



HAL
open science

Œil collyres et conservateurs. Le chlorure de benzalkonium : conséquences et alternatives de conservation des collyres à usage domestique

Marc Darie

► To cite this version:

Marc Darie. Œil collyres et conservateurs. Le chlorure de benzalkonium : conséquences et alternatives de conservation des collyres à usage domestique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02990510

HAL Id: dumas-02990510

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02990510>

Submitted on 5 Nov 2020

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°1

THESE POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le jeudi 16 juillet 2020

Par **DARIE Marc**

Né le 15/06/1987 à Agen

ŒIL, COLLYRES ET CONSERVATEURS
Le Chlorure de Benzalkonium :
Conséquences et alternatives de conservation des collyres à
usage domestique

Sous la direction de : Gaëlle VACHER

Membres du Jury :

Mme AULOIS-GRIOT Marine

Mme VACHER Gaëlle

Mr DUBRAC Gérard

Professeur

Maître de Conférence

Docteur en Pharmacie

Président

Directeur

Juge

« Mieux vaut tarder que n'arriver jamais... »
Denys d'Halicarnasse

REMERCIEMENTS

A Madame Gaëlle VACHER,
Maître de Conférences en Technologies Pharmaceutiques à l'Université de Bordeaux.

Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse, pour votre regard très juste sur ce travail et pour m'avoir permis de mettre de l'ordre et clarifier mes idées.

A Madame Marine AULOIS-GRIOT,
Professeur de Droit et Économie Pharmaceutiques à l'Université de Bordeaux.

Merci d'avoir été présente et pour toute l'aide apportée depuis que j'ai quitté la faculté, il y a maintenant plusieurs années.

Je vous remercie également de me faire l'honneur de présider ce jury.

A Monsieur Gérard DUBRAC,
Docteur en Pharmacie, ancien député du Gers et maire de Condom.

Ami de la famille depuis de nombreuses années, je suis très heureux de ta présence parmi les membres de mon jury.

A Monsieur Stéphane FREGEVILLE,
Docteur en Pharmacie, Pharmacie Porte du Pin à Agen

Merci d'avoir accepté mon passage temporaire à mi-temps pour me permettre de rédiger cette thèse.

A mes parents,

Merci pour votre soutien indéfectible et votre amour malgré mes égarements.
Merci à mon père, le Dr Michel DARIE, d'avoir été présent tout au long de la rédaction pour m'aider à mieux comprendre et organiser ce travail.

Tu dois souvent endosser le difficile rôle d'avocat du diable, et même si on a du mal à le reconnaître au début, tu as raison.

Merci à ma mère, la meilleure et la plus forte qu'il soit.

Tu es et tu resteras la femme la plus importante dans ma vie.

A mes grand-mères, mes sœurs et mon frère,

La famille est un pilier fondamental et la nôtre est bien belle.

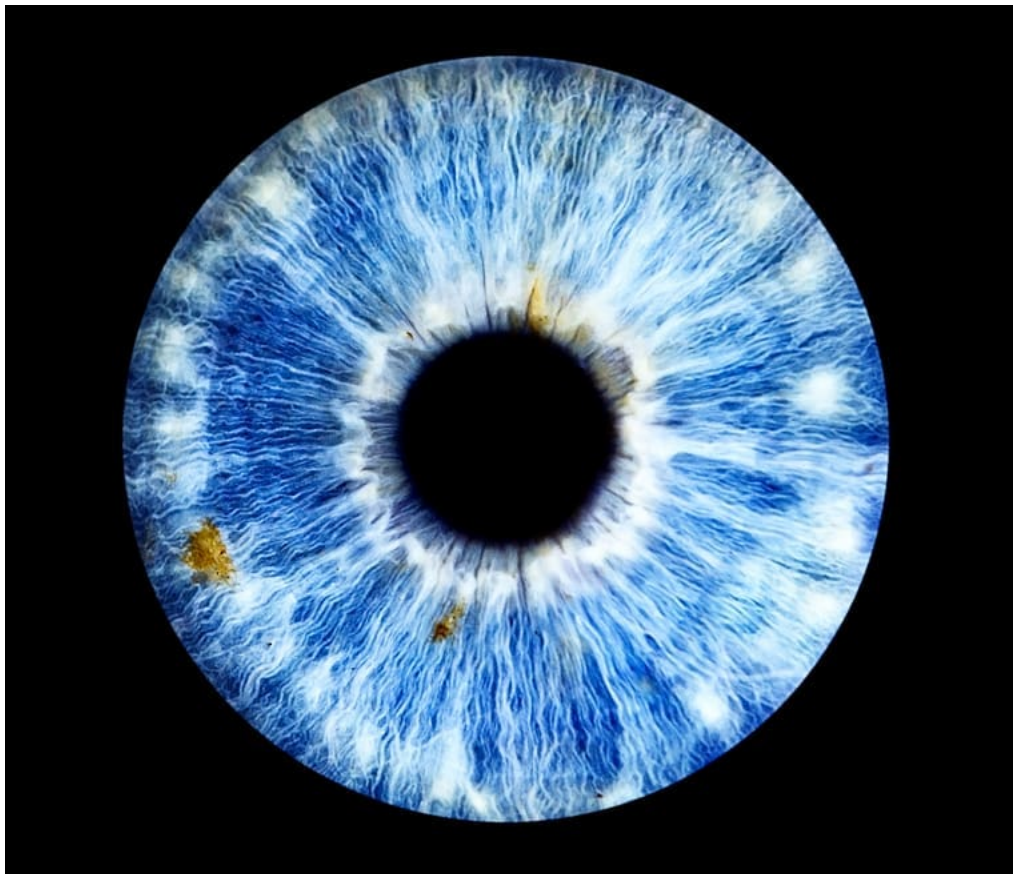
Nous sommes unis et indivisibles, je souhaite qu'il en soit toujours ainsi.

Je vous aime.

A tous mes amis,

Merci pour votre soutien et votre présence.

ŒIL, COLLYRES ET CONSERVATEURS
Le Chlorure de Benzalkonium :
Conséquences et alternatives de conservation des collyres à usage
domestique



Source image «Irisfoto®»

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ABREVIATIONS	5
TABLE DES FIGURES	6
TABLE DES TABLEAUX.....	9
INTRODUCTION GENERALE.....	10
Chapitre I : RAPPELS ANATOMIQUES ET PHARMACOCINETIQUE DE LA VOIE OPHTALMIQUE.....	11
<u>1. RAPPELS ANATOMIQUES.....</u>	<u>12</u>
1.1. LES TROIS COUCHES DE LA PAROI.....	13
1.1.1. LA TUNIQUE FIBREUSE.....	13
1.1.1.1. La sclérotique ou sclère.....	13
1.1.1.2. La cornée.....	14
1.1.2. LA TUNIQUE VASCULAIRE	17
1.1.2.1. L'iris.....	18
1.1.2.2. Le corps ciliaire	20
1.1.2.3. La choroïde.....	25
1.1.3. LA TUNIQUE NERVEUSE.....	26
1.2. LES MILIEUX TRANSPARENTS DE L'ŒIL	30
1.2.1. LE VITRE	30
1.2.2. LE CRISTALLIN.....	30
1.2.3. L'HUMEUR AQUEUSE.....	31
1.2.3.1. Rôle et composition.....	31
1.2.3.2. Mécanismes de sécrétion de l'humeur aqueuse.....	32
1.2.3.3. Mécanisme d'écoulement de l'humeur aqueuse.....	36
1.2.3.4. Mécanismes d'excrétion de l'humeur aqueuse	37
2. PHARMACOCINETIQUE DE LA VOIE OPHTALMIQUE	38
2.1. L'ABSORPTION.....	38
2.2. LA DISTRIBUTION.....	39
2.3. LE METABOLISME.....	40
2.4. L'ELIMINATION	40
3. CONCLUSION.....	41
Chapitre II : COLLYRES ET CONSERVATEURS.....	42
<u>1. DEFINITIONS PRINCIPALES.....</u>	<u>43</u>
<u>2. PROPRIETES ET COMPOSITION DES COLLYRES.....</u>	<u>43</u>
2.1. PROPRIETES D'UN COLLYRE	43
2.1.1. NEUTRALITE.....	43
2.1.2. PRESSION OSMOTIQUE	44
2.1.3. STERILITE	44
2.1.4. TAILLE DES PARTICULES	45
2.1.5. VISCOSITE.....	45
2.1.6. VOLUME INSTILLE	45
2.2. COMPOSITION D'UN COLLYRE.....	45
2.2.1. PRINCIPE ACTIF	45
2.2.2. EXCIPIENTS.....	46
2.2.2.1. Le véhicule	46
2.2.2.2. Isotonisants	47
2.2.2.3. Tampons	47
2.2.2.4. Conservateurs	48
2.2.2.5. Tensio-actifs	48
2.2.2.6. Agents viscosifiants	48

3.	<u>LES CONSERVATEURS DANS LES COLLYRES.....</u>	48
3.1.	GENERALITES SUR LES CONSERVATEURS.....	48
3.2.	LES CATEGORIES, LES MODES D’ACTIONS ET LES CONSERVATEURS CLASSIQUES	51
3.2.1.	LES CATEGORIES ET METHODES DE CLASSIFICATION DES CONSERVATEURS	51
3.2.1.1.	Définitions.....	51
3.2.1.2.	Détermination de la CMI/CMB	52
3.2.1.2.1.	<i>Méthodes en milieu gélosé.....</i>	53
3.2.1.2.2.	<i>Méthodes en milieu liquide.....</i>	54
3.2.1.2.2.1.	<i>Macrométhode.....</i>	54
3.2.1.2.2.2.	<i>Microméthode</i>	55
3.2.1.3.	Le test d’efficacité de la conservation microbienne	56
3.2.2.	LES MODES D’ACTIONS DES CONSERVATEURS	58
3.2.3.	LES CONSERVATEURS CLASSIQUES DES COLLYRES.....	58
3.2.3.1.	Les ammoniums quaternaires	58
3.2.3.2.	Les dérivés organomercurels	61
3.2.3.3.	Les amidines	63
3.2.3.4.	Les alcools.....	67
3.3.	LES METHODES DE DETECTION DE LA TOXICITE D’UN CONSERVATEUR POUR L’OEIL	70
3.3.1.	LES TESTS SUR LES ANIMAUX.....	70
3.3.2.	LA MESURE DE LA PERMEABILITE CORNEENNE.....	71
3.3.3.	LES ANALYSES MORPHOLOGIQUES.....	71
3.3.3.1.	La microscopie spéculaire	71
3.3.3.2.	La microscopie électronique en transmission	72
3.3.3.3.	La microscopie électronique à balayage.....	73
3.3.4.	LES MESURES ELECTROPHYSIOLOGIQUES	73
4.	<u>CONCLUSION.....</u>	74
Chapitre III : LE CHLORURE DE BENZALKONIUM ET ALTERNATIVES..... 75		
1.	<u>CARACTERISTIQUES GENERALES DU BAC.....</u>	76
1.1.	PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU BAC	77
1.2.	PHARMACOCINETIQUE DU BAC.....	77
1.3.	TOXICITE DU BAC	78
2.	<u>PROPRIETES ET MECANISMES D’ACTION DU BAC</u>	79
3.	<u>UTILISATION DU BAC HORS OPHTALMOLOGIE : CONSEQUENCES ET TOXICITE.....</u>	80
3.1.	UTILISATION COMME CONSERVATEUR DANS LES DECONGESTIONNANTS TOPIQUES.....	80
3.2.	UTILISATION POUR SES PROPRIETES SPERMICIDES.....	82
3.3.	L’UTILISATION DU BAC DANS L’INDUSTRIE : UN PROBLEME DE SANTE PUBLIQUE ?.....	82
3.3.1.	UN RISQUE DE RESISTANCES CROISEES	82
3.3.1.1.	La résistance intrinsèque	82
3.3.1.2.	La résistance acquise.....	83
3.3.1.3.	La sélection de super-bactéries	83
3.3.1.4.	Exemple de résistance au BAC.....	84
3.3.2.	L’IMPACT SUR L’ENVIRONNEMENT.....	84
3.3.2.1.	La toxicité inhérente.....	85
3.3.2.2.	La bioaccumulation.....	85
3.3.2.3.	La persistance	85
3.4.	UTILISATION DANS LES COSMETIQUES.....	86
4.	<u>CONSEQUENCES DU BAC EN OPHTALMOLOGIE</u>	86
4.1.	LES REACTIONS ALLERGIQUES	86
4.2.	LES MECANISMES RESPONSABLES DE LA TOXICITE DU BAC	87

4.2.1.	PERTURBATION DE LA MEMBRANE CELLULAIRE PAR EFFET DETERGENT.....	87
4.2.2.	MORT CELLULAIRE PAR NECROSE OU APOPTOSE.....	88
4.2.3.	MORT CELLULAIRE DUE AU STRESS OXYDANT.....	89
4.2.4.	POTENTIALISATION D'UNE REACTION D'INFLAMMATION.....	90
4.3.	LES STRUCTURES OCULAIRES TOUCHEES.....	90
4.3.1.	ATTEINTE DES STRUCTURES OCULAIRES SUPERFICIELLES.....	90
4.3.1.1.	Altération du film lacrymal.....	91
4.3.1.2.	Altération de la conjonctive.....	92
4.3.1.3.	Altération de la cornée.....	93
4.3.2.	ATTEINTE DES STRUCTURES OCULAIRES PROFONDES.....	96
4.3.2.1.	Altération du trabéculum.....	96
4.3.2.2.	Altération du cristallin.....	96
4.3.2.3.	Altération de la rétine.....	97
5.	<u>ALTERNATIVES A L'UTILISATION DU BAC.....</u>	100
5.1.	LES UNIDOSES.....	100
5.2.	LES SYSTEMES MULTIDOSES SANS CONSERVATEUR.....	102
5.2.1.	LE SYSTEME AVEC FILTRE : ABAK®.....	102
5.2.2.	LE SYSTEME A VALVE : COMOD®.....	104
5.3.	LES SYSTEMES DE CONSERVATION ALTERNATIFS AUX CONSERVATEURS CLASSIQUES.....	105
5.3.1.	LE SYSTEME PYLOTE®.....	105
5.3.2.	LE SYSTEME POLYQUAD®.....	106
5.3.3.	LES COMPLEXES OXYDANTS.....	107
5.3.3.1.	Le système GenAqua®.....	107
5.3.3.2.	Le système SOFZIA®.....	108
5.3.3.3.	Le système PURITE®.....	108
6.	<u>CONCLUSION.....</u>	109
	CONCLUSION GENERALE.....	110
	ANNEXE 1.....	112
	ANNEXE 2.....	114
	ANNEXE 3.....	116
	BIBLIOGRAPHIE.....	118

TABLE DES ABREVIATIONS

ADN = acide désoxyribonucléique
ADP = adénosine diphosphate
ANSM = agence nationale de sécurité du médicament
ATP = adénosine triphosphate
BAC = chlorure de benzalkonium ou benzalkonium chloride
BISED = barbados incidence study of eye diseases
BPF = bonnes pratiques de fabrication
BPU = bonnes pratiques d'utilisation
CMB = concentration minimal bactéricide
CMI = concentration minimal inhibitrice
DMLA = dégénérescence maculaire liée à l'âge
EC50 = concentration efficace 50
EDTA = acide éthylènediaminetétraacétique
EMGT = early manifest glaucoma treatment study
EOG = électro-oculogramme
ERG = électrorétinogramme
FBC = facteur de bioconcentration
FDA = food and drug agency
H = hydrogène
Hg = mercure
IGF = insulin like growth factor
IL = interleukine
IUPAC = international union pure and applied chemistry
JAM = molécules jonctionnelles d'adhésion
LC 50 = dose létale 50
MDR = multi drug resistant
N = azote
Na = sodium
O = oxygène
OHTS = ocular hypertension treatment study
OMC = œdème maculaire cystoïde
PAO = période après ouverture
PGE = prostaglandine
pH = potentiel hydrogène
SEM = microscope électronique à balayage
TEM = microscope électronique à transmission
UV = ultra-violets
VEGF = vascular endothelial growth factor

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Tuniques, milieux transparents et segments topographiques de l'œil.....	12
Figure 2 : Conjonctives.....	14
Figure 3 : Les cinq couches de la cornée.....	15
Figure 4 : Changement de densité endothéliale en fonction de l'âge.....	17
Figure 5 : Changement de densité endothéliale chez deux individus du même âge sans et après port de lentille de contact	17
Figure 6 : Tunique vasculaire	17
Figure 7 : Fermeture et ouverture de l'iris.....	18
Figure 8 : Muscles iriens.....	18
Figure 9 : Face postérieure d'un corps ciliaire de lapin.....	20
Figure 10 : Le corps ciliaire.....	21
Figure 11 : Épithélium ciliaire	22
Figure 12 : Les jonctions cellulaires	23
Figure 13 : Tunique nerveuse	26
Figure 14 : Dessin de rétine grand angle.....	27
Figure 15 : Fond d'œil de la périphérie proche de la rétine.....	27
Figure 16 : Les 10 couches de la rétine.....	29
Figure 17 : Structure du cristallin adulte.....	31
Figure 18 : Passages transmembranaires de la barrière hémato-oculaire ..	33
Figure 19 : Mécanisme d'écoulement de l'humeur aqueuse.....	36
Figure 20 : Mécanisme d'excrétion de l'humeur aqueuse	37

Figure 21 : Administration d'un collyre	38
Figure 22 : Cyclodextrines, principe actif et complexe d'inclusion	47
Figure 23 : Les méthodes en milieu gélosé	53
Figure 24 : Macrométhode en milieu liquide	54
Figure 25 : Microméthode en milieu liquide	56
Figure 26 : Réaction de quaternisation d'une amine	58
Figure 27 : Ammoniac et Amines	59
Figure 28 : Impressions mercurielles de l'œil	62
Figure 29 : Structures Amide et Amidine	63
Figure 30 : Guanidine, Guanide et Diguanide	64
Figure 31 : Structure chimique de la chlorhexidine	64
Figure 32 : Kératite amibienne et néo-vascularisation cornéenne	66
Figure 33 : Synthèse du Chlorobutanol	67
Figure 34 : Synthèse du Phényléthanol	68
Figure 35 : Test de la Fluorescéine	71
Figure 36 : Microscopie Spéculaire, TEM et SEM	73
Figure 37 : Desquamation de l'épithélium induite par le BAC chez le lapin	88
Figure 38 : Le film lacrymal	91
Figure 39 : Symblépharon et diminution du cul de sac conjonctival	93
Figure 40 : Œdème maculaire cystoïde, métamorphopsie et scotome	98
Figure 41 : Processus de fabrication « Blow-Fill-Seal »	102

Figure 42 : Les différentes générations des flacons ABAK®	104
Figure 43 : Le flacon COMOD®	105
Figure 44 : Le système POLYQUAD® ou polyquaternium-1.....	107

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères d'acceptation de l'essai d'efficacité de la conservation antimicrobienne pour les préparations ophtalmiques	57
Tableau 2 : Les ammoniums quaternaires utilisés dans les collyres	60
Tableau 3 : Dérivés Organomercuriels	61
Tableau 4 : Alcools utilisés comme conservateurs dans les collyres	67
Tableau 5 : Récapitulatif des conservateurs ancienne génération.....	70
Tableau 6 : Médicaments de la voie nasale contenant ou non du BAC	81
Tableau 7 : Expression du marqueur Apo2.7 en fonction de la concentration en BAC.....	89
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des effets du BAC sur les structures superficielles et profondes de l'œil	100

INTRODUCTION GENERALE

L'œil est un organe capital de notre corps et pas seulement car il nous permet de visualiser et d'appréhender le monde extérieur.

Malheureusement, on oublie que trop souvent à quel point celui-ci est fragile et surtout irremplaçable.

Malgré l'avancée de la science et de la médecine, il faut être conscient que l'œil, au même titre que le cerveau avec qui il est en lien direct, fait partie des organes majeurs du corps humain que nous sommes encore incapables de greffer tant ses connexions sont complexes.

Il est donc primordial d'en prendre soin tout au long de sa vie.

L'objet de cette thèse est donc là : les collyres, dont la fonction première est de soigner et protéger l'œil, n'ont-ils pas des effets secondaires pervers et cachés dus à des excipients inattendus comme les conservateurs ?

Les industriels connaissent l'importance et la nécessité de concevoir, pour cet organe extrêmement fragile et sensible, des produits d'une très grande qualité et surtout exempts de toute contamination par des micro-organismes. Par une action, a priori, louable et une bonne intention qu'est l'utilisation de conservateurs, les laboratoires pharmaceutiques n'ont-ils pas justement provoqué des effets délétères non désirés ?

Nous évoquerons donc dans un premier temps un rappel sur les structures anatomiques de base de l'œil, nécessaires à la compréhension.

Par la suite, nous parlerons des collyres en eux-mêmes, de leurs caractéristiques ainsi que des conservateurs classiquement utilisés pour les protéger.

Finalement, nous parlerons plus en détail du conservateur n°1 dans le monde : le chlorure de benzalkonium. Nous verrons ses caractéristiques, ses qualités mais également les conséquences, pas toujours positives, de sa très vaste utilisation.

Enfin, nous développerons certaines alternatives possibles afin de réduire au maximum les impacts collatéraux engendrés par les conservateurs et revenir à l'idée première des collyres : soigner et protéger.

***Chapitre I : RAPPELS ANATOMIQUES ET
PHARMACOCINETIQUE DE LA VOIE OPHTALMIQUE***

1. RAPPELS ANATOMIQUES ⁽¹⁾

Nous allons décrire les principales structures anatomiques de l'œil nécessaires à la compréhension de la suite de cette thèse en commençant par les différents tissus structurels puis les milieux qui le compose.

Comme le montre la figure 1, le globe oculaire est formé des éléments suivants :

- Une paroi composée de trois couches appelées tuniques qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur :
 - Une tunique fibreuse = la sclérotique ou sclère en arrière qui protège l'œil et lui donne sa forme, se prolongeant par la cornée transparente en avant qui laisse entrer la lumière.
 - Une tunique vasculaire = le tissu uvéal ou uvée
 - Une tunique nerveuse = la rétine
- Trois milieux transparents, qui sont de l'arrière vers l'avant de l'œil :
 - Le vitré
 - Le cristallin
 - L'humeur aqueuse, répartie entre la chambre postérieure et la chambre antérieure séparées par l'iris.

Deux segments topographiques de part et d'autre du cristallin sont à mettre en évidence :

- Un segment antérieur en avant du cristallin : lui-même compartimenté en une chambre antérieure (entre cornée et iris) et une chambre postérieure (entre iris et cristallin).
- Un segment postérieur en arrière du cristallin.

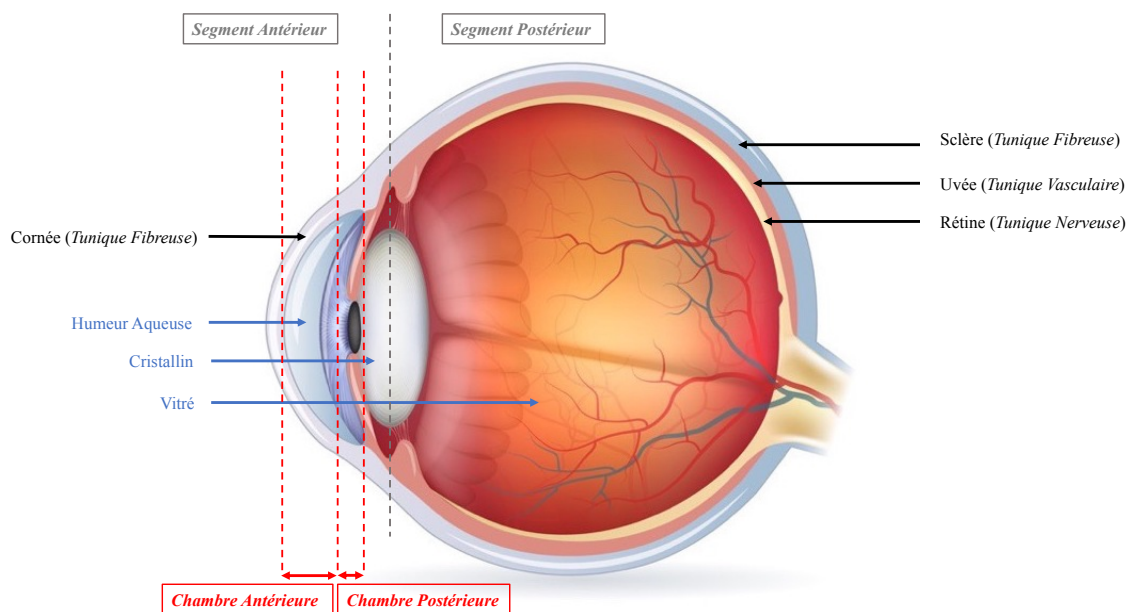


Figure 1 : Tuniques, milieux transparents et segments topographiques de l'œil ⁽²⁾

1.1. LES TROIS COUCHES DE LA PAROI

1.1.1. LA TUNIQUE FIBREUSE

1.1.1.1. La sclérotique ou sclère ^(3,4)

Il s'agit de la tunique la plus externe du globe oculaire formée principalement de fibres de collagène.

Elle est inextensible et quasiment acellulaire.

On peut toutefois noter la présence de quelques fibrocytes mais en quantité insuffisante pour permettre une cicatrisation en cas de plaies.

La sclère entoure les 4/5^{ème} postérieurs du globe et son rôle est de protéger et maintenir la forme de l'œil.

Dans sa partie antérieure, la sclère est recouverte par une membrane muqueuse translucide extrêmement vascularisée appelée conjonctive.

Cette conjonctive est divisée en deux parties (voir figure 2) :

- La conjonctive palpébrale qui tapisse la face postérieure de la paupière
- La conjonctive bulbaire qui recouvre la partie saillante du globe oculaire jusqu'au début de la cornée.

Une structure anatomique d'importance à mettre en évidence est le cul de sac conjonctival ou fornix qui correspond à la jonction entre la conjonctive palpébral et la conjonctive bulbaire.

Cette muqueuse permet ainsi d'isoler la partie interne du globe oculaire du milieu extérieur en formant une barrière protectrice.

La conjonctive est également à l'origine de la production du film lacrymal et permet une réponse immunitaire notamment inflammatoire en cas d'infection ou de réaction allergique : il s'agit de la conjonctivite.

Pour se protéger face à une agression, l'œil peut réagir de différentes façons :

- Via une protection mécanique avec une augmentation de la sécrétion lacrymale en présence d'un corps étranger
- Via un phénomène inflammatoire avec l'intervention de cellules polynucléaires et la phagocytose du corps étranger
- Via une protection immunologique avec la production d'enzymes bactériostatiques ou bactériolytiques à la surface de la conjonctive.

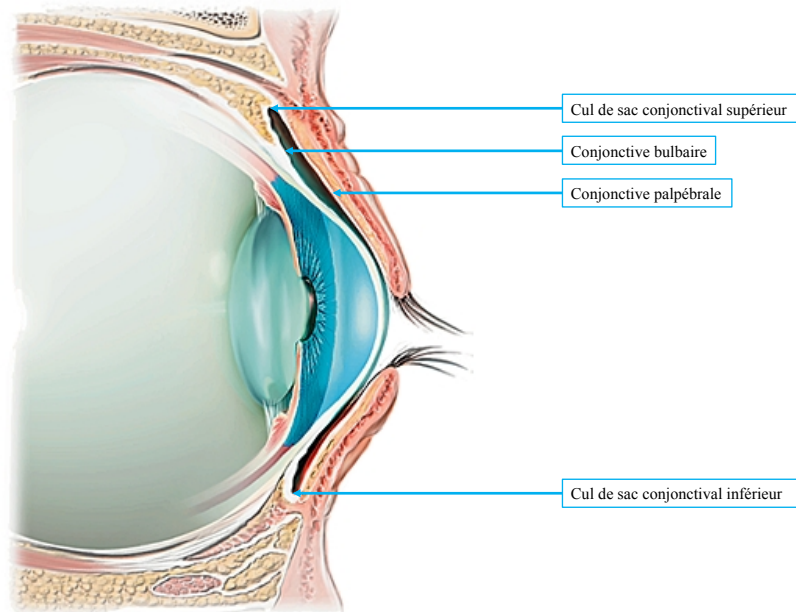


Figure 2 : Conjonctives (5)

1.1.1.2. La cornée

La cornée se situe dans la prolongation antérieure de la sclère. Elle possède une fonction de réfraction et de transmission de la lumière et agit comme premier dioptré du système optique.

Cette surface doit nécessairement être d'une transparence absolue et parfaitement lisse pour permettre l'obtention d'une image nette. Les larmes formant un film y jouent donc un rôle fondamental.

Sa face antérieure est convexe et elliptique. Elle est recouverte par le film lacrymal et est en contact avec l'air ambiant ou avec les paupières lors de la fermeture de l'œil.

Sa face postérieure, directement en contact avec l'humeur aqueuse, est concave et constitue la limite extérieure de la chambre antérieure.

Sa circonférence est en rapport avec la sclère et les voies de drainage de l'humeur aqueuse.

La cornée est l'une des zones les plus sensibles de l'organisme, elle est très fortement innervée mais n'est pas vascularisée.

Elle est formée de 5 couches parallèles entre elles qui sont de l'extérieur vers l'intérieur (voir figure 3) :

- L'épithélium cornéen, composé de plusieurs couches cellulaires, directement en contact avec le film lacrymal. C'est par son intermédiaire que la cornée puise son oxygène dans l'air ambiant.
- La membrane de Bowman, couche acellulaire formée de fibres de collagène.

- Le stroma cornéen (ou tissu cornéen), couche la plus épaisse de la cornée composée de fibrocytes et de fibres de collagène parallèles.
- La membrane de Descemet, couche amorphe, élastique et acellulaire.
- L'endothélium cornéen, composé d'une couche de cellules plates de forme hexagonale. Il est directement en contact avec l'humeur aqueuse de la chambre antérieure et va permettre l'apport de nutriment via la filtration de l'humeur aqueuse.

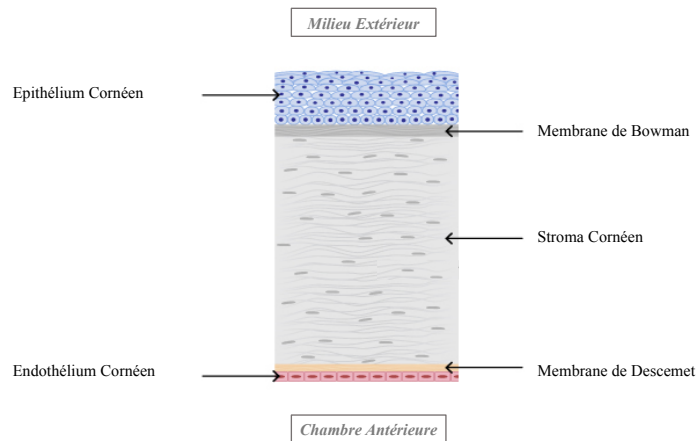


Figure 3 : Les cinq couches de la cornée (6)

La cornée ne possède aucune sensibilité thermique mais simplement une innervation douloureuse.

Au niveau biochimique, la cornée est composée de 6 éléments :

- Eau à 80%
- Protéines : principalement du collagène (70% du poids sec) sur lequel se fixe des mucopolysaccharides neutres
- Protéoglycanes qui interviennent dans l'hydratation cornéenne et comblent les espaces entre les protéines de collagène.
- Enzymes, notamment de dégradation du glucose au niveau de l'endothélium et de l'épithélium.
- Ions : sodium et potassium
- Glucose et métabolites, principalement au niveau de l'épithélium.

La transparence cornéenne est potentialisée par :

- L'organisation régulière, uniforme et parallèle des fibres de collagène
- Les protéoglycanes qui maintiennent un espace interfibrillaire fixe
- L'absence de vascularisation
- La pauvreté cellulaire du stroma
- L'hydratation avec près de 80% d'eau. Elle est paradoxalement maintenue en déshydratation comparativement au film lacrymal qui

possède une osmolarité hypertonique et agit comme une pompe en collaboration avec l'endothélium.

- La pression oculaire.

Nous pouvons mettre en évidence plusieurs voies de nutrition pour la cornée :

- Via la vascularisation limbique pour la partie la plus périphérique de la cornée.
- Par voie trans-épithéliale pour le passage de l'oxygène depuis le milieu extérieur.
- Par voie trans-endothéliale en interne depuis l'humeur aqueuse.

Cette dernière voie fait appel à différents mécanismes :

- Un mécanisme passif par simple diffusion au travers de l'endothélium pour les molécules de faible poids moléculaire ou par la solubilité de phase pour les gaz
- Un mécanisme actif pour les molécules de plus haut poids moléculaire par passage combiné à l'eau. C'est par ce mécanisme que transitent depuis l'humeur aqueuse, les sources d'énergie telles que le glucose et le glycogène ou les acides aminés et protéines, nécessaires à la croissance et au renouvellement cellulaire.

Cette croissance et ce renouvellement cellulaire des 3 principales couches de la cornée se font de différentes façons :

- Pour l'épithélium, le cycle de renouvellement complet est de 7 jours. Il se fait par division, migration cellulaire et desquamation des cellules superficielles dans les larmes.
- Pour le stroma, le cycle de renouvellement est plus lent. Dans un premier temps, il y a destruction des tissus lésés par des phagocytes ou par un mécanisme enzymatique faisant intervenir des collagénases, suivi dans un second temps par une synthèse de collagène par les fibroblastes.
- Pour l'endothélium, le stock post-natal de cellules hexagonales est définitif. L'absence de renouvellement cellulaire entraîne donc une diminution progressive de leur nombre. La cicatrisation tissulaire se fait par un mécanisme appelé coalescence entraînant, au fil du temps, une diminution de densité endothéliale et une augmentation de la variabilité de tailles et de formes des cellules (voir figure 4).
De plus, pour deux individus du même âge, d'autres facteurs peuvent provoquer un changement endothélial comme le port prolongé de lentilles de contact sur plusieurs années (voir figure 5).

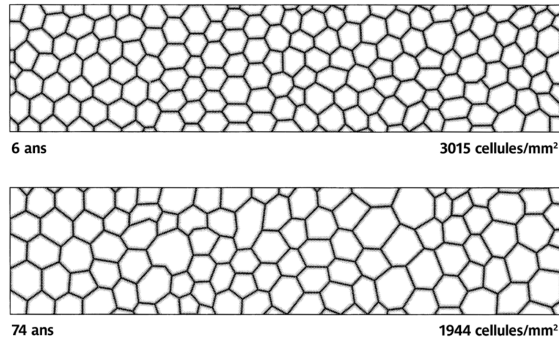


Figure 4 : Changement de densité endothéliale en fonction de l'âge ⁽¹⁾

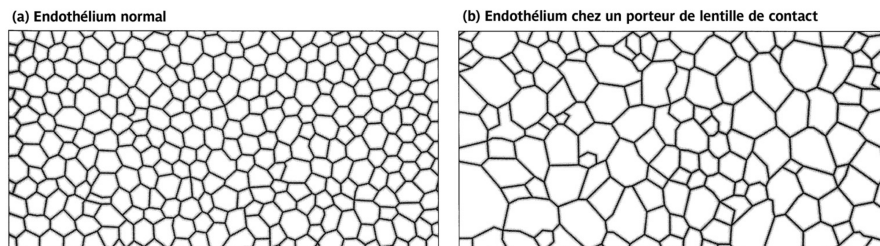


Figure 5 : Changement de densité endothéliale chez deux individus du même âge sans et après port de lentille de contact ⁽¹⁾

1.1.2. LA TUNIQUE VASCULAIRE

Cette tunique aussi appelée tissu uvéal ou uvée (voir figure 6) est formée par la choroïde dans la partie arrière du globe et l'iris dans la partie antérieure. Ces deux tissus sont reliés par le corps ciliaire. L'uvée est une tunique vasculaire qui joue un rôle nourricier pour l'œil.

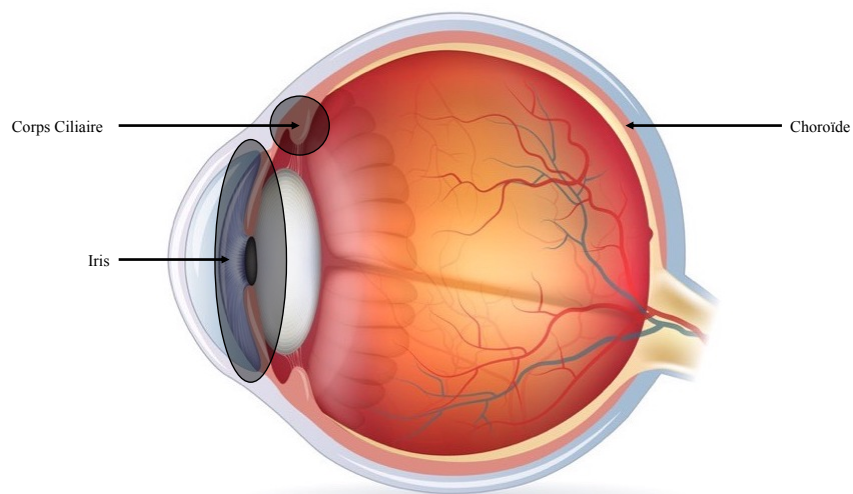


Figure 6 : Tunique vasculaire ⁽²⁾

1.1.2.1. L'iris

L'iris est une membrane en forme de disque perforée en son centre. Cet orifice circulaire, la pupille, agit comme un diaphragme à ouverture variable et automatique en fonction de l'accommodation et de l'intensité lumineuse du milieu extérieur (voir figure 7).

L'iris possède deux types de fibres musculaires lisses (voir figure 8) :

- Le sphincter, circulaire, autour de la pupille, permettant la fermeture dans un milieu lumineux
- Le dilatateur de Grynfelt, dans l'iris, composé de fibres plus minces, radiales permettant l'ouverture, dans un milieu sombre

Pour ce qui est de l'innervation, elle est due au trijumeau, au nerf oculaire commun et au sympathique :

- La constriction se fait grâce au nerf moteur oculaire commun (nerf III)
- La dilatation est sous la dépendance du sympathique
- L'innervation sensitive se fait via le nerf VI

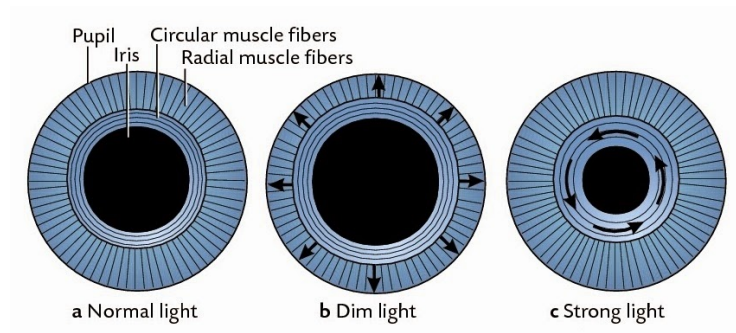


Figure 7 : Fermeture et ouverture de l'iris ⁽⁷⁾

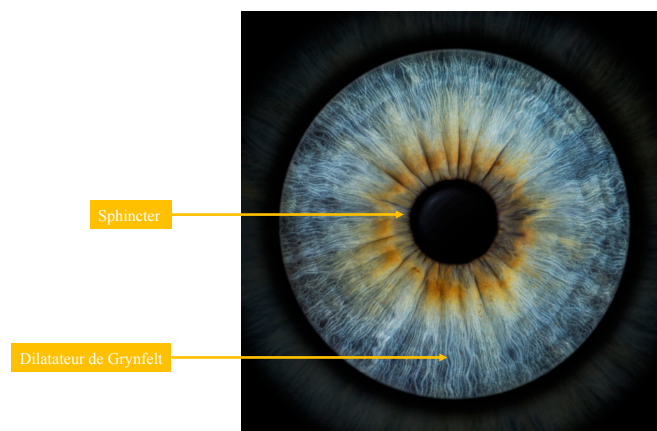


Figure 8 : Muscles iriens ⁽⁸⁾

L'iris possède une face postérieure, de couleur brune, uniforme et présentant des plis.

La face antérieure de l'iris est variablement pigmentée. Elle est composée d'une matrice de collagène dans laquelle s'enchevêtrent deux types de cellules : les fibroblastes qui fabriquent ce collagène et les mélanocytes qui sont des cellules pigmentées conférant sa couleur à l'iris et donc à l'œil.

Pour rappel, la coloration d'un objet est à définir comme une sensation colorée dépendante des longueurs d'ondes qui la composent et captées par l'œil de la personne qui l'observe.

Cette composition va varier en fonction de la lumière que l'objet émet ou réfléchit. ⁽⁹⁾

La lumière solaire étant composée de l'ensemble des longueurs d'onde du spectre visible, elle apparaît blanche. Par ailleurs, un objet perçu comme vert absorbe en fait tous les rayons du spectre de la lumière naturelle sauf le vert qui est réfléchi et capté par l'œil de l'observateur. Par extension, un objet rouge réfléchit le rouge, un objet noir absorbe la totalité des rayons du spectre lumineux et un objet blanc les réfléchit intégralement.

D'autre part, la composition de la lumière qui éclaire un objet va avoir une influence, ce qui explique la variation de couleur de nos yeux en fonction de la lumière environnante.

Dans le cas d'une exposition à la lumière naturelle, les facteurs influençant la couleur de l'iris sont les suivants :

- La densité et la structure organisationnelle des fibres de collagène composant la trame de la face antérieure de l'iris.
- La densité de cellules pigmentées (mélanocytes) ainsi que la densité de pigments qu'elles contiennent.

Ainsi, plus un œil contient un nombre important de mélanocytes, plus ceux-ci absorbent les rayons lumineux et plus l'œil apparaît sombre (marron voir noir). Un phénomène comparable pouvant être donné en exemple est le brunissement de la peau lors d'une exposition aux rayons UV résultant de la production croissante de mélanine par les cellules de la peau.

Dans le cas des yeux bleus, il s'agit au contraire d'une absence totale de mélanocytes dans la face antérieure de l'iris. La lumière est donc peu absorbée et c'est sa réflexion et diffraction au travers des structures transparentes de l'œil qui expliquent cette couleur bleue.

En effet, le bleu est la longueur d'onde la plus courte et donc la plus facilement diffusée du spectre visible. C'est par ce même phénomène que le ciel nous apparaît bleu. ⁽⁹⁾

Il est intéressant de noter que les collyres contenant des dérivés de prostaglandines utilisés dans le traitement du glaucome comme le latanoprost par exemple provoquent une pigmentation définitive des yeux bleus en vert voire marron. Une autre classe de collyre sera donc préférablement utilisée pour éviter ce phénomène. ⁽⁹⁾

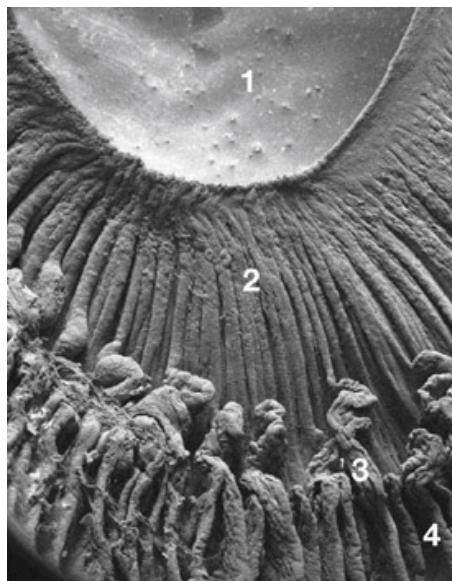
1.1.2.2. Le corps ciliaire

C'est un épaississement du tissu uvéal en arrière de l'iris, formant un anneau (voir figure 9).

En coupe, il a une forme triangulaire (voir figure 10).

Le corps ciliaire et l'iris partagent la même origine embryologique.

Il est en charge de la sécrétion de l'humeur aqueuse via les procès ciliaires (décrits ultérieurement) sur sa face postérieure et joue un rôle essentiel dans l'accommodation puisque l'iris et le cristallin s'insèrent sur lui.



- 1 = Pupille
- 2 = Face postérieure de l'iris
- 3 = Procès ciliaire
- 4 = Pars plicata

Figure 9 : Face postérieure d'un corps ciliaire de lapin
(microscopie électronique à balayage $\times 28$) ⁽¹⁰⁾

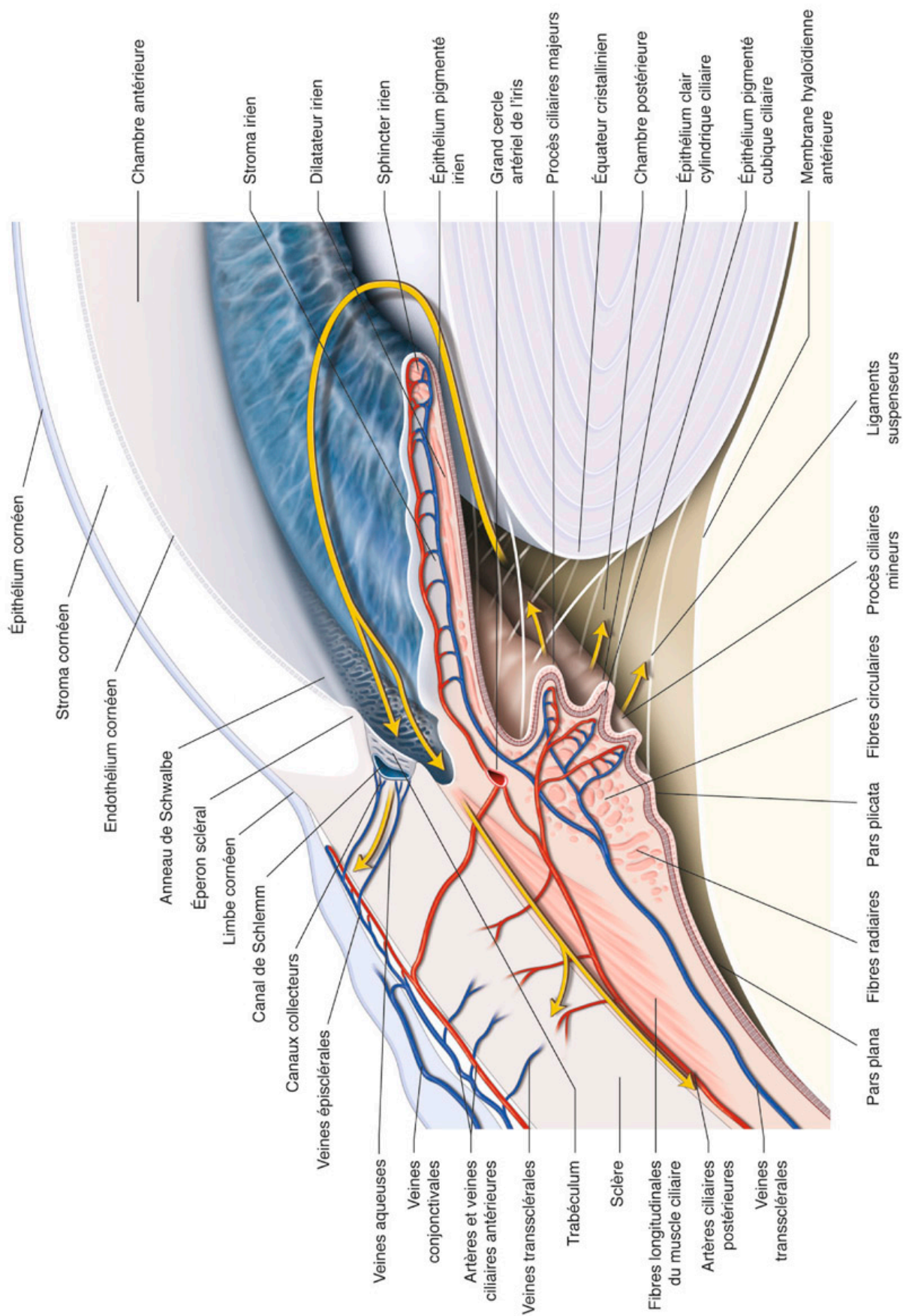


Figure 10 : Le corps ciliaire ⁽¹⁰⁾

Procès ciliaires :

Ils sont au nombre de 60 à 80 chez l'Homme, chacun centré sur une artériole issue du grand cercle artériel de l'iris et se divisant en plusieurs capillaires fenêtrés.

Ces structures conjonctivo-vasculaires sont recouvertes par un épithélium bistratifié appelé épithélium ciliaire.

Comme nous le montre la figure 11, on distingue de l'extérieur vers l'intérieur de l'œil :

- La limitante externe : formée par la membrane basale, elle est en contact direct avec le stroma (tissu conjonctif de remplissage lui-même en contact direct avec les capillaires fenêtrés).
- La couche de cellules pigmentées : cellules cubiques
- La couche de cellules claires : cellules non pigmentées, cylindriques, à noyaux ovale et dont le cytoplasme contient de nombreux organites en rapport avec la fonction sécrétante de l'épithélium ciliaire (humeur aqueuse)
- La limitante interne composée de glycoprotéines comme le collagène et de laminine sépare l'épithélium ciliaire de la chambre postérieure.

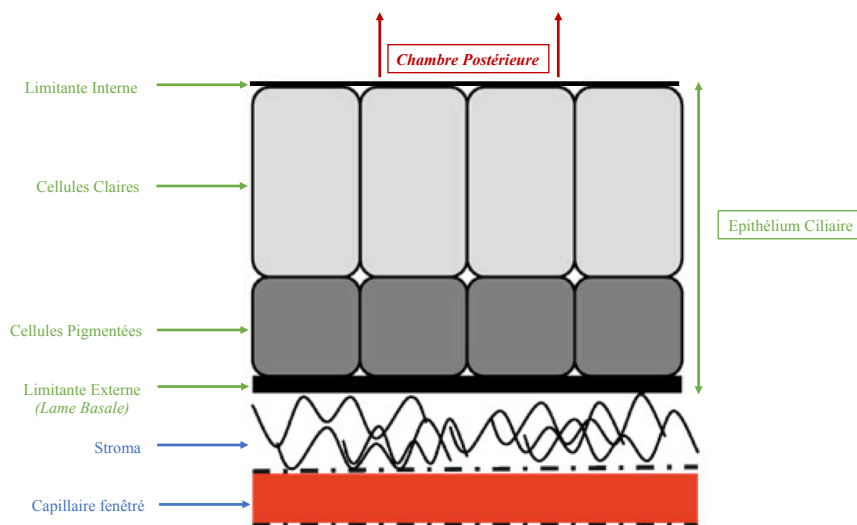
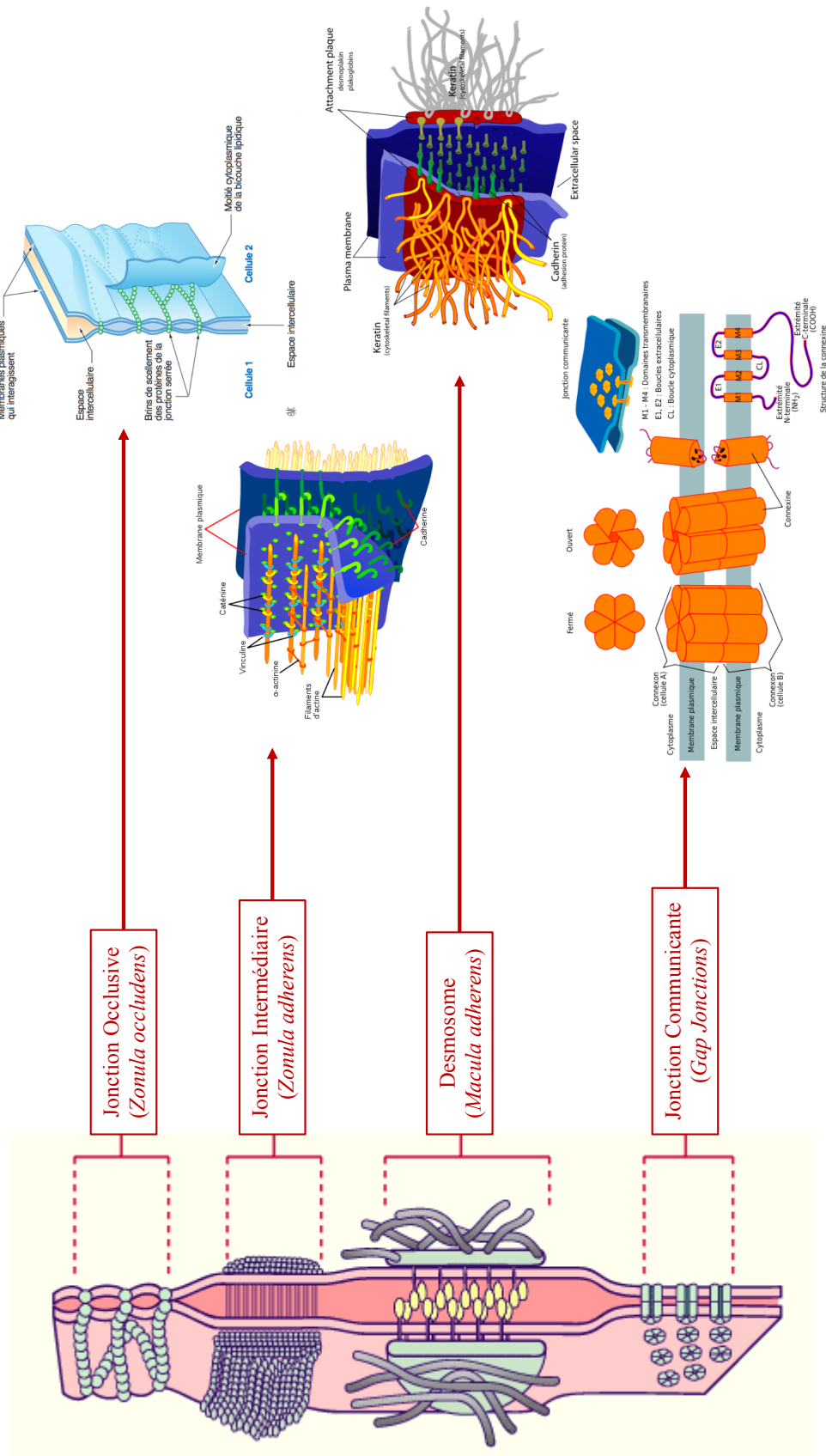


Figure 11 : Épithélium ciliaire (10)

Les cellules disposées les unes à côté des autres sont en contact par leurs membranes cellulaires.

Des jonctions cellulaires permettent de maintenir un ensemble cohérent en unissant des cellules entre elles, en permettant la communication, ou encore l'adhérence des cellules à la lame basale (figure 12).

Il existe trois types de jonctions cellulaires : (11,12)



Jonction Occlusive
(Zonula occludens)

Jonction Intermédiaire
(Zonula adherens)

Desmosome
(Macula adherens)

Jonction Communicante
(Gap Junctions)

Figure 12 : Les jonctions cellulaires (11-13)

- Les jonctions occlusives ou serrées aussi appelées *Zonulae Occludens*. Il s'agit d'une soudure des deux membranes cellulaires adjacentes dont résulte la disparition de l'espace inter cellulaire. Ce scellement créé des occlusions qui empêchent tout passage de molécules même les plus petites.
Elles sont présentes seulement entre les cellules non pigmentées, au pôle apical, formant un complexe étanche.
Les jonctions serrées sont la composante essentielle des barrières tissulaires. Elles sont formées par de protéines d'adhérence transmembranaires organisées en réseau ramifié de brins de scellement. Les jonctions serrées sont composées de protéines comme les occludines, les claudines et les molécules jonctionnelles d'adhésion (JAM).
Ces molécules sont en relation avec des protéines membranaires situées dans le cytoplasme en périphérie directe des jonctions serrées, appelées protéines ZO qui permettent l'ancrage au cytosquelette (actine).
- Les jonctions intermédiaires appelées *Zonulae Adherens* permettent d'attacher les cellules à leurs voisines via leur cytosquelette.
Elles laissent cependant un espace intercellulaire plus important que les jonctions serrées.
Elles sont composées de cadhérines et de nectines qui s'encrent sur une plaque dense située dans le cytoplasme.
La fixation des cadhérines et des nectines au cytosquelette et donc aux microfilaments d'actine, se fait grâce :
 - aux caténines pour les jonction actines/cadhérines
 - à l'afadine et la ponsine pour les jonctions actine/nectines
- Les desmosomes et hémidesmosomes sont des zones d'ancrage des filaments intermédiaires sous la forme de tâche, d'où le terme de *Macula Adherens*.
Les desmosomes créent des jonctions intercellulaires alors que les hémidesmosomes permettent les jonctions entre cellules et lame basale.
La plaque dense située dans le cytoplasme est de forme arrondie et permet la fixation des filaments intermédiaires de cytokératine.
Les desmosomes et hémidesmosomes sont responsables du maintien de la cohésion cellulaire via le réseau de filaments intermédiaires de cytokératine entre les plaques.
- Les jonctions communicantes ou *Gap Junction* qui comme leur nom l'indique laissent passer des molécules ou des signaux entre cellules

voisines. On retrouve ce type de jonctions entre les cellules pigmentées, entre les cellules non pigmentées et entre les cellules pigmentées et non pigmentées.

Elles sont composées de plusieurs centaines de canaux bidirectionnels. Chaque canal est un connexon formé de 6 sous-unités appelées connexines, elles même formées par 4 segments transmembranaires.

En plus de ces jonctions intercellulaires, des microvillosités sont présentes sur les membranes plasmiques apicales des deux couches cellulaires, augmentant ainsi la surface de contact et la cohésion cellulaire.

L'ensemble de ces structures aboutissent à la formation d'une structure anatomique cohérente : l'épithélium ciliaire.

Une autre structure anatomique d'importance est à mettre en évidence : la barrière hémato-aqueuse, sous-structure anatomique qui en association avec la barrière hémato-rétinienne forme les barrières hémato-oculaires.

Les barrières hémato-oculaires séparent le système circulatoire du reste du tissu oculaire. Elles garantissent ainsi le maintien de la transparence cornéenne et du cristallin, la régulation de la pression intraoculaire et l'homéostasie de la rétine.

La barrière hémato-aqueuse peut être mise en évidence sur deux sites :

- au niveau du corps ciliaire, principalement représentée par l'épithélium ciliaire
- au niveau de l'iris, principalement représenté par l'endothélium des capillaires

Le site qui nous intéresse ici est celui du corps ciliaire. En effet, à ce niveau, la présence des capillaires fenêtrés permet un échange relativement simple et rapide entre le sang et le stroma et ne constitue pas la barrière.

Celle-ci est donc formée par les couches de cellules pigmentaires en externe et claires en interne, reposant sur la membrane basale.

L'ensemble forme une structure anatomique cohérente grâce à la présence des jonctions cellulaires, décrites précédemment.

La présence de cette barrière hémato-oculaire joue un rôle important dans la régulation de la production d'humeur aqueuse qui sera décrite plus tard.

1.1.2.3. La choroïde

Elle forme les 2/3 postérieurs du tissu uvéal en s'étendant du corps ciliaire au nerf optique.

La choroïde est une membrane intermédiaire entre la rétine et la sclère dont elle peut se décoller.

Elle est formée de cellules pigmentées, d'éléments vasculaires et nerveux et elle fournit les nutriments à l'œil.

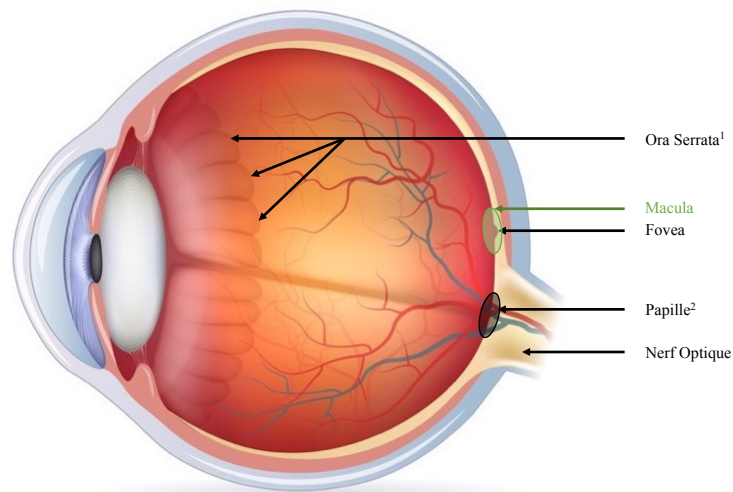
Cette membrane, qui empêche la lumière de se diffuser dans l'œil, est un lieu de cheminement pour les artères ciliaires, les veines vortiqueuses et les nerfs ciliaires.

1.1.3. LA TUNIQUE NERVEUSE

Aussi appelée rétine, cette tunique sensorielle est constituée d'un ensemble de fibres nerveuses qui se regroupent pour former le nerf optique.

Membrane la plus interne du globe oculaire, la rétine s'étend de la papille à l'ora serrata (voir figure 13).

Elle est en charge de la transformation de la lumière en signal nerveux, ainsi que de sa transmission au système nerveux central.



1 = l'Ora Serrata est une ligne blanche festonnée composée de dents correspondant à la partie la plus externe de la Rétine. Elle est aussi appelée Extrême Périphérie Rétinienne.
2 = la Papille est la portion intra-oculaire du nerf optique où convergent les axones non myélinisés des cellules ganglionnaires de la rétine. C'est le point de départ de la voie optique et le carrefour d'épanouissement des vaisseaux rétiniens.

Figure 13 : Tunique nerveuse (2)

La rétine se divise en deux grandes zones :

- La rétine centrale qui contient en son centre la fovea au centre de laquelle on trouve la fovéola.

On distingue également une zone elliptique avasculaire formant une dépression autour de cette fovéola, appelée macula. La présence de pigments xanthophylles donnent à cette zone un aspect jaunâtre.

- La rétine périphérique divisée en 4 avec de la partie centrale vers l'extérieur, successivement : La périphérie proche, la périphérie moyenne, la périphérie éloignée et l'extrême périphérie (ora serrata)

Il faut donc visualiser la rétine comme une superposition de cercles ayant pour centre commun la fovéola et pour pourtour, l'ora serrata.

La figure 14 nous montre d'un point de vue théorique via un dessin cette superposition de cercles.

La figure 15 est un véritable fond d'œil sur lequel sont clairement visibles la papille, la rétine centrale, la macula et la fovea.

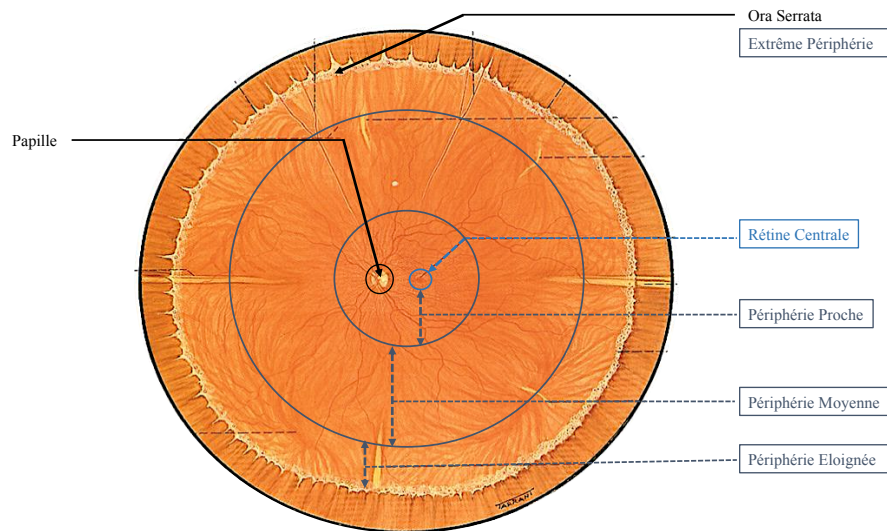


Figure 14 : Dessin de rétine grand angle (14)

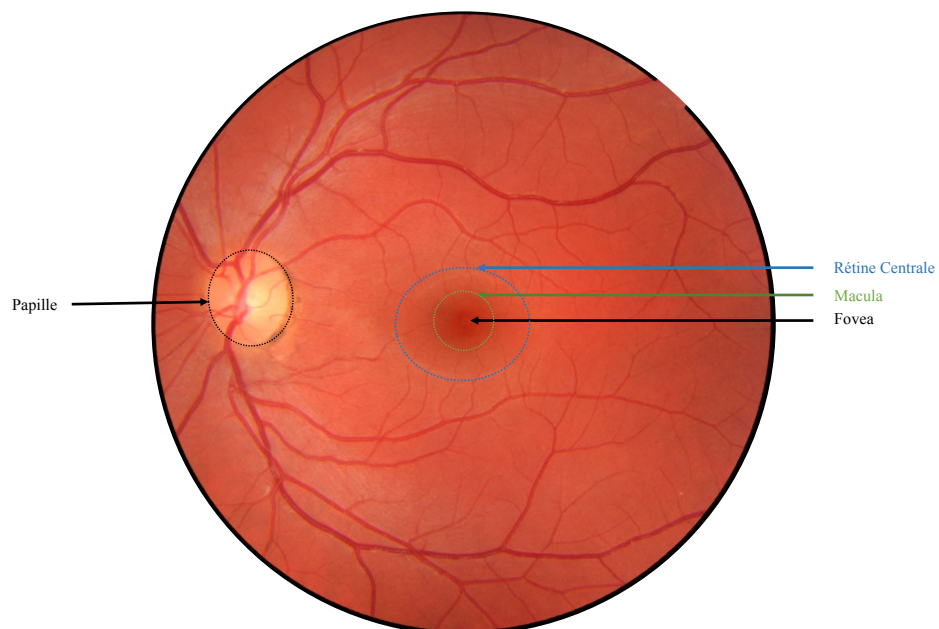


Figure 15 : Fond d'œil de la périphérie proche de la rétine (15)

D'un point de vue histologique, la rétine est composée de 10 couches cellulaires qui sont de la périphérie vers le centre de l'œil (voir figure 16) :

- L'épithélium pigmentaire : son nom est dû à la présence de grains de mélanine. Il joue le rôle d'écran, stock la vitamine A, intervient dans la phagocytose et les échanges de nutriments et d'oxygène, et permet ainsi la régénération des photorécepteurs.
- La couche des photorécepteurs : composée des cônes et bâtonnets qui sont des récepteurs sensibles aux influx lumineux. Les cônes sont globalement plus nombreux que les bâtonnets avec un rapport d'environ 1 pour 15 mais leur répartition est très inégale dans la rétine. Dans la fovéola seuls les cônes sont présents contrairement au reste du tissu rétinien où les bâtonnets sont majoritaires.
- La membrane limitante externe : fine lame perforée par les extrémités des photorécepteurs, jouant plus le rôle d'une zone d'adhérence que de véritable membrane.
- La couche nucléaire externe : couche contenant les expansions des cellules photoréceptrices.
- La couche pléxiforme externe : lieu de jonction entre les deux systèmes de vascularisation de la rétine (interne et externe). Elle contient les synapses entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires.
- **La couche nucléaire interne** : couche contenant les corps cellulaires de plusieurs cellules et notamment les cellules bipolaires qui forment un relais pour permettre le passage de l'influx nerveux des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires.
- **La couche pléxiforme interne** : couche contenant un enchevêtrement d'axones et de dendrites provenant des cellules ganglionnaires.
- **La couche des cellules ganglionnaires** : couche contenant les corps cellulaires des cellules ganglionnaires. Ces cellules ganglionnaires sont des neurones à proprement parlé.
- **La couche des fibres optiques** : couche contenant les axones des cellules ganglionnaires axés horizontalement et parallèles, formant ainsi une couche.
- La membrane limitante interne : Il s'agit cette fois-ci d'une véritable membrane correspondant à l'élément le plus interne de la rétine en contact avec le vitré.

NB = Couches absentes au niveau de la fovéola

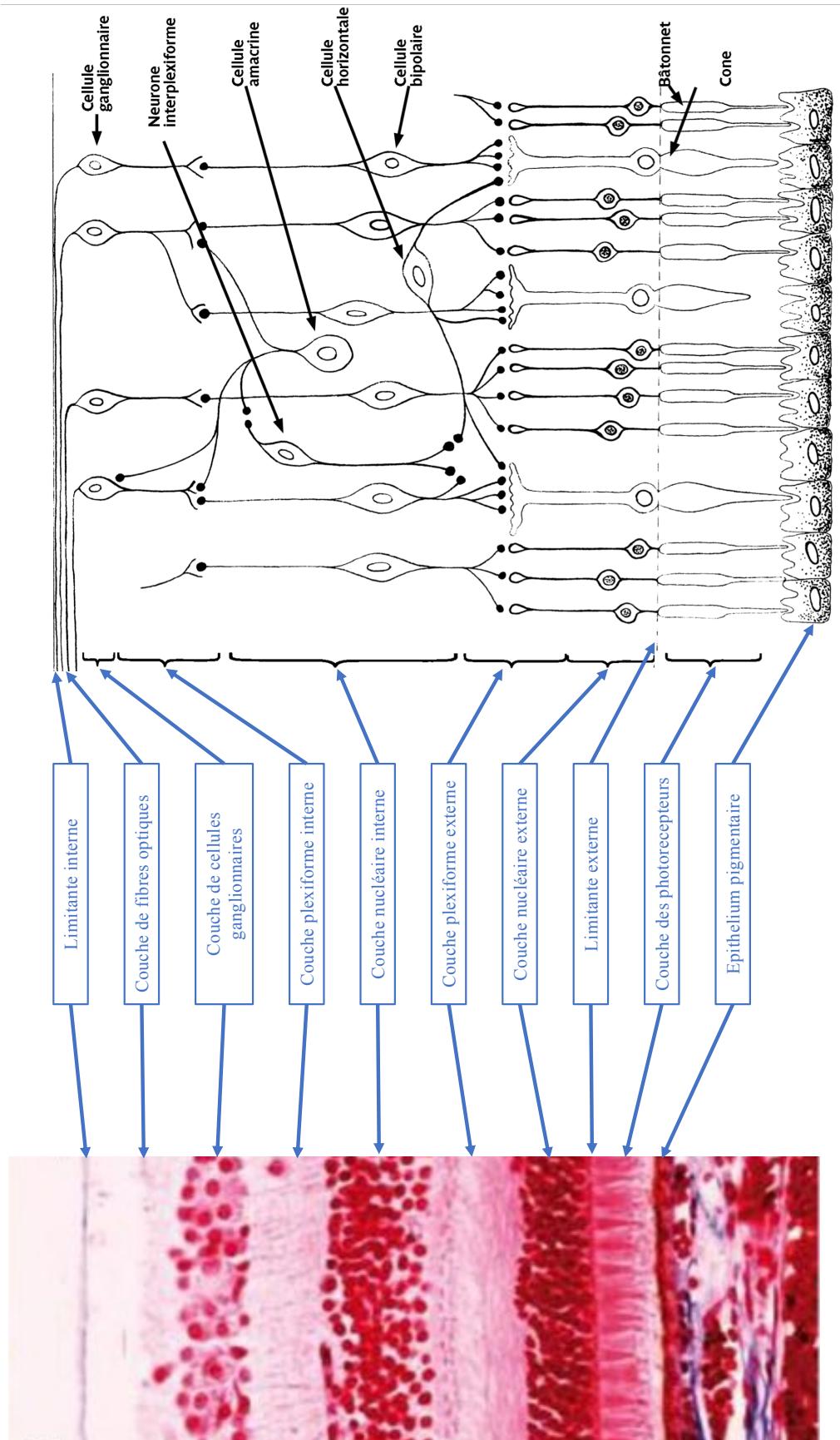


Figure 16 : Les 10 couches de la rétine (1,16)

1.2. LES MILIEUX TRANSPARENTS DE L'ŒIL

En plus de la cornée, qui est le premier élément transparent facilement observable de l'œil, on peut distinguer 3 autres milieux transparents internes de la sphère oculaire :

- En arrière, le vitré
- Au centre, le cristallin
- En avant, l'humeur aqueuse

1.2.1. LE VITRE

C'est le milieu transparent le plus important en volume.

Il possède un rôle de tamponnement et d'échanges avec les structures environnantes que sont la rétine, la choroïde, le corps ciliaire et le cristallin.

Il s'agit d'un gel dont l'hydratation et donc la viscosité varie en fonction de la partie observée : il est gélifié en son centre et fibreux en périphérie.

Il s'insère sur la rétine et, de ce fait, toute traction sur les fibres vitréennes peut la décoller voir la déchirer.

1.2.2. LE CRISTALLIN

Il s'agit d'une lentille biconvexe, aplatie en avant, suspendue dans l'œil par le ligament suspenseur la reliant aux corps ciliaires.

Le cristallin est la seule structure réfractrice dynamique de l'œil globalement composée de trois parties allant du centre vers la périphérie : le noyau, le cortex et la capsule (voir figure 17).

Le noyau est une structure évolutive, pouvant être subdivisée en plusieurs parties. La plus centrale appelée noyau embryonnaire qui ressemble à un grain de café, se forme *in utero* dans les trois premiers mois de gestation. Elle est ensuite recouverte par le noyau fœtal qui se développe jusqu'à la naissance puis par le noyau adulte qui prend le relais *post-natal*.

Le cortex, qui lui se forme après l'âge de 10 ans, est composé d'une série de couches concentriques de fibres cristalliniennes centrées sur le noyau à la manière de pelures d'oignon.

Enfin, la capsule est composée de collagène bordé par une simple couche de cellules épithéliales.

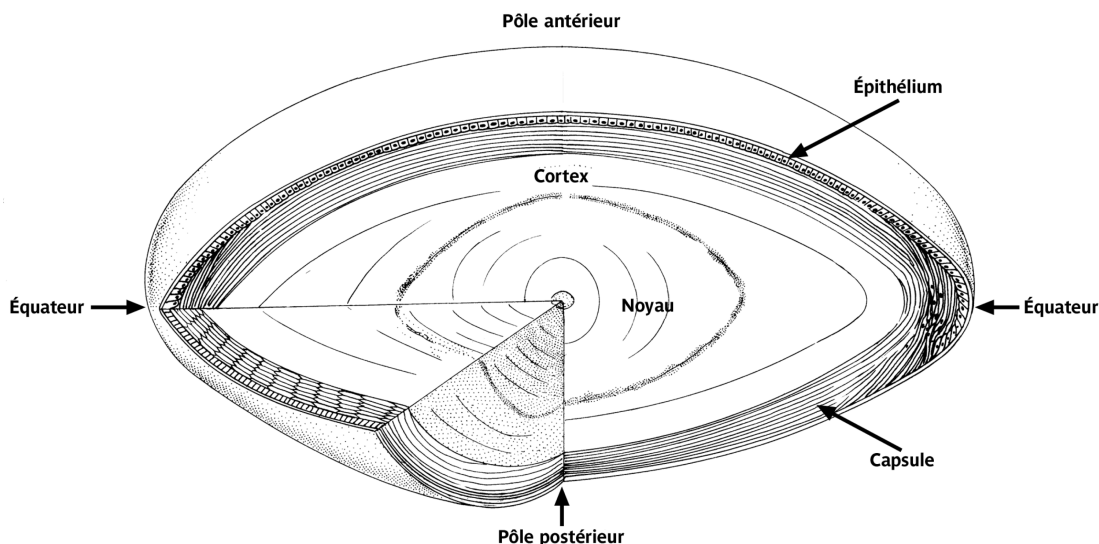


Figure 17 : Structure du cristallin adulte (1)

Le cristallin est une structure transparente, totalement dépourvue de vascularisation, d'innervation et dont la nutrition est assurée par l'humeur aqueuse.

Avec l'âge, le cristallin peut subir plusieurs variations de propriétés. La plus connue est la modification qualitative et quantitative de la transmission lumineuse résultant de l'opacification du noyau et du cortex aboutissant à la cataracte.

Dans le cadre de la presbytie, il s'agit d'une perte presque complète de l'élasticité du cristallin, qui survient aux environs de 60 ans, aboutissant à une puissance accommodative proche de zéro perturbant ainsi la vision rapprochée.

1.2.3. L'HUMEUR AQUEUSE

1.2.3.1. Rôle et composition

Située entre le cristallin et la cornée, il s'agit d'un liquide nourricier limpide comme de l'eau.

Il est sécrété par les procès ciliaires et éliminé au niveau de l'angle iridocornéen, de façon continue.

La pression oculaire est le résultat d'un équilibre entre le contenant et le contenu de l'œil. L'humeur aqueuse étant la seule structure potentiellement variable, la pression intra oculaire est intimement liée à la régulation des phénomènes de sécrétion et excrétion de ce liquide pour maintenir une pression oculaire normale.

On peut donc observer trois étapes dans « la vie » de l'humeur aqueuse : la sécrétion, la circulation dans la chambre antérieure et l'excrétion.

L'humeur aqueuse est composée à 99% d'eau.

On y trouve également des ions, un faible taux de protéines et des substances non électrolytiques telles que du glucose, des acides aminés ou de l'acide hyaluronique.

Les compositions chimiques de l'humeur aqueuse et du plasma sont les suivantes : ⁽¹⁰⁾

- Sodium (mmol/L) : 153 (plasma : 143)
- Bicarbonate (mmol/L) : 19,6 (plasma : 25)
- Chlorure (mmol/L) : 134 (plasma : 106)
- Glucose (mmol/L) : 3,7 -4,8 (plasma : 4,7-6,5)
- Protéines (mmol/L) : 0,3-1,7 (Plasma : 65-80)
- **Ascorbate (mmol/L) : 1,06 (Plasma : 0,04)**

Si on compare la composition de l'humeur aqueuse à celle du plasma, elle est hypertonique, acide, très riche en acide ascorbique et en ion chlore.

L'acide ascorbique est présent en forte concentration dans l'humeur aqueuse des yeux de nombreuses espèces.

Il a été observé que les mammifères diurnes avaient un taux de concentration 35 fois plus élevé d'acide ascorbique que les mammifères nocturnes. ⁽¹⁷⁾

Ce taux élevé d'acide ascorbique dans l'humeur aqueuse aurait un effet protecteur contre les dommages induits pas les UV sur l'ADN des cellules épithéliales et protégerait l'œil des mammifères diurnes contre les effets cataractogènes de ces rayons. ⁽¹⁸⁾

L'existence de la barrière hémato-oculaire explique la différence de composition entre le plasma et l'humeur aqueuse.

Cette barrière laisse passer :

- des grosses molécules au niveau des capillaires fenêtrés du stroma
- des molécules de plus petite taille (urée)
- des molécules liposolubles et des ions
- de l'eau.

1.2.3.2. Mécanismes de sécrétion de l'humeur aqueuse

L'humeur aqueuse est sécrétée dans la chambre postérieure par l'épithélium ciliaire qui recouvre les procès ciliaires, disposés de façon circulaire en arrière de l'iris.

En effet, au niveau microscopique, cette partie du corps ciliaire comporte de nombreux éléments concordant avec son caractère sécrétant : un nombre de mitochondries important dans les cellules claires, de nombreuses jonctions communicantes entre les cellules claires et les cellules pigmentées et des fenestrations de l'endothélium capillaire.

Comme nous avons pu le voir précédemment, la présence de capillaires fenêtrés permet un passage simple et rapide du sang vers le stroma, mais par la suite le passage des différents éléments dans la chambre postérieure et donc la production de l'humeur aqueuse et sous la dépendance des différentes forces osmotiques et hydrostatiques présentes de part et d'autre de la double couche cellulaire formant la barrière hémato-aqueuse.

Le passage des molécules se fait donc via les trois mécanismes classiques que sont la diffusion simple, la diffusion facilitée ou la sécrétion active (voir figure 18) et un dernier transport particulier mais mineur appelé ultrafiltration.

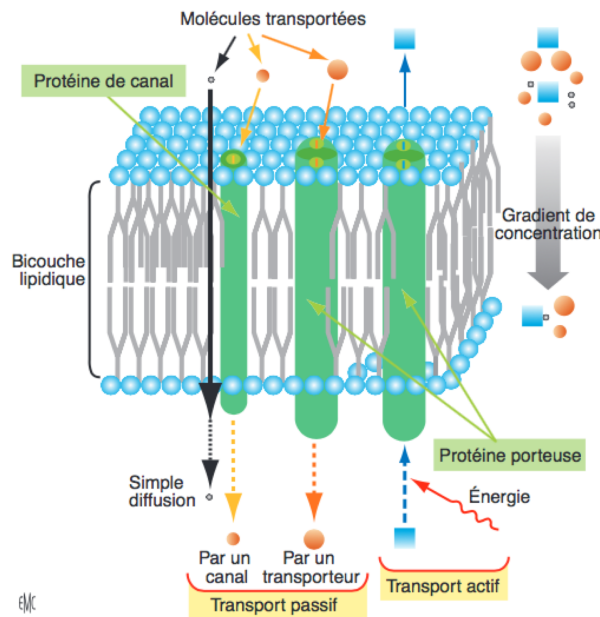


Figure 18 : Passages transmembranaires de la barrière hémato-oculaire (11)

- **La Diffusion Simple :**

Elle est sous la simple dépendance du gradient de concentration et ne nécessite pas d'énergie.

Ce mécanisme est également appelé diffusion passive car elle correspond à un libre passage des molécules au travers de la membrane lipidique du milieu le plus concentré vers le moins concentré jusqu'à l'équilibre de celles-ci.

Les molécules concernées sont donc des molécules liposolubles qui doivent se dissoudre dans la bicouche phospholipidique avant de passer de l'autre

côté ou des molécules hydrosolubles de taille suffisamment petite pour pouvoir diffuser malgré leur polarité.

Il s'agit d'un mécanisme relativement lent comparativement aux deux suivants. La vitesse de diffusion est dépendante de la différence de concentration entre les deux milieux, de la taille de la molécule et de la température.

La diffusion simple n'étant pas un mécanisme régulé, il n'est donc pas spécifique.

- **La Diffusion Facilitée :**

Le principe de fonctionnement de base est le même que pour la diffusion simple : la diffusion facilitée se fait selon le gradient de concentration sans consommation d'énergie et fait donc partie des transports dit passifs.

L'élément différenciant est la fixation transitoire sur l'élément à transporter d'une protéine appelée transporteur membranaire lors de son passage au travers de la bicouche phospholipidique, créant une sorte de canal.

Ce mécanisme est donc plus rapide que la diffusion simple mais saturable.

La vitesse de diffusion au travers de la membrane augmente donc de façon équivalente au gradient de concentration jusqu'à saturation des transporteurs membranaires et stabilisation de la vitesse de diffusion.

Les protéines canal pouvant se fermer, il s'agit d'un transport régulé.

Les principales substances utilisant ce type de transport dans l'œil sont le glucose, la plupart des acides aminés et l'acide ascorbique.

- **La Sécrétion Active :**

Contrairement aux deux mécanismes de diffusion précédents, la sécrétion active s'effectue contre le gradient de concentration et implique donc l'utilisation d'énergie.

Cette énergie peut être fournie via l'utilisation de co-transport, dans ce cas, c'est le gradient de concentration d'un autre élément qui fournit l'énergie nécessaire au passage de l'élément désiré contre son gradient de concentration.

L'autre source d'énergie potentielle est l'hydrolyse de l'ATP en ADP, avec la pompe NaK ATPase.

La sécrétion active est le mécanisme majeur de la production d'humeur aqueuse puisqu'il participe à hauteur de 80-85% de sa sécrétion notamment au travers de la création d'un gradient de concentration de l'ion sodium (ion Na⁺, voir ANNEXE 1 pour le tableau périodique)

Le sodium va diffuser librement au travers des capillaires fenêtrés vers le stroma, puis par simple diffusion, va passer au travers de la lame basale vers les cellules pigmentées.

L'ion Na^+ va ensuite passer des cellules pigmentées vers les cellules claires via un échange Na^+/H^+ régulé par l'anhydrase carbonique.

Enfin, le passage des cellules claires vers la chambre postérieure est un passage actif sous le contrôle de la NaK ATPase.

Le gradient de concentration d'ion Na^+ ainsi créé aboutit à une hyperosmolarité dans la chambre postérieure de laquelle résulte un passage de l'eau du plasma des capillaires fenêtrés vers la chambre postérieure.

Pour rappel, ce phénomène nommé appel osmotique de l'eau est une diffusion simple des molécules d'eau au travers de la membrane semi-perméable, du milieu le moins concentré en ions vers le milieu le plus concentré.

L'humeur aqueuse est composée à 99 % d'eau. La sécrétion de l'ion Na^+ dans la chambre postérieure, et donc la création d'un gradient de concentration, est le phénomène clé directement responsable de la majeure partie de la production d'humeur aqueuse.

- **L'Ultrafiltration :**

Ce mécanisme très particulier est un phénomène de filtrage au travers de la barrière hémato-aqueuse et donc de séparation des molécules contenues dans le liquide plasmatique en fonction de leur poids moléculaire.

L'ultrafiltration se produit au travers de deux filtres : au niveau des capillaires ciliaires au travers de l'endothélium fenêtré et au niveau de l'épithélium ciliaire.

La barrière hémato-aqueuse (épithélium ciliaire) peut, en effet, être considérée comme un filtre constitué par une couche cellulaire continue unie par des jonctions serrées (cellules claires et pigmentées) reposant sur une lame basale possédant des pores d'un diamètre de l'ordre de 10 à 20 nm.

Ceci explique donc la faible concentration de protéine dans l'humeur aqueuse puisque qu'il s'agit de macromolécules de gros poids moléculaire.

Cette dialyse est un phénomène mineur responsable de seulement 10 à 15 % de la production d'humeur aqueuse.

L'ultrafiltration est sous la dépendance du gradient de pression existant de part et d'autre du filtre et fournissant la force nécessaire au passage des molécules au travers de celui-ci, selon la loi de Starling :

$$F = C \times (\mathbf{Phc} - \mathbf{Pht}) + (\mathbf{Posmt} - \mathbf{Posmc})$$

F = Flux d'Humeur Aqueuse

C = Constante

Phc = pression hydrostatique capillaire

Pht = pression hydrostatique tissulaire

Posmt = pression osmotique tissulaire

Posmc = pression osmotique capillaire

1.2.3.3. Mécanisme d'écoulement de l'humeur aqueuse

Nous avons vu précédemment que l'humeur aqueuse est sécrétée dans la chambre postérieure.

Après l'avoir remplie, elle passe ensuite en avant de l'iris vers la chambre antérieure au travers de la pupille.

Il existe une légère différence de température entre l'humeur aqueuse déjà présente dans la chambre antérieure et celle nouvellement produite.

L'iris étant richement vascularisé, sa température est de l'ordre de 36°C alors que la cornée présente une température de 30°C car elle est en contact avec le milieu extérieur. ⁽¹⁹⁾

L'humeur aqueuse déjà présente a été en contact avec la cornée et est donc légèrement plus froide, ce qui entraîne la nouvelle humeur aqueuse, plus chaude, vers le haut le long de l'iris lors de son arrivée dans la chambre antérieure.

Celle-ci va ensuite redescendre le long de la face postérieure de la cornée.

Il s'agit donc d'un mouvement de convection lié au gradient de température :

- Température plus basse vers la cornée = mouvement descendant
- Température plus élevée vers l'iris = mouvement ascendant

L'humeur aqueuse quitte ensuite l'œil, il s'agit de l'excrétion.

Ce mécanisme d'écoulement de l'humeur aqueuse est représenté dans la figure 19.

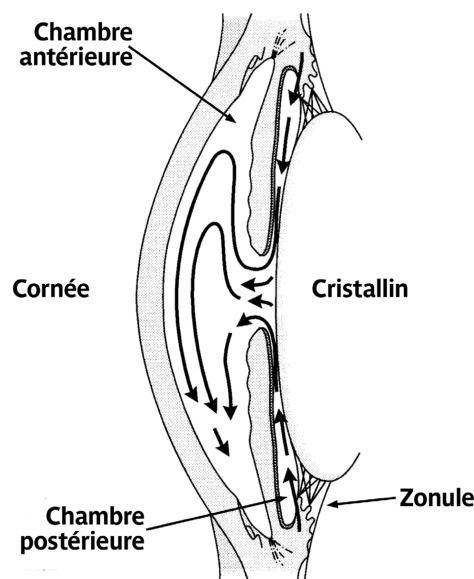


Figure 19 : Mécanisme d'écoulement de l'humeur aqueuse ⁽¹⁾

1.2.3.4. Mécanismes d'excrétion de l'humeur aqueuse

L'excrétion de l'humeur aqueuse se fait par les voies trabéculaire ou uvéosclérale avant de rejoindre la circulation générale (voir figure 20).

Comme son nom l'indique, la voie trabéculaire se fait au travers du trabéculum qui joue le rôle de filtre.

Il est situé à la jonction de l'iris et de la cornée, dans l'angle iridocornéen.

Après son passage par le trabéculum, l'humeur aqueuse filtrée rejoint la circulation générale via le canal de Schlemm situé en arrière de la cornée.

Cette voie est la voie dite principale car elle est responsable de l'excrétion de 70 à 90 % de l'humeur aqueuse.

Au cours du vieillissement, sa part augmente suite au déclin de la voie uvéosclérale.

La voie uvéosclérale est la seconde voie d'excrétion de l'humeur aqueuse.

Elle regroupe en fait deux voies dites voies non conventionnelles : la voie irienne et la voie uvéosclérale à proprement parlé.

Elle se fait au niveau de la racine de l'iris. Cette partie étant dépourvue d'épithélium, le passage se fait au travers du stroma irien.

De façon mineure à l'état physiologique, l'humeur aqueuse est résorbée par les veines de l'iris (voie irienne).

L'humeur aqueuse peut aussi continuer et passer au travers du corps ciliaire puis de la sclère où elle est résorbée par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques (voie uvéosclérale).

Cette voie est responsable de 10 à 30 % de l'excrétion de l'humeur aqueuse et sa part diminue avec l'âge. ⁽²⁰⁾

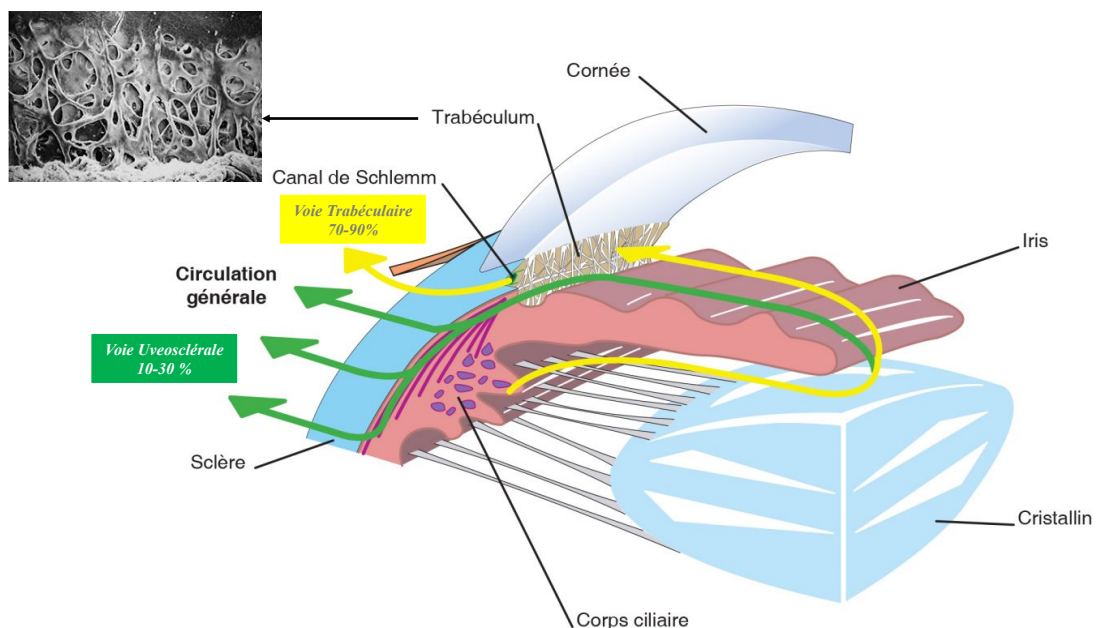


Figure 20 : Mécanisme d'excrétion de l'humeur aqueuse ^(21,22)

2. PHARMACOCINETIQUE DE LA VOIE OPHTALMIQUE

Pour rappel, la méthode d'application d'un collyre d'après le site ameli.fr, représentée dans la figure 21, se fait de la suivante : ⁽²³⁾

- Si l'œil à traiter présente des sécrétions épaisses, il doit être préalablement nettoyé à l'aide d'une compresse humidifiée d'eau. Celui-ci doit être propre et débarrassé de toute sécrétion pour que le collyre puisse pénétrer.
- Incliner légèrement la tête vers l'arrière, abaisser la paupière inférieure avec l'index et regarder vers le haut.
- Laisser tomber une goutte dans le cul de sac conjonctival en évitant tout contact entre le flacon et l'œil afin d'éviter de contaminer le contenant.
- Relâcher la paupière et fermez l'œil en appuyant légèrement avec le doigt sur le coin interne de l'œil pendant une dizaine de secondes afin d'éviter une élimination trop rapide du produit par les voies lacrymales.
- En cas d'administration de plusieurs collyres contenant des principes actifs différents, il est nécessaire de respecter un intervalle de 5 minutes entre deux applications ⁽²⁴⁾

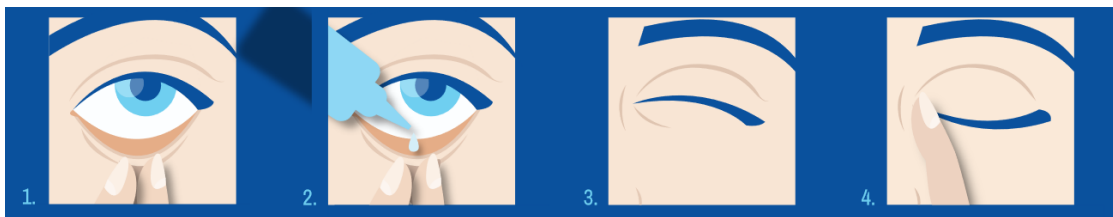


Figure 21 : Administration d'un collyre ⁽²⁵⁾

Lors de l'instillation d'un collyre dans l'œil, le produit est soumis aux processus pharmacocinétiques classiques que sont l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination.

2.1. L'ABSORPTION ^(24,26)

On appelle absorption le processus par lequel le principe actif passe, sous forme dissoute, de son site d'administration au sang et donc le phénomène aboutissant à la pénétration d'un collyre dans l'œil.

Celle-ci peut se faire soit directement au travers de la cornée soit au travers de la conjonctive et de la sclère.

L'absorption et donc la biodisponibilité du produit sera fonction des propriétés physico-chimique de la substance mais elle est également sous la

dépendance de facteurs environnementaux comme par exemple la perméabilité de la conjonctive ou la sécrétion lacrymale.

A l'état physiologique normal, la sécrétion lacrymale est de 1,2 µl/min mais comme nous avons pu le préciser précédemment, un des mécanismes de défense de l'œil en cas d'irritation consiste en une protection mécanique se faisant via une augmentation significative de cette sécrétion pouvant aller jusqu'à 400 µl/min, ce qui peut considérablement diminuer la quantité de produit au contact de l'œil.

La voie d'absorption au travers de la cornée est la voie mineure.

En effet, le passage par cette voie étant environ cent fois plus lent que la vitesse de drainage par la voie naso-lacrymal, au final la fraction de produit effectivement absorbé est assez faible.

La lenteur de cette voie peut s'expliquer par le fait que le collyre va devoir passer au travers de trois couches de la cornée décrites précédemment.

Dans un premier temps, le produit doit traverser l'épithélium, qui est un tissu à caractère lipophile et contenant de nombreuses jonctions serrées. Puis, il doit franchir le stroma composé à 78 % d'eau et donc hydrophile et enfin la monocouche cellulaire représentée par l'endothélium.

De ce fait, le produit idéal pour un passage par cette voie doit à la fois posséder des propriétés hydrophiles et lipophiles.

Cependant, même dans des conditions idéales, cette voie ne permettra pas le passage de plus de 1 à 10 % du produit. ⁽²⁷⁾

Par conséquent, la voie privilégiée pour l'absorption des collyres sera donc au travers de la conjonctive et de la sclère.

Selon les recommandations, l'instillation doit donc se faire dans le cul de sac conjonctival qui a une contenance d'environ 10 µl ce qui correspond à environ 20 % du volume d'une goutte de collyre. ⁽²⁸⁾

Malgré ce faible volume, l'absence de barrière à ce niveau permet un passage plus rapide et plus important en volume que par la cornée.

Le produit va emprunter le réseau artériel de la conjonctive fortement vascularisée et parvenir directement dans le corps ciliaire et l'uvée.

2.2. LA DISTRIBUTION ^(24,29)

Le phénomène faisant suite à l'absorption s'appelle la distribution. Elle correspond à la diffusion du médicament dans l'organisme et donc au passage du principe actif de l'humeur aqueuse vers les tissus environnants tels que : l'iris, le corps ciliaire, le cristallin et le vitré.

Si l'on compare la distribution en fonction de ces différents tissus :

- L'iris étant fortement vascularisé et ayant une grande surface de contact avec l'humeur aqueuse, les principes actifs seront rapidement distribués.
- La distribution dans le corps ciliaire est très lente
- La structure fibreuse du cristallin aboutit également à une faible distribution dans ce tissu
- Le vitré, de par sa consistance gélatineuse et une vitesse de distribution faible, ne reçoit également qu'une faible quantité de principe actif. Par conséquent, s'il s'agit de l'organe cible, on préférera au collyre la voie sous-conjonctivale ou intra-vitréenne pour traiter ce tissu efficacement.

En plus de ce différentiel de distribution, d'autres phénomènes peuvent faire obstacle à la distribution du principe actif d'un collyre :

- La fixation à la mélanine de l'iris
- La fixation à des protéines présentes dans l'humeur aqueuse
- Le flux de renouvellement de l'humeur aqueuse rapide et opposé à la distribution du médicament puisque ce flux va du corps ciliaire vers la chambre antérieure.

2.3. LE METABOLISME (24,29)

La métabolisation au niveau de l'œil est faible et se fait au niveau du corps ciliaire, de la rétine, dans l'épithélium et l'endothélium de la cornée.

2.4. L'ELIMINATION (24,29)

Pour cette phase, l'élimination du principe actif est principalement sous la dépendance du renouvellement de l'humeur aqueuse.

Le renouvellement total de l'humeur aqueuse étant en moyenne de 1,5 % par minute, la demi-vie d'un collyre est donc située entre 30 minutes et 2 h. ⁽³⁰⁾

Pour rappel, la demi-vie évalue la vitesse d'élimination d'un médicament. C'est le temps au bout duquel la concentration d'un médicament en phase d'élimination a diminué de moitié. Il faut 5 demi-vies pour qu'un médicament soit considéré comme totalement éliminé.

3. CONCLUSION

Dans cette première partie nous avons vu la complexité et l'aspect extrêmement structuré de l'anatomie de l'œil, ainsi que les principaux phénomènes relatifs à la pharmacocinétique de la voie ophtalmique.

L'œil, véritable trait d'union entre le monde extérieur et le cerveau, est un organe à la fois sensible mais également bien armé pour faire face aux agressions. Il met en jeu des protections mécaniques comme par exemple la production accrue de film lacrymal ou le renouvellement rapide des éléments les plus exposés comme l'épithélium cornéen.

Les protections structurelles sont également importantes comme les jonctions cellulaires formant une barrière, comparable à celle que l'on peut retrouver au niveau hémato-encéphalique, ne laissant que peu passer les éléments.

Cette première partie nous a démontré l'aspect normal et nous met face à un paradoxe : l'œil est un organe cumulant les protections mais laissant entrevoir un équilibre fragile que des éléments extérieurs comme les conservateurs présents dans les collyres pourraient mettre à mal.

Il est donc primordial de développer des médicaments adaptés prenant en compte l'ensemble de ces paramètres.

Chapitre II : COLLYRES ET CONSERVATEURS

Comme nous avons pu le voir précédemment, un ensemble d'éléments aboutit à une faible biodisponibilité du principe actif des collyres, inférieure à 5 %.

Même si cette biodisponibilité paraît faible, elle peut être suffisante pour avoir une action thérapeutique car, dans le cadre de la voie ophtalmique, la finalité de ces collyres appartenant aux médicaments topiques est le plus souvent d'avoir une action locale ou de surface. ⁽³¹⁾

Dans cette seconde partie, nous développerons d'un côté les caractéristiques générales des collyres et de l'autre celles des conservateurs utilisés dans leurs formulation.

1. DEFINITIONS PRINCIPALES

L'éventail galénique des produits à usage ophtalmique ne se limite pas seulement aux collyres. Les définitions officielles, d'une part, des préparations ophtalmiques de façon générale et, d'autre part, des collyres en particulier, sont les suivantes :

Préparations ophtalmiques :

« Les préparations à usage ophtalmique sont des préparations liquides (collyres, solutions pour lavage ophtalmique), semi-solides (pommades, crèmes, gels ophtalmiques) ou solides (poudres pour collyres et pour solutions de lavage, inserts) stériles et destinées à être appliquées sur le globe oculaire et/ou les conjonctives ou à être introduites dans le sac conjonctival. » ⁽²⁵⁾

Collyres :

« Solutions, émulsions ou suspensions stériles, aqueuses ou huileuses, contenant une ou plusieurs substances actives et destinées à l'instillation oculaire. » ⁽³²⁾

2. PROPRIETES ET COMPOSITION DES COLLYRES ^(31,33,34)

2.1. PROPRIETES D'UN COLLYRE

L'œil est un organe sensible et, de ce fait, les produits administrés doivent respecter certaines propriétés physico chimiques.

2.1.1. NEUTRALITE

Un collyre se doit d'être théoriquement le plus proche possible du pH physiologique du liquide lacrymal.

Le pH d'un collyre va influencer non seulement le confort à l'instillation mais également l'activité du produit (pénétration, solubilisation) et sa stabilité.

Le pH physiologique du film lacrymal étant situé entre 7,4 et 7,7 ; la préparation idéale devrait se situer dans cette fourchette afin d'éviter toute irritation de l'œil aboutissant comme nous l'avons vu précédemment à une sécrétion accrue de larme et donc une élimination d'autant plus rapide du principe actif.

Cependant, l'une des propriétés du film lacrymal est son pouvoir tampon faible mais toutefois suffisant pour permettre l'administration de collyres avec un pH plus acide ou plus basique.

Les larmes pourront ainsi abaisser ou augmenter le pH d'une faible quantité de solutions modérément acides ($\text{pH} > 3,5$) ou modérément basiques ($\text{pH} < 10,5$).⁽³⁵⁾

A cet effet tampon s'ajoute le mécanisme de larmoiement réflexe induit par l'instillation d'une solution irritante entraînant la dilution rapide des ions acides ou basiques en excès et à la normalisation rapide du pH (en 20 min environ).⁽³⁶⁾

Ces deux propriétés permettront donc de favoriser un pH compatible avec l'administration de principes actifs dont la solubilité, l'activité ou la stabilité est pH-dépendante.

Au final, un collyre doit donc trouver un équilibre entre stabilité, solubilité, efficacité du principe actif et tolérance de l'œil.

2.1.2. PRESSION OSMOTIQUE

Les larmes ont une osmolarité proche de celle du plasma et sont donc comparables à une solution de chlorure de sodium à 0,9 %.

L'isotonie d'un collyre est importante pour avoir un bon confort lors de l'application. Un œil sain peut tolérer une variation d'osmolarité comprise entre 0,7 à 1,5 % sans réaction d'inconfort type larmoiement accru ou douleur.

Cependant, lors de l'application d'un collyre sur un œil pathologique, ce dernier étant plus sensible, il est donc préférable de se rapprocher au plus près de l'isotonie.

Les collyres hypertoniques sont généralement mieux tolérés par l'œil que les collyres hypotoniques.

2.1.3. STERILITE

La stérilité des collyres est un point fondamental et obligatoire tant pour la stabilité du principe actif que pour la sécurité microbiologique.

Il est donc souvent nécessaire de prévoir un conservateur lors de la formulation d'un collyre.

De façon schématique, l'ajout de conservateur n'est pas indispensable pour les formes unidoses mais s'avère presque incontournable pour les récipients multidoses sauf dans des cas particuliers que nous développerons plus tard.

2.1.4. TAILLE DES PARTICULES

La taille des particules présentes dans un collyre doit se situer dans une fourchette comprise entre 25 et 90 μm .

2.1.5. VISCOSITE

La viscosité est fonction de la tolérance, de la stabilité du principe actif et du temps de résidence nécessaire à la surface de l'œil.

2.1.6. VOLUME INSTILLE

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'instillation d'un collyre doit se faire dans le cul de sac conjonctival dont le volume est d'environ 10 μL . Le volume instillé ne dépasse donc pas 25 à 30 μL en général car un volume plus important serait immédiatement éliminé et créerait un inconfort à l'application.

De ce fait, si plusieurs gouttes de collyres différents ou identiques doivent être appliquées, il convient d'attendre 10 à 15 min entre deux instillations pour permettre une bonne efficacité du traitement.

2.2. COMPOSITION D'UN COLLYRE

Un collyre étant un médicament, il contient donc un ou plusieurs principes actifs et des excipients.

2.2.1. PRINCIPE ACTIF

Définition du principe actif selon la pharmacopée européenne 2001 :

« Tout composant d'un médicament qui est destiné à exercer une action pharmacologique ou un autre effet direct en rapport avec le diagnostic, le traitement ou la prévention d'une maladie, ou à agir sur la structure ou les fonctions de l'organisme humain ou animal par les moyens pharmacologiques. Un médicament peut contenir plusieurs principes actifs. » ⁽³⁷⁾

Comme pour les autres formes galéniques, les principes actifs sont aussi divers que variés et doivent être aussi purs que possible.

Dans les collyres, la concentration en principe actif est en général de l'ordre de 0,1 à 2 %.

2.2.2. EXCIPIENTS

Définition de l'excipient selon la pharmacopée européenne 2001 :

« Tout composant, autre que le(s) principe(s) actif(s), qui est présent dans un médicament ou utilisé pour sa fabrication. La fonction d'un excipient est de servir de vecteur (véhicule ou base) au(x) principe(s) actif(s), ou d'entrer dans la composition du vecteur, contribuant ainsi à certaines propriétés du produit telle que la stabilité, le profil biopharmaceutique, l'aspect et l'acceptabilité pour le patient, la facilité de fabrication. La formulation d'un médicament comprend en général plusieurs excipients. » ⁽³⁷⁾

Les excipients sont des matières premières sans effet thérapeutique direct, présents pour servir l'action du ou des principes actifs ou permettre leur mise en forme et l'administration.

Les excipients présents dans les formulations de collyres sont destinés à adapter au plus juste les propriétés physico-chimiques pour permettre l'absorption la plus optimale possible tout en respectant au mieux le confort d'application et l'action médicamenteuse finale recherchée.

Ils peuvent notamment modifier la solubilité du principe actif mais également le pH, l'osmolarité, la viscosité ou la stabilité du produit final.

2.2.2.1. Le véhicule ⁽²⁶⁾

Les collyres étant majoritairement des solutions aqueuses, le véhicule est en général de l'eau purifiée.

Afin d'augmenter la solubilité du principe actif dans l'eau, on peut l'incorporer sous forme de sel qui sont des formes habituellement hydrosolubles ou ajouter un co-solvant comme le glycérol ou le propylène glycol qui sont miscibles dans l'eau.

Pour les principes actifs apolaires, afin d'éviter une formulation sous forme de suspension, des cyclodextrines qui sont des molécules permettant de former un complexe d'inclusion avec le principe actif et augmenter sa solubilité apparente peuvent être utilisées.

En effet, les cyclodextrines, parfois appelées molécule-cages, ont une structure en tronc de cône. Elles possèdent en leur centre un environnement

carboné hydrophobe alors que l'extérieur du cône possède de nombreux groupements hydroxyles, leur conférant une bonne solubilité.

Le principe du complexe d'inclusion est la fixation d'un principe actif hydrophobe de manière non-covalente à l'intérieur de la cavité via des liaisons hydrogènes ou des interactions électroniques mettant en jeu les forces de Van der Waals.

Au final, la cyclodextrine offre à l'intérieur de sa cavité un microenvironnement lipophile dans lequel se fixe le principe actif apolaire, formant ainsi un complexe dont la solubilité dans l'eau est améliorée. ⁽³⁸⁾

La figure 22 nous montre une représentation schématique de ce complexe d'inclusion.

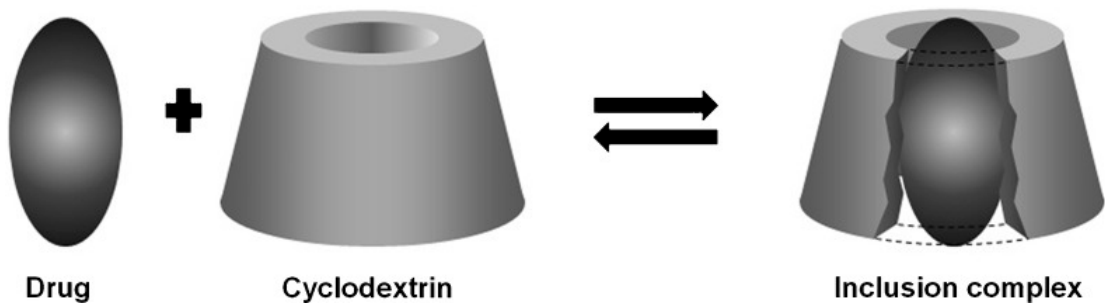


Figure 22 : Cyclodextrines, principe actif et complexe d'inclusion ⁽³⁹⁾

D'autres véhicules que l'eau peuvent être utilisés pour les principes actifs très lipophiles ou risquant d'être hydrolysés.

Le véhicule choisi est alors le plus souvent une huile végétale.

Il existe également des suspensions liquides qui sont employées pour les principes actifs peu solubles dans l'eau ou lorsqu'un effet retard est recherché.

Dans ce type de formulation, un sédiment peut se former mais il est facilement dispersé par agitation du flacon.

2.2.2.2. Isotonisants

En général, pour ajuster l'isotonie, le chlorure de sodium est le plus souvent utilisé. Il peut être remplacé par le mannitol en cas d'incompatibilité du chlorure de sodium avec d'autres composants.

2.2.2.3. Tampons

Les tampons les plus courants sont le tampon borate, le tampon phosphate et le tampon citrate.

Des sels tampons peuvent également être utilisés pour ajuster à la fois le pH et l'osmolarité.

2.2.2.4. Conservateurs

Ces conservateurs seront développés plus en détail un peu plus loin mais de façon générale, leur but sera de maintenir l'efficacité et la sécurité du collyre jusqu'à la fin de son utilisation.

Ils seront choisis en fonction de leurs propriétés physicochimiques, des risques d'interactions avec les autres constituants, de leur pouvoir bactéricide ou bactériostatique, de leur spectre d'action, du pouvoir allergisant et bien évidemment du risque de toxicité oculaire.

2.2.2.5. Tensio-actifs

Les tensio-actifs sont utilisés comme agent solubilisant, mouillant et dispersant.

Dans les collyres, ils doivent être utilisés à une concentration aussi faible que possible de par le risque de provoquer une rupture de la couche lipidique externe de la cornée.

De plus, ils peuvent également se fixer sur les conservateurs et réduire leur efficacité.

2.2.2.6. Agents viscosifiants

Leur introduction dans la formulation présente un intérêt pour permettre l'augmentation du temps de séjour dans le cul de sac conjonctival.

Il s'agit généralement de polymères types acide hyaluronique ou carbomères qui se doivent d'être transparents, solubles ou miscibles dans l'eau.

3. LES CONSERVATEURS DANS LES COLLYRES

3.1. GENERALITES SUR LES CONSERVATEURS ^(40,41)

Définition d'un conservateur :

Un conservateur est défini comme toute substance exclusivement ou principalement destinée à s'opposer aux altérations d'origine physique (lumière, température...), d'origine chimique (réactions entre les ingrédients eux même, entre le contenant et le contenu...) ou d'origine microbiologique d'un produit.

L'œil étant un organe sensible et les collyres étant principalement des préparations aqueuses à grand risque de contamination, l'utilisation de conservateurs est donc quasiment incontournable lors de la formulation de ces formes galéniques qui se doivent d'être stériles lors de leur instillation. Les conservateurs vont avoir pour but de protéger le collyre d'une contamination éventuelle et s'opposent notamment aux dégradations d'origine bactérienne ou fongique (champignons microscopiques ou unicellulaires (levures) ou filamenteux (moisissures)).

Dans le cadre des collyres, les conservateurs vont surtout être ajoutés lorsque les préparations n'ont pas elles-mêmes des propriétés antimicrobiennes suffisantes pour se protéger contre les proliférations des micro-organismes et présentent donc un risque d'altération de la préparation ou un danger pour le patient.

Les paramètres de choix du conservateur sont les suivants :

- Le spectre d'activité : bactéries Gram +, Gram -, levures ou champignons
- La toxicité pour le patient
- Le pouvoir allergisant
- Leurs propriétés physico chimiques
- La compatibilité avec les autres constituants
- La stabilité dans le produit final

Il est également important de prendre en compte qu'un conservateur n'est pas d'une fiabilité absolue et que son efficacité va dépendre de différents facteurs.

Selon la pharmacopée européenne, un conservateur va donc contribuer à **stabiliser** le médicament :

« Un médicament est considéré comme pratiquement stable lorsque, dans un laps de temps déterminé, ses propriétés essentielles ne changent pas ou changent au plus dans des proportions tolérables ; de plus, il est entendu que le médicament doit être conservé dans des conditions appropriées et prescrites de température, d'humidité et d'exposition à la lumière et qu'un récipient convenable a été utilisé »

Les conservateurs utilisés dans les collyres doivent présenter les 3 caractéristiques suivantes :

- Assurer une stabilité microbiologique, c'est-à-dire lutter contre la contamination ou la prolifération de micro-organismes durant toute la durée d'utilisation par le patient selon les recommandations du fabricant (conditions de stockage, durée de validité après ouverture...)

- Présenter une inertie vis-à-vis du ou des principes actifs et du conditionnement
- Présenter une compatibilité physico-chimique avec les autres constituants de la formule

Concernant la stabilité microbiologique, on peut identifier deux types de contaminations : lors de la fabrication ou après la fabrication. Ces contaminations sont décrites ci-dessous :

- Contamination lors de la fabrication :

Trois sources potentielles sont à surveiller pour limiter cette contamination :

- Les matières premières à risque dont l'eau qui, comme nous l'avons vu, est un des excipients principaux des collyres aqueux et les produits d'origine végétale comme les huiles dans les collyres huileux.
- Les locaux et le matériel : il faut des matériaux adaptés comme des surfaces lisses ou de l'acier inoxydable. Des procédures devront également être mises en place et validées pour le nettoyage avec des désinfectants adaptés, les appareillages et les locaux. Les tuyauteries avec un risque de formation de biofilm ainsi que l'air sont des éléments à contrôler.
- Le personnel : importance de l'hygiène, le choix des vêtements et surtout de la formation du personnel.

Pour obtenir un produit avec le plus faible risque de contamination, les **Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)** doivent être respectées.

- Contamination après la fabrication

Deux sources peuvent être à l'origine de cette contamination :

- Le conditionnement primaire lui-même qui peut être inadapté
- Le patient lors de l'utilisation avec l'introduction d'air, d'eau dans le contenant, la conservation à une température trop élevée ou encore la contamination par contact avec l'œil infecté, les mains ou autre.

Une fois encore, afin de limiter au maximum le risque de contamination, les **Bonnes Pratiques d'Utilisation (BPU)** doivent être respectées.

Les contaminations lors de l'utilisation par le patient sont plus compliquées à maîtriser, d'où l'importance des conseils donnés au comptoir lors de la délivrance par le pharmacien qui doit s'assurer de la bonne compréhension du traitement mais également du respect des règles permettant de préserver l'asepsie : (23,25,42,43)

- Avant l'instillation, procéder à un lavage soigneux des mains et éventuellement utiliser des gants à usage unique

- Vérifier l'aspect de la solution avant l'instillation, bien agiter le flacon dans le cas des suspensions et jeter la première goutte en cas d'application après une période de non utilisation du flacon
 - Après ouverture du flacon, déposer le bouchon sur une compresse stérile
 - Presser le corps du flacon et non son extrémité.
 - Éviter tout contact du contenant avec l'œil, les paupières ou les cils
 - Dans la mesure du possible, préférer une instillation par une autre personne
 - Pour éviter les contaminations croisées, utiliser un collyre donné pour une seule personne
 - Reboucher le flacon immédiatement après utilisation.
 - Respecter la date de péremption et les modalités de conservation définies par le fabricant (température de conservation, exposition à la lumière...)
- Dans tous les cas, ne jamais exposer un collyre à une chaleur excessive ou au soleil.
- Lors de la première utilisation, indiquer la date d'ouverture sur le flacon et respecter la période après ouverture (PAO) qui peut aller de deux semaines à plusieurs mois.

3.2. LES CATEGORIES, LES MODES D'ACTION ET LES CONSERVATEURS CLASSIQUES

3.2.1. LES CATEGORIES ET METHODES DE CLASSIFICATION DES CONSERVATEURS

Les conservateurs étant principalement utilisés dans les collyres pour protéger celui-ci des contaminations microbiennes, on peut distinguer deux grandes catégories de conservateurs antimicrobiens selon la cible :

- Les bactériostatiques et bactéricides
- Les fongostatiques et fongicides

3.2.1.1. Définitions

Ci-dessous, quelques définitions d'intérêt pour appréhender la suite du paragraphe.

Pouvoir bactériostatique :

On qualifie de bactériostatique tout phénomène ou toute substance, notamment antibiotique capable d'inhiber la prolifération des bactéries sans les tuer.

Pouvoir bactéricide :

On qualifie de bactéricide une substance ayant la capacité de tuer des bactéries.

Pouvoir fongistatique :

On qualifie de fongistatique, toute substance capable de limiter la prolifération de champignons.

Pouvoir fongicide :

On qualifie de fongicide, une substance conçue pour éliminer des champignons.

Inoculum :

C'est un échantillon contenant le germe sur lequel on déterminera le pouvoir antimicrobien du conservateur. Il est préparé à partir d'une culture de 24h dans un bouillon de Mueller-Hinton (milieu de culture pour micro-organismes composé d'extrait de viande, d'hydrolysate acide de caséine et d'amidon soluble ⁽⁴⁴⁾)

CMI : ^(45,46)

Concentration minimale inhibitrice qui est la plus petite concentration de substance qui inhibe toute culture visible après 18 h à 24 h de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique ou fongistatique.

CMB (ou CMF) : ^(45,46)

Concentration minimale bactéricide (ou fongicide) qui est la plus petite concentration ne laissant subsister que 0,01 % ou moins de survivants de l'inoculum initial après un temps de contact donné. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide ou fongicide.

3.2.1.2. Détermination de la CMI/CMB

Les conservateurs étant des biocides au même titre que les antibiotiques ce pouvoir bactériostatique ou bactéricide (ou fongistatique/fongicide) se fera au travers de la détermination du CMI ou CMB (CMF) du conservateur.

Un conservateur contrairement à un antibiotique n'agira pas sur une cible bactérienne spécifique mais aura une multitude de cibles, non spécifiquement bactérienne.

De plus, les conservateurs ne sont pas des produits destinés à être administrés par voie générale. ⁽⁴⁷⁾

Afin de faciliter la compréhension, les méthodes décrites dans la suite du paragraphe seront basées sur les déterminations de CMI/CMB pour des antibiotiques mais les principes restent applicables pour les autres biocides et micro-organismes.

La CMI peut être déterminée selon plusieurs méthodes : (45,48)

- Les méthodes en milieu gélosé
- Les méthodes en milieu liquide : macrométhode et microméthode.

La CMB ne pourra être déterminée que par une macrométhode en milieu liquide avec passage par un milieu gélosé. (49)

3.2.1.2.1. Méthodes en milieu gélosé (48)

Il existe deux méthodes en milieu gélosé représentées dans la figure 23.

La première méthode de détermination de la CMI en milieu gélosé consiste à incorporer une dilution du conservateur dans des géloses de Mueller-Hinton maintenues en surfusion.

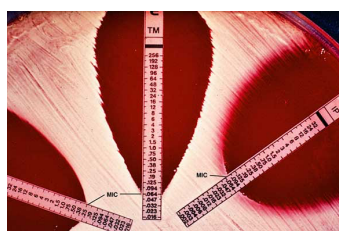
Cette gélose est ensuite coulée dans une boîte de Pétri etensemencée d'un inoculum (1 boîte de Pétrie = 1 concentration).

Un des avantages de cette méthode est la possibilité d'ensemencer jusqu'à une dizaine de souches par boîte.

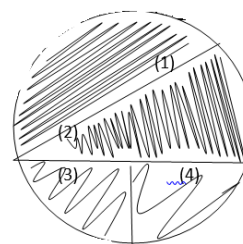
La lecture de la CMI correspond à la boîte ayant la plus petite concentration en conservateur inhibant la croissance bactérienne (absence de colonie sur la strie).

La seconde méthode, appelée méthode Etest[®], consiste en l'ensemencement d'une boîte de Pétri de façon classique.

Une bandelette graduée et imprégnée de façon croissante du biocide à étudier est déposée. Le biocide va diffuser selon un gradient de concentration et la détermination de la CMI se fait par simple lecture de la valeur inscrite à la jonction entre la zone d'inhibition et la bandelette.



Méthode Etest[®]



Ensemencement strie de 4 souches

Figure 23 : Les méthodes en milieu gélosé (50,51)

3.2.1.2.2. Méthodes en milieu liquide ^(48,52)

3.2.1.2.2.1. Macrométhode ^(49,53)

On utilise une série de tubes à hémolyse contenant une gamme de concentration croissante du conservateur à étudier.

On ajoute le même volume d'inoculum dans chaque tube contenant une dilution différente.

Un tube témoin sans conservateur est également réalisé.

Après le temps d'incubation nécessaire de 24h, on observe les tubes.

Le tube témoin doit présenter un trouble, signe d'une croissance positive de micro-organisme.

- Détermination de la CMI :

La CMI correspond à la concentration en conservateur la plus faible pour laquelle il n'y a pas de croissance visible, c'est-à-dire la concentration correspondant au premier tube non trouble dans la gamme de concentration (voir figure 24).

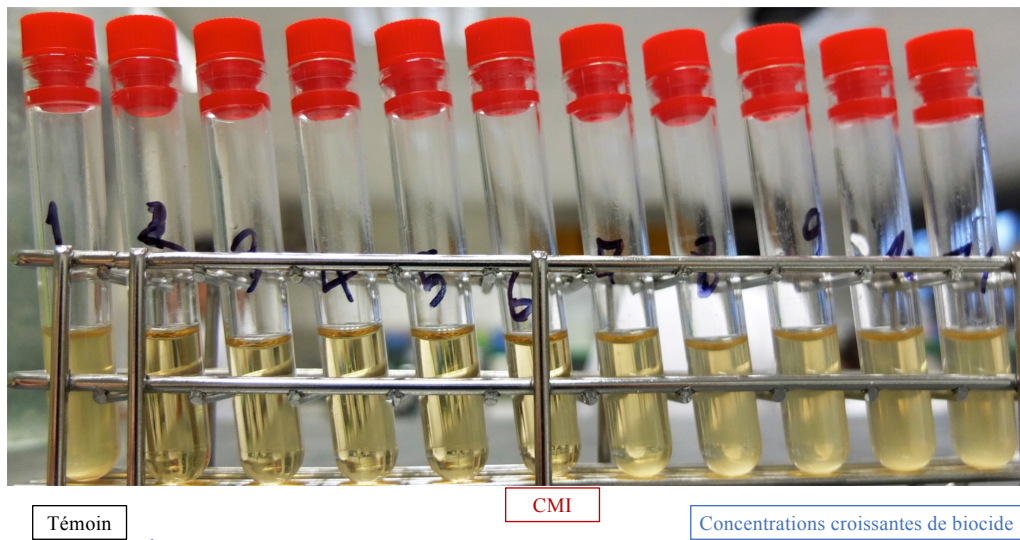


Figure 24 : Macrométhode en milieu liquide ⁽⁵³⁾

- Détermination de la CMB :

On détermine dans un premier temps le nombre de micro-organismes présents dans l'inoculum initial. Cela se fait par ensemencement en milieu gélosé d'une série de dilution de l'inoculum initial.

Lorsqu'une solution suffisamment diluée permet le décompte, on compte le nombre d'unités formant colonie (UFC) et on pourra ainsi calculer la concentration dans l'inoculum initial selon la formule :

$$N = n \times (1/V) \times f$$

N = nombre de micro-organismes présents dans l'inoculum initial

n = nombre d'unités formant colonie dans la boîte dont la dilution permet un dénombrement

1/V = où *V* correspond au volume de l'inoculum

F = facteur de dilution de l'inoculum pour la boîte dont la dilution permet un dénombrement

On procède ensuite de façon analogue par ensemencements du tube correspondant à la CMI déterminée précédemment.

On obtient ainsi deux valeurs que l'on peut comparer : le nombre de microorganismes présents dans l'inoculum initial (**N_{inoculum}**) et le nombre de microorganismes présents dans le tube correspondant à la CMI (**N_{CMI}**).

Si le rapport **N_{CMI}/N_{inoculum}** est inférieur à 0,01% alors la CMI est égale à la CMB et le conservateur est considéré comme étant bactéricide.

Par contre si le rapport **N_{CMI}/N_{inoculum}** est supérieur à 0,01 %, cela signifie que la CMB est supérieure à la CMI et que le conservateur est bactériostatique.

Dans ce cas pour déterminer la CMB, il faut alors dénombrer les autres dilutions non troubles et les comparer au **N_{inoculum}** afin de déterminer celle qui tue 99,99 % du nombre de micro-organismes de l'inoculum initial.

3.2.1.2.2.2. Microméthode

Pour la microméthode, on réalisera la gamme de conservateur sur une plaque de 96 puits à fond en U.

Selon, le même principe, un volume identique d'inoculum est mis en contact avec une concentration croissante de conservateur et le premier puit ne présentant pas de trouble correspondra à la CMI. ⁽⁴⁸⁾

La figure 25 représente une plaque vide à gauche et une ensemencée à droite.

L'avantage de cette méthode est qu'elle peut être partiellement ou totalement automatisée d'un bout à l'autre des manipulations et peut également permettre la détermination de plusieurs CMI différentes en même temps.

C'est notamment le cas pour les systèmes *Sensititre*[®] du laboratoire Thermo Fisher Scientific qui permettent un gain de temps et de précision non négligeables par rapport aux méthodes manuelles. ⁽⁵⁴⁾

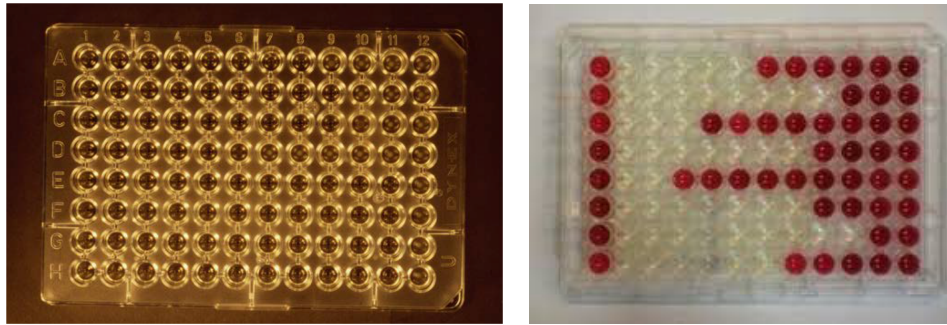


Figure 25 : Microméthode en milieu liquide (55,56)

3.2.1.3. Le test d'efficacité de la conservation microbienne (57,58)

Ces méthodes de classification des conservateurs selon qu'ils soient bactériostatiques ou bactéricides via la détermination de leur CMI/CMB, bien qu'applicables, ne sont pas les plus utilisées en pratique et on leur préférera l'essai de l'efficacité de la conservation antimicrobienne dont le conservateur de référence est le chlorure de benzalkonium.

Cet essai consiste en la contamination artificielle par un microorganisme donné de la préparation à étudier, dans notre cas du collyre selon sa formule finale et dans son récipient définitif.

Le but est de déterminer la pertinence de l'utilisation d'un conservateur donné dans un produit fini précis.

En effet, l'efficacité d'un agent de conservation antimicrobienne peut être modifié par l'un des composants de la formulation définitive ou par le récipient et le mode de fermeture utilisés. On va étudier la stabilité microbienne du produit fini sur sa durée de validité pour s'assurer que l'activité antimicrobienne ne se modifie pas au cours de la période de conservation.

On va donc maintenir la préparation inoculée à une température donnée et effectuer des prélèvements à intervalles de temps réguliers et procéder à des dénombrements.

Les propriétés de conservation de la formulation et donc du conservateur seront jugées acceptables si, dans les conditions de températures et de temps du test, on observe une diminution ou une absence d'augmentation du nombre de microorganisme.

Bien évidemment, les critères d'acceptations seront variables selon la catégorie de préparation ou le degré de protection recherché.

Pour les préparations ophtalmiques, au même titre que les préparations parentérales, les critères pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne sont les mêmes et sont exprimés en réduction logarithmique du nombre de microorganismes viables par rapport à la valeur obtenue dans l'inoculum. Les critères d'acceptation sont récapitulés dans le tableau 1.

		Réduction Logarithmique				
		6 h	24 h	7 j	14 j	28 j
Bactéries	A	2	3	-	-	Non retrouvé
	B	-	1	3	-	Pas d'augmentation
Champignons	A	-	-	2	-	Pas d'augmentation
	B	-	-	-	1	Pas d'augmentation

Tableau 1 : Critères d'acceptation de l'essai d'efficacité de la conservation antimicrobienne pour les préparations ophtalmiques ⁽⁵⁸⁾

Dans ce tableau, les critères d'acceptation notés A sont les critères qu'il faudrait atteindre dans l'idéal.

Lorsque ces critères A ne peuvent être respectés, dans le cas de risque d'augmentation d'effets indésirables par exemple, ce sont les critères B qui s'appliquent.

Si nous prenons l'exemple des bactéries, pour qu'un conservateur soit jugé efficace pour une préparation ophtalmique, on doit observer une réduction logarithmique du nombre de bactéries de 2 à 6 h et de 3 à 24 h par rapport à l'inoculum initial. De plus, à 28 jours, le microorganisme ne doit pas être détecté dans l'échantillon prélevé.

Si l'on ne peut respecter ces critères, les critères B imposent une réduction logarithmique de 1 à 24 h et de 3 à 7 jours et enfin une absence d'augmentation à 28 jours.

La méthodologie décrivant comment réaliser ce test d'efficacité de la conservation microbienne est décrite en ANNEXE 2.

3.2.2. LES MODES D' ACTIONS DES CONSERVATEURS

Les trois principaux modes d'actions des conservateurs antimicrobiens sont les suivants :

- La dénaturation des protéines
- L'altération du système enzymatique de la cellule bactérienne
- La modification du système de reproduction par dénaturation de l'acide nucléique

3.2.3. LES CONSERVATEURS CLASSIQUES DES COLLYRES

Nous pouvons distinguer quatre grandes familles de conservateurs classiques (ou ancienne génération) utilisés dans les collyres : (57,59)

- Les ammoniums quaternaires
- Les dérivés organomercuriels
- Les amidines
- Les alcools

Quelques rappels de chimie organique pouvant être utiles à la compréhension de ce paragraphe sont disponibles en ANNEXE 3.

3.2.3.1. Les ammoniums quaternaires

Les ammoniums quaternaires dont la formule de base est NR_4^+ , se présentent sous forme de sels neutres issus de la réaction d'une amine tertiaire sur un composé halogéné via une réaction de quaternisation également appelée réaction de Menshutkin (voir figure 26). (60)

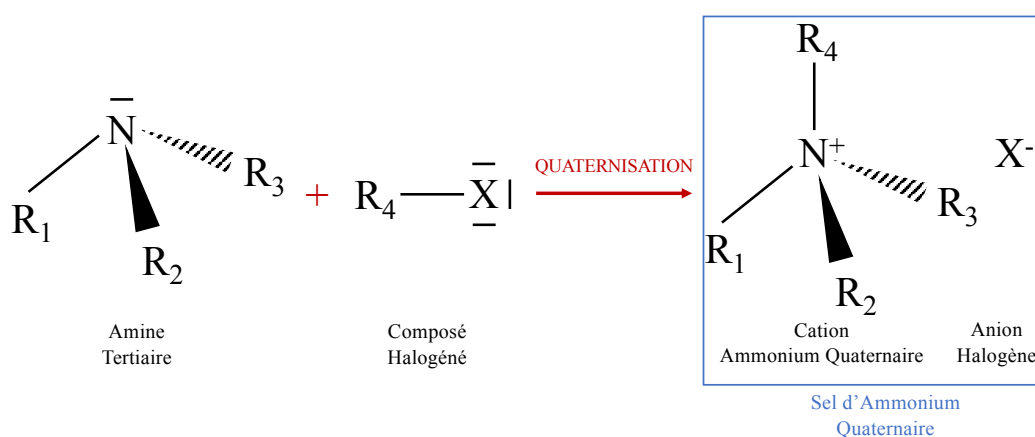


Figure 26 : Réaction de quaternisation d'une amine

Pour rappel une Amine tertiaire (voir figure 27) est un dérivé de l'ammoniac (de formule NH_3) constitué d'un atome d'azote (N) et dont les trois atomes d'hydrogène (H) ont été remplacés par des groupes carbonés qui peuvent être des groupements alkyles ou aryles (notés R) dans le cas des ammonium quaternaires.

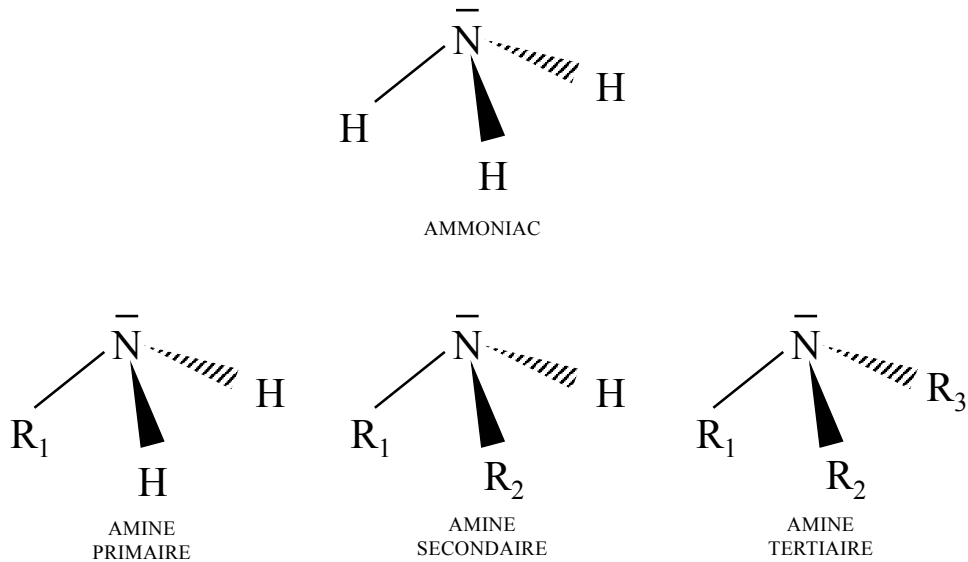


Figure 27 : Ammoniac et Amines

Les ammoniums quaternaires sont donc des composés chimiques constitués d'un atome d'azote lié à quatre groupements carbonés et possédant entre 8 et 35 atomes de carbone.

Les principaux ammoniums quaternaires utilisés dans les collyres sont le chlorure de benzalkonium, le bromure de cétrimonium (cétrimide), le bromure de benzododécinium et le chlorure de cétylpyridinium.
(voir tableau 2)

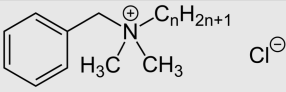
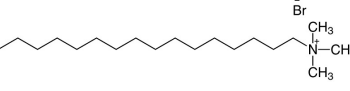
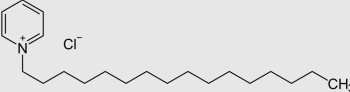
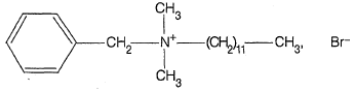
Formule chimique développée	Nom	Formule chimique brute
 <p>$n = 8, 10, 12, 14, 16, 18$</p>	Chlorure de benzalkonium	$C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$ R= groupement alkyle de C8 à C18
	Bromure de cétrimonium (cétrimide)	$C_{19}H_{42}BrN$
	Chlorure de cétypyridinium	$C_{21}H_{38}ClN$
	Bromure de benzododécinium	$C_{21}H_{38}BrN$

Tableau 2 : Les ammoniums quaternaires utilisés dans les collyres ^(61–65)

Propriétés des ammonium quaternaires et modes d'actions :

Il s'agit de composés polaires, très solubles dans l'eau et ayant également des propriétés tensioactives.

Les ammoniums quaternaires vont agir sur la bicouche phospholipidique des bactéries provoquant leur rupture et le déversement du contenu cytoplasmique dans l'environnement.

L'effet bactéricide est concentration-dépendant puisque, à faible concentration, les ammoniums quaternaires se fixent sur la surface membranaire, provoquant la perte de capacité de la cellule à réguler son osmolarité et une fuite de potassium.

Une concentration intermédiaire d'ammonium quaternaire va perturber la respiration membranaire, le transport de solutés et la synthèse protéique.

Enfin, à forte concentration, ils vont provoquer la dissolution de la membrane cellulaire et le relargage du contenu cellulaire. ⁽⁶⁶⁾

Les ammoniums quaternaires ont un pouvoir bactéricide rapide qui augmente à 37°C en milieu alcalin.

Ils ont un spectre d'action principalement orienté sur les bactéries Gram + comme *Staphylococcus aureus* mais leur action sur les bactéries Gram – type *Pseudomonas aeruginosa* peut être augmentée par une association avec de l'acide éthylènediaminetétraacétique ou EDTA.

Les ammoniums quaternaires ont également une très bonne activité fongicide et plus particulièrement sur *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*.

Ces très bonnes propriétés bactéricide et fongicide, associées à une puissante activité spermicide, font des ammoniums quaternaires des molécules très largement utilisées au-delà de leur fonction de conservateur dans les préparations ophtalmiques (cosmétiques, spermicides, détergents...).

Il est cependant important de noter que, chez les porteurs de lentilles de contact, les collyres contenant des ammoniums quaternaires sont à éviter au même titre que les collyres colorés. Il est donc conseillé de retirer les lentilles pendant le traitement. ⁽⁴³⁾

3.2.3.2. Les dérivés organomercuriels

Les dérivés organomercuriels sont des composés organométalliques ayant pour formule de base R-Hg-X.

L'élément central est le Mercure (Hg) sur lequel se fixent un composé organique (R = groupement alkyle, aryle ou alcoxy) ainsi qu'un anion dissociable (X) qui peut être organique ou inorganique. ⁽⁶⁷⁾

Les quatre types de dérivés organomercuriels sont le phénylmercure, le mercurbutol, le mercurothiolate sodique et la Merbromine (tableau 3). ⁽⁶⁸⁾

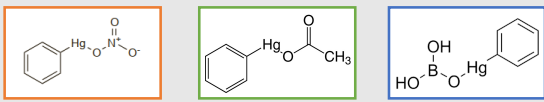
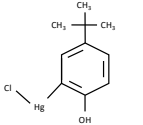
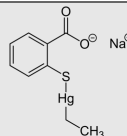
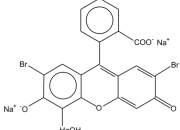
Formule chimique développée	Noms	Formules chimiques brutes
	Phénylmercure Nitrate de Phénylmercure Acétate de Phénylmercure Borate de Phénylmercure	$C_6H_5HgNO_3$ $C_8H_8HgO_2$ $C_6H_5BHgO_2$
	Mercurbutol	$C_{10}H_{13}ClHgO$
	Mercurothiolate sodique (également appelé Thiomersal ou Thimerosal)	$C_9H_9HgNaO_2S$
	Merbromine	$C_{20}H_8Br_2HgNa_2O_6$

Tableau 3 : Dérivés Organomercuriels ⁽⁶⁹⁻⁷⁸⁾

Propriétés des organomercurels et modes d'actions : (78,79)

Les organomercurels possèdent une activité bactériostatique et fongistatique.

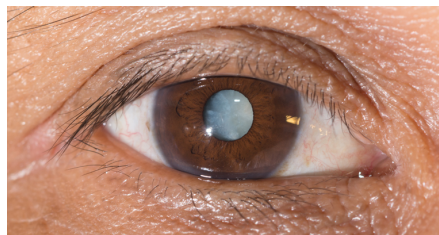
Cette activité se base sur les propriétés thiolooprives liées à l'ion mercuriel, c'est-à-dire qu'ils vont facilement se fixer aux molécules possédant un atome de soufre.

Le groupement thiol constituant la partie active de nombreuses enzymes bactériennes, c'est donc plus précisément sur elles qu'ils vont agir provoquant leur précipitation sous forme de protéinates de mercure.

Nous ne parlerons pas ici du Mercurbutol ni de la Merbromine, respectivement vendus sous les noms commerciaux Mercryl® et Mercurochrome® comme antiseptiques cutanés dans leurs formules originelles, modifiées depuis le début des années 2000.

En pratique, l'utilisation de dérivés organomercurels dans les collyres tant à disparaître et le Thiomersal est actuellement le seul utilisé dans de rares spécialités comme l'Indocollyre® en flacon en raison de sa plus grande stabilité et des effets secondaires moins importants engendrés aux concentrations d'usage comprises entre 0,001 et 0,004 %.

En effet, les sels de phénylmercure appliqués de façon chronique peuvent entraîner des impressions mercurielles de l'œil à savoir une coloration grise irréversible du cristallin pouvant aboutir à une forme de cataracte ou une kératopathie en bandelette (voir figure 28).



Cataracte



Kératopathie en bandelette

Figure 28 : Impressions mercurielles de l'œil (80,81)

Cependant, le Thiomersal reste un conservateur contesté notamment pour son utilisation dans les vaccins.

Depuis la fin des années 90, une hypothèse est apparue selon laquelle le Thiomersal pourrait être à l'origine de déficits neurologiques comme l'autisme ou d'atteintes rénales.

Cette hypothèse n'a pas été confirmée par les autorités sanitaires françaises comme l'Agence National de Sécurité du Médicament (ANSM) mais elles ont cependant invité les laboratoires producteurs à limiter son utilisation dans les formulations de vaccins. Depuis 2012, il n'existe plus de vaccins contenant du Thiomersal en France. ⁽⁸²⁻⁸⁴⁾

3.2.3.3. Les amidines

Les amidines sont des composés organiques ayant pour formule de base $R_1-C-NR_2R_3-NR_4$.

La structure est homologue à celle d'un amide dans lequel l'atome d'oxygène (O) a été remplacé par un atome d'azote (N), (voir figure 29).

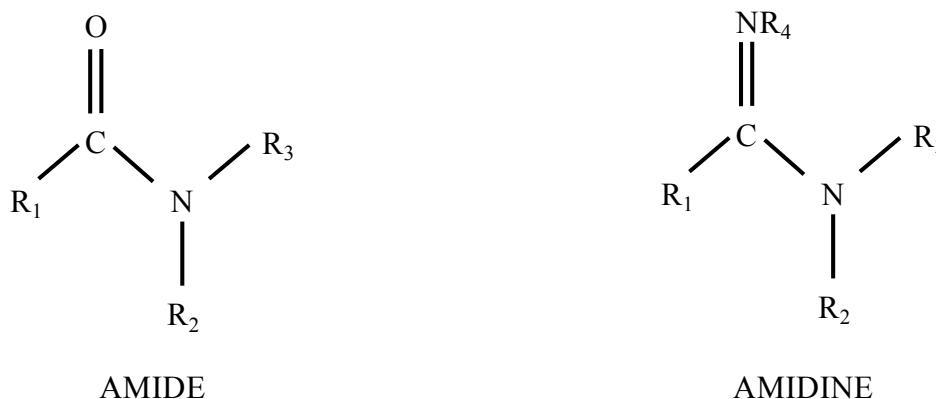


Figure 29 : Structures Amide et Amidine

Le principal représentant utilisé dans les collyres pour ce type de conservateurs est la chlorhexidine de formule $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$.

Il s'agit d'une molécule appartenant à la famille des bis-diguanides c'est-à-dire qu'elle comporte deux groupements diguanides ($RC_2H_6N_5$).

En effet, selon les règles de nomenclature mises en place par l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) en 1970, les deux ligands étant deux guanides identiques, on parle de diguanides. Ces diguanides étant eux même les deux ligands formant la molécule de chlorhénidine, on remplace alors le préfixe grec « di » par « bi ».

Au final la chlorhénidine est un bis-diguanide. ⁽⁸⁵⁾

Pour rappel, un groupement diguanide est un groupement composé de deux groupements guanidines (CH_5N_3) dont l'un des atomes d'azote est commun (figure 30).

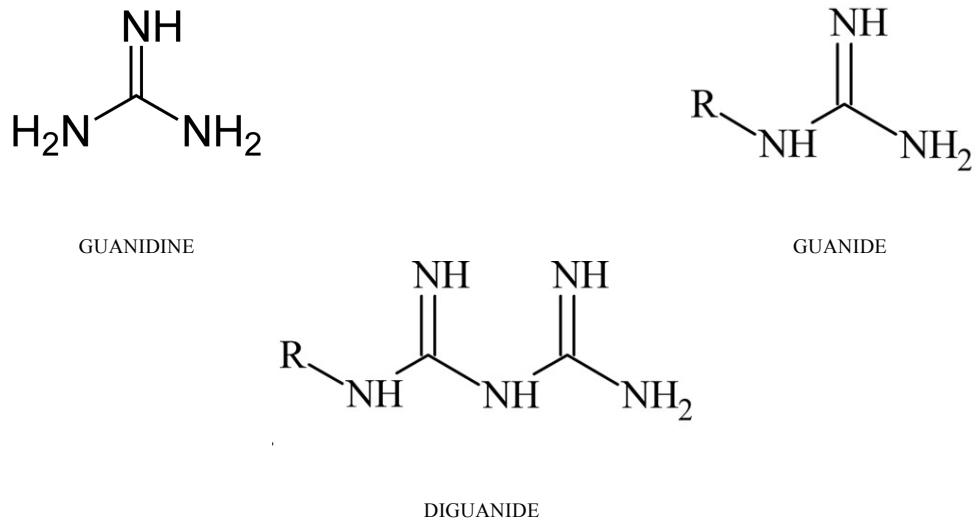


Figure 30 : Guanidine, Guanide et Diguanide (86,87)

La forme de base de la chlorhéxidine (figure 31) est une molécule symétrique dont les deux ligands (diguanides) sont reliés entre eux par une chaîne carbonée C_6H_{12} .

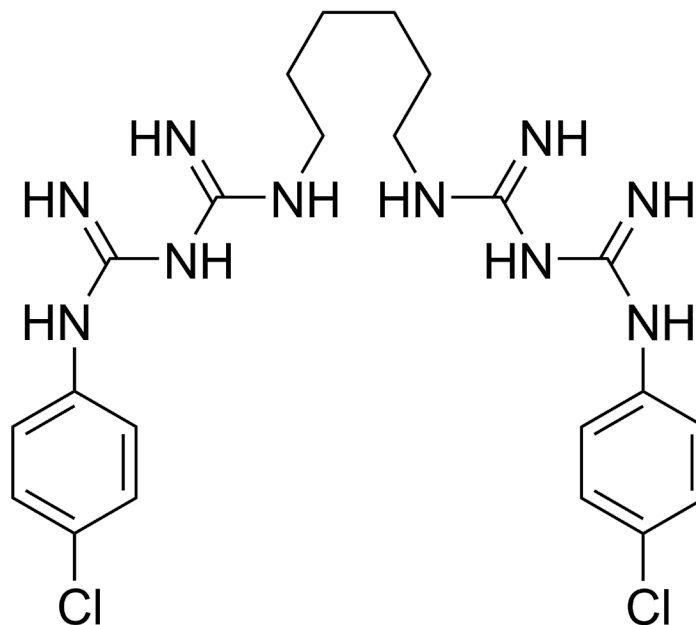


Figure 31 : Structure chimique de la chlorhéxidine (88)

Cette forme de base étant pratiquement insoluble dans l'eau, le chlorhexidine est alors utilisée dans les formulations galéniques sous forme de sels comme le diacétate, le dihydrochloride ou le digluconate.

La forme chlorhydrate est la moins soluble, la forme acétate est d'une solubilité intermédiaire et la forme gluconate est très hydrosoluble. ⁽⁸⁹⁾

Dans les collyres, la chlorhexidine est donc utilisée sous forme de digluconate en raison de cette forte solubilité et de son activité en milieu neutre ou légèrement alcalin (pH = 8).

Au final, par abus de langage on désigne souvent par le terme générique chlorhexidine la forme de base ou ses sels. Il convient donc de rappeler que c'est le digluconate de chlorhexidine de formule $C_{34}H_{54}C_{12}N_{10}O_{14}$ qui présente un intérêt dans les formulations.

Il s'agit donc d'un sel composé de la molécule de chlorhexidine de base associée à deux molécules de D-Gluconate (dérivées du D-Glucose). ⁽⁹⁰⁾

Propriétés de la chlorhexidine et modes d'actions : ⁽⁹¹⁾

La chlorhexidine possède une activité bactéricide sur les bactéries de type Gram + et Gram –.

Cette activité antimicrobienne est d'une efficacité supérieure sur les bactéries de type Cocci et Bacille Gram +.

Elle possède également une activité fongistatique notamment sur *Candida albicans*.

On observe une certaine résistance des bactéries de type *Serratia*, *Proteus* et *Pseudomonas*.

La chlorhexidine est un agent cationique chargé positivement qui va réagir avec les groupements chargés négativement de la paroi des bactéries.

Elle est immédiatement absorbée à la surface des bactéries et son effet va être dépendant de la quantité de produit absorbé ainsi que du type de microorganisme ciblé.

A faible concentration, la chlorhexidine va altérer la membrane cytoplasmique des bactéries et provoquer une fuite du contenu cellulaire ainsi que l'inhibition de certains enzymes comme notamment ceux impliqués dans le transport membranaire des cations ou l'hydrolyse de l'ATP membranaire.

A une forte concentration, l'intégrité de la paroi bactérienne reste intacte mais le cytoplasme des bactéries apparaît coagulé par précipitation des protéines et de l'acide nucléique.

L'action de la chlorhexidine est annulée en milieu alcalin et elle va précipiter à un pH supérieur à 8.

Les savons, les composés anioniques, les tensio-actifs, les récipients en polyéthylène ou les tannins (présents dans les bouchons en liège par exemple) sont incompatibles avec la chlorhexidine et vont inhiber son action.

Dans les collyres, la chlorhexidine est utilisée à une concentration comprise entre 0,005 et 0,01 %.

Elle présente également un intérêt pour les porteurs de lentilles de contact. En effet, on lui reconnaît une activité amibicide et notamment contre *Acanthamoeba*, qui est un agent responsable de kératite oculaire auquel les porteurs de lentilles de contact peuvent être exposés par le contact avec l'eau (baignade avec les lentilles, lavage des lentilles ou du boîtier à l'eau du robinet ou l'eau minérale).

C'est pourquoi elle rentre dans la composition de nombreux produits d'entretien pour les lentilles de contact à une concentration de 4 %. ⁽⁹²⁻⁹⁴⁾

La chlorhexidine est également utilisée dans l'hygiène bucco-dentaire sous forme de bain de bouche notamment dont il convient de limiter l'usage à 6 mois maximum selon la FDA en raison du risque carcinogène d'un de ses métabolite (la p-chloroaniline) ^(93,95)

Enfin, son utilisation la plus courante reste dans la désinfection des mains et de la peau.

Son usage pour la désinfection péri-orbitale est cependant déconseillée en raison de la concentration potentiellement toxique pour la cornée avec un risque de kératopathie grave avec néo-vascularisation.

Des exemples de kératite amibienne et de néo-vascularisation de la cornée sont visibles dans la figure 32.



Kératite amibienne sévère sous lentille



Neo-vascularisation de la cornée

Figure 32 : Kératite amibienne et néo-vascularisation cornéenne ^(92,96)

3.2.3.4. Les alcools

La formule de base des alcools est R-OH.

Il s'agit de composé organique dont un des atomes de carbone est lié à un groupe hydroxyle (OH).

Les seuls alcools utilisés comme conservateurs dans les formulations ophtalmiques sont le Chlorobutanol et le Phényléthanol (voir tableau 4).

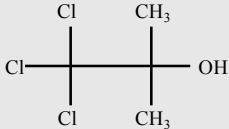
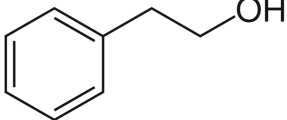
Formule chimique développée	Nom	Formule chimique brute
	Chlorobutanol	C ₄ H ₇ Cl ₃ O
	Phényléthanol	C ₈ H ₁₀ O

Tableau 4 : Alcools utilisés comme conservateurs dans les collyres ^(97,98)

Le chlorobutanol est obtenu par simple addition de chloroforme et d'acétone (voir figure 33) et se présente sous la forme d'une poudre blanche brillante à l'odeur camphrée.

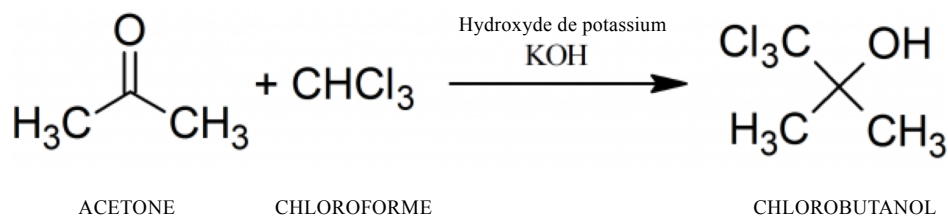


Figure 33 : Synthèse du Chlorobutanol ⁽⁹⁹⁾

Concernant le phényléthanol, la forme utilisée comme conservateur dans les collyres est le 2-Phényléthanol.

Il est naturellement présent dans certaines plantes comme la rose, la fleur de Pandanus (espèce tropicale principalement présente en Polynésie), l'amande ou l'huile d'ylang-ylang.

Ce composé ayant une odeur de rose et un goût amer à légèrement sucré, il est souvent utilisé comme arôme, tant dans l'industrie agroalimentaire que dans les cosmétiques.

Le 2-Phényléthanol naturel est principalement extrait des pétales de rose mais ce processus nécessite une grande quantité de matière première et présente un coût élevé. De plus, les paramètres tels que la saisonnalité, la météo, le temps de pousse des plantes ou les maladies sont des facteurs difficilement maîtrisables pour les industriels.

C'est pourquoi plusieurs méthodes chimiques ont été mises en place pour permettre la synthèse du 2-Phényléthanol.

La figure 34 montre une des méthodes possibles, simple et peu coûteuse consiste à faire réagir du benzène en présence de pyridine pour obtenir un bromobenzène.

Ce bromobenzène est mis en réaction avec un magnésium et un éther pour donner du bromure de phénylmagnésium.

L'autre réactif, l'éthylène, a été synthétisé à partir d'éthanol pour donner le 1,2-dibromoéthane.

Par réaction entre le bromure de phénylmagnésium et le 1,2-dibromoéthane, on obtient du 2-phénylbromoéthane.

Ce 2-phénylbromoéthane en présence d'hydroxyde de sodium avec pour solvant l'acétone va donner du 2-phényléthanol. ^(98,100)

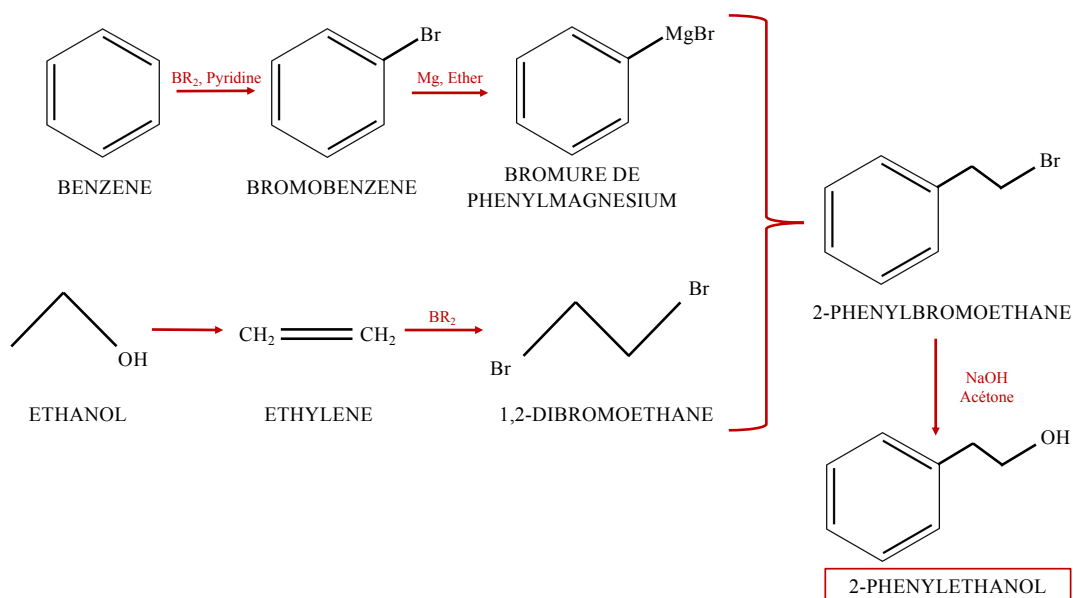


Figure 34 : Synthèse du Phényléthanol (100)

Propriétés du chlorobutanol et mode d'action : (97,101,102)

Le chlorobutanol possède une activité antimicrobienne de par sa capacité à traverser la membrane lipidique. Il va agir en augmentant la solubilité lipidique de la cellule entraînant une augmentation de la solubilité membranaire.

Il est bactériostatique et antifongique aux concentrations usuelles comprises entre 0,2 et 0,5 %.

Le chlorobutanol est actif à la fois sur les bactéries Gram+ et Gram- comme *Pseudomas aeruginosa* et *Candida albicans*.

En dehors de son activité antimicrobienne, le chlorobutanol possède également une faible activité anesthésique locale qui peut s'avérer d'une certaine utilité dans les collyres pour éviter les instillations douloureuses. Il possède également une activité sédatrice voir hypnotique mais il est cependant rarement utilisé en tant que sédatif à cause de sa demi-vie très longue (37 jours) pouvant être à l'origine d'une accumulation néfaste.

Propriétés du phényléthanol et mode d'action :

Le phényléthanol possède une activité bactériostatique à de faibles concentrations et bactéricide à de fortes concentrations.

Il est actif à des concentrations similaires à la fois sur les bactéries Gram+ et Gram- et va agir en augmentant la solubilité membranaire à des concentrations bactériostatiques et une fuite massive des ions potassium à des concentrations bactéricides. (46)

Le phényléthanol en lui-même possède cependant une faible activité antimicrobienne.

Il est plutôt utilisé en association avec d'autres conservateurs comme la chlorhexidine, le chlorure de benzalkonium ou encore le chlorobutanol dont il va potentialiser l'effet par son action synergique.

Le tableau 5 récapitule l'ensemble des conservateurs ancienne génération.

Famille	Noms	Activité	Mécanisme d'action
AMMONIUMS QUATERNAIRES	Chlorure de benzalkonium Bromure de cétrimonium Chlorure de cétylpyridinium Bromure de benzododécinium	Bactéricides Plutôt Gram + Action sur Gram – augmentée par association avec EDTA Fongicides	Cible : bicouche phospholipidique Faibles doses : perte de l'osmorégulation et fuite de potassium Doses intermédiaires : perturbation de la respiration membranaire, du transport de solutés et de la synthèse protéique Fortes doses : rupture membranaire et déversement du contenu cytoplasmique dans l'environnement
DERIVES ORGANOMERCURIELS	Phénylmercures Mercurbutol Thiomersal Merbromine	Bactériostatiques Fongostatiques	Cible : molécules possédant un atome de soufre (enzymes) par leur activité thiolo-prive = précipitation sous forme de protéinates de mercure
AMIDINES	Chlorhêxidine	Bactéricide Efficacité supérieure sur cocci et bacilles Gram+ Fongostatique	Cible : molécules membranaires chargées négativement Faibles doses : altération de la membrane, fuite du contenu cellulaire et inhibition des enzymes (transport ou ATPase) Fortes doses : paroi intacte mais coagulation des protéines et acide nucléique cytoplasmiques
ALCOOLS	Chlorobutanol Phényléthanol	Bactériostatiques et antifongiques aux doses usuelles Action synergique avec d'autres conservateurs	Cible : membrane lipidique par augmentation de la solubilité membranaire

Tableau 5 : Récapitulatif des conservateurs ancienne génération

3.3. LES METHODES DE DETECTION DE LA TOXICITE D'UN CONSERVATEUR POUR L'OEIL ⁽¹⁰³⁾

Bien que de nombreuses techniques, *in vitro* ou *in vivo*, peuvent être utilisées pour observer la toxicité d'un conservateur, nous allons nous intéresser dans ce paragraphe aux principales.

Chacune de ces méthodes va permettre de mettre en évidence les potentiels effets secondaires suivants :

- Les tests sur les animaux : le pouvoir irritant
- La mesure de la perméabilité membranaire : l'érosion cornéenne
- Les analyses morphologiques : les dystrophies, les déperditions ou les altérations des composants des cellules endothéliales
- Les mesures électrophysiologiques : les neuropathies

3.3.1. LES TESTS SUR LES ANIMAUX ^(103,104)

Il s'agit d'une des méthodes classiques utilisée pour évaluer l'effet toxique et notamment irritant sur l'œil, qui se fait généralement via des tests sur les lapins albinos.

En effet, même si les réactions du sujet sont moins proches de l'homme que celles d'un chat, d'un chien ou d'un primate, la facilité d'élevage en laboratoire, le coût et l'uniformité génétique, associés à la large surface d'exposition oculaire et l'absence de pigmentations facilitant les observations et interprétations, le lapin albinos est le sujet le plus adapté.

La méthode de référence longtemps recommandée par la FDA fut le test de Draize.

Il s'agit d'un test se déroulant sur 28 jours, avec trois semaines d'application topique sur l'œil du lapin, puis une semaine d'observations et enfin sacrifice de l'animal avec une étude histologique.

Des tests réalisés sur le primate ont mis évidence les résultats suivants : une instillation de chlorure de benzalkonium à 10 % provoque des dommages importants suivis par une guérison lente mais complète en 21 jours.

Lors de l'instillation, la réaction immédiate est un œdème modéré à sévère et un érythème de la conjonctive palpébrale, un écoulement modéré et un certain trouble de la cornée.

3.3.2. LA MESURE DE LA PERMEABILITE CORNEENNE

En clinique, on va mettre en évidence l'abrasion de la cornée induite et donc la modification de perméabilité cornéenne par un test utilisant un colorant appelé fluorescéine (voir figure 35).

En effet, la surface épithéliale de la cornée présente des charges négatives et un caractère lipophile favorisant l'interaction avec les molécules cationiques et faisant obstacle à la pénétration des molécules hydrophiles.

La fluorescéine est une molécule anionique relativement hydrophile qui possède donc une pénétration limitée dans un épithélium cornéen sain.

Cependant, lors d'une érosion cornéenne, la fluorescéine pénètre plus facilement et va se fixer sur le stroma hydrophile au niveau de la lésion permettant sa mise en évidence par coloration. ^(105,106)

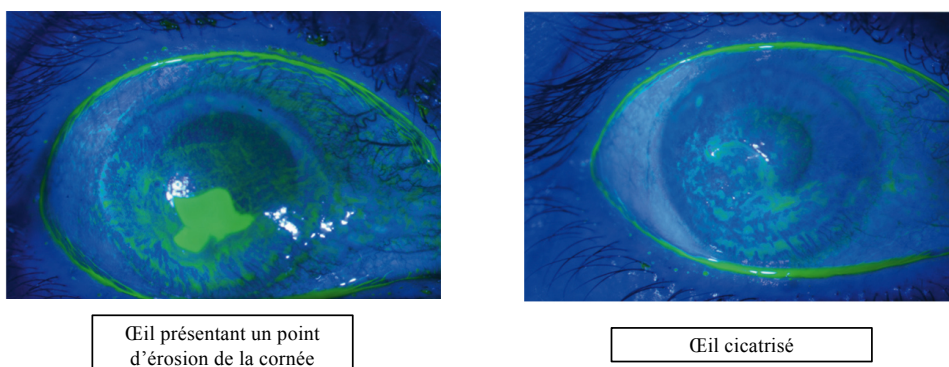


Figure 35 : Test de la Fluorescéine ⁽¹⁰⁷⁾

3.3.3. LES ANALYSES MORPHOLOGIQUES ⁽¹⁰³⁾

3.3.3.1. La microscopie spéculaire

L'analyse morphologique peut se faire à l'aide d'un microscope spéculaire permettant une visualisation directe des cellules épithéliales et endothéliales. En pratique, le microscope spéculaire s'est imposé comme la technique d'évaluation de l'endothélium cornéen.

Cette technique ne permet pas une analyse précise de l'endothélium, ni de mesurer sa densité cellulaire, mais elle permet toutefois d'observer une dystrophie cellulaire ou une importante déperdition cellulaire, en lien avec la cytotoxicité endothéliale potentielle d'un produit.

Ci-dessous, le principe du microscope spéculaire dont le nom dérive du latin « speculum » signifiant « miroir ».

Cette technique est basée sur l'observation de la lumière réfléchiée par l'endothélium à la manière d'un miroir et la formation d'une image endothéliale par réflexion spéculaire.

A l'aide d'une lampe à fente, on éclaire fortement l'épithélium par une lumière incidente qui arrive obliquement sur la cornée selon un angle d'environ 50° et après des réflexions successives produites par la traversée de différentes interfaces, on obtient une image de l'endothélium avoisinant la zone d'éblouissement.

Deux techniques existent : ⁽¹⁰⁸⁾

- La microscopie spéculaire sans contact cornéen qui est la technique de base, la plus simple à mettre en place mais qui ne permet qu'une observation en champ étroit et d'une surface limitée de la cornée.
- La microscopie spéculaire avec contact cornéen qui permet une observation en grand champ.

3.3.3.2. La microscopie électronique en transmission

Les observations morphologiques peuvent également être faites à partir d'un TEM (microscope électronique en transmission ou Transmission Electron Microscopy).

Contrairement à l'observation histologique qui nécessite une dégénérescence ou une altération cellulaire pour déterminer la toxicité d'un produit, le TEM va permettre une analyse de l'ultrastructure des cellules.

En effet, celui-ci va permettre d'observer des objets plus petits que la cellule et donc directement les altérations des composants cellulaires tels que les mitochondries, les microfilaments, les réticulum endoplasmiques ou les jonctions cellulaires par exemple.

La TEM utilise un faisceau d'électrons à haute tension émis par un canon à électrons pour mettre un échantillon en image.

Des lentilles électromagnétiques vont focaliser le faisceau d'électrons et les atomes traversés vont produire différentes sortes de rayonnements. ^(109,110)

3.3.3.3. La microscopie électronique à balayage

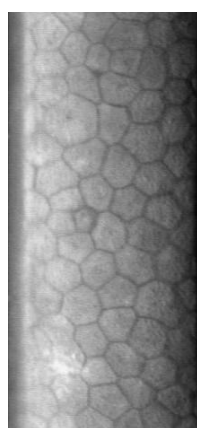
La SEM (microscopie électronique à balayage ou Scanning Electron Microscopy) est basée sur le même principe que la TEM avec un faisceau d'électrons à haute tension émis par un canon à électrons.

La différence réside dans le fait que les rayonnements observés ne seront pas les rayonnements transmis au travers de l'échantillon mais ceux renvoyés.

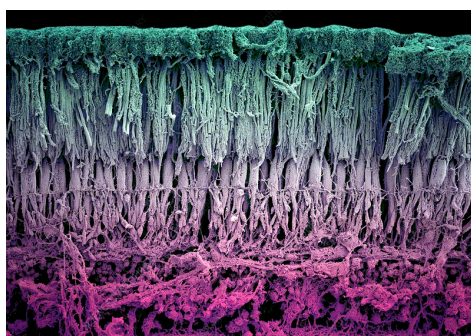
On obtient ainsi une image en trois dimensions de la surface de l'échantillon. On va pouvoir ainsi observer des structures telles que des couches de desquamations, un détachement anormal des cellules endothéliales ou évaluer l'aspect normal ou anormal de toute structure observable.

Il est à noter que la TEM et la SEM sont des techniques nécessitant la préparation d'échantillons et donc utilisables *in vitro* et non *in vivo*.

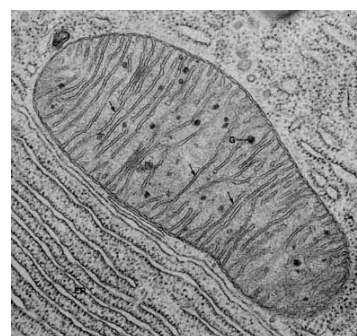
La figure 36 représente les trois types d'images observées par microscopie spéculaire, TEM et SEM.



Endothélium cornéen
par microscopie spéculaire



Couches de la rétine par SEM



Mitochondrie par TEM

Figure 36 : Microscopie Spéculaire, TEM et SEM (111-113)

3.3.4. LES MESURES ELECTROPHYSIOLOGIQUES (114-117)

Comme tous les organes du corps humain, l'œil génère des signaux électriques qui ne sont pas strictement des courants électriques au sens d'une circulation d'électrons dans un conducteur comme le cuivre mais il s'agit de courants ioniques correspondant à une circulation d'ions.

L'œil se comporte au final comme un dipôle électrique dont le pôle positif est situé à l'avant (vers l'extérieur au niveau de la cornée) et le pôle négatif à l'arrière de l'œil.

Le principe sera donc de mesurer les variations des potentiels électriques de l'œil lors d'un examen comme électrorétinogramme (ERG) ou l'électro-oculogramme (EOG) afin de mettre en évidence un éventuel disfonctionnement.

Pour se faire, les signaux électriques sont recueillis à l'aide d'électrodes placées à la surface du corps au voisinage de l'œil et après avoir soumis le patient à différents signaux lumineux on pourra déceler une neuropathie optique inflammatoire, toxique ou dégénérative.

4. CONCLUSION

Dans cette seconde partie, nous avons définis ce qu'est un collyre et nous avons mis en évidence la composition de base ainsi que les propriétés requises.

Nous avons également fait un bilan sur les conservateurs classiquement utilisés dans cette forme galénique en développant leurs propriétés physico-chimiques et leurs principaux modes d'action.

Malgré un éventail de choix de conservateurs d'apparence assez large, la grande majorité d'entre eux ont été délaissés dans les formulations des collyres en raison de leurs effets secondaires importants.

Au fil des années, les industriels se sont très majoritairement tournés vers le chlorure de benzalkonium pour en faire le conservateur le plus utilisé sur le marché.

C'est la raison pour laquelle nous allons maintenant nous y intéresser.

***Chapitre III : LE CHLORURE DE BENZALKONIUM ET
ALTERNATIVES***

Dans cette troisième et dernière partie nous développerons plus en détail les caractéristiques ainsi que les conséquences de l'utilisation d'un des conservateurs les plus utilisés dans la voie ophtalmique à l'heure actuelle : le chlorure de benzalkonium (BAC).

En effet, si l'on fait un bilan des conservateurs encore utilisés sur le marché à l'heure actuelle, la très grande majorité a été abandonnée ou est en cours de disparition, au profit du BAC ou des formulations sans conservateur.

C'est pourquoi, le choix de s'intéresser au BAC s'est imposé.

Cette partie sera conclue par des alternatives possibles à celui-ci ainsi qu'à l'utilisation des conservateurs de façon générale dans la voie ophtalmique.

1. CARACTERISTIQUES GENERALES DU BAC ^(57,118)

Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, le BAC appartient à la famille des ammoniums quaternaires.

Il pourrait cependant être lui-même considéré comme un nom désignant une sous famille, puisqu'il s'agit en réalité d'un mélange de Chlorures d'alkylbenzyl diméthylammonium de formule générale $C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$ où le groupement R est un radical alkyl qui peut aller de 8 à 18 carbones ⁽¹¹⁹⁾ :

- BAC-C8 : Chlorure de Benzyl diméthyl octyl ammonium
- BAC-C10 : Chlorure de Benzyl diméthyl décyl ammonium
- BAC-C12 : Chlorure de Benzyl diméthyl dodécyl ammonium
- BAC-14 : Chlorure de Benzyl diméthyl tétradécyl ammonium ou Chlorure de Myristalkonium
- BAC-C16 : Chlorure de Benzyl diméthyl hexadécyl ammonium ou Chlorure de Cétalkonium
- BAC-C18 : Chlorure de Benzyl diméthyl octadécyl ammonium

La composition du mélange final va dépendre du procédé de fabrication et notamment de l'amine tertiaire de départ utilisée pour sa synthèse.

L'appellation « chlorure de benzalkonium » est principalement utilisée dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique et regroupe l'ensemble de ces dérivés que l'on peut également appeler « composés d'ammonium quaternaire alkyl en C₈₋₁₈ benzyl diméthyles, chlorures ».

Cependant, la majorité des composés utilisés sont ceux comportant une chaîne de C₁₂ à C₁₈ et plus majoritairement ceux en C₁₂ et C₁₄.

Le BAC présente un intérêt pour ses propriétés tensio-actives et biocide puisqu'il est bactériostatique à bactéricide (selon la concentration), fongicide et algicide.

1.1. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU BAC

Il se présente sous forme de poudre amorphe, de paillettes gélatineuses ou de gel épais de couleur blanche à jaunâtre et légèrement aromatique.

Il est très soluble dans l'eau, l'alcool et l'acétone mais il est très légèrement soluble dans le benzène et pratiquement insoluble dans l'éther.

Les solutions aqueuses contenant du BAC ont une faible tension de surface et vont mousser lorsqu'elles sont agitées.

En effet, il s'agit d'un tensioactif (également appelé agent de surface ou surfactant) qui va donc modifier la tension qu'il existe à la surface de séparation entre deux milieux non miscibles et permettre ainsi leur solubilisation.

Les tensioactifs présentent donc deux parties de polarités différentes leur conférant leur propriété. Ils ont une partie dite apolaire et donc lipophile et une partie dite polaire et donc hydrophile.

Pour le BAC, il s'agit d'un tensioactif cationique, c'est-à-dire que sa partie hydrophile est chargée positivement (NH_4^+).

Il possède une concentration micellaire critique à 0,02 %, c'est-à-dire qu'au-delà de cette concentration, les molécules dispersées grâce à cette action tensioactive vont en partie se regrouper sous forme de micelles.

Comme il s'agit d'un mélange de plusieurs composés certaines caractéristiques sont légèrement variables comme son point de fusion (entre 29 et 34°C) et son pH (de 6 à 8).

Dans des conditions normales, il s'agit d'un produit stable qui se décompose au-delà de 150°C.

Lors de sa combustion, il va dégager des composés dangereux comme le chlorure d'hydrogène, des oxydes d'azote ou des oxydes de carbone.

Il corrode les métaux classiques et présente un risque d'incendie et d'explosion s'il est mis en contact avec des oxydants puissants.

1.2. PHARMACOCINETIQUE DU BAC

Chez l'animal, en cas d'ingestion, il est rapidement absorbé en faible quantité au niveau du tractus gastro-intestinal. Au niveau cutané, il est peu absorbé.

Il diffuse ensuite dans le foie, les poumons et les reins où on observe une concentration 10 fois supérieure à celle du sang, laissant penser qu'il s'agit d'organes cibles et de réservoirs.

La demi-vie du BAC est de 1h30 à 2h, il n'est pas métabolisé et est éliminé lentement dans les urines et les fèces.

1.3. TOXICITE DU BAC

En cas d'intoxication aiguë, c'est l'action corrosive du produit qui domine avec une sensation de brûlure immédiate. Il est nocif par voie orale, provoque une atteinte musculaire et une dépression du système nerveux central pouvant conduire à des convulsions et un arrêt respiratoire fatal. On peut également observer une hypotension, une insuffisance rénale et une cytolysé hépatique.

Il est également corrosif pour la peau, les muqueuses, ou par inhalation. Des solutions concentrées (à partir d'une concentration de 10 %), sont irritantes pour la peau et peuvent entraîner une nécrose. Enfin, il est sévèrement irritant pour l'œil, provoquant des conjonctivites pour des concentrations de 0,1 à 0,5 %, voire une atteinte grave de la cornée à partir de 10 %.

Lors d'intoxications chroniques, ce sont les réactions allergiques cutanées et respiratoires qui prédominent avec de rares cas d'asthme réactionnel notamment lors de l'utilisation de désinfectants par pulvérisation. Il est irritant pour les muqueuses et toxique pour le rein, le foie et les poumons.

Selon sa fiche toxicologique, le BAC ne présente pas d'effet cancérigène ni mutagène sur les animaux.

Le test d'Ames sur *Salmonella typhimurium*, le test d'électrophorèse sur gel d'ADN d'hépatocytes de rats, et le test du micronoyau sur lymphocytes humains et sur des cellules de racine de *Vicia faba*, ont mis en évidence un effet génotoxique modéré mais significatif chez les cellules eucaryotes. ⁽¹²⁰⁾

D'autres tests ont mis en évidence des effets cytotoxiques et génotoxiques du BAC sur des cellules respiratoires humaines en culture après 2h d'exposition à des concentrations comprises entre 0,002 et 0,05 %. Cet effet cytotoxique s'est révélé croissant en fonction de la concentration avec une valeur maximale à 0,02 % puis décroissant aux concentrations supérieures, sûrement lié à la concentration micellaire critique de 0,02 % citée précédemment. ⁽¹²¹⁾

Concernant ses effets sur la reproduction, il n'est pas tératogène mais il est embryotoxique en intra-vaginal chez le rat selon sa fiche toxicologique.

2. PROPRIETES ET MECANISMES D'ACTION DU BAC ⁽¹²²⁻¹²⁴⁾

Il va avoir une activité antibactérienne selon plusieurs mécanismes d'action :

- Il va dénaturer de façon plus ou moins sélective les protéines ou les enzymes bactériennes par solubilisation ou dépolymérisation. Il en résulte une inactivation notamment des déshydrogénases ou des enzymes intervenant dans la respiration et la glycolyse. Cette inactivation est réversible mais devient définitive après un contact prolongé.
- Il peut se fixer sur les ribosomes, entraînant un arrêt de la synthèse protéique.
- Par adsorption sur la membrane cellulaire des cellules chargées, il peut provoquer une perturbation des échanges osmotiques, entraînant un changement de perméabilité et des lésions membranaires. Ceci aboutit à une baisse de l'activité mitotique, une altération du potentiel électrique et même une lyse cellulaire.

Comme nous avons pu le voir précédemment, le BAC est un agent tensioactif cationique qui possède une activité bactériostatique voir bactéricide à de faibles concentrations (0,1 à 0,2 %) avec un large spectre contre les bactéries Gram+ et Gram- mais avec une prédominance sur les Gram+.

Il est faiblement fongistatique et virucide mais il est inactif contre les mycobactéries.

Pour rappel, les mycobactéries sont des bacilles aérobies appartenant au genre *Mycobacterium* dont la paroi possède une composition particulière riche en cire (acide mycolique) qui leur confère une grande résistance aux antiseptiques et certains antibiotiques.

Ces différentes propriétés vont en réalité dépendre de l'homologue et donc de la longueur de la chaîne alkyle.

L'action antiseptique va être maximale pour les composés en C₁₄ et minimale pour les composés en C₈ et C₁₈. ⁽¹²⁵⁾

L'homologue C₁₂ va être plus efficace sur les levures ou champignons, le C₁₄ sur les bactéries Gram+ et le C₁₆ sur les bactéries Gram-. ⁽¹²⁶⁾

Cependant, à l'heure actuelle, le BAC utilisé dans les collyres est un mélange qui n'est pas précisé par le fabricant mais comme nous l'avons vu précédemment, les industriels favorisent l'utilisation des homologues en C₁₂ et C₁₄.

Des études ont d'ailleurs été réalisées pour déterminer la composition de ces mélanges en utilisant notamment l'électrophorèse capillaire couplée à un spectromètre de masse.

Avec ce genre de méthode, les différents éléments vont non seulement être séparés en phase liquide en fonction de leur charge sous l'influence d'un champ électrique comme dans une électrophorèse classique, mais ils vont également être séparés en fonction de leur taille par passage au travers d'un capillaire.

Le spectromètre de masse va quant à lui les séparer en phase gazeuse en fonction de leur rapport masse/charge.

Le couplage de ces deux méthodes permet ainsi une identification directe et une évaluation des pourcentages de concentrations relatives dans l'échantillon. ⁽¹²⁷⁾

L'activité biocide va également être favorisée par des facteurs comme le pH légèrement alcalin ou la température de 37°C mais son action sera annulée par les composés anioniques comme les savons, les eaux calcaires et les matières organiques comme le sang ou le pus.

3. UTILISATION DU BAC HORS OPHTALMOLOGIE : CONSEQUENCES ET TOXICITE

Son activité biocide et surfactante présente un intérêt pour les industriels au-delà de celui de son utilisation comme conservateur dans les collyres.

On le retrouve ainsi dans de nombreux domaines comme l'hygiène humaine ou animal, comme agent de traitement antimousse des toitures ou dalles, algicide pour les piscines ou circuits d'eau, en taxidermie, comme produit anti-biofilm, spermicide, agent de nettoyage ménager et industriel...

3.1. UTILISATION COMME CONSERVATEUR DANS LES DECONGESTIONNANTS TOPIQUES ^(57,128-133)

Des études ont mis en évidence la toxicité de l'utilisation chronique de produits décongestionnants possédant dans leur formule du BAC avec pour conséquence une rhinite médicamenteuse.

Les rhinites médicamenteuses, aussi appelées rhinites iatrogènes, est un type de rhinite chronique c'est-à-dire une atteinte non mécanique chronique (au moins 12 semaines par an, consécutives ou non) des structures nasales (muqueuse et éléments associés) à l'exclusion des atteintes infectieuses des structures sinusiennes.

Des études comparatives de l'influence sur la fréquence des battements ciliaires de cellules épithéliales nasales humaines de 5 conservateurs utilisés dans les formulations de décongestionnants nasaux ont été réalisées.

Ces conservateurs que sont le BAC, l'alcool phényléthylique, le méthylparaben, le propylparaben et le chlorbutol, ont été étudiés pour une exposition de courte durée et une exposition à long terme.

Les résultats de ces études sont les suivants :

- Pour les concentrations usuelles de méthylparaben (0,0033 %), de propylparaben (0,0017 %) et de chlorbutol (0,005 %), aucun effet n'a été mis en évidence pour une exposition tant sur le court terme que sur le long terme.
- Par contre, une exposition à long terme à l'alcool phényléthylique (0,125 %), à l'association de méthyl/propylparaben (0,033/0,017 %) ou au BAC (0,001 %) a diminué significativement la fréquence des battements ciliaires.

De plus, pour le BAC, cette diminution de la fréquence de battements ciliaires s'est révélée irréversible et sa toxicité a été confirmée *in vitro*.

Le BAC va donc être responsable de la diminution de la clearance ciliaire, mais également de la modification histologique de la muqueuse nasale et de la sélection de germes comme *Pseudomas aeruginosa* ou *Staphylococcus*.
(133)

De ce fait, l'utilisation chronique de spécialités de la voie nasale contenant dans leur formule du BAC est potentiellement génératrice de rhinite iatrogène.

Le tableau 6 récapitule les médicaments de la voie nasale ainsi que la présence ou l'absence de BAC dans leur formulation.

Classe de médicaments	DCI	Nom de spécialité	Présence de Benzalkonium
Vasoconstricteurs	Ephédrine	Rhinamide	Oui
	Naphazoline + Prednisolone	Derinox	Non
	Oxymétazoline	Aturgyl	Oui
	Oxymétazoline + Prednisolone	Deturgylone	Oui
	Phényléphrine	Humoxal	Oui
	Tuaminoheptare	Rhinofluimucil	Oui
	Glucocorticoïdes	Béclométasone	Beconase, Rhinomaxil
Budésonide		Rhinocort	Non
Fluticasone		Avamys, Flixonase	Oui
Flunisolide		Nasalide	Oui
Mométasone		Nasonex	Oui
Tixocortol		Pivalone	Non
Triamcinolone		Nasacort	Oui
Anti H1		Azélastine	Allergodil
Anticholinergiques	Bromure d'Ipratropium	Atrovent	Oui
Cromones	Acide cromoglicique	Cromorhinol	Non

Tableau 6 : Médicaments de la voie nasale contenant ou non du BAC (133)

3.2. UTILISATION POUR SES PROPRIETES SPERMICIDES

Le BAC possède également une activité spermicide et va provoquer la rupture de la membrane du spermatozoïde par déséquilibre osmotique dû à son pouvoir surfactant. On aura d'abord la destruction du flagelle, puis l'éclatement de la tête aboutissant à la destruction totale du spermatozoïde.

Il est donc présent dans la composition de certains médicaments contraceptifs locaux.

Son efficacité théorique est de l'ordre de 100 % puisqu'il est efficace même à l'état de traces. ^(57,134)

3.3. L'UTILISATION DU BAC DANS L'INDUSTRIE : UN PROBLEME DE SANTE PUBLIQUE ?

Comme nous avons pu l'évoquer précédemment, les propriétés du BAC en ont fait un produit très répandu tant dans l'industrie pharmaceutique, que chimique, cosmétique ou agro-alimentaire.

Cependant, son utilisation, au même titre que celle des ammoniums quaternaires de façon plus générale n'est pas sans conséquences.

En effet, plusieurs études ont mis en évidence des impacts dont les répercussions dépassent le cadre de la simple pathologie induite au niveau individuel.

3.3.1. UN RISQUE DE RESISTANCES CROISEES ^(57,135)

Les ammoniums quaternaires, seraient selon plusieurs chercheurs, à l'origine du développement de résistances de certaines bactéries, tant Gram+ que Gram-.

Ces résistances sont dites « résistances croisées » c'est-à-dire que la méthode développée par la bactérie pour survivre à l'action des ammoniums quaternaires pourrait également être efficace contre des antibiotiques ou d'autres antiseptiques.

3.3.1.1. La résistance intrinsèque

Comme nous avons pu le voir précédemment, les ammoniums quaternaires sont plus efficaces sur les bactéries Gram+ que sur les bactéries Gram- qui possèdent donc ce que l'on appelle une résistance intrinsèque. C'est par exemple le cas pour *Pseudomonas aeruginosa* qui montre une résistance intrinsèque pour des taux élevés d'ammoniums quaternaires.

Cette résistance est due à sa membrane cellulaire, principale cible du mode d'action des ammoniums quaternaires, qui présente une faible perméabilité et également à la présence de pompes d'efflux qui vont expulser l'agent antimicrobien en dehors de la cellule.

3.3.1.2. La résistance acquise

La fréquente utilisation des ammoniums quaternaires comme désinfectants dans l'environnement agro-alimentaire notamment, peuvent également provoquer des changements phénotypiques chez *Pseudomonas aeruginosa*, faisant craindre l'émergence de résistances. C'est ce que l'on appelle une résistance acquise.

Ce risque de résistance acquise est d'autant plus élevé si ces bactéries sont exposées à des doses non létales répétitives lors de désinfections inadaptées.

Ces changements phénotypiques sont principalement des changements qui se font au niveau de la membrane des bactéries avec des modifications des protéines membranaires, des acides gras, des polysaccharides, de la perméabilité...

Dans les modifications des protéines membranaires induites par les changements phénotypiques, celles qui entrent en jeu dans les systèmes d'efflux sont particulièrement importantes pour le développement de résistances croisées aux antibiotiques.

En effet, ces systèmes d'efflux sont des transporteurs membranaires qui vont rejeter à l'extérieur de la cellule des composés toxiques.

Le plus connu et le plus important est le transporteur Multi-Drug Resistant (MDR), qui présente un spectre d'action très large.

Ces systèmes d'efflux vont pouvoir être surexprimés suite à des mutations génétiques chez certains individus leur conférant une plus grande résistance aux biocides, et notamment aux antibiotiques.

Le risque résulte principalement dans l'apparition de mutants hautement résistants.

Une étude réalisée sur un prélèvement de la flore bactérienne d'une femme de ménage ayant utilisé des produits contenant des ammoniums quaternaires pendant des années comparée à celle d'une personne n'en utilisant pas, a mis en évidence une augmentation de la CMI et donc une plus grande résistance des bactéries de sa flore aux antibiotiques. ⁽¹³⁶⁾

3.3.1.3. La sélection de super-bactéries

Au-delà de cette résistance aux antibiotiques, il a été démontré que l'augmentation de l'efflux, associée à d'autres modifications phénotypiques,

induisent non seulement une résistance aux antibiotiques mais également une meilleure condition physique pour les bactéries.

Nous sommes dès lors face à un risque de sélection de super-bactéries.

Les recherches s'orientent donc à l'heure actuelle vers des inhibiteurs des pompes à efflux pour permettre la restauration de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries.

3.3.1.4. Exemple de résistance au BAC

Pour le BAC, des études ont été menées chez *Listeria monocytogène*, mettant en évidence des résistances faisant entrer en jeux ces mécanismes d'efflux.

Deux pompes d'efflux ont été trouvées :

- La pompe MDR L capable d'expulser des antibiotiques comme les macrolides ou la céfotaxime, des métaux lourds et le bromure d'ethidium
- La pompe LDE, qui va agir sur les fluoroquinolones, l'acridine d'orange ou le bromure d'éthidium.

Les souches de *Listeria monocytogènes* sont normalement naturellement sensibles aux ammonium quaternaires (CMI < 1 mg/L) mais celles-ci sont capables de s'adapter en deux à trois semaines avec une augmentation de deux à quatre fois de la CMI aux antibiotiques et aux désinfectants et ceci notamment via la surexpression de la pompe MDR L.

Pour des bactéries comme *Escherichia coli*, l'adaptation progressive au BAC a multiplié la CMI par sept à huit fois sa valeur initiale.

3.3.2. L'IMPACT SUR L'ENVIRONNEMENT ⁽¹³⁷⁻¹³⁹⁾

La large utilisation du BAC dans les produits désinfectants ou comme surfactant dans beaucoup d'industries, couplé à la grande difficulté à traiter les tensioactifs dans les eaux usées ⁽¹⁴⁰⁾, en fait un produit largement retrouvé dans l'environnement et ceci principalement dans les eaux de surface.

Cependant, au-delà des problèmes déjà évoqués, celui-ci présente une forte toxicité même à faible concentration pour la faune et la flore aquatique. ⁽¹⁴¹⁾

Comme pour la détermination des formules des mélanges de BAC dans les collyres, la méthode d'électrophorèse capillaire couplée à un spectromètre de masse peut être utilisée pour déterminer les différents homologues présents dans un échantillon d'eau de surface ainsi que leur concentration. ⁽¹²⁷⁾

Trois paramètres de référence doivent être déterminés pour évaluer l'impact d'un produit sur l'environnement : la toxicité inhérente, la bioaccumulation potentielle et la persistance.

3.3.2.1. La toxicité inhérente

Elle est principalement déterminée par les doses létales 50 (LC50) à savoir les concentrations provoquant 50 % de mortalité chez les espèces étudiées.

Par exemple, elles sont les suivantes pour les poissons d'eau douce :

- *Poecilia reticulata* = 1,3 mg/L, 96h semi-statique
- *Oryzias latipes* = 2,4 mg/L, 96h semi-statique
- *Lepomis macrochirus* = 0,223 - 0,46 mg/L, 96h statique
- *Oncorhynchus mykiss* = 0,823 - 1,61 mg/L, 96h statique

Pour *Photobacterium phosphoreum* qui est une bactérie aquatique souvent associée aux poissons, la concentration efficace 50 (EC50) à savoir la concentration donnant 50 % de réduction de prolifération est de 0,6 mg/L en 15 min à 15 °C.

3.3.2.2. La bioaccumulation

Le facteur de bioconcentration ou FBC est le résultat d'une équation qui traduit un bilan de masse entre apport et élimination d'un élément par un organisme.

Il y a bioaccumulation lorsque les apports de contaminants à l'organisme dépassent les quantités éliminées.

Pour la bioconcentration, seule entre en compte l'accumulation par un organisme d'un contaminant à partir de l'eau, par la respiration ou par contact direct avec la peau.

Pour la bioaccumulation, il s'agit de l'accumulation d'une substance à partir de l'eau et de la nourriture.

Au final, le FBC est donc le ratio, à l'état d'équilibre, entre la concentration en contaminant dans l'organisme sur la concentration en contaminant dissous dans l'eau. ^(142,143)

La bioaccumulation du BAC est peu probable puisque son facteur de bioconcentration est inférieur à 100. ⁽¹⁴⁴⁾

A titre de comparaison, la valeur moyenne de FBC du mercure organique pour les moules est de 2 540. ⁽¹⁴⁵⁾

3.3.2.3. La persistance

Le BAC est facilement miscible dans l'eau ce qui lui confère une forte mobilité dans l'environnement et également dans les sols.

Il est heureusement facilement biodégradable et donc sa persistance est peu probable.

3.4. UTILISATION DANS LES COSMETIQUES

L'utilisation du BAC dans les produits cosmétiques est assez rare mais elle est très réglementée.

Les règles sont définies dans la Directive européenne 76/768/CEE du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux produits cosmétiques modifiée par la Directive 98/62/CE de la Commission du 3 septembre 1998 et par la Directive 2000/6/CE de la Commission du 29 février 2000.

L'intérêt principal sera l'utilisation en tant que conservateur, et les directives limitent sa concentration à 0,1 %.

Lorsqu'il est utilisé dans des produits pour les cheveux destinés à être rincés, la limite autorisée est de 3 %. Cependant, pour les homologues contenant une chaîne inférieure ou égale à C₁₄, et pour toute autre utilisation la limite reste à 0,1 %.

Dans tous les cas, la mention « Éviter le contact avec les yeux » est obligatoire dans tout produit cosmétique contenant du BAC car, comme nous allons le voir dans la partie suivante, les expositions au niveau oculaire ne sont pas sans conséquences.

4. CONSEQUENCES DU BAC EN OPHTALMOLOGIE

L'utilisation répétée et prolongée de préparations ophtalmiques contenant des conservateurs et, a fortiori, du BAC, peut être à l'origine de plusieurs réactions oculaires.

En effet, lors de l'instillation des formes ophtalmiques, les composants et donc les conservateurs vont se retrouver de façon temporaire à de fortes concentrations qui peuvent avoir des effets néfastes.

L'intégrité de la barrière oculaire peut alors être impactée et ceci de façon d'autant plus importante que l'œil est pathologique et donc fragilisé.

La cytotoxicité des conservateurs est le plus souvent cumulative et peut aboutir à des maladies iatrogènes parfois permanentes, particulièrement lorsqu'elles touchent les cellules endothéliales, qui comme nous l'avons vu, présentent une absence de renouvellement cellulaire. ⁽¹⁰³⁾

4.1. LES REACTIONS ALLERGIQUES ⁽⁵⁷⁾

Les réactions de sensibilisation et allergiques aux conservateurs ont tendance à augmenter de par la présence de ces derniers, non seulement dans de nombreuses préparations ophtalmiques, mais également comme nous avons pu le voir dans d'autres produits d'usage courant.

Une étude portée sur 27 patients souffrants de conjonctivites, kérato-conjonctivites ou blépharo-conjonctivites chroniques, a démontré une réaction allergique cutanée aux préparations ophtalmiques dans 44,4 % des cas. De plus, cette étude a également mis en évidence un pouvoir modérément allergisant du BAC dans 3,7 % des cas. ⁽¹⁴⁶⁾

Dans une étude finlandaise similaire, des patchs tests ont été appliqués entre 2002 et 2014 sur 622 patients représentatifs de la population présentant des dermatites périorbitales de contact. Dans ce cas, 11,4 % ont présenté une réaction allergique aux préparations ophtalmiques et 1,6 % plus spécifiquement au BAC. ⁽¹⁴⁷⁾

En réalité, le BAC est plutôt considéré comme un irritant que comme un allergène.

En effet, une étude à grande échelle a été réalisée dans plus de 45 départements de dermatologie en Allemagne, Autriche et Hongrie entre 1996 et 2006 sur 42 898 patients. Une concentration de 0,1 % de BAC a été testée sous trois formes : cutanées, ophtalmiques et les désinfectants. Cette étude a démontré que le BAC est un irritant pouvant provoquer des réactions de sensibilisation et peut dans de rares cas être considéré comme un allergène de contact. ⁽¹⁴⁸⁾

4.2. LES MECANISMES RESPONSABLES DE LA TOXICITE DU BAC

La toxicité d'un conservateur va mettre en jeu plusieurs mécanismes caractéristiques.

4.2.1. PERTURBATION DE LA MEMBRANE CELLULAIRE PAR EFFET DETERGENT ^(57,149)

Comme nous avons pu le voir précédemment, le BAC est un produit non seulement tensio-actif mais possédant également un pouvoir détergent comme la plupart des conservateurs.

Il possède donc une tête hydrophile chargée positivement et une partie hydrophobe non chargée qui permet son ancrage sur les membranes.

Par conséquent, il va fortement perturber la stabilité de la bicouche phospholipidique et créer des ouvertures intracellulaires ou intercellulaires.

Au niveau de l'épithélium cornéen, cet effet détergent va créer une pénétration exagérée de fluide dans le stroma aboutissant à son hydratation et éventuellement au développement d'un œdème cornéen.

Il a en effet été prouvé que le BAC provoque une perturbation dose-dépendante de la membrane plasmique des cellules épithéliales cornéennes et un relâchement des jonctions cellulaires.

Il perturbe l'intégrité de la couche la plus externe de l'épithélium en provoquant la desquamation des couches périphériques (voir figure 37).



Figure 37 : Desquamation de l'épithélium induite par le BAC chez le lapin
(150)

4.2.2. MORT CELLULAIRE PAR NECROSE OU APOPTOSE ⁽⁵⁷⁾

Selon la concentration en ammonium quaternaire et donc en BAC, il a été mis en évidence deux mécanismes de mort cellulaire.

Si la concentration est relativement forte, à savoir entre 0,01 et 0,05 %, le mécanisme de mort cellulaire mis en jeu est celui de la nécrose.

Pour des concentrations plus faibles, on observe un gel de la croissance cellulaire et le mécanisme de mort cellulaire mis en jeux est celui de l'apoptose ou mort programmée.

Rappels sur la nécrose et l'apoptose : ^(151,152)

La nécrose est une mort cellulaire qui aboutit à l'éclatement de la cellule suivi d'une réaction inflammatoire.

En effet, la nécrose est considérée comme une mort cellulaire accidentelle de la cellule suite à un stress, provoquant un gonflement de celle-ci et un éclatement déversant le contenu cellulaire dans le milieu environnant.

Par opposition, l'apoptose ou mort cellulaire programmée est un phénomène hautement régulé ne conduisant pas à une réaction inflammatoire.

On observe dans ce cas une rétraction progressive de la cellule avec une compaction et une marginalisation de la chromatine nucléaire. Le noyau se fragmente et chaque fragment est entouré d'une double enveloppe.

Les éléments cytoplasmiques et nucléaires entourés d'une membrane et appelés corps apoptotiques sont relargués dans le milieu extérieur où ils seront phagocytés.

Au finale, la nécrose est en quelque sorte un phénomène anarchique et désordonné à caractère explosif, tandis que l'apoptose est un processus actif et contrôlé d'implosion cellulaire.

Des études ont été menées sur des cellules épithéliales cornéennes humaines en culture exposées ou non à du BAC à différentes concentrations pendant 10 minutes.

On a ensuite mesuré la concentration d'un marqueur de l'apoptose l'Apo2.7. Les résultats de cette étude sont exprimés dans le tableau 7.

Concentration en Chlorure de Benzalkonium	0 %	0,0001 %	0,001 %	0,01 %
Pourcentage de cellules exprimant d'Apo2.7	0 %	44 %	69 %	89 %

Tableau 7 : Expression du marqueur Apo2.7 en fonction de la concentration en BAC ⁽¹⁵³⁾

D'autres recherches ont également mis en évidence une diminution de la viabilité cellulaire associée à une augmentation du pH et une diminution de 70 % du calcium intracellulaire après une exposition de cellules épithéliales de cornée de lapin à une faible concentration de BAC (0,0001 %). ⁽¹⁵⁴⁾

4.2.3. MORT CELLULAIRE DUE AU STRESS OXYDANT

Les mécanismes de nécroses et apoptoses précédemment cités peuvent en partie être engendrés par la génération d'anion superoxyde suite à une exposition à des collyres contenant des ammoniums quaternaires.

L'anion superoxyde O_2^- est une molécule d'oxygène portant un électron supplémentaire formant un radical libre chargé négativement, de durée de vie extrêmement courte, capable de provoquer des réactions d'oxydation dans les cellules et dans les lipides membranaires.

Il va ainsi provoquer une perte d'intégrité membranaire, corrélée à une nécrose ou une apoptose et potentialiser les réactions inflammatoires.

Une étude a montré par comparaison entre des collyres contenant ou ne contenant pas du BAC, une potentialisation de la génération d'anion superoxyde dans le cas des collyres en contenant. ⁽¹²⁴⁾

4.2.4. POTENTIALISATION D'UNE REACTION D'INFLAMMATION ⁽¹⁵⁵⁾

Une étude a été menée pour évaluer l'impact des conservateurs contenus dans les collyres lors d'une utilisation chronique notamment chez les patients traités par des spécialités anti-glaucomes.

Pour se faire, on a évalué l'impact sur la conjonctive et le trabéculum de 61 patients recevant un traitement en monothérapie ou multi-thérapie anti-glaucome depuis au moins 1 an et les résultats ont été comparés à une étude expérimentale sur des rats exposés pendant 1 mois à une solution de BAC à 0,01 %, une solution Timolol à 0,5 % sans conservateur, une solution de Timolol à 0,05 % contenant 0,01 % de BAC ou une solution de contrôle de chlorure de sodium à 0,9 % sans conservateur. Lors de ces études, plusieurs marqueurs caractéristiques de l'inflammation ont été recherchés.

Concernant l'étude faite sur les patients, une infiltration anormale de cellules inflammatoires a été observée tant au niveau de la conjonctive que du trabéculum associé et ceci de façon particulièrement marquée pour les patients suivant une multi-thérapie anti-glaucome.

Dans la partie expérimentale de l'étude, le timolol sans conservateur a montré moins de toxicité que la solution de timolol contenant un conservateur et que la solution de BAC seul.

De façon concomitante, une infiltration de cellules inflammatoires a été observée dans la conjonctive et dans les tissus plus profonds et ceci de façon très faible pour le timolol sans conservateur mais de façon plus importante et en proportions similaires pour le timolol avec conservateur et le BAC seul. Cette étude a donc mis en évidence que les traitements anti-glaucomes induisent une modification du statut inflammatoire des tissus oculaires et que cette modification est en large proportion due au BAC utilisé comme conservateur.

Cette étude pose donc le problème de l'incidence du BAC sur une utilisation à long terme avec un maintien d'une réaction immuno-inflammatoire sous-jacente pouvant aboutir à une fibrose sous-conjonctivale à long terme.

4.3. LES STRUCTURES OCULAIRES TOUCHÉES

Nous venons de voir les différents mécanismes mis en jeu lors d'une exposition au BAC et induisant une toxicité.

Nous allons maintenant développer plus en détail les structures atteintes.

4.3.1. ATTEINTE DES STRUCTURES OCULAIRES SUPERFICIELLES

4.3.1.1. Altération du film lacrymal ⁽¹⁵⁶⁾

Comme nous avons pu le voir, le film lacrymal joue un rôle important à la fois protecteur et lubrifiant pour l'œil et va permettre de maintenir sa surface parfaitement lisse et transparente.

Ce film lacrymal est composé de trois couches et il est maintenu en place par ses deux couches périphériques :

- Au niveau de sa couche interne, appelée couche muqueuse, en contact avec la cornée et qui maintient le film par la présence de mucus.
- Au niveau de sa couche externe, appelée couche lipidique, en contact avec l'extérieur qui est une fine couche huileuse limitant l'évaporation de l'eau.
- Entre ces deux couches périphériques se situe la couche aqueuse

Le BAC étant un conservateur détergent, il va dissoudre cette fine couche lipidique externe du film lacrymal et on pourra observer une accélération de l'évaporation de l'eau.

De façon similaire, le BAC va toucher le mucus adsorbé sur l'épithélium cornéen au niveau de la couche interne, augmentant ainsi la tension de surface et aboutissant à une rupture du film lacrymal et une rétraction de ce dernier laissant des zones sèches.

Le film lacrymal ne jouera donc plus son rôle et on observera une sécheresse oculaire (voir figure 38).

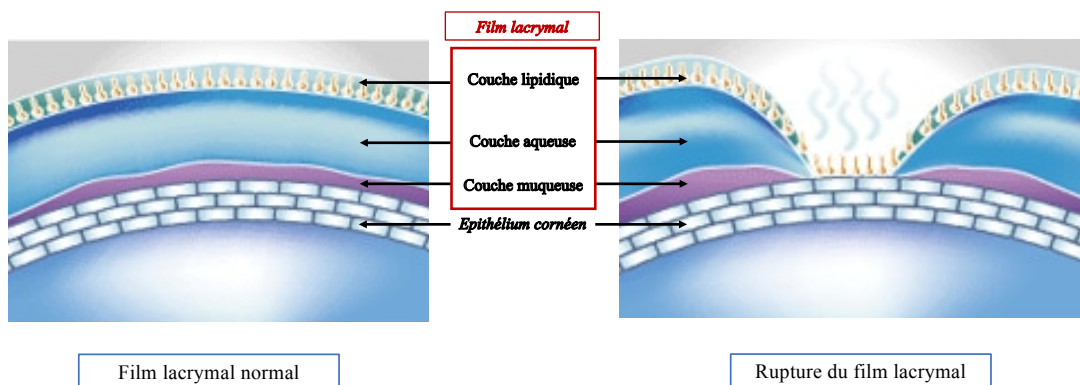


Figure 38 : Le film lacrymal ⁽¹⁵⁷⁾

Ces résultats ont pu être mis en évidence par une observation du temps de rupture du film lacrymal correspondant à la durée au bout de laquelle un spot de sécheresse bien défini d'environ 1 mm de diamètre est observé.

Par comparaison entre le temps normal de rupture et celui observé en présence d'une concentration croissante de BAC allant de 0,001 % à 0,01 %,

il a été mis en évidence une diminution de ce temps de rupture du film lacrymal.

Cette diminution est dose-dépendante et elle va d'environ 55 % du temps normal pour une concentration de 0,0001 % en BAC à presque 25 % du temps normal pour une concentration de 0,01 %.

4.3.1.2. Altération de la conjonctive

Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, le BAC peut être à l'origine d'une rupture du film lacrymal et d'une sécheresse oculaire qui aura des conséquences négatives sur les structures avoisinantes comme la conjonctive.

Une étude réalisée sur le lapin avec une seule instillation a démontré que la BAC avait une demi-vie de 20 h sur la conjonctive mais que des résidus pouvaient être retrouvés jusqu'à 9 jours après l'instillation.

Il est important de garder en tête cette information car elle commence à faire apparaître l'aspect cumulatif de ce conservateur dont résultent en partie ses effets secondaires.

Dans la même étude, des tests *in vitro* sur des cultures de cellules conjonctivales ont démontrés qu'une concentration comprise entre 0,05 et 0,1 % de BAC entraînait une lyse cellulaire dès les trois premières heures d'exposition et qu'une concentration comprise entre 0,01 et 0,0001 % avait quant à elle des effets concentrations dépendants retardés aboutissant à une apoptose voir à une nécrose cellulaire. ⁽¹⁵⁸⁾

Une autre étude réalisée sur des rats s'est intéressée aux conséquences de l'application de divers conservateurs en observant plus particulièrement les infiltrations de cellules inflammatoires.

Cinq conservateurs ont été ainsi comparés à savoir trois ammoniums quaternaires (cetrimonium, benzododecinium, benzalkonium), un organo-mercuriel (thiomersal) et un parabène (méthylparabène qui est souvent utilisé dans les cosmétiques et donc susceptible de se retrouver à proximité voir en contact avec les yeux).

L'ensemble de ces conservateurs ont eu pour conséquences une altération de la conjonctive avec une infiltration de cellules inflammatoires, une augmentation des couches épithéliales superficielles, une kératinisation, et ceci dans des proportions comparables quel que soit le composé testé.

L'ensemble des conservateurs et non seulement le BAC seraient donc toxiques pour la surface oculaire et plus particulièrement pour la conjonctive. ⁽¹⁵⁹⁾

Au-delà de la mort cellulaire ou la réaction inflammatoire, une autre conséquence importante du BAC est l'infiltration de fibroblastes et l'installation d'une fibrose chronique de la conjonctive.

Ceci a été mis en évidence par une étude menée sur des lapins exposés pendant 6 mois à du métipranolol (béta bloquant anti-glaucomeux) contenant un conservateur, puis pendant 2 mois supplémentaires à du métipranolol sans conservateur ou à des stéroïdes.

Les observations ont montré un accroissement comparable du collagène sous-épithélial chez tous les animaux traités. Par conséquent, le BAC entre bien en jeu dans le développement d'une fibrose chronique de la conjonctive qui est observable relativement rapidement après l'exposition et qui de plus semble irréversible.⁽¹⁶⁰⁾

La fibrose conjonctivale va avoir pour conséquences une diminution de la profondeur du cul de sac conjonctival pouvant même aboutir à la formation de symblépharons (adhésion partielle ou totale de la conjonctive au globe oculaire visible sur la figure 39) ainsi qu'à l'obstruction des canaux excréteurs des glandes à l'origine de la production du film lacrymal.

La qualité et la quantité de celui-ci est alors impacté, aggravant le phénomène de sécheresse oculaire qui lui-même va amplifier l'inflammation initiale et renforcer cette fibrose conjonctivale.

Nous faisons alors face à un cercle vicieux qui aura lui aussi des répercussions sur la surface oculaire voisine avec une kératinisation potentielle de la cornée.⁽¹⁶¹⁾



Figure 39 : Symblépharon et diminution du cul de sac conjonctival ⁽¹⁶²⁾

4.3.1.3. Altération de la cornée ⁽⁵⁷⁾

La cornée est un élément de l'œil particulièrement vulnérable à l'exposition au BAC puisqu'elle est en contact direct avec le milieu extérieur si l'on fait abstraction du film lacrymal.

Les modifications observées lors de l'instillation d'un conservateur sont d'ordre morphologiques comme une perte des microvillosités ou une rupture des jonctions intercellulaires augmentant ainsi la pénétration des solutions instillées ou de potentiels micro-organismes.

Pour rappel, en temps normal, la cornée est composée de cellules épithéliales parfaitement jointives pour éviter que l'eau du film lacrymal ne pénètre dans le stroma cornéen.

De plus, l'épithélium cornéen est un tissu en renouvellement permanent qui se fait à partir de cellules souches situées au niveau de la limbe (à la jonction de la cornée et de la conjonctive). Ces cellules vont se différencier et migrer de la périphérie vers le centre et de l'intérieur vers l'extérieur de l'œil pour aboutir à la couche la plus externe de la cornée où elles se couvrent de microvillosités permettant ainsi d'augmenter la surface de contact entre l'épithélium cornéen et le film lacrymal.

Enfin les cellules desquament et sont évacuées dans le film lacrymal.

Le cycle de migration complet est d'une à deux semaines. ⁽¹⁶³⁾

Plusieurs études ont mis en évidence qu'une exposition aux conservateurs produisait des microlésions cornéennes que l'on peut mettre en évidence par un test à la fluorescéine.

C'est le cas d'une étude réalisée sur des lapins comparant la tolérance cornéenne d'une instillation sur 28 jours de trois collyres différents : le Timabak[®] ne contenant pas de conservateur, et deux contenant un conservateur, le Timoptol[®] et le Timoptol[®] LP.

La spécialité Timoptol[®] contient du BAC à 0,01 %, tandis que le Timoptol[®] LP contient un autre ammonium quaternaire qui est le bromure de benzododécinium à 0,012 %.

Dans les trois cas, aucune réaction macroscopique négative n'est observée au cours de l'étude. Cependant, le test à la fluorescéine a mis en évidence une augmentation du pourcentage de microlésions normales dues au renouvellement cellulaire pour les formes contenant des conservateurs alors que ce pourcentage reste stable pour la formulation non conservée.

Les conservateurs de type ammonium quaternaires comme le BAC s'accompagnent donc d'une tendance à l'accroissement des microlésions cornéennes. ⁽¹⁶⁴⁾

Cet effet de potentialisation de microlésions cornéennes a été confirmé par une étude sur des lapins mis en contact prolongé (1,5 à 3 h) avec des larmes artificielles contenant du BAC à 0,01 %, sur lesquels on a observé, comparativement à une solution de contrôle et d'autres conservateurs (thimérosal et polyquad), une augmentation allant jusqu'à un facteur 100 de

la carboxy-fluorescéine qui est une forme de fluorescéine se fixant moins facilement sur la surface cornéenne non lésée.

Concernant la mise en évidence de la rupture des jonctions intercellulaires, c'est un test utilisant le rouge de ruthénium qui a été utilisé dans cette même étude.

Le rouge de ruthénium est un colorant se fixant sur les muco-polysaccharides anioniques situés sur la membrane latérale des cellules épithéliales.

Après une exposition au BAC, le rouge de ruthénium a pénétré jusqu'à la lame basale alors qu'il est resté cantonné aux couches superficielles de l'épithélium pour les autres conservateurs testés.

Cette accumulation de rouge de ruthénium dans les espaces intercellulaires confirme donc que l'exposition au BAC provoque une rupture profonde des jonctions intercellulaires épithéliales rendant ainsi la cornée plus vulnérable à l'invasion de pathogènes. ⁽¹⁶⁵⁾

En plus de ces microlésions cornéennes associées à une rupture intercellulaire, il a également été démontré que le BAC pouvait être responsable d'un retard voire d'une inhibition de la réparation cellulaire épithéliale.

Pour mettre en évidence ce phénomène, une étude a été faite sur des cultures de cellules épithéliales cornéennes de chien qui ont été lésées expérimentalement.

Dans la culture de référence, les cellules épithéliales périphériques ont émis des pseudopodes en direction de la lésion pour permettre leur migration et la réparation cellulaire se caractérisant par une diminution progressive de la superficie de la lésion.

Dans le cas d'une exposition à 0,0025 % de BAC, les cellules épithéliales n'ont pas émis de pseudopodes et la migration a été inhibée. ⁽¹⁶⁶⁾

Cette inhibition de la réparation cellulaire a été confirmée par une étude menée sur des lapins ayant subi une kératectomie partielle (ablation d'une partie de la cornée).

Dans le cas d'une exposition à du BAC à 0,01 % associé à de l'EDTA à 0,1 %, les chercheurs ont observé un léger retard de cicatrisation et dans le cas d'une exposition à une concentration de 0,02 % de BAC, la cicatrisation complète n'a pu être obtenue qu'après l'arrêt complet de l'administration du BAC. ⁽¹⁶⁷⁾

En définitive, une exposition prolongée au BAC peut être potentiellement responsable d'une altération de la cornée pouvant mener à une kératite le plus souvent réversible en quelques jours après l'arrêt de l'exposition au conservateur.

4.3.2. ATTEINTE DES STRUCTURES OCULAIRES PROFONDES

4.3.2.1. Altération du trabéculum ^(168,169)

En temps normal, les collyres ne pénètrent que très faiblement au niveau des tissus profonds. Cependant lorsque la surface cornéo-conjonctivale est fortement atteinte, ceux-ci peuvent pénétrer de façon plus importante dans les tissus.

Des études *in vitro* ont démontré que le trabéculum est un tissu particulièrement sensible au BAC et ceci même à des doses très faibles.

Pour exemple, une exposition durant 7 jours à une concentration de 10^{-7} à 10^{-5} % inhibe la croissance des cellules trabéculaires et une exposition à une concentration de 0,0001 % pendant 15 min provoque même une apoptose des cellules trabéculaires.

4.3.2.2. Altération du cristallin ^(168,170)

En 2002, trois études à grandes échelles ont été menées sur des patients recevant des traitement anti-glaucomeux sur le long terme.

Comme nous avons pu le voir, sur ce type de traitement au long court, l'utilisation d'un conservateur, dont le plus utilisé reste le BAC, s'avère presque indispensable.

Ces trois études que sont l'OHTS (The Ocular Hypertension Treatment Study), l'EMGT (Early Manifest Glaucoma Treatment Study) et BISED (Barbados Incidence Study of Eye Diseases) ont toutes mis en évidence une augmentation de l'incidence sur l'apparition de cataractes chez les patients traités de façon topique par des collyres anti-glaucomeux.

Les buts de ces trois études n'étaient pas de prouver cette incidence sur le développement de la cataracte mais le fait que ces trois études très différentes mettent en évidence ce point commun pose question.

Trois hypothèses peuvent alors être évoquées :

- La diminution de l'humeur aqueuse induite prive le cristallin des nutriments et des facteurs de croissances nécessaires
- La diminution de l'humeur aqueuse empêche la bonne évacuation des déchets et particulièrement des radicaux libres
- Les traitements anti-glaucomeux eux même ou un de leur composant sont toxiques pour les cellules du cristallin

Des études *in vitro* portées sur des cultures de cellules humaines de cristallin exposées à des concentrations variables de timolol, latanoprost et BAC ont démontré une toxicité concentration-dépendante des trois composés testés à

l'égard des cellules cristallines et ceci, en proportion d'autant plus importante pour le BAC.

De même, il a été démontré une augmentation de l'expression de médiateurs chimiques types prostaglandines E2 (PGE2) et interleukines (IL-1 et IL-6) avec la même variabilité entre timolol/latanoprost et BAC seul.

Ces cytokines sont des marqueurs de l'inflammation souvent retrouvés en post-opératoire chez des patients atteints de cataracte et notamment impliqués dans le développement d'œdèmes maculaires cystoïdes (OMC) que nous développerons plus tard.

Comme nous l'avons vu, la pénétration intraoculaire des collyres en temps normal est très faible avec environ 1/1000^{ème} de la goutte instillée qui passe dans la chambre antérieure. A cette concentration, seul le BAC a provoqué une augmentation significative des médiateurs chimiques cités ci-dessus.

Ces études *in vitro* viendraient alors accréditer la troisième théorie, en incriminant le BAC entrant dans les compositions des collyres anti-glaucomeux.

Cependant, en l'absence d'étude spécifique sur le passage du BAC au niveau intraoculaire, une causalité ne peut être mise en évidence.

Il faut pourtant être conscient que les patients traités pour des glaucomes reçoivent souvent plusieurs traitements contenant du BAC, appliqués plusieurs fois dans la journée et ceci souvent sur plusieurs années.

Le taux d'exposition attendu est donc important.

4.3.2.3. Altération de la rétine ^(168,171,172)

Comme nous avons commencé à l'évoquer dans la partie précédente, il a été établi que les patients recevant un traitement anti-glaucomeux sur le long terme sont plus susceptibles de développer un OMC après une opération de la cataracte.

Un OMC est une accumulation de liquide dans la rétine centrale (macula) avec une formation de logettes au niveau de la couche pléxiforme externe ou de la couche granuleuse interne.

La macula étant un élément indispensable à la vision, le patient souffrira d'une baisse de la vision avec éventuellement un phénomène de métamorphopsie à savoir une déformation des lignes droites qui deviennent ondulées comme on peut l'observer dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ou encore un scotome central (tâche au milieu de la vision).
^(171,173)

Un OMC par OCT ainsi qu'une métamorphopsie et un scotome sont représentés dans la figure 40.

Plus de 50 % des patients opérés de cataracte seraient touchés par une forme non cliniquement significative d'OMC, c'est-à-dire une forme asymptomatique ne s'accompagnant pas d'une perte d'acuité visuelle, 8 % des patients présenteraient une forme cliniquement significative et entre 1 et 3 % développeraient des OMC persistants dans le temps. En effet, dans la très grande majorité des cas (presque 90 %), cet OMC post-opératoire va se résorber spontanément en quelques mois.

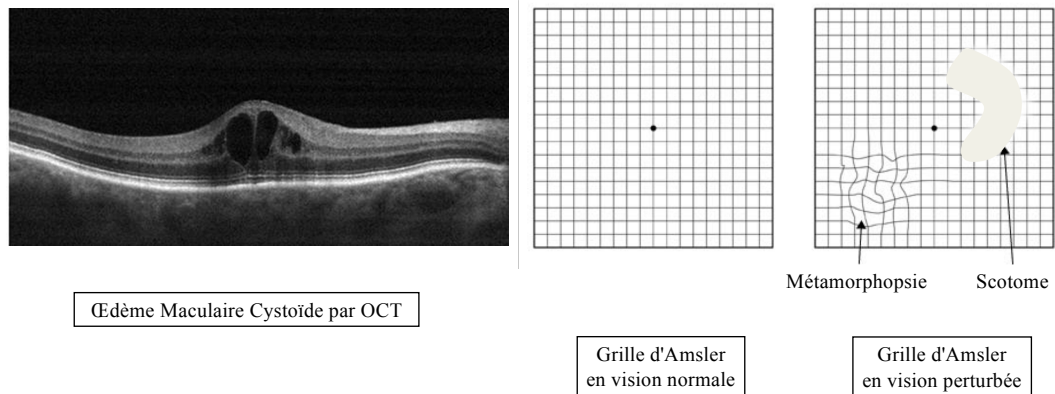


Figure 40 : Œdème maculaire cystoïde, métamorphopsie et scotome (174,175)

L'origine exacte des OMC n'est pas clairement définie mais la théorie la plus probable serait une inflammation intra-oculaire faisant suite à l'opération de la cataracte.

Des marqueurs de l'inflammation type prostaglandines ou interleukines sont libérés par les tissus lésés lors de l'opération.

D'autres cytokines comme les Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ou les Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) sont également libérés par les tissus ischémiques et participent au développement de ces OMC post-opératoires.

Ces médiateurs chimiques de l'inflammation seraient responsables de la rupture de la barrière hémato-aqueuse, provoquant ainsi une augmentation de la perméabilité au liquide extracellulaire, puis diffuseraient jusqu'à la rétine par ouverture des jonctions serrées.

Cette théorie est, de plus, appuyée par l'efficacité des anti-inflammatoires non stéroïdiens utilisés en prévention.

Il a également été démontré que la probabilité d'apparition d'un OMC post-opératoire est d'autant plus importante chez les patients traités par des collyres anti-glaucomeux contenant du BAC.

En effet, celui-ci va non seulement favoriser la rupture de la barrière hémato-aqueuse mais comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, il va également augmenter l'expression des médiateurs chimiques comme les prostaglandines ou interleukines.

Le BAC favoriserait donc l'apparition de l'OMC angiographique post-opératoire précoce de la cataracte avec une incidence très certainement sous-estimée puisque la grande majorité des OMC sont des formes non infra-cliniques peu détectables.

Par mesure de prévention, il serait donc judicieux d'utiliser des collyres non conservés chez les patients présentant des facteurs de risques de développer un OMC.

Une étude expérimentale menée sur des lapins a également mis en évidence la toxicité du BAC pour les cellules rétinienne.

Des injections sous conjonctivales quotidiennes ont été faites sur des lapins albinos et pigmentés pendant deux semaines.

Ces injections ont été réalisées avec différentes solutions :

- les formes commerciales du timolol ou du befunolol contenant du BAC
- les même principes actif sans BAC
- une solution ophtalmique de base saline contenant du BAC
- une solution ophtalmique de base saline sans BAC

Après une semaine d'injections, les formes commerciales du timolol et du befunolol ainsi que la solution de base contenant du BAC, ont eu un impact significatif sur l'électrorétinogramme des lapins pigmentés mais très peu d'effet sur celui des lapins albinos.

Après les deux semaines d'injections, pour ces même produits, les études histologiques ont montré un décollement de rétine et une perte cellulaire chez les lapins pigmentés mais pas chez les lapins albinos.

L'ensemble des autres formes n'ont eu presque aucun voir aucun effet significatif que ce soit chez le lapin pigmenté ou albinos.

La toxicité rétinienne du BAC a donc bien été décrite avec une possible accumulation dans les pigments oculaires. ⁽¹⁷⁶⁾

Le tableau 8 récapitule l'ensemble des structures oculaires pouvant être touchées ainsi que des conséquences potentielles de leur exposition au BAC.

		Conséquences de l'exposition au Chlorure de Benzalkonium	
Structures Touchées	Superficielles	Film Lacrymal	- Dissolution de la couche lipidique externe et accélération de l'évaporation de l'eau - Atteinte de la couche muqueuse interne et rupture du film lacrymal Conséquence finale = Sécheresse oculaire
		Conjonctive	- Lyse cellulaire par nécrose ou apoptose - Infiltration de cellules inflammatoires - Augmentation du collagène et des fibroblastes Conséquences finales = Symblépharons, sécheresse oculaire renforcée et fibrose chronique de la conjonctive irréversible
		Cornée	- Perte des microvillosités et rupture des jonctions intercellulaires - Microlésions cornéennes avec retard voir inhibition de la réparation épithéliale Conséquences finales = kératite réversible entraînant une vulnérabilité accrue aux pathogènes
	Profondes	Trabéculum	- Forte sensibilité concentration dépendante à faibles doses Conséquences finales = inhibition de la croissance trabéculaire voir apoptose
		Cristallin	- Augmentation de l'expression des médiateurs de l'inflammation - Toxicité cellulaire concentration dépendante Conséquence finale = risque potentiel de cataracte
		Rétine	- Augmentation de l'expression des médiateurs de l'inflammation - Rupture de la barrière hémato-aqueuse Conséquences finales = potentialisation de développement d'un OMC normalement réversible avec possibilité de métamorphosie ou scotome

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des effets du BAC sur les structures superficielles et profondes de l'œil

5. ALTERNATIVES A L'UTILISATION DU BAC

Comme nous avons pu le développer précédemment, l'utilisation de collyres contenant des conservateurs et notamment le BAC peut avoir des conséquences négatives plus ou moins réversibles lors d'une utilisation à moyen ou long terme.

Une information importante que le prescripteur devrait garder à l'esprit, c'est l'aspect cumulatif notamment pour les patients multi-traités qui pourraient diminuer de façon importante leur exposition au BAC en faisant appel à des associations fixes lorsqu'elles existent.

Cependant, il existe également sur le marché des alternatives sans conservateur ou avec de nouveaux systèmes de conservation dont l'utilisation est à considérer plus particulièrement chez les personnes présentant des facteurs de risque.

5.1. LES UNIDOSES

Une des premières alternatives à l'utilisation de conservateurs et la plus évidente qui vient à l'esprit est le passage sur des formes unidoses.

Les collyres unidoses sont des formes galéniques apparues dans les années 60 à la demande du ministère britannique de la santé à la suite d'une épidémie d'endophtalmies dues à des contaminations croisées survenues dans un hôpital de Birmingham. ⁽¹⁷⁷⁾

Ces formes contiennent une quantité de collyre suffisante pour une instillation (moins de 1 ml et généralement 0,2 à 0,5 mL) voir pour une administration quotidienne lorsqu'ils sont rebouchables.

De par leur utilisation instantanée après leur ouverture, le recours à des conservateurs dans leur formulation n'est pas obligatoire et permet donc de s'affranchir des conséquences liées à leur présence.

Les collyres unidoses permettent également de garantir un bon usage en délivrant la quantité exacte de produit nécessaire sans risque de surdosage.⁽¹⁷⁸⁾

Ces formes sont donc particulièrement recommandées pour ces multiples raisons comme par exemple par la commission gériatrie Centre-Val de Loire de l'Observatoire des Médicaments Dispositifs médicaux Innovations Thérapeutiques (OMÉDIT) dans son rapport de Juin 2016.⁽¹⁷⁹⁾

Cependant, le recours aux formes unidoses est à réserver en priorité aux traitements d'une courte durée.⁽⁴³⁾

En effet, même si cette forme galénique présente des avantages non négligeables, elle présente également des inconvénients.

Tout d'abord le coût d'industrialisation de ces formes unidoses reste élevé et leur manipulation semblerait, selon la littérature, peu aisée pour les personnes âgées mais aucune différence significative avec les flacons multidoses n'a été mise en évidence lors d'une étude clinique.⁽¹⁷⁷⁾

La fabrication de ces formes unidoses se fait généralement selon un mode de production appelé « Blow-Fill-Seal Process » ou « Procédé Fromage-Remplissage-Scellage » représenté dans la figure 41.

Ce procédé de fabrication est réalisé en environnement entièrement stérile et comporte plusieurs étapes⁽¹⁸⁰⁾ :

- **Etape 1** : formation d'un tube extrudé à partir de granulats
- **Etape 2** : la mise en forme du conditionnement primaire avec la fermeture du moule qui soude le fond du récipient. Cette mise en forme se fait soit par un souffle d'air comprimé soit par le vide
- **Etape 3** : Remplissage du récipient
- **Etape 4** : Fermeture de la deuxième partie du moule et scellement par le vide de la partie supérieure du récipient à la forme souhaitée
- **Etape 5** : Ouverture du moule principal et libération du récipient

Ce procédé, bien que coûteux, permet donc une formation, un remplissage et un scellement de l'unidose en une seule étape industrielle.

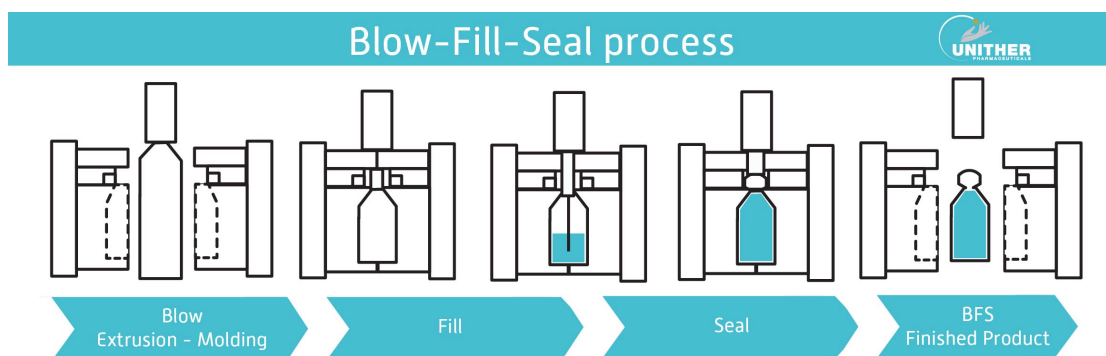


Figure 41 : Processus de fabrication « Blow-Fill-Seal » (181)

L'impact environnemental des unidoses est également à prendre en compte. Un impact qui peut être important non seulement du point de vue du volume de déchets plastiques générés mais également au regard de l'impact carbone engendré par le transport de ces formes qui, à durée de traitement égale, nécessitent un volume supérieur et donc une multiplication des transports logistiques vis-à-vis des formes multidoses.

5.2. LES SYSTEMES MULTIDOSES SANS CONSERVATEUR

A la vue des inconvénients de la forme unidoses, les laboratoires pharmaceutiques ont donc cherché des alternatives en format multidose. Deux grands systèmes sont alors développés : un système à filtre et un système à valve.

5.2.1. LE SYSTEME AVEC FILTRE : ABAK® (177,182,183)

Paradoxalement, cette solution pionnière et innovante a été mise au point par le laboratoire qui lui-même avait été le premier à introduire le BAC dans ses formulations ophtalmiques : les laboratoires Théa.

Après 10 ans de recherche, ils ont mis au point le premier flacon multidose sans conservateur appelé ABAK® en référence au « A » privatif de « BAK » qui est l'abréviation anglaise de BAC.

Ce système a subi plusieurs évolutions (figure 42) :

- **ABAK® de 1^{ère} génération** : apparu en 1989.
Dans ce système, le filtre adsorbait le conservateur pour en purifier le collyre au moment de l'instillation.

Ce système de tampon poreux présentait une limite majeure puisqu'il pouvait adsorber non seulement le conservateur mais également partiellement certains principes actifs.

- **ABAK® de 2^{ème} génération** : apparu en 1998.
A partir de cette 2^{ème} génération de flacons, le laboratoire Théa a supprimé les conservateurs dans la formulation du collyre et utilisé une membrane anti-microbienne de 0,2 µm de porosité.

Cependant, avec ces technologies, que ce soit de 1^{ère} ou de 2^{ème} génération, le filtre, une fois mouillé par la solution, ne permettait pas un échange d'air pour compenser la sortie de produit.

Ces flacons devaient donc contenir un récipient élastique déformable pour compenser ce problème et permettre les instillations suivantes.

Ce récipient se déformait de façon inappropriée au cours de l'utilisation et, à la fin, lorsque la quantité de collyre devenait faible, la pression nécessaire à l'administration d'une goutte devenait plus importante, rendant ainsi la manipulation plus difficile.

- **ABAK® de 3^{ème} génération** : apparu en 2005
Dans cette dernière génération encore utilisée à l'heure actuelle, la membrane en polyéther sulfone est à la fois hydrophile comme dans les générations précédentes mais elle est également rendue en partie hydrophobe par un traitement de surface permettant ainsi un échange optimal liquide sortant/air entrant, permettant de s'affranchir du compartiment élastique déformable.

Grace à ce système ABAK® 3^{ème} génération, un seul flacon permet la délivrance de 300 gouttes stériles parfaitement calibrées sans ajout nécessaire de conservateur à la formulation.

Les gains apportés par cette nouvelle technologie vont au-delà de l'affranchissement de conservateur puisque si l'on compare des substituts lacrymaux en boîtes unidoses de 36 unités et en flacon ABAK® 3^{ème} génération, on gagne près de 3 % d'espace linéaire par la réduction du volume de conditionnement secondaire, on multiplie par 25 le nombre de traitements par palette, et on diminue d'autant le nombre de palettes annuelles nécessaires ainsi que le transport routier associé.

Un flacon d'ABAK® 3^{ème} génération correspond également à 150 unidoses et peut être utilisé jusqu'à 2 mois après ouverture.

Cette technologie présente donc des avantages de coût, de logistique, d'impact carbone et environnemental non négligeables.

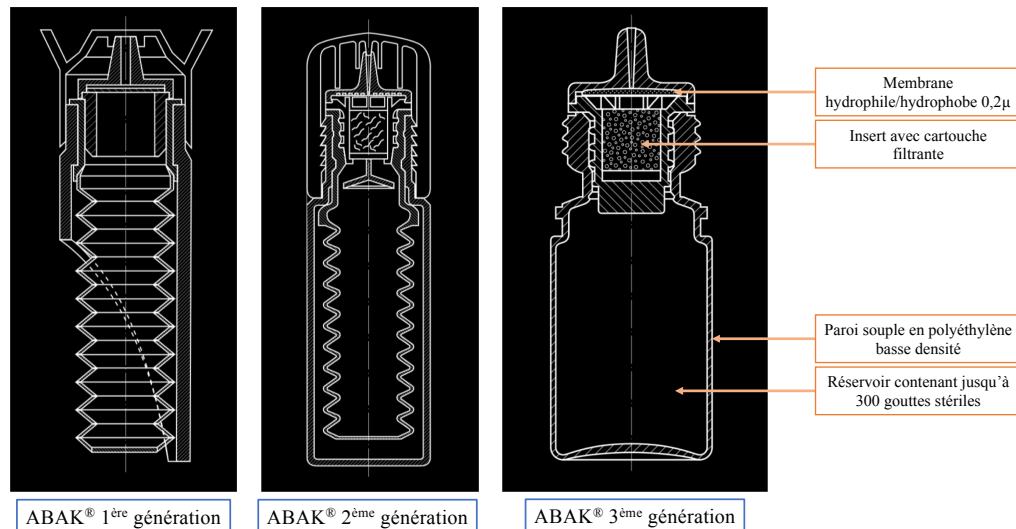


Figure 42 : Les différentes générations des flacons ABAK® (182)

5.2.2. LE SYSTEME A VALVE : COMOD® (177,184)

Le système COMOD® (figure 43) est un système dont le nom signifie **C**ontinuous **M**ono **D**ose mis au point par les laboratoires Ursapharm. Il s'agit d'un autre système multidose de technologie différente appelée technologie AIRLESS.

Dans ce cas, le flacon contient un sac souple sans air, rempli de solution avec un équilibre permanent entre la pression à l'intérieur du sac et celle dans l'espace entre le sac et la paroi du flacon.

L'instillation induit une baisse de pression à l'intérieure du sac qui s'effondre alors sur lui-même en empêchant l'entrée de micro-organismes.

Il n'y a donc aucun contact entre l'air ambiant et la solution du flacon et l'équilibre des pressions se fait par expansion de l'air sous pression contenu entre le sac et la paroi et non par un apport d'air extérieur.

La gestuelle d'instillation est différente des flacons multidoses classiques ou du système ABAK® évoqué précédemment pour lesquels il est nécessaire d'effectuer une pression sur la paroi extérieure du flacon qui se doit d'être suffisamment souple.

Dans le cas du système COMOD®, le patient va effectuer une pression avec son index sur la base du flacon composé grossièrement de deux parties et dont cette base rentre dans la partie supérieure à la manière d'un piston, permettant ainsi l'ouverture très brève des deux points de scellements (une valve à bille dans la partie basse et une valve en piston dans la partie haute). Une goutte calibrée est ainsi libérée sans aucun risque de reflux et donc de contamination de la solution contenue dans le sac.

La durée d'utilisation de ce type de flacon est de 6 mois après ouverture et un flacon COMOD[®] peut délivrer jusqu'à 300 gouttes.
Les avantages attendus sont donc comparables à ceux du système ABAK[®].

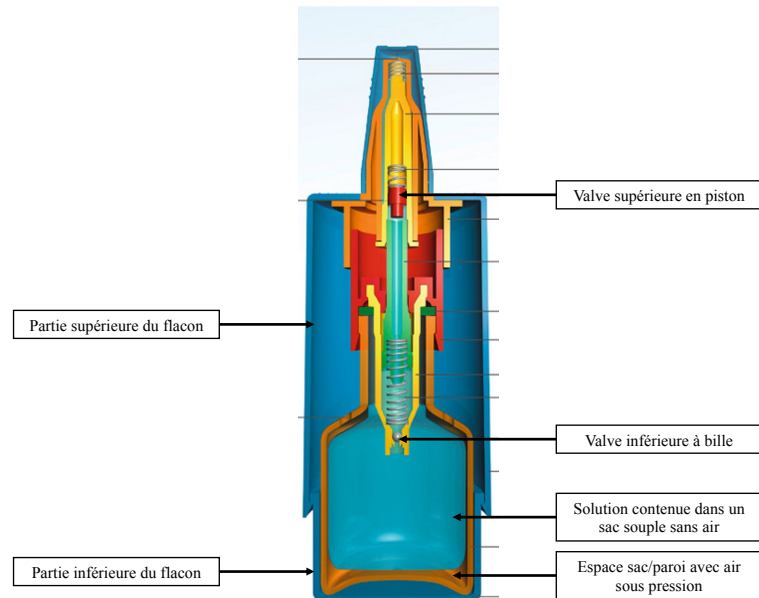


Figure 43 : Le flacon COMOD[®] (185)

5.3. LES SYSTEMES DE CONSERVATION ALTERNATIFS AUX CONSERVATEURS CLASSIQUES

Une autre alternative à l'utilisation des conservateurs dans les collyres autrement que par une technologie nécessitant une recherche longue et coûteuse et devant être protégée par de multiples brevets, sera de faire appel à des systèmes de conservation alternatifs aux conservateurs classiques. Nous développerons donc un système en phase de développement (Pylote[®]) et des systèmes déjà existants sur le marché tel que Polyquad[®] et les complexes oxydants (Sofzia[®], Purite[®] et GenAqua[®]).

5.3.1. LE SYSTEME PYLOTE[®] (40,186,187)

Une société toulousaine a reçu en 2016 le Pharmapack Awards dans la catégorie « protection du patient » pour cette innovation. La société Pylote a donc mis au point un nouveau système de conservation basé sur l'utilisation de nano ou microparticules minérales sphériques désagglomérées et intégrées à l'emballage primaire de la spécialité. Cette nouvelle technologie appelée Pyclear Protection[®] permettrait de supprimer l'utilisation des conservateurs en intégrant des microsphères

minérales à l'emballage sans en modifier l'aspect, l'usage ou les processus de fabrications associés.

Les microsphères contenues dans le plastique vont par réaction catalytique avec les solutions aqueuses libérer les dérivés réactifs permettant ainsi leur action antimicrobienne.

De par son intégration dans l'emballage plastique lui-même, le système Pyclear Protection[®] permettrait de maintenir une hygiène microbiologique non seulement pour la solution contenue à l'intérieur du flacon mais également à l'extérieur au niveau de la canule de sortie du produit, permettant ainsi que 100 % des gouttes délivrées soit préservées.

Selon une étude réalisée par le laboratoire, cette technologie permettrait de réduire une contamination microbienne de façon très importante comparativement à une surface plastique classique :

- D'approximativement log de 5,2 en UFC à log de 2,8 pour l'*Adénovirus de type 3* qui est un virus responsable de nombreuses conjonctivites virales.
- De quasiment faire disparaître les contaminations à *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*

Vis-à-vis de l'alternative que représentent les unidoses cette technologie aurait un impact environnemental largement inférieur puisque le poids de plastique nécessaire à un même traitement peut être réduit jusqu'à 18 fois.

5.3.2. LE SYSTEME POLYQUAD[®] (57)

Ce système également appelé polyquaternium-1 (voir figure 44) est à rapprocher de la famille des ammonium quaternaires dans laquelle on pourrait le classer.

Polyquad[®] ne possède cependant pas d'activité détergente et présente un profil toxicologique beaucoup plus favorable. Il s'agit d'une molécule de grande taille ne pénétrant pas dans les cellules eucaryotes, ce qui expliquerait en partie sa toxicité moins importante.

Son efficacité antimicrobienne est similaire à celle du BAC et ceci même à faible concentration. (188)

Il est en effet utilisé à une concentration de l'ordre de 0,001 % qui est un dosage entre 4 à 20 fois moins élevé que les doses usuelles de BAC.

Il possède activité antimicrobienne optimale à un pH de 6 à 8 et 37 °C. (189)

En effet, une étude comparative a été menée sur des rats pour évaluer les profils toxicologiques du BAC et du polyquaternium-1 à différentes concentrations (0,1 % et 0,5 %).

Il a été démontré que le BAC altérerait de façon significative la surface cornéo-conjonctivale, ainsi que la production de larmes et qu'il présentait donc un

profil toxicologique moins favorable que le polyquaternium-1 à forte concentration. ⁽¹⁹⁰⁾

Bien que possédant un profil toxicologique plus favorable, le polyquaternium-1 peut également être impliqué dans le syndrome de l'œil sec, perturber la couche muqueuse du film lacrymal et provoquer des dommages sur l'épithélium cornéen ou la conjonctive, au même titre que le BAC mais dans une moindre mesure. ⁽¹⁹¹⁾

Le polyquaternium-1 a été utilisé à l'origine pour les solutions de traitement des lentilles de contact car il présente l'avantage de ne pas saturer la lentille et donc évite une exposition de la cornée à des doses importantes de conservateurs.

A la vue de tous ces éléments, le polyquaternium-1 peut donc représenter une alternative viable au BAC mais ne semble pas pour autant être la solution idéale.

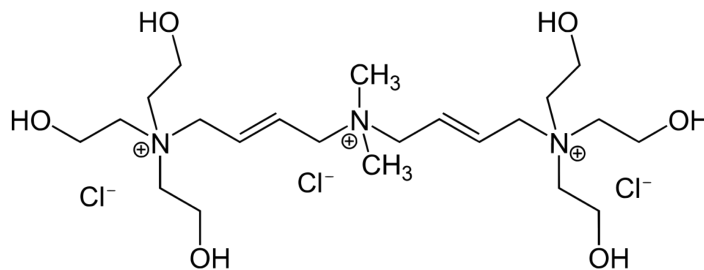


Figure 44 : Le système POLYQUAD[®] ou polyquaternium-1 ⁽¹⁹²⁾

5.3.3. LES COMPLEXES OXYDANTS

5.3.3.1. Le système GenAqua[®] ^(57,191)

Également appelé perborate de sodium, le système GenAqua[®] est un conservateur oxydant qui va agir sur les membranes des micro-organismes et inhiber les enzymes liées. Cette oxydation des membranes va alors altérer la synthèse protéique associée.

En milieu aqueux, le perborate de sodium va se décomposer en eau, oxygène et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), et c'est ce dernier élément qui va avoir une action sur les micro-organismes, et notamment *Aspergillus niger*. Le peroxyde d'hydrogène est en générale présent à des taux compris entre 30 et 100 ppm ce qui peut provoquer des brûlures au niveau oculaire.

De plus, il existe actuellement très peu d'informations concernant les effets du système GenAqua® sur la cornée et la conjonctive.

Ce système reste donc très peu utilisé à l'heure actuelle dans les formulations.

5.3.3.2. Le système SOFZIA® (57,188,191)

Le système SOFZIA® n'est pas une molécule à proprement parlé mais un mélange de plusieurs composés : acide borique, propylène glycol, sorbitol et chlorure de zinc.

Il s'agit d'un tampon ionique qui est désactivé au contact des cations présents naturellement dans le film lacrymal et qui représente donc un danger moins important pour les cellules épithéliales cornéennes ou les cellules conjonctivales. Ce système de conservation va agir en causant des dommages oxydatifs aboutissant à la mort des bactéries qui ne possèdent pas d'enzyme cytochrome oxydase ou catalase pouvant les protéger.

Ce système de conservation a démontré une efficacité sur de nombreux agents pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger* avec cependant un effet conservateur légèrement inférieur aux ammoniums quaternaires.

Ce système de conservation a été approuvé en 2006 par la FDA mais il n'est pas autorisé en Europe malgré une absence de toxicité apparente sur les utilisations à long terme.

En effet, une étude comparative a été réalisée entre le BAC et le système SOFZIA® et a démontré que la réduction bactérienne significative n'intervenait qu'après un délai de 7 jours pour le système SOFZIA® alors qu'il était de seulement 6 h pour le BAC. De même, concernant l'activité fongicide, le système SOFZIA® n'a pu démontrer une efficacité suffisante contrairement au BAC.

Ce test a été réalisé selon les critères de la pharmacopée européenne, plus strictes que les pharmacopées américaine et japonaise, avec des prélèvements à 6 h et 24 h non requis dans les deux autres. Le système de conservation SOFZIA® répond donc aux critères de deux pharmacopées de références mais pas à ceux de la pharmacopée européenne d'où le refus de son utilisation en Europe. (193)

5.3.3.3. Le système PURITE® (57,191)

Il s'agit d'un système oxychloro stabilisé qui est apparu dans le milieu des années 1990 pour purifier l'eau potable d'où son appellation « PURITE® ».

Les complexes oxychlorés sont des petites molécules qui pénètrent facilement à l'intérieur des membranes et qui vont altérer les fonctions cellulaires normales en modifiant les lipides, les protéines ou l'ADN. Il va agir principalement par oxydation du glutathion entraînant une diminution des défenses cellulaires contre le stress oxydant et altérer ainsi les fonctions cellulaires. Il est donc particulièrement efficace contre les espèces contenant peu de glutathion comme *Staphylococcus aureus*.

Ce système est un détergent oxydatif à large spectre d'action antimicrobien même à une faible concentration de l'ordre de 0,005 %.

Le système PURITE® a également démontré son efficacité sur des champignons tel qu'*Aspergillus niger*.

Ce système oxychloro stabilisé présente l'avantage, lorsqu'il est exposé à la lumière, de se décomposer en éléments naturellement présents dans le film lacrymal tels que le sodium, l'ion chlorure, l'oxygène et l'eau.

Cette propriété fait de lui un agent de conservation potentiellement mieux toléré par la surface oculaire.

Il reste cependant peu utilisé à l'heure actuelle en ophtalmologie.

6. CONCLUSION

Nous avons vu dans ce dernier chapitre les caractéristiques principales du BAC et nous avons évoqué sa large utilisation dans de nombreux domaines. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ses effets sur l'œil qui peut être touché tant sur des structures superficielles que plus profondes avec des conséquences qui peuvent s'avérer graves et irréversibles.

Heureusement, des alternatives au BAC tendent à se développer, que ce soit par une suppression complète de conservateur ou par l'utilisation de systèmes de conservation avec un profil toxicologique plus favorable.

CONCLUSION GENERALE

Cette thèse avait pour objectif de faire un bilan sur les connaissances relatives à l'impact de l'utilisation des conservateurs dans les collyres et plus particulièrement du chlorure de benzalkonium.

Tout au long de celle-ci nous avons démontré l'inévitable nécessité de garder ces formes pharmaceutiques exemptes de toute contamination microbienne. Nous avons exposé les avantages et les inconvénients des conservateurs classiquement utilisés et nous nous sommes attardés sur le chlorure de benzalkonium, conservateur le plus répandu, qui, jusqu'à il y a peu de temps, était considéré comme étant totalement inoffensif.

Nous avons mis en évidence, la relative dangerosité des conservateurs lors des utilisations à long terme et dont le lien de cause à effet est rarement remarqué tant par les patients que par les professionnels de santé alors que les conséquences peuvent pourtant s'avérer très gênantes et parfois irréversibles.

En effet, s'affranchir des conservateurs classiques présente un intérêt majeur pour les personnes utilisant des collyres au long cours car ceux-ci peuvent compliquer les interventions chirurgicales. Cette utilisation prolongée est principalement associée à trois grandes pathologies : les allergies chroniques, la sécheresse oculaire ou le glaucome.

L'incidence dans la population n'est pas négligeable puisque près de 15 % des français de plus de 60 ans souffrent de sécheresse oculaire et 15 à 20 % de la population mondiale serait sujette aux allergies oculaires. ⁽¹⁹⁴⁾

De même, en France plus de 10 % des personnes de plus de 70 ans, soit 400 000 à 500 000 personnes seraient atteintes de glaucome. ⁽¹⁹⁵⁾

La suppression des conservateurs classiques dans les collyres ne peut se faire, en l'état actuel des connaissances, que de deux manières :

- via une protection mécanique que ce soit par le passage à la forme unidose ou au travers des innovations technologiques des emballages primaires
- via l'ajout d'un agent de conservation au profil toxicologique plus favorable.

La protection mécanique des collyres semble être la piste la plus prometteuse à l'heure actuelle pour s'affranchir totalement de la nécessité de l'utilisation de conservateur dans les formules.

Mais ce type de protection, choisie notamment par le laboratoire Théa (système ABAK[®]) et le laboratoire Ursapharm (système COMOD[®]), fait souvent appel à de nouvelles technologies nécessitant de lourds

investissements tant sur le plan financier que temporel et qui, dans le contexte actuel, doivent prendre en compte non seulement le bien être du patient mais également des critères plus larges comme l'impact environnemental.

Comme nous avons pu le voir, le passage à la forme unidose ne constitue pas non plus une réponse automatiquement envisageable que ce soit pour des raisons de formulation, de coût ou encore pour les questions environnementales que nous avons évoquées.

D'autres grands laboratoires ont fait le choix de développer des systèmes de conservation alternatifs aux conservateurs classiques comme Alcon avec Polyquad[®], Novartis avec GenAqua[®] ou SOFZIA[®] et Allergan avec PURITE[®].

Cette stratégie présente l'avantage non négligeable de ne pas perturber le patient dans ses habitudes, ce qui peut favoriser une meilleure observance du traitement.

Quelle que soit la stratégie adoptée, on constate clairement une disparition progressive des conservateurs dans les collyres les plus utilisés de façon chronique.

L'argument du « sans conservateur », que ce soit pour répondre à la tendance actuelle ou pour apporter une véritable réponse aux problèmes causés par les conservateurs classiques, s'inscrit désormais dans la stratégie commerciale des laboratoires.

Alors que faut-il répondre à un patient se présentant au comptoir avec des inquiétudes sur l'utilisation d'un collyre contenant ou non un conservateur ? Il est important de garder à l'esprit qu'il n'y a pas une seule et unique réponse à la question : « avec ou sans conservateur ? »

Chaque cas est unique et doit être étudié en fonction du rapport bénéfice/risque prenant en compte des critères multiples comme les facteurs de risques, la durée ou la chronicité du traitement afin de proposer au patient la forme la plus adaptée.

ANNEXE 1
Tableau périodique des éléments ⁽¹⁹⁶⁾

Tableau périodique des éléments

O 18

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
I A	II A	III A	IV A	V A	VI A	VII A	VIII	IX	X	XI	II B	III B	IV B	V B	VI B	VII B	O	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Hydrogène H 1,00794 1 1	Hélium He 4,002602 2 0	Lithium Li 6,939 3 1	Béryllium Be 9,0121831 4 2	Bore B 10,811 5 3	Carbone C 12,0106 6 4	Azote N 14,00644 7 5	Oxygène O 15,999 8 6	Fluor F 18,99840316 9 7	Neon Ne 20,1797 10 8	Sodium Na 22,98976928 11 1	Magnésium Mg 24,305 12 2	Aluminium Al 26,9815385 13 3	Silicium Si 28,0855 14 4	Phosphore P 30,97376203 15 5	Soufre S 32,065 16 6	Chlore Cl 35,4513 17 7	Argon Ar 39,948 18 0	
Kalium K 39,0983 4 1	Calcium Ca 40,078 20 2	Scandium Sc 44,955908 21 3	Titane Ti 47,867 22 4	Vanadium V 50,9415 23 5	Chrome Cr 51,9961 24 6	Manganèse Mn 54,938044 25 7	Fer Fe 55,845 26 8	Cobalt Co 58,933194 27 9	Nickel Ni 58,6934 28 10	Argent Ag 107,8682 47 11	Cuivre Cu 63,546 29 11	Zinc Zn 65,38 30 12	Gallium Ga 69,723 31 13	Arsenic As 74,921595 33 15	Sélénium Se 78,971 34 16	Brome Br 79,904 35 17	Krypton Kr 83,998 36 18	
Rubidium Rb 85,4678 37 1	Sr 87,62 38 2	Yttrium Y 88,90584 39 3	Zirconium Zr 91,224 40 4	Niobium Nb 92,90637 41 5	Molibdène Mo 95,95 42 6	Téchnétium Tc 98 43 7	Ruthénium Ru 101,07 44 8	Rhodium Rh 102,90550 45 9	Palladium Pd 106,42 46 10	Or Au 196,966569 79 11	Indium In 114,818 49 13	Cadmium Cd 112,414 48 12	Étain Sn 118,710 50 14	Antimoine Sb 121,760 51 15	Tellure Te 127,60 52 16	Iode I 126,90447 53 17	Xénon Xe 131,29 54 18	
Césium Cs 132,90545 55 1	Baryum Ba 137,327 56 2	Lanthanides 57-71 57-71	Hafnium Hf 178,49 72 6	Tantale Ta 180,94788 73 7	Tungstène W 183,84 74 8	Rhénium Re 186,207 75 9	Osmium Os 190,23 76 10	Iridium Ir 192,222 77 11	Platine Pt 195,084 78 12	Plomb Pb 207,2 82 14	Bismuth Bi 208,98040 83 15	Polonium Po 209 84 16	Astatoine At 210 85 17	Radon Rn 222 86 18	Francium Fr 223 87 1	Radium Ra 226 88 2	Actinides 89-103 89-103	
Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103
Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103	Actinides 89-103 89-103

Origine

primordial

désintégration d'autres éléments

synthétique

Non classés

Gaz nobles

Halogènes

Métaux

Autres non-métaux

Métalloïdes

Métaux pauvres

Métaux de transition

Actinides

Alcalino-terreux

Alcalins

Non métaux

Gaz nobles

Halogènes

Autres non-métaux

Métalloïdes

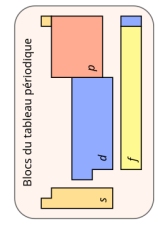
Métaux pauvres

Métaux de transition

Actinides

Alcalino-terreux

Alcalins



états d'oxydation (réducteur)

1^{ère} énergie d'ionisation (en kJ/mol)

électronégativité (Pauling)

configuration électronique

électrons par niveau d'énergie

nom de l'élément **gaz, liquide ou solide** à 0°C et 101,3 kPa

numéro atomique

symbole chimique

masse atomique relative (ou celle de l'isotope le plus stable) [CAAW "Atomic Weights 2013" + rev. 2015]

He 2

Ne 10

Ar 18

Kr 36

Xe 54

Rn 86

Fr 87

Ra 88

Ac 89

Th 90

Pa 91

U 92

Np 93

Pu 94

Am 95

Cm 96

Bk 97

Cf 98

Es 99

Fm 100

Md 101

No 102

Lr 103

ANNEXE 2

Méthodologie du test d'efficacité de la conservation microbienne ⁽⁵⁸⁾

Les essais sont généralement effectués à l'aide de souches uniques.

On va, dans un premier temps, comme pour la détermination de la CMI/CMB, préparer un inoculum.

On procède par ensemencement à partir d'une culture mère de microorganisme de la surface d'un milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja pour les bactéries ou d'un milieu Sabouraud dextrosé-gélosé sans addition d'antibiotiques pour les champignons.

On va ensuite incuber la culture selon des paramètres de température et de temps qui diffèrent selon le microorganisme à étudier.

En générale, on procède à une incubation à 30-35 °C pendant 18 à 24 h.

Pour certaines souches difficiles à cultiver, il sera parfois nécessaire de procéder à des subcultures à savoir un repiquage et une remise en culture pour obtenir un microorganisme dans son état optimal. Cependant, la pharmacopée recommande de limiter au maximum le nombre de repiquage.

On procède ensuite à la récolte et à la mise en suspension d'environ 10^8 microorganismes.

Ces suspensions doivent être utilisées immédiatement.

On prélève alors un échantillon approprié et on procède au dénombrement afin de déterminer le nombre d'unités formant colonie dans l'inoculum initial.

Il est important de noter que le milieu gélosé utilisé pour ce dénombrement initial ou les dénombrements suivants devra être le même que celui utilisé pour la culture initiale du microorganisme.

Dans un second temps, on va procéder à l'ensemencement ou à la contamination du produit à étudier avec un inoculum de 10^5 à 10^6 microorganismes dont le volume ne dépasse pas 1 % du volume total du produit.

On homogénéise par mélange puis on maintient le produit à une température de 20-25 °C à l'abri de la lumière et on procède aux prélèvements selon les intervalles de temps appropriés.

Enfin, on procède au dénombrement du nombre de microorganismes viables dans les différents prélèvements aux différents intervalles de temps.

On les compare ensuite à l'inoculum initiale afin de déterminer si les critères d'acceptations sont respectés.

ANNEXE 3
Rappels de chimie organique

Sel : Composé ionique constitué d'anions et de cations formant au final un produit neutre sans charge nette.

Groupe Alkyle : issus d'un alcane qui est un hydrocarbure saturé composé d'atomes de carbone liés par liaisons simples à un nombre maximal d'atome d'hydrogène (exemple : méthyl, éthyl, propyl...).

Dans le groupement alkyle, l'alcane a perdu un atome d'hydrogène.

Groupe Aryle : issus d'un arène qui est un hydrocarbure aromatique, c'est-à-dire un hydrocarbure possédant un cycle ayant une alternance de liaisons simples et doubles respectant la règle d'aromaticité.

Composé halogéné : il s'agit d'un composé portant un groupe halogène qui sont des éléments de la 17^{ème} colonne du tableau périodique type Fluor, Chlore, Brome ou Iode. L'Astate et le Tennessé étant très radioactifs et synthétique pour le dernier, ils ne sont pas à prendre en compte dans cette famille d'éléments chimique.

Famille d'éléments chimique : regroupements d'éléments chimiques en fonction des propriétés physico chimique des corps simples à l'état standard.

Composé organométallique : composé possédant au moins une liaison covalente entre un atome de carbone et un métal.

Composé organique et inorganique : sauf exceptions, les composés organiques sont des composés possédant généralement un atome de carbone par opposition aux composés inorganiques qui en général ne possèdent pas d'atome de carbone mais un ou plusieurs atomes métalliques dans leur structure.

Groupe alcoxy : également appelé alcoxyle, il s'agit d'un groupement composé d'un alkyle lié à un atome d'oxygène.

BIBLIOGRAPHIE

1. SANTALLIER M, PECHEREAU J, PECHEREAU A. Anatomie pour les écoles d'Orthoptie, v1.0. Alain & Jocelyne Pêchereau; 2008.
2. PROVISU. Découvrez tout sur l'oeil, son anatomie, son fonctionnement. [Internet]. [cité 19 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.provisu.ch/fr/dossiers/oeil-et-vision.html>
3. CORNUT P-L. L'anatomie de la conjonctive - Pôle Vision Val d'Ouest - Centre spécialiste de l'ophtalmologie à Lyon [Internet]. 2020 [cité 19 févr 2020]. Disponible sur: https://www.polevision.fr/Anatomie_oeil_normal_la_conjonctive_ophtalmologie_Centre_Pole_Vision_Lyon.php
4. Chapitre III : La conjonctive [Internet]. [cité 19 févr 2020]. Disponible sur: http://opticienlunetier.fr/files/chapitre_iii_728.pdf
5. LAROUSSE. Conjonctive [Internet]. [cité 19 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Conjonctive/1001426>
6. MEDIRIS. La cornée [Internet]. Mediris. 2014 [cité 19 févr 2020]. Disponible sur: <http://www.mediris.com/loeil-et-ses-experts/loeil-et-sa-fonction/lanatomie-de-loeil/la-cornee/>
7. SJAASTAD OV, SAND O, HOVE K. Physiology of domestic animals 2nd edn. Eye Opener [Internet]. Scandinavian Veterinary Press. 2010 [cité 19 févr 2020]; Disponible sur: <http://rodsncones.blogspot.com/2014/05/physiology-image-formation.html>
8. IRIS PHOTO [Internet]. Kollektiv Lumen. [cité 19 févr 2020]. Disponible sur: <https://irisphoto.art/>
9. GATINEL D. Iris et couleur des yeux [Internet]. 2020 [cité 19 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.gatinel.com/recherche-formation/pupille-irienne/iris-couleur-yeux/>
10. APTEL F. Rapport SFO - Chapitre 7 - Mécanismes de l'écoulement de l'humeur aqueuse [Internet]. 2014 [cité 21 févr 2020]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2014/html/file_100018.html
11. PATTE M, SILLAIRE I, PAUCHARD E, COULANGEON LM, KANTELIP B, BACIN F. Barrières hémato-oculaires. Physiologie. EMC - Ophtalmol. janv 2006;3(4):1-12.
12. SIMON M. Adhérence cellulaire [Internet]. Cours Pharmacie. 2011 [cité 21 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/adherence-cellulaire.html>
13. ADE-DAMILANO M. Dispositif de jonction, jonction imperméable, communicante, d'ancrage [Internet]. 2005 [cité 21 févr 2020]. Disponible sur: <https://www3.unifr.ch/apps/med/elearning/fr/epithel/epithel05.html>
14. ESSAM OSMAN MD. Basic Anatomy & Physiology of the Eye [Internet]. [cité 21 févr 2020]. Disponible sur: <https://slideplayer.com/slide/8572068/>
15. HAGGSTROM M. Medical gallery of Mikael Häggström.

WikiJournal Med. 2014;1(2).

16. SENECHAL A. Chapitre 2 - Des cellules photoréceptrices aux aires visuelles cérébrales [Internet]. [cité 21 févr 2020]. Disponible sur: <https://slideplayer.fr/slide/13428436/>

17. KOSKELA TK, REISS GR, BRUBAKER RF, ELLEFSON RD. Is the high concentration of ascorbic acid in the eye an adaptation to intense solar irradiation? Invest Ophthalmol Vis Sci. oct 1989;30(10):2265-7.

18. REDDY VN, GIBLIN FJ, LIN L-R, CHAKRAPANI B. The Effect of Aqueous Humor Ascorbate on Ultraviolet B-Induced DNA Damage in Lens Epithelium. 1998;39(2):7.

19. BECHETOILLE A. Glaucomes. France: Japperenard; 1987.

20. TORIS CB, YABLONSKI ME, WANG Y-L, CAMRAS CB. Aqueous humor dynamics in the aging human eye. Am J Ophthalmol. avr 1999;127(4):407-12.

21. KANSKI JJ, BOWLING B, NISCHAL KK, PEARSON A. Clinical ophthalmology : a systematic approach. Edinburgh; New York: Elsevier/Saunders; 2011.

22. JEAN C. Glaucome : Types, symptômes, diagnostic, suivi, traitements [Internet]. Santé sur le net. [cité 25 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/ophtalmologie/glaucome/>

23. AMELI. Comment mettre un collyre ? [Internet]. [cité 25 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.ameli.fr/assure/sante/utiliser-medicaments/mettre-collyre>

24. BANNINGER PB, BECHT CN. Comment un médicament atteint-il son site d'action dans l'œil? Forum Med Suisse. 16 mars 2011;(2011/11):192-5.

25. omedit_oculaire.pdf [Internet]. [cité 25 févr 2020]. Disponible sur: http://www.omedit-paysdelaloire.fr/files/00/01/22/00012234-c65c89ff8136e546fabf33c6e0c2f9c5/omedit_oculaire.pdf

26. DEFRANCESCHI M. Chimie et médicaments. Paris: Ellipses; 2011.

27. LEE VHL, ROBINSON JR. Topical Ocular Drug Delivery: Recent Developments and Future Challenges. J Ocul Pharmacol Ther. janv 1986;2(1):67-108.

28. SAETTONE MF, BUCCIM, SPEISER P. Ophthalmic Drug Delivery: Biopharmaceutical, Technological and Clinical Aspects. New York, NY: Springer; 2013.

29. DUPIN O, TRINQUAND C. Ocular drug penetration. J Fr Ophtalmol. mai 2000;23(5):501-4; quiz 523.

30. SEARS ML. Pharmacology of the Eye. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1984.

31. WEHRLE P. Pharmacie galénique: formulation et technologie pharmaceutique. Paris: Maloine; 2012.

32. BROSSARD D, CRAUSTE-MANCIET S. Monographie de la

- Pharmacopée européenne [Internet]. Techniques de l'Ingénieur. 2014 [cité 25 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/mise-en-forme-des-medicaments-42611210/formes-ophtalmiques-pha2018/monographie-de-la-pharmacopee-europeenne-pha2018niv10002.html>
33. LE VAN GONG L. Les collyres: intérêts et application en officine [These pour l'obtention du Diplome d'Etat de Docteur en Pharmacie]. Université de Bordeaux; 2017.
 34. LE HIR A, CHAUMEIL J-C, BROSSARD D, CHARRUEAU C, CRAUSTE-MANCIET S. Pharmacie galénique: bonnes pratiques de fabrication des médicaments. Issy-les-Moulineaux: Elsevier, Masson; 2016.
 35. PISELLA P-J. Surface oculaire: rapport 2015. 2015.
 36. COLES WH, JAROS PA. Dynamics of ocular surface pH. Br J Ophthalmol. 1 août 1984;68(8):549-52.
 37. CFA de PHARMACIE de TOULOUSE. Pharmacie galénique - Chapitre V - Les excipients. 2015.
 38. DECOTTIGNIES A. Catalyse dans l'eau en présence de cyclodextrine native ou modifiée: Application au couplage croisé de type Suzuki. [Thèse pour le titre de Docteur en Génie des Procédés Industriels et du Développement Durable]. Université de Technologie de Compiègne; 2013.
 39. SALUSTIO PJ, PONTES P, CONDUTO C, SANCHES I, CARVALHO C, ARRAIS J, et al. Advanced Technologies for Oral Controlled Release: Cyclodextrins for Oral Controlled Release. AAPS PharmSciTech. déc 2011;12(4):1276-92.
 40. AUBERT A. Les conservateurs antimicrobiens en pharmacie&cosmétique. UE 6 -Préparations officinales et magistrales présenté à; 2018 nov; Département Pharmacie Galénique et Biomatériaux.
 41. COHEN Y, GLEITZ C. Les conservateurs dans les produits cosmétiques: cas des parabens et du phénoxyéthanol. Et que penser des produits cosmétiques « "biologiques" »? [These pour l'obtention du Diplome d'Etat de Docteur en Pharmacie]. Grenoble; 2009.
 42. HALLOUET P, EGGERS J, MALAQUIN-PAVAN E. Fiches de soins infirmiers. Paris: Masson; 2006.
 43. BERTHELEMY S. Préparations ophtalmiques et conseils d'utilisation. Actual Pharm. févr 2009;48(482):22-3.
 44. GROSSERON. Bouillon de Mueller-Hinton [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: https://www.grosseron.com/mueller-hinton-bouillon_51-385-1-851-1-9620.html
 45. ROBIOLLE S, PERRIN_GUYOMARD A, SOUMET C. Sensibilité aux désinfectants des Escherichia coli porteurs d'une résistance aux céphalosporines de 3ème génération de type CTX-M. 2012.
 46. CORRE J, LUCCHINI JJ, MERCIER GM, CREMIEUX A. Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane

- alterations. *Res Microbiol.* janv 1990;141(4):483-97.
47. CAVALLO J-D. Concentrations critiques, spectre d'activité des antibiotiques. Ecole de santé des armées; 2017.
 48. LARCHER C. Détermination CMI. lycée des Métiers de la Biologie et de la Chimie (lycée Saint Louis) à Bordeaux; 2016.
 49. GIRARD F, MOREDA R. CMI et CMB milieu liquide - Lycée Docteur Lacroix - Narbonne [Internet]. [cité 25 févr 2020]. Disponible sur: <https://studylibfr.com/doc/1323239/cmi-et-cmb-milieu-liquide>
 50. POKHREL P. E (Epsilometer) Test- Principe, Purpose, Procedure, Result Interpretation with Precaution, Advantages and Disadvantages [Internet]. *Microbiology Notes.* 2015 [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://microbiologynotes.com/e-epsilometer-test-principle-purpose-procedure-result-interpretation-with-precaution-advantages-and-disadvantages/>
 51. BENSAKHRIA A. Milieux de culture et Techniques d'ensemencement » Magazine Science [Internet]. *Magazine Science.* 2018 [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.magazinescience.com/biologie/milieux-de-culture-techniques-densemencement/>
 52. GANIERE JP, MANGION C, PERIDY M. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacin, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. *Rev Méd Vét.* 2004;6.
 53. DABAT Y. AntibioGramme en milieu liquide, recherche de la CMI et de la CMB d'un germe responsable d'une infection urinaire [Internet]. 2017 [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <http://stlbiotekanglet.fr/wp-content/uploads/2017/02/AT12-AntibioGramme-CMI-et-CMB-2017.pdf>
 54. Sensititre-Brochure-FR.pdf [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Sensititre-Brochure-FR.pdf>
 55. ANOUNE C. Profil de bio-résistance d'E coli chez les volailles : AntibioGramme. 2013;23.
 56. CAVALLO J-D. Lecture interprétative de l'antibioGramme. Ecole du Val-de-Grâce; 2017.
 57. VAEDE D, BAUDOIN C, WARNET J-M, BRIGNOLE-BAUDOIN F. Les conservateurs des collyres : vers une prise de conscience de leur toxicité. *J Fr Ophtalmol.* sept 2010;33(7):505-24.
 58. DIRECTION DE LA QUALITE DU MEDICAMENT. Pharmacopée européenne supplément 6.6: publiée selon la Convention relative à l'élaboration d'une pharmacopée européenne (Série des traités européens, n° 50). Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2008.
 59. GOMEZ G. Abécédaire de chimie organique : Ammoniums quaternaires [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: [122](https://tice.ac-

</div>
<div data-bbox=)

montpellier.fr/ABCDORGA/Famille5/QUATS.htm

60. HALLS MD, SCHLEGEL HB. Chemistry Inside Carbon Nanotubes: the Menshutkin Reaction. *J Phys Chem B*. févr 2002;106(8):1921-5.
61. JU - Université Carl von Ossietzky d'Oldenbourg. Chlorure de benzalkonium. 2013.
62. ROTH. Cétrimonium bromure (CTAB) [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.carlroth.com/fr/fr/detergents/cetrimonium-bromure-%28ctab%29/p/9161.1>
63. LGC. Benzododecinium bromure [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.lgcstandards.com/FR/fr/Benzododecinium-bromure/p/FPC0141>
64. MERCK. Chlorure de cétypyridinium [Internet]. 2018. Disponible sur: <https://www.indiamart.com/proddetail/cetylpyridinium-chloride-11656286162.html>
65. ANSM. Benzododécinium (bromure de). Pharmacopée française; 1996.
66. GILBERT P, MOORE LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol*. oct 2005;99(4):703-15.
67. KHALED T. Les Organomercuriels [Internet]. Documents de Médecine Légale. 2010 [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://medecinelegale.wordpress.com/2010/12/24/les-organomercuriels/>
68. VIGUIER M. Érythème mercuriel - Thérapeutique Dermatologique [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.therapeutique-dermatologique.org/spip.php?article1101>
69. DRUGSTER. Phenylmercuric Nitrate [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://drugster.org/disinfectants-and-preservatives/phenylmercuric-nitrate>
70. CSST. Nitrate de phénylmercure [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: https://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/Pages/fiche-complete.aspx?no_produit=107516
71. CNESST. Acétate phénylmercurique [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: https://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/Pages/fiche-complete.aspx?no_produit=52399
72. ROTH. Phénylmercure acétate [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.carlroth.com/fr/fr/a-a-z/phenylmercure-acetate/p/6626.1>
73. SPECTRABASE. Phenylmercuric borate [Internet]. 2018. Disponible sur: <https://spectrabase.com/spectrum/ALKICTekBoB>
74. CNESST. Fiche complète pour Borate de phénylmercure [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: https://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/Pages/fiche-complete.aspx?incr=0&no_produit=1361641&no_seq=5
75. PUBCHEM. Mercurobutol [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible

- sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71633>
76. ACADEMIE NATIONALE DE PHARMACIE. Thiomersal [Internet]. 2015. Disponible sur: <https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Thiomersal>
77. ACADEMIE NATIONALE DE PHARMACIE. Merbromine [Internet]. 2016. Disponible sur: <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Merbromine>
78. KIRKIACHARIAN S. Guide de chimie médicinale et médicaments. Lavoisier; 2010. 899 p.
79. ALLAIN P. Dérivés mercuriels, pharmacologie [Internet]. Pharmacorama. 2016 [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.pharmacorama.com/pharmacologie/medicaments-elements/divers/derives-mercuriels-pharmacologie/>
80. UNIVERSITE DE GENEVE. Uvéites [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/uveites/deck/13968803>
81. LYNX VISION. Cataracte [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://centrelinxvision.com/pathologie-2/>
82. PICOT A, GROSMAN M, GROSMAN M. Famille : COMPOSES ORGANOMINERAUX Novembre 2009. :2.
83. AFPA. Réponse aux allégations Vaccins et mercure - fiche_vaccins_mercure.pdf. 2017.
84. AFSSAPS. Le thiomersal - Fiche-Thiomersal.pdf. 2009.
85. LANCASHIRE R. Nomenclature des composés de Coordination [Internet]. 2009 [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <http://ressources.univ-lemans.fr/AccessLibre/UM/Pedago/chimie/06/deug/CHIM105B/compnom.html>
86. ACADEMIE NATIONALE DE PHARMACIE. Guanidine [Internet]. 2017. Disponible sur: <https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Guanidine>
87. WILKINSON RA, PINCUS SH, SHEPARD JB, WALTON SK, BERGIN EP, LABIB M, et al. Novel Compounds Containing Multiple Guanide Groups That Bind the HIV Coreceptor CXCR4. Antimicrob Agents Chemother. 1 janv 2011;55(1):255-63.
88. ACADEMIE NATIONALE DE PHARMACIE. Chlorhexidine [Internet]. 2017. Disponible sur: [https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Chlorhexidine_\(digluconate_de\)](https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Chlorhexidine_(digluconate_de))
89. ZENG P, RAO A, WIEDMANN TS, BOWLES W. Solubility Properties of Chlorhexidine Salts. Drug Dev Ind Pharm. févr 2009;35(2):172-6.
90. PUBCHEM. Chlorhexidine digluconate [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9552081>
91. ABBARA A. Les antiseptiques : classification et caractéristiques [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <http://www.aly->

- abbara.com/livre_gyn_obs/termes/hygiene/antiseptiques_classification_caracteristiques.html
92. BOULANGER G, GEORGE MN. Rapport SFO - Chapitre 10 - Surface oculaire et lentilles [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100022.html
 93. COUTEAU C, COIFFARD L. La chlorhexidine, laissons-la dans l'armoire à pharmacie ! [Internet]. Regard sur les cosmétiques. 2018 [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.regard-sur-les-cosmetiques.fr/nos-regards/la-chlorhexidine-laissons-la-dans-l-armoire-a-pharmacie-856/>
 94. LIN S-C, HUANG C-F, SHEN L-J, WANG H-J, LIN C-Y, WU F-LL. Formulation and stability of an extemporaneous 0.02% chlorhexidine digluconate ophthalmic solution. *J Formos Med Assoc.* déc 2015;114(12):1162-9.
 95. BELOW H, ASSADIAN O, BAGUHL R, HILDEBRANDT U, JAGER B, MEISSNER K, et al. Measurements of chlorhexidine, p-chloroaniline, and p-chloronitrobenzene in saliva after mouth wash before and after operation with 0.2% chlorhexidine digluconate in maxillofacial surgery: a randomised controlled trial. *Br J Oral Maxillofac Surg.* févr 2017;55(2):150-5.
 96. AADRAOUI SE. Les injections sous conjonctivales du bévécizumab dans le Traitement de la néo vascularisation cornéenne [These pour l'obtention du Doctorat en Médecine]. Marrakech; 2012.
 97. PUBCHEM. Chlorobutanol [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5977>
 98. PUBCHEM. 2-Phenylethanol [Internet]. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6054>
 99. BARROWLIFF M. Preparation of chlorobutanol [Internet]. PrepChem.com. 2019 [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.prepchem.com/synthesis-of-chlorobutanol/>
 100. UNUIGBOJE A, EMENIKE B. Convergent preparation of 2-phenylethanol. *African Journal of Pure and Applied Chemistry Vol. 5(6)*, p. 123-126, June, 2011.
 101. ELKIN E. Chlorobutanol as a preservative in ophthalmic solutions [Thesis for the degree Master of science (Pharmacy)]. University of Southern California; 1956.
 102. KRACKE G, LANDRUM A. Chlorobutanol, a Pharmaceutical Preservative and Sedative Hypnotic, Inhibits Brain Type Voltage Gated Sodium Channels. *Biophys J.* févr 2011;100(3):421a.
 103. KRAMER A, STEVEN G. Corneal Cytotoxicity of Topically Applied Drugs, Vehicles and Preservatives. *Surv Ophthalmol.* 1980;25(1).
 104. BUEHLER EV, NEWMANN EA. A comparison of eye irritation in monkeys and rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol.* nov 1964;6(6):701-10.
 105. BEHAR-COHEN F, DIRANI A. Rapport SFO - Chapitre 13 -

- Principes thérapeutiques : galénique [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100026.html
106. DESMETTRE T, DEVOISSELLE JM, MORDON S. Fluorescence properties and metabolic features of fluorescein. *J Fr Ophtalmol*. nov 2000;23(9):821-33.
107. GUEUDRY J, MURAINÉ M. Rapport SFO - Chapitre 8 - Ulcères et ulcérations cornéennes chroniques [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100020.html
108. COTINAT J. Specular microscopy of the corneal endothelium. *J Fr Ophtalmol*. mars 1999;22(2):255-61.
109. FUTURA SCIENCES. Microscope électronique en transmission [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-microscope-electronique-transmission-7781/>
110. EAG Laboratories. Microscopie électronique en transmission (TEM) et Microscopie électronique en transmission à balayage (STEM) [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.eaglabs.fr/cm/tem-stem.html>
111. GAIN P. Corneal endothelium under specular microscopy. 2006.
112. HUGHES L. Retina layers, SEM.
113. MESSENT V. Déshydratation, Inclusions, Coupes, ... et microscopie électronique à transmission. 2015.
114. HOPITAL FONDATION ROTHSCHILD. Electrophysiologie, examens cellules visuelles, basse vision [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <http://www.frothschild.fr/soins/ophtalmologie/electrophysiologie.html>
115. MONNIER M, DIETERLE P, HUFSCHEMIDT HJ. Principes d'électro-oculographie et d'électro-nystagmographie chez l'homme. 1952 [cité 28 févr 2020]; Disponible sur: <https://www.e-periodica.ch/digbib/view?pid=sam-001:1952:8::702>
116. RIGAUDIERE F, CHARLIER J, LE GARGASSON J-F, GRALL Y. V-1 : Réponses évoquées : recueil et traitement du signal. In: *Oeil et Physiologie de la vision*. Rigaudiere(Florence); 2010.
117. RIGAUDIERE F. V-2 : L'électro-oculogramme. In: *Oeil et Physiologie de la vision*. Rigaudiere(Florence); 2010.
118. BONNARD N, BRONDEAU MT, FALCY M, JARGOT D, ROBERT S, SCHNEIDER O. Chlorures d'alkyldiméthylbenzylammonium (FT 253). Généralités - Fiche toxicologique - INRS [Internet]. 2019 [cité 27 févr 2020]. Disponible sur: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHET_OX_253
119. ANALYTICE. Benzyl diméthyl octyl ammonium chloride (BAC C8)

- (959-55-7) ; Benzyltrimethyldecylammonium chloride (BAC C10) (965-32-2) ; Benzyltrimethyldodecylammonium chloride (BAC C12) (139-07-01) ; Benzyltrimethyltetradecylammonium chloride (BAC C14) (139-08-2) ; Benzyltrimethylhexadecylammonium chloride (BAC C16) (122-18-9) ; Benzyltrimethyloctadecylammonium chloride (BAC C18) (122-19-0) ; Benzalkonium chloride (total) [Internet]. Analytice. [cité 27 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.analytice.com/catalogue/benzyltrimethyloctylammonium-chloride-bac-c8-959-55-7-benzyltrimethyldecylammonium-chloride-bac-c10-965-32-2-benzyltrimethyldodecylammonium-chloride-bac-c12-139-07-01-benzyltrimethyltetradecyl-10930/>
120. FERK F, MISIK M, HOELZL C, UHL M, FUERHACKER M, GRILLITSCH B, et al. Benzalkonium chloride (BAC) and dimethyldioctadecyl-ammonium bromide (DDAB), two common quaternary ammonium compounds, cause genotoxic effects in mammalian and plant cells at environmentally relevant concentrations. *Mutagenesis*. 20 août 2007;22(6):363-70.
121. DEUTSCHLE T, PORKERT U, REITER R, KECK T, RIECHELMANN H. In vitro genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. *Toxicol In Vitro*. déc 2006;20(8):1472-7.
122. CROSS J, SINGER EJ. *Cationic Surfactants: Analytical and Biological Evaluation*. CRC Press; 2019. 399 p.
123. DEBBASCH C, BRIGNOLE F, PISELLA PJ, WARNET JM, RAT P, BAUDOUIN C. Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. mars 2001;42(3):642-52.
124. DEBBASCH C, PISELLA PJ, DE SAINT JEAN M, RAT P, WARNET JM, BAUDOUIN C. Mitochondrial activity and glutathione injury in apoptosis induced by unpreserved and preserved beta-blockers on Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. oct 2001;42(11):2525-33.
125. FLEURETTE J, FRENEY J, REVERDY M-E. *Antisepsie et désinfection*. Paris: Editions Eska; 1995.
126. BLOCK SS, éditeur. *Disinfection, sterilization, and preservation*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. 1481 p.
127. PARA BV, NÚÑEZ O, MOYANO E, GALCERAN MT. Analysis of benzalkonium chloride by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *ELECTROPHORESIS*. juin 2006;27(11):2225-32.
128. SFO. *Recommandation pour la pratique clinique « Prise en charge des rhinites chroniques »*. 2017.
129. GRAF P. Benzalkonium chloride as a preservative in nasal solutions: re-examining the data. *Respir Med*. sept 2001;95(9):728-33.
130. GILAIN L, COUDERT A. Rhinites d'origine médicamenteuse. Oto-

- Rhino-Laryngol [Internet]. 2014 [cité 28 févr 2020]; Disponible sur: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0246-0351\(14\)63725-9](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0246-0351(14)63725-9)
131. MALLANTS R, JORISSEN M, AUGUSTIJNS P. Effect of preservatives on ciliary beat frequency in human nasal epithelial cell culture: single versus multiple exposure. *Int J Pharm.* 29 juin 2007;338(1-2):64-9.
 132. HO C-Y, WU M-C, LAN M-Y, TAN C-T, YANG A-H. In vitro effects of preservatives in nasal sprays on human nasal epithelial cells. *Am J Rhinol.* avr 2008;22(2):125-9.
 133. GILAIN L. 9ème congrès francophone d'allergologie - Actualités ORL. 2014.
 134. VIDAL. Benzalkonium chlorure [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/substances/525/benzalkonium_chlorure/
 135. HEGSTAD K, LANGSRUD S, LUNESTAD BT, SCHEIE AA, SUNDE M, YAZDANKHAH SP. Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health? *Microb Drug Resist.* juin 2010;16(2):91-104.
 136. CARSON RT, LARSON E, LEVY SB, MARSHALL BM, AIELLO AE. Use of antibacterial consumer products containing quaternary ammonium compounds and drug resistance in the community. *J Antimicrob Chemother.* nov 2008;62(5):1160-2.
 137. MICHAEL R, RICHARDS E, XING DKL. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activities of Selected Lozenges. *J Pharm Sci.* déc 1993;82(12):1218-20.
 138. LEAL JS, GONZALEZ JJ, KAISER KLE, PALABRICA VS, COMELLES F, GARCIA MT. On the Toxicity and Biodegradation of Cationic Surfactants Über die Toxizität und den biologischen Abbau kationischer Tenside. *Acta Hydrochim Hydrobiol.* févr 1994;22(1):13-8.
 139. SCOTT MJ, JONES MN. The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* nov 2000;1508(1-2):235-51.
 140. SAYADI S. Traitement des effluents industriels riches en tensioactifs par un bioréacteur membranaire : Application réelle. 2005.
 141. MERCK. FDS Benzalkonium Chloride. 2017.
 142. SIRE A, AMOUROUX I. IFREMER - Avantages et limites du recours aux BCF - BAF pour produire des VGE mollusques. 2016.
 143. ABARNOU A. ONEMA - Elaboration d'une méthodologie pour établir des NQE dans des matrices pertinentes et alternatives à l'eau pour les substances listées dans la DCE et DCSMM. 2012.
 144. THERMOFISHER SCIENTIFIC. FDS Benzalkonium Chloride. 2019.
 145. INERIS. Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé

- [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.senat.fr/rap/100-261/100-261137.html>
146. HATINEN A, TERASVIRTA M, FRAKI JE. Contact allergy to components in topical ophthalmologic preparations. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 27 mai 2009;63(4):424-6.
147. KYRKLUND C, ALANKO K, KARI O. Allergic Contact Dermatitis from Ophthalmic Medications. 2017;5.
148. UTER W, LESSMANN H, GEIER J, SCHNUCH A. Is the irritant benzalkonium chloride a contact allergen? A contribution to the ongoing debate from a clinical perspective. *Contact Dermatitis*. juin 2008;58(6):359-63.
149. MONTI D, CHETONI P, BURGALASSI S, NAJARRO M, SAETTONE MF. Increased corneal hydration induced by potential ocular penetration enhancers: assessment by differential scanning calorimetry (DSC) and by desiccation. *Int J Pharm*. janv 2002;232(1-2):139-47.
150. BURSTEIN NL, KLYCE SD. Electrophysiologic and morphologic effects of ophthalmic preparations on rabbit cornea epithelium. 1977;16:13.
151. EBIOLOGIE. L'apoptose, une mort cellulaire programmée - Cours de biologie [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.ebiologie.fr/cours/s/13/l-apoptose-une-mort-cellulaire-programmee>
152. BERGER F. L'apoptose ou mort cellulaire programmée. UE2 : Biologie cellulaire - Université Joseph Fourier de Grenoble présenté à; 2011.
153. DE SAINT JEAN M, BRIGNOLE F, BRINGUIER AF, BAUCHET A, FELDMANN G, BAUDOIN C. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. mars 1999;40(3):619-30.
154. GRANT RL, ACOSTA D. Prolonged adverse effects of benzalkonium chloride and sodium dodecyl sulfate in a primary culture system of rabbit corneal epithelial cells. *Fundam Appl Toxicol Off J Soc Toxicol*. sept 1996;33(1):71-82.
155. BAUDOIN C, PISELLA P-J, FILLACIER K, GOLDSCHILD M, BECQUET F, DE SAINT JEAN M, et al. Ocular surface inflammatory changes induced by topical antiglaucoma drugs. *Ophthalmology*. mars 1999;106(3):556-63.
156. WILSON WS, DUNCAN AJ, JAY JL. Effect of benzalkonium chloride on the stability of the precorneal tear film in rabbit and man. *Br J Ophthalmol*. 1 nov 1975;59(11):667-9.
157. URSAPHARM. Hylo-Comod® [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.ursapharm.be/produits/secheresse-oculaire/hylo-eye-care/hylo-comod/>
158. HOLLY FJ, LAMBERTS DW, MACKEEN DL, éditeurs. *The Preocular tear film in health, disease, and contact lens wear*. Lubbock, Texas:

Dry Eye Institute; 1986. 987 p.

159. BECQUET F, GOLDSCHILD M, MOLDOVAN MS, ETTAICHE M, GASTAUD P. Histopathological effects of topical ophthalmic preservatives on rat corneoconjunctival surface. *Curr Eye Res.* janv 1998;17(4):419-25.

160. MIETZ H, SCHLOTZER-SCHREHARDT U, LEMKE JH, KRIEGLSTEIN GK. Early conjunctival changes following treatment with metipranolol and preservatives are not reversible with dexamethasone. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* juill 1997;235(7):452-9.

161. GUEUDRY J, VERA L, MURAINÉ M. Les conjonctivites fibrosantes. *J Fr Ophtalmol.* oct 2010;33(8):577-85.

162. Symblépharon [Internet]. 2019 [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.lalanguefrancaise.com/dictionnaire/definition-symblépharon/>

163. GATINEL D. La cornée [Internet]. 2014 [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.gatinel.com/recherche-formation/la-cornee/>

164. FURRER P, BERGER J, MAYER JM, GURNY R. Étude comparative de la tolérance oculaire de 3 spécialités à base de timolol : influence du conservateur sur la tolérance oculaire. *J Fr Ophtalmol.* 2020;24:8.

165. LOPEZ BERNAL D, UBELS JL. Quantitative evaluation of the corneal epithelial barrier: effect of artificial tears and preservatives. *Curr Eye Res.* juill 1991;10(7):645-56.

166. HENDRIX DVH, WARD DA, BARNHILL MA. Effects of anti-inflammatory drugs and preservatives on morphologic characteristics and migration of canine corneal epithelial cells in tissue culture. *Vet Ophthalmol.* juin 2002;5(2):127-35.

167. COLLIN HB, GRABSCH BE. The effect of ophthalmic preservatives on the healing rate of the rabbit corneal epithelium after keratectomy. *Am J Optom Physiol Opt.* mars 1982;59(3):215-22.

168. GOTO Y. Human Lens Epithelial Cell Damage and Stimulation of Their Secretion of Chemical Mediators by Benzalkonium Chloride Rather Than Latanoprost and Timolol. *Arch Ophthalmol.* 1 juin 2003;121(6):835.

169. SAMPLES JR, BINDER PS, NAYAK S. The effect of epinephrine and benzalkonium chloride on culture corneal endothelial and trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res.* juill 1989;49(1):1-12.

170. BRANDT JD. Does Benzalkonium Chloride Cause Cataract? *Arch Ophthalmol.* 1 juin 2003;121(6):892.

171. NEU F. Cystoid macular edema. *Bull Soc Belge Ophtalmol.* 2007;(304):71-6.

172. ZHOU T, CHIQUET C. Rapport SFO - Chapitre 11 - Œdème maculaire postopératoire (dont syndrome d'Irvine-Gass) [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2016/html/file_100024.html

173. SNOF. Oedème maculaire cystoïde [Internet]. SNOF. 2012 [cité 28

- févr 2020]. Disponible sur: <https://www.snof.org/encyclopedie/oed%C3%A8me-maculaire-cysto%C3%AFde>
174. LUMBROSO-LE ROUIC L. Un oedème maculaire cystoïde révélateur d'un mélanome de la choroïde. Images En Ophtalmol [Internet]. sept 2016 [cité 28 févr 2020];10(5). Disponible sur: <https://www.edimark.fr/ressources/oedeme-maculaire-cystoi-revelateur-melanome-choroi-figure-3>
175. CORNUT P-L. Pathologies oculaires - La DMLA ou Dégénérescence Maculaire liée à l'Age (formes atrophique ou sèche et exsudative ou humide, causes, diagnostic, traitement, évolution) - Pôle Vision Val d'Ouest - Centre spécialiste de l'ophtalmologie à Lyon [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: https://www.polevision.fr/Pathologies_oculaires_la_DMLA_Centre_Pole_Vision_Lyon.php
176. CHOU A, HORI S, TAKASE M. Ocular toxicity of beta-blockers and benzalkonium chloride in pigmented rabbits: electrophysiological and morphological studies. Jpn J Ophthalmol. 1985;29(1):13-23.
177. VILLEMONT AS. Comparaison de la qualité d'instillation des collyres conditionnés en unidoses et multidoses chez le patient glaucomateux : étude prospective multicentrique randomisée en cross-over [Thèse d'exercice de médecine]. Université Claude Bernard Lyon 1; 2017.
178. UNITHER Pharmaceuticals. Unidoses stériles : Blow-Fill-Seal (BFS), une technologie au service de l'ophtalmologie [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.unither-pharma.com/fr/pathologies-et-formes-galeniques/unidoses-steriles-blow-fill-seal-bfs-une-technologie-au-service-de-lophthalmologie>
179. OMEDIT. Liste préférentielle de collyres et gels ophtalmiques. 2016.
180. ROMMELAG ENGINEERING. Inventeur des solutions Blow-fill-seal [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.rommelag.com/fr/engineering/bfs/>
181. UNITHER Pharmaceuticals. Blow-fill-seal (BFS) [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.unither-pharma.com/fr/technologies/blow-fill-seal-bfs>
182. LABORATOIRES THEA. ABAK - un concentré de technologie dans un flacon [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: https://www.laboratoires-thea.com/medias/abak_brochure_fr.pdf
183. LABORATOIRES THEA. Le labo du sans conservateur [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.laboratoires-thea.com/fr/groupe/le-labo-du-sans-conservateur>
184. URSAPHARM. Comod®-System [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.youtube.com/watch?v=69FvRBWxc-o>
185. URSAPHARM. The COMOD system [Internet]. [cité 28 févr 2020].

- Disponible sur: <https://hylo.de/en/products/the-comod-system/>
186. COUTO A. Pylote révolutionne les plastiques anti-microbiens [Internet]. 2016 [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <http://www.plastiques-caoutchoucs.com/Pylote-revolutionne-les-plastiques.html>
187. PYLOTE [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://pylote.com/>
188. KAHOOK MY. The Pros and Cons of Preservatives [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.reviewofophthalmology.com/article/the-pros-and-cons-of-preservatives>
189. BODAGHI B. Uvéites : les nouveautés thérapeutiques. *Réflexions ophtalmologiques*. mars 2012;Tome 17(153).
190. LABBE A, PAULY A, LIANG H, BRIGNOLE-BAUDOUIN F, MARTIN C, WANET J-M, et al. Comparison of toxicological profiles of benzalkonium chloride and polyquaternium-1: an experimental study. *J Ocul Pharmacol Ther Off J Assoc Ocul Pharmacol Ther*. août 2006;22(4):267-78.
191. SHAARAWY T. *Glaucoma medical diagnosis and therapy*. London: Elsevier; 2015.
192. YIKRAZUUL. Structure of polyquaternium 1 [Internet]. 2011 [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polyquaternium_1.svg
193. RYAN G, FAIN JM, LOVELACE C, GELOTTE KM. Effectiveness of ophthalmic solution preservatives: a comparison of latanoprost with 0.02% benzalkonium chloride and travoprost with the sofZia preservative system. *BMC Ophthalmol*. 21 avr 2011;11:8.
194. MORTEMOSQUE B, BREMOND-GIGNAC D. Rapport SFO 2015 - Chapitre 5 - Allergie oculaire [Internet]. [cité 5 mai 2020]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100017.html
195. INSERM. Glaucome [Internet]. Inserm - La science pour la santé. [cité 5 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-essentielle/dossiers-information/glaucome>
196. MAESTRACCI A. *Tableau périodique des éléments*. 2016.

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.