HAL
open science

Stratégies galéniques actuelles dans le développement de formes ophtalmiques : application au syndrome de l'œil sec

Maëlis Brito

To cite this version:

Maëlis Brito. Stratégies galéniques actuelles dans le développement de formes ophtalmiques : application au syndrome de l'œil sec. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03545014

HAL Id: dumas-03545014

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03545014v1

Submitted on 27 Jan 2022

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.

université de BORDEAUX

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2021 Thèse n°132

THÈSE POUR L'OBTENTION DU

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par Maëlis BRITO
Né(e) le 22 avril 1997 à Bordeaux

Le 17 décembre 2021

STRATÉGIES GALÉNIQUES ACTUELLES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE FORMES OPHTALMIQUES : APPLICATION AU SYNDROME DE L'ŒIL SEC

Sous la direction de Madame Gaëlle VACHER

Membres du jury :

Mme Gaëlle VACHER	Directrice de thèse - Pharmacienne, PhD
Mme Tina KAUSS	Présidente du jury - Pharmacienne, MCU HDR
Mme Capucine SORBIER	Membre industriel - Pharmacienne

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Gaëlle VACHER, pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse. Merci pour votre disponibilité, votre bienveillance et vos conseils dans la construction de ce travail. Merci plus personnellement pour votre suivi durant ces dernières années de pharmacie.

Merci à Tina KAUSS d'avoir accepté de présider ce jury. Votre partage de connaissances durant ces études de pharmacie m'a permis d'avoir un œil plus critique sur certains aspects de ma thèse.

Merci à Capucine SORBIER, pour avoir accepté sans la moindre hésitation de faire partie de ce jury. Merci de me partager ta passion du métier et de m'en apprendre un peu plus chaque jour. Je prends précieuses notes de tous tes conseils.

Un merci particulier à Jean-François CORDOLIANI, directeur du site Unither Développement Bordeaux, pour votre confiance dans mes capacités à travailler au sein de votre entreprise. Merci pour votre écoute et votre avis d'expert. Merci également à Aurélie SARAFIAN, pour m'avoir ouvert les portes de ton service.

Un grand et chaleureux merci à toute l'équipe galénique. Aux chargé(e)s de projets Emeline, Prisca, Julien, à la future ingénieure Emma, et une seconde fois à Capucine. Merci pour tous ces bons petits moments, ces pizzas du vendredi et ces (plus ou moins) bonnes blagues de tous les jours. Merci à tous les techniciens galéniques, pour leur aide au quotidien mais surtout pour m'avoir nourrie de chocolatines plus qu'il ne fallait. Grâce à vous, cette thèse à un léger goût de cholestérol.

Merci à ma famille. A mes parents, pour vos encouragements, vos bons conseils et votre présence. Vous y êtes pour beaucoup dans cette réussite. A ma sœur, pour ton œil aguerri de Brand Manager envers tous mes petits papiers professionnels, pour ton écoute et soutien infaillible dans la vie quotidienne. A ma mamie, pour m'avoir chouchoutée à la moindre occasion. A mon papi, pour ne jamais me faire oublier que mon objectif de future galéniste est de te créer des médicaments carrés pour qu'ils ne roulent plus sur la table.

Merci à mes amis pour toute la rigolade et les encouragements. A mon pompier et futur pharmacien, merci pour ta bienveillance au quotidien.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS **5**

TABLE DES FIGURES **6**

TABLE DES TABLEAUX **8**

INTRODUCTION GENERALE **9**

CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE **10**

1. L'ŒIL, ORGANE DE LA VISION : ANATOMIE, PHYSIOLOGIE ET SYNDROME DE L'ŒIL SEC **11**

1.1. ANATOMIE DE L'ŒIL 11

1.1.1. Anatomie générale *11*

1.1.2. La cornée *12*

1.1.3. Le film lacrymal *14*

1.1.3.1. Production et élimination du film lacrymal : le système lacrymal 14

1.1.3.2. Composition du film lacrymal 15

1.1.3.3. Rôles du film lacrymal 16

1.1.3.4. Régulation du film lacrymal 16

1.2. PROCESSUS DE CICATRISATION ET REPARATION DE LA CORNEE 18

1.2.1. Renouvellement cornéen physiologique *18*

1.2.2. Renouvellement cornéen après une lésion *19*

1.3. LE SYNDROME DE L'ŒIL SEC 21

1.3.1. Physiopathologie et étiologie *21*

1.3.2. Diagnostic *24*

1.3.3. Stratégie thérapeutique *26*

1.3.3.1. Stratégie environnementale 26

1.3.3.2. Stratégie médicamenteuse 26

1.3.3.2.1. Sérum physiologique 28

1.3.3.2.2. Alcool polyvinylique et dérivés 28

1.3.3.2.3. Dérivés de celluloses 29

1.3.3.2.4. Carbomères 30

1.3.3.2.5. Hyaluronate de sodium 31

1.3.3.2.6. Autres substituts lacrymaux et osmorégulateurs 32

2. L'ŒIL VIS-A-VIS D'UN MEDICAMENT : FOCUS SUR LES FORMES TOPIQUES **34**

2.1. PHARMACOCINETIQUE 35

2.1.1. Absorption *35*

2.1.2. Distribution *36*

2.1.3. Métabolisation *36*

2.1.4. Excrétion *36*

2.2. BIODISPONIBILITE 37

2.3. TOXICITE ET TOLERANCE 40

3. LA GALENIQUE APPLIQUEE AUX COLLYRES **42**

3.1. PROPRIETES ET COMPOSITION DES COLLYRES 43

3.1.1. Activité thérapeutique *43*

3.1.2. Volume instillé *43*

3.1.3. Limpidité et taille des particules *44*

3.1.4. Neutralité et pH toléré *45*

3.1.5. Pression osmotique *46*

3.1.6. Tension superficielle *46*

3.1.7. Comportement rhéologique et viscosité *47*

3.1.8. Bioadhésion et rémanence *50*
3.1.9. Autres propriétés et excipients *52*
3.1.10. Stérilité *52*
3.1.10.1. Stérilisation par chaleur humide 54
3.1.10.2. Filtration sur membrane 56
3.1.10.3. Préparation en milieu aseptique 57
3.3. PROBLEMATIQUES DE FORMULATION DES COLLYRES ET STRATEGIES GALENIQUES ASSOCIEES 58
3.3.1. Amélioration de la solubilité des principes actifs *58*
3.3.1.1. Salification du principe actif et pro-drogues 58
3.3.1.2. Utilisation d'un co-solvant 59
3.3.1.3. Utilisation de cyclodextrines 59
3.3.1.4. Formulation de liposomes 61
3.3.1.5. Formulation de nanoparticules 63
3.3.1.6. Formulation de nanosuspensions 65
3.3.1.7. Microémulsions 66
3.3.1.7.1. HLB : Hydrophilic-Lipophilic Balance 67
3.3.1.7.2. HLD : Hydrophilic-Lipophilic Difference 68
3.3.1.7.3. Rapport de Winsor 69
3.3.1.7.4. Diagramme ternaire 69
3.3.1.8. Nano-émulsions 70
3.3.2. Amélioration de la biodisponibilité des collyres *72*
3.3.2.1. Amélioration de la solubilité des principes actifs 72
3.3.2.2. Augmentation de la viscosité 72
3.3.2.2.1. Utilisation de viscosifiants 72
3.3.2.2.2. Formulation d'organogels et d'hydrogels 73
3.3.2.3. Optimisation de la bioadhésion 74
3.3.2.4. Amélioration de la perméabilité 75

4. CONCLUSION 77

CHAPITRE 2 : ETUDE EXPÉRIMENTALE - DEVELOPPEMENT D'UN COLLYRE DANS LE TRAITEMENT DE L'ŒIL SEC : PREUVE DE CONCEPT 79

1. PRESENTATION DE L'OBJECTIF DE DEVELOPPEMENT 80

2. MATERIELS ET METHODES 82

2.1. MATIERES PREMIERES 82
2.2. FORMULATIONS 82
2.3. PROCEDE DE FABRICATION 84
2.4. DESCRIPTION DES TESTS DE CARACTERISATION DE LA FORMULATION 86
2.4.1. Mesure du pH et de l'osmolalité *86*
2.4.2. Évaluation de la taille des gouttes *86*
2.4.3. Mesure de la viscosité *87*
2.5. IMPACT DE LA STERILISATION 87
2.6. ÉVALUATION DE LA RECONSTRUCTION CELLULAIRE *IN VITRO* 88
2.6.1. Intérêt de la culture cellulaire *88*
2.6.2. Protocole *89*
2.6.2.1. Phase I : mise en place du modèle pathologique 89
2.6.2.2. Phase II : validation du modèle pathologique 91
2.6.2.3. Phase III : évaluation de l'efficacité de la reconstruction cellulaire 93
2.6.3. Avantages et limites *93*

3. RESULTATS ET DISCUSSION 95

3.1. MESURE DU pH ET DE L'OSMOLALITE 95
3.2. ÉVALUATION DE LA TAILLE DES GOUTTES 95
3.3. MESURE DE LA VISCOSITE 96
3.4. IMPACT DE LA STERILISATION 99

3.5. ÉVALUATION DE LA RECONSTRUCTION CELLULAIRE *IN VITRO* 102
3.5.1. Phase I : mise en place du modèle pathologique 102
3.5.1.1. Résultats de résistance épithéliale 102
3.5.1.2. Résultats de viabilité cellulaire 104
3.5.1.3. Résultats du relargage des cytokines 104
3.5.1.4. Comparaison des coupes histologiques 105
3.5.1.5. Conclusion 107
3.5.2. Phase II : validation du modèle pathologique 107
3.5.2.1. Résultats de résistance épithéliale 107
3.5.2.2. Résultats de viabilité cellulaire 108
3.5.2.3. Résultats du relargage des cytokines 109
3.5.2.4. Comparaison des coupes histologiques 110
3.5.2.5. Conclusion 113
3.5.3. Phase III : évaluation de l'efficacité de la reconstruction cellulaire 114

4. CONCLUSION 115

CONCLUSION GENERALE 117

BIBLIOGRAPHIE 119

ANNEXES 127

LISTE DES ABREVIATIONS

AH : acide hyaluronique
CD : cyclodextrine
CMC : carboxyméthylcellulose
DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge
EC : éthylcellulose
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
HAS : Haute Autorité de Santé
HP-β-CD : hydroxypropyl-béta-cyclodextrine
HPMC : hydroxypropylméthylcellulose
HS : hyaluronate de sodium
MC : méthylcellulose
MTT : sel de tétrazolium MTT
m/v : masse/volume
PA : principe actif
PBS : Phosphate Buffer Saline
PEG : polyéthylène glycol
PES : polyéther sulfone
POC : proof of concept
PVDF : diflurorure de polyvinylidène
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
TEER : transepithelial electrical resistance

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma anatomique de l'œil (image originale) (3). 12
Figure 2 : Schéma anatomique de la cornée (image originale) (5). 13
Figure 3 : Schéma du système lacrymal, rôles des glandes et parcours des larmes (production et élimination) (image originale) (11). 14
Figure 4 : Schéma anatomique du film lacrymal (image originale) (12). 15
Figure 5 : Schéma représentant les deux théories principales impliquées dans le renouvellement cornéen (extrait de) (8). 20
Figure 6 : Cercle vicieux de la sécheresse oculaire, causes et facteurs de risques intervenant dans la pathologie (image originale) (29). 23
Figure 7 : Schéma représentant les valeurs de l'osmolarité du liquide lacrymal chez les patients atteints ou non du syndrome de l'œil sec, basé sur la méta-analyse de Tomlinson (extrait de) (34). . 25
Figure 8 : Schéma représentant les valeurs de viscosités extensionnelles des larmes chez un groupe contrôle et un groupe atteint de sécheresse oculaire (extrait de) (35). 25
Figure 9 : Stratégies thérapeutiques médicamenteuses dans le traitement de l'œil sec en fonction de la cible du film lacrymal et de la cornée (extrait de) (38), (39). 26
Figure 10 : Structures chimiques de l'alcool polyvinylique (a) et de la polyvinylpyrrolidone (b) (image originale) (42). 29
Figure 11 : Structures chimiques de la carboxyméthylcellulose sodique (a) et de l'hydroxypropylméthylcellulose (b) (image originale) (42). 30
Figure 12 : Structure moléculaire des carbomères (image originale) (42). 30
Figure 13 : Structure moléculaire du hyaluronate de sodium (image originale) (42). 31
Figure 14 : Facteurs intervenant dans la biodisponibilité d'un médicament au niveau de l'œil (extrait de) (6), (58). 38
Figure 15 : Comportement d'un fluide newtonien. 48
Figure 16 : Comportement d'un fluide rhéofluidifiant. 49
Figure 17 : Comportement d'un fluide à seuil d'écoulement. 49
Figure 18 : Graphiques représentant les paramètres de temps de réduction décimale (a) et de valeur d'inactivation thermique (b) lors de la stérilisation par la chaleur. 55
Figure 19 : Schéma d'une α-cyclodextrine. (a) : unité glucopyranose, (b) : α-CD en 2D, (c) : α-CD en 3D (image originale) (95). 59
Figure 20 : Positions des fonctions hydroxyles sur les unités glucose (image originale) (96). 60
Figure 21 : Schéma représentant un liposome (extrait de) (103). 61
Figure 22 : Représentation schématique des étapes intervenant dans le procédé de réalisation des liposomes par la méthode de dispersion mécanique des phospholipides (extrait de) (109). 62
Figure 23 : Structure d'une nanocapsule et d'une nanosphère (extrait de) (110). 63
Figure 24 : Fabrication de nanocapsules à cœur huileux par la méthode d'émulsion/évaporation du solvant (image originale) (114). 64
Figure 25 : Différents types d'émulsions et microémulsion. 66
Figure 26 : Echelle de HLB des tensioactifs et rôles associés (extrait de) (119). 68
Figure 27 : Représentation des différents types de microémulsions à l'équilibre (extrait de) (121). .. 70
Figure 28 : Schéma représentant le type d'émulsion en fonction de la température et de la concentration en surfactif (image originale) (125). 71
Figure 29 : Schéma représentant un hydrogel et les différents types de réticulation pouvant se former (extrait de) (129). 73
Figure 30 : Procédé de fabrication des formulations. 85

Figure 31 : Angle d'application du collyre pour la mesure de taille des gouttes. 86
Figure 32 : Coupe histologique de cellules SkinEthic HCE® saines. Grossissement x40. 88
Figure 33 : Schéma représentant un insert cellulaire contenant un tapis cellulaire. A gauche vue de haut, à droite vue de profil 89
Figure 34 : Résultats de viscosité des formulations contenant une seule matière première à différentes concentrations (n = 1). 97
Figure 35 : Résultats de viscosité des formulations contenant une seule matière première à différentes concentrations, pour des taux de cisaillement ayant un couple de torsion associé interprétable (n = 1). 98
Figure 36 : Résultats de viscosité des formulations contenant les matières premières en combinaison à différentes concentrations (n = 1). 98
Figure 37 : Résultats de viscosité des formulations contenant les matières premières en combinaison à différentes concentrations, pour des taux de cisaillement ayant un couple de torsion associé interprétable (n = 1). 99
Figure 38 : Résultats de viscosité de la solution de HS seul (0,2 %) après autoclavage et filtration comparé à la viscosité initiale (n = 1). 100
Figure 39 : Résultats de viscosité de la solution de molécule UDB (5 %) après autoclavage et filtration comparé à la viscosité initiale (n = 1). 101
Figure 40 : Résultats de viscosité de la solution contenant les matières premières en combinaison (HS 0,15 % et molécule UDB 5 %) après autoclavage et filtration comparé à la viscosité initiale (n = 1). 101
Figure 41 : Résultats de la TEER des cellules ayant été traitées pendant 24h avec du SDS comparé aux cellules contrôles (n = 3). 103
Figure 42 : Résultats de la TEER des cellules ayant été traitées pendant 48h avec du SDS comparé aux cellules contrôles (n = 3). 103
Figure 43 : Résultats de la viabilité cellulaire après 24 ou 48 heures d'inflammation par du SDS (% par rapport au contrôle traité uniquement au PBS) (n = 1). 104
Figure 44 : Résultats des tests ELISA : évaluation de la quantité de cytokines (IL-1α et TNFα) relarguée dans le milieu de culture après 24 et 48h d'inflammation (n = 3). 105
Figure 45 : Coupes histologiques des cellules ayant subi une inflammation pendant 24h (n = 2). Grossissement x40. 106
Figure 46 : Coupes histologiques des cellules ayant subi une inflammation pendant 48h (n = 2). Grossissement x40. 107
Figure 47 : Résultats de la TEER des cellules après 2 jours de protocole inflammatoire et 7 jours de traitement (n = 3). 108
Figure 48 : Résultats de la viabilité cellulaire après application de différents traitements réparateurs durant 7 jours (n = 1). 109
Figure 49 : Résultats des tests ELISA : évaluation de la quantité d'IL-1α relarguée dans le milieu de culture à J3, J5 et J7 de traitement (n = 3). 109
Figure 50 : Coupes histologiques contrôles à J-2 (a) et à la fin du protocole inflammatoire J0 : 0,02 % de SDS pendant 48 heures (b) (n = 2). Grossissement x40. 110
Figure 51 : Coupes histologiques à J3, J5 et J7 de traitement par du PBS (n = 2). Grossissement x40. 111
Figure 52 : Coupes histologiques à J3, J5 et J7 de traitement par de l'Unilarm® (n = 2). Grossissement x40. 112
Figure 53 : Coupes histologiques à J3, J5 et J7 de traitement par du Hyabak® (n = 2). Grossissement x40. 113

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques des matières premières utilisées dans les substituts lacrymaux. 33
Tableau 2 : Caractéristiques de différentes matières premières concernant leur rémanence, bioadhésion et rétention d'eau (extrait de) (37). 51
Tableau 3 : Différents conservateurs utilisés dans les formes ophtalmiques (liste non exhaustive) (87). 53
Tableau 4 : Différents types de filtres stérilisants couramment utilisés pour l'industrialisation de formes ophtalmiques (liste non exhaustive) (91). 56
Tableau 5 : Solubilité des différentes cyclodextrines (liste non exhaustive) (96), (97), (98). 60
Tableau 6 : Concentrations testées des matières premières seules en solution aqueuse (eau PPI). ... 82
Tableau 7 : Concentrations testées des matières premières seules dans un tampon phosphate. 83
Tableau 8 : Formulation du tampon phosphate 83
Tableau 9 : Concentrations testées des matières premières en association dans un tampon phosphate. 83
Tableau 10 : Valeurs des taux de cisaillement appliqués aux formulations développées (de gauche à droite). 87
Tableau 11 : Chronologie des essais pour la mise en place du protocole inflammatoire. 91
Tableau 12 : Essais de validation du protocole de culture cellulaire lors de la mise en place d'une inflammation puis évaluation de la reconstruction cellulaire après application d'un traitement réparateur. 92
Tableau 13 : Résultats du pH et de l'osmolalité des solutions formulées. 95
Tableau 14 : Résultats de la mesure du volume moyen des gouttes. 96

INTRODUCTION GENERALE

Le globe oculaire est un organe du corps humain dont le développement débute au 22ème jour de gestation. Il permet d'acquérir l'un des cinq sens qu'est la vision. *Via* le biais du nerf optique, l'œil capte des signaux lumineux qui sont interprétés par le cerveau et transformés en image.

Comme tout organe du corps, celui-ci peut être sujet à des transformations, agressions, inflammations, etc. Des infections comme les conjonctivites ou les orgelets peuvent affecter l'œil, tout comme diverses maladies tels que le glaucome, la cataracte ou la DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age), certaines pouvant entrainer la cécité. L'ensemble de ces pathologies peut entrainer des traumatismes oculaires, réversibles ou non. Des lésions au niveau des différentes couches de la surface oculaire peuvent apparaître et entrainer des irritations, aggravant des phénomènes d'inflammations ou d'infections. Il est alors indispensable de traiter précocement et de manière efficace chacune de ces pathologies.

Les médicaments par voie orale n'atteignant que très peu le globe oculaire, le traitement de cette zone se fait le plus souvent par voie locale. Déjà en 3 000 avant J.-C., les pharaons traitaient les troubles oculaires par voie topique, grâce à des formes ophtalmiques qui se présentaient comme des bâtonnets composés de principe actif et de colle (1).

Aujourd'hui, les formes ophtalmiques regroupent tout un panel de formes comme les collyres, les pommades, les inserts ou encore les injections oculaires. Chaque forme a des caractéristiques propres et est utilisée pour diverses pathologies pouvant toucher la totalité du globe oculaire. Certaines formes sont alors plus adaptées pour des actions de surface, d'autres pour des actions en profondeur. Quelle que soit la forme, des critères de qualité tels que la stérilité et la tolérance oculaire sont indispensables pour permettre leur mise sur le marché.

Les collyres, définis dans la Pharmacopée Européenne comme des « préparations liquides, semi-solides ou solides stériles destinées à être appliquées sur le globe oculaire et/ou les conjonctives, ou à être introduites dans le sac conjonctival », sont à ce jour les formes les plus utilisées. En effet, ils sont adaptés au mode de vie nomade des patients de part la facilité de transport et d'utilisation.

Toutefois, l'anatomie oculaire et ses nombreux mécanismes de défense font que la biodisponibilité résultant d'une instillation de collyre est extrêmement faible. Le patient doit alors répéter de nombreuses fois l'instillation, pouvant provoquer une diminution de l'observance. Ainsi, il y a une recherche constante d'améliorations galéniques pour optimiser et augmenter l'efficacité du médicament oculaire. L'objectif de ces développements étant de trouver le médicament idéal, c'est-à-dire le plus efficace et le plus adapté pour le patient, tant dans sa facilité d'utilisation que dans sa tolérance.

CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. L'ŒIL, ORGANE DE LA VISION : ANATOMIE, PHYSIOLOGIE ET SYNDROME DE L'ŒIL SEC

De part sa complexité anatomique et son exposition partielle à l'environnement extérieur, l'œil est un organe extrêmement sensible. Sa composition doit être parfaitement comprise pour pouvoir traiter les pathologies associées de manière efficace.

Une pathologie fréquemment rencontrée est la sécheresse oculaire, qui peut être causée par une exposition trop importante à certains facteurs extérieurs (climatisation) ou par des mécanismes physiopathologies intrinsèques. Elle se manifeste par un manque d'humidification à la surface de la cornée, entrainant une inflammation de l'épithélium et des microlésions cornéennes. Ces facteurs sont responsables d'un renouvellement cellulaire trop peu efficace et d'une gêne constante chez le patient, avec une sensation de grains de sable dans l'œil. Une suppléance lacrymale est alors indispensable pour soulager l'inconfort du patient. A ce jour, des traitements de plus en plus adaptés et efficaces permettent de répondre de manière satisfaisante aux exigences et attendus des patients.

Il sera présenté en premier lieu dans cette partie l'anatomie de l'œil avec une focalisation au niveau de la cornée et du film lacrymal. Ensuite, les mécanismes cellulaires impliqués dans le renouvellement de la cornée seront développés. Enfin, le syndrome de l'œil sec sera exposé, en détaillant sa physiopathologie, les méthodes de diagnostic et les traitements associés.

1.1. Anatomie de l'œil

1.1.1. Anatomie générale

L'œil, également appelé globe oculaire, est un organe complexe et unique du corps humain. De forme sphérique, il est composé d'un cristallin, de trois tuniques et de liquides (figure 1) (2).

Au niveau le plus externe est présente la sclérotique, membrane opaque blanche et avasculaire qui a un rôle de protection de l'œil, prolongée sur la partie antérieure par la cornée. Cette dernière, riche en fibres nerveuses, avasculaire et transparente, est en contact direct avec l'extérieur et permet aux rayons lumineux de converger pour atteindre le nerf optique. Accolée à cette cornée se trouve la conjonctive, qui tapisse à la fois la surface interne des paupières et la sclérotique (ou sclère). Un film lacrymal, jouant un rôle de protection, est présent sur la partie antérieure et recouvre à la fois la conjonctive et la cornée.

La tunique vasculaire, composée de la choroïde, du corps ciliaire et de l'iris possède plusieurs fonctions dont la principale est l'accommodation aux rayons lumineux.

Enfin, la tunique la plus interne correspond à la rétine, où sont présents des photorécepteurs et cellules permettant d'intercepter le signal lumineux et de l'acheminer au cerveau pour qu'il puisse être interprété.

L'œil est séparé en deux segments par une membrane transparente : le cristallin. Le segment postérieur est rempli d'humeur vitrée (également appelé corps vitré) qui permet de réguler la pression du globe oculaire. Cette substance transparente est gélatineuse, due à sa composition riche en collagène et acide hyaluronique. Le segment antérieur est rempli d'un liquide appelé l'humeur aqueuse. Cette dernière est produite et sécrétée par le corps ciliaire et est composée majoritairement d'eau, mais aussi d'électrolytes et de vitamines. Renouvelée en permanence, l'humeur aqueuse permet d'avoir un rôle nourricier pour l'iris et la cornée mais permet aussi d'éliminer les déchets. Le segment antérieur est lui-même divisé par l'iris en une chambre antérieure et postérieure (2).

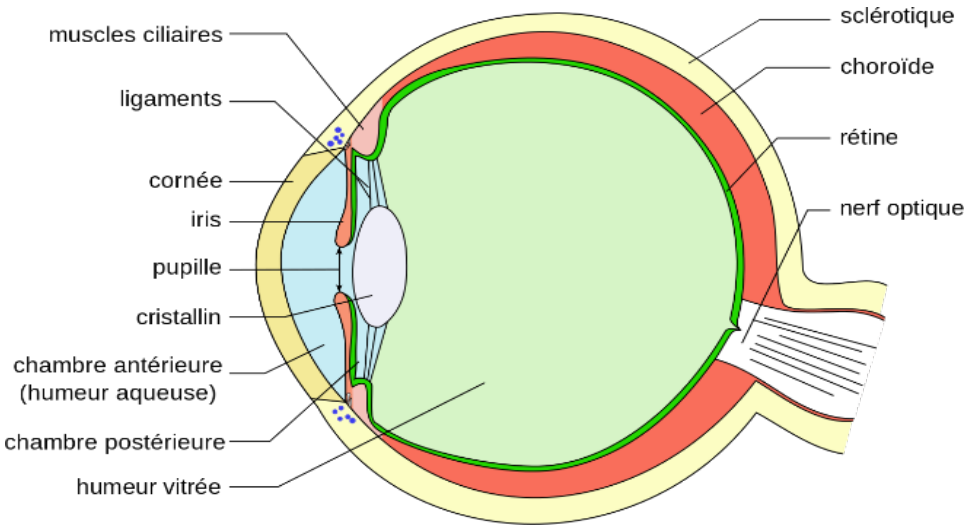


Figure 1 : Schéma anatomique de l'œil (image originale) (3).

1.1.2. La cornée

Comme évoqué précédemment, la partie de l'œil en contact direct avec l'extérieur est la cornée (figure 2). Au niveau biochimique, la cornée est composée de divers éléments comme de l'eau (80 %), des protéines (collagène principalement), des protéoglycanes, des enzymes, des ions, du glucose, des métabolites (4). Elle peut se diviser en 5 couches : l'épithélium, la couche de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium.

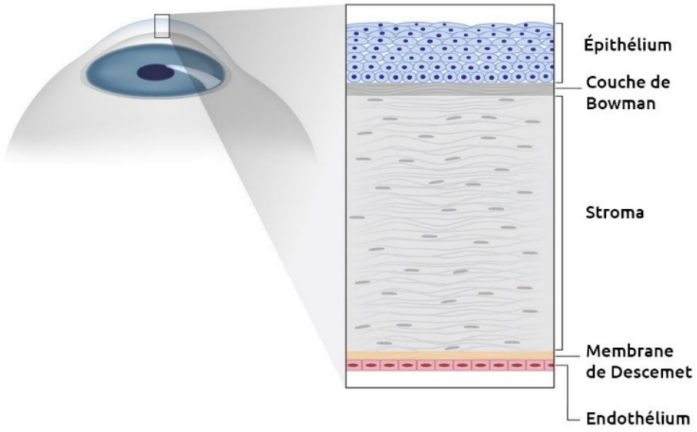


Figure 2 : Schéma anatomique de la cornée (image originale) (5).

L'épithélium cornéen, couche la plus externe, est composé de 5 à 6 couches de cellules non kératinisées reliées par des jonctions serrées, pour une épaisseur totale d'environ 50 µm. C'est une zone lipophile, qui laisse diffuser des formes médicamenteuses non ionisées. Elle joue le rôle de réservoir de molécules lipophiles, relâchant au fur et à mesure dans le stroma les substances en fonction de leur caractère hydrophile. Indissociable du film lacrymal, les deux zones forment la principale barrière aux attaques extérieures, en plus de la protection amenée par les paupières et les cils. La membrane basale de l'épithélium, en contact avec la couche de Bowman, est composée de collagène (6), (7).

La couche de Bowman correspond à une condensation des cellules antérieures du stroma, composée majoritairement de fibres de collagène. Les propriétés mécaniques de la cornée sont principalement dues à cette couche (7), (8).

Le stroma est à dominance hydrophile ce qui laisse passer à travers les substances actives ionisées. Couche la plus épaisse de la cornée (400 µm), le stroma est composé en grande partie de fibrocytes (fibroblastes au repos), de kératocytes (fibroblastes spécialisés et différenciés) et de fibres de collagène, ces dernières ayant un agencement spécifique permettant de garder la transparence de la cornée (6), (9).

La membrane de Descemet est produite de manière continue tout au long de la vie, entraînant ainsi une augmentation de son épaisseur au cours du temps. Composée de collagène, elle est dépourvue de fibres élastiques et n'est pas innervée (8).

Enfin, l'endothélium, couche la plus interne, est une couche tissulaire lipophile, jouant un rôle dans le maintien d'une hydratation stable et dans la transparence de la cornée. Cette couche, tout comme la membrane de Descemet, n'est pas innervée (7).

1.1.3. Le film lacrymal

Le film lacrymal, communément appelé larmes, est présent de manière continue à la surface de la cornée et possède de nombreux rôles indispensables au bon fonctionnement et à la santé de l'œil. Sa régulation est extrêmement contrôlée et fait intervenir plusieurs facteurs.

1.1.3.1. Production et élimination du film lacrymal : le système lacrymal

Le système lacrymal englobe les annexes de l'œil qui permettent de produire et d'évacuer le film lacrymal. Plusieurs phases interviennent dans le cycle de vie de ce dernier : (i) la production par les glandes lacrymales, (ii) la distribution et l'étalement correct par le clignement des paupières, et (iii) l'élimination par évaporation (10 %) ou drainage par le canal nasolacrymal (90 %). Les clignements de l'œil, apparaissant à une fréquence de 15 à 20 clignements par minute, permettent son étalement et son évacuation par les canalicules et le sac lacrymal (10).

La figure 3 récapitule les annexes intervenant dans la production du film lacrymal et dans l'élimination de celui-ci.

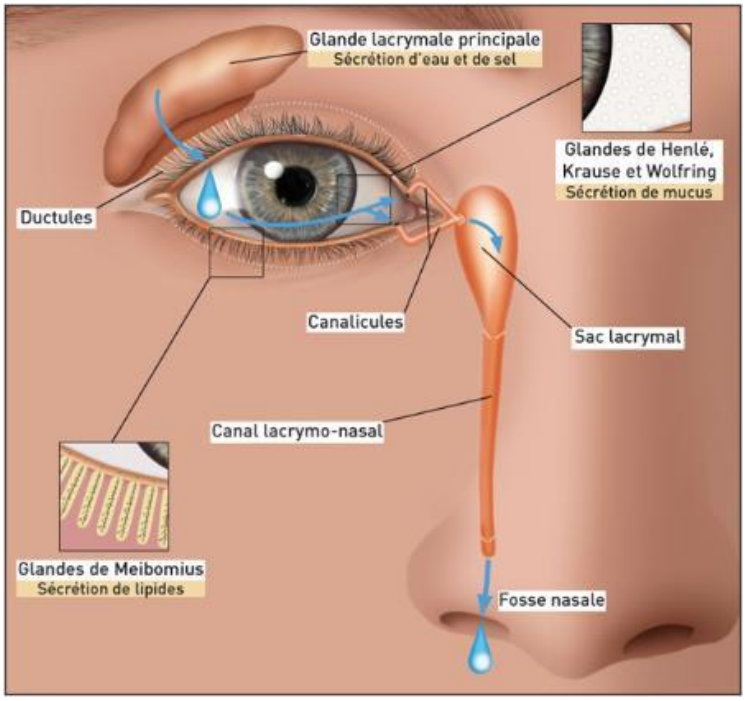


Figure 3 : Schéma du système lacrymal, rôles des glandes et parcours des larmes (production et élimination) (image originale) (11).

1.1.3.2. Composition du film lacrymal

Le film précornéen est composé à 99 % d'eau, est riche en lysozymes, lactoferrines, immunoglobulines et autres composés comme des sels, du saccharose, de l'albumine, etc. Son pH est relativement neutre, avec une osmolarité aux alentours de 300 mOsm/L et une température entre 30 et 35°C. Il peut être divisé en 3 parties : une couche superficielle huileuse, une couche aqueuse et une couche mucoïde (figure 4), les deux dernières n'étant pas physiquement distinctes. Le volume du film lacrymal est de 7 à 9 µl, avec un renouvellement de 0,5 à 2 µl/min (1), (3).

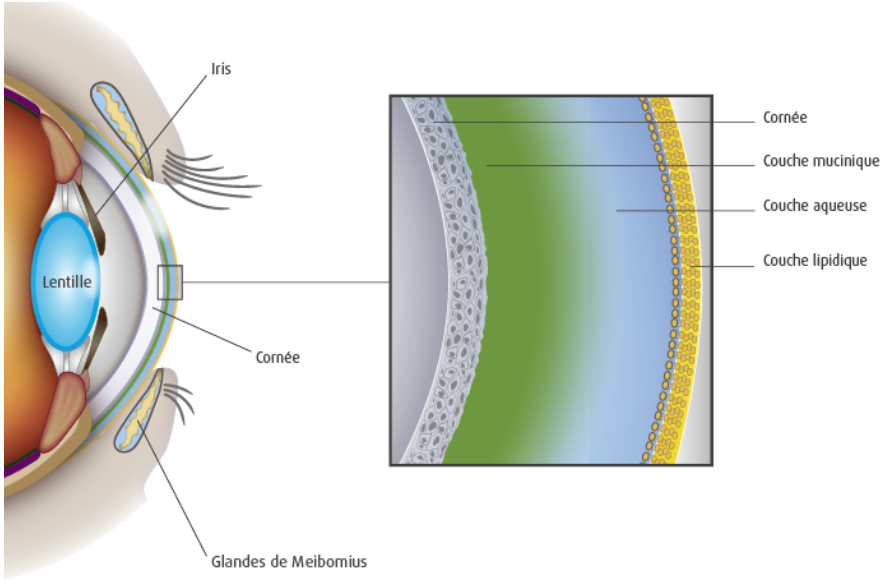


Figure 4 : Schéma anatomique du film lacrymal (image originale) (12).

La couche huileuse, couche externe du film lacrymal, est composée de lipides qui sont sécrétés par les glandes de Meibomius, situées sur les paupières supérieures et inférieures. Cette couche peut rapidement être détruite par des instillations répétées de collyres ou des pathologies telles que des infections (8), (13).

La couche aqueuse, couche intermédiaire hydrophile, correspond à proprement parler aux larmes. Avec une épaisseur de 6 à 7 µm, elle représente plus de 95 % de l'épaisseur du film lacrymal. La sécrétion de la couche aqueuse est prise en charge par différentes glandes : la sécrétion de base est assurée par les glandes accessoires (telles que les glandes de Krause) alors que la sécrétion réflexe est assurée par la glande lacrymale principale (8).

Enfin, la couche mucoïde est composée de mucines qui adhèrent aux microvillosités et glycocalyx de l'épithélium pour assurer le mouillage de la cornée par les larmes. Elles forment un réseau protéique où coexistent des régions hydrophiles et hydrophobes. Elles peuvent être sécrétées dans le liquide lacrymal, alors appelées mucines solubles (MUC2,

MUC7, MUC11), ou sont associées à la membrane (MUC1, MUC4, MUC6). Ces mucines sont sécrétées par trois glandes distinctes, dont les glandes de Krause et Henlé. La concentration en mucines est très élevée dans la zone profonde de la couche mucoïde et suit un gradient décroissant en se rapprochant de la couche aqueuse. En pratique, la couche mucoïde et la couche aqueuse ne sont pas distinctement séparées, mais représentent plutôt un mélange de mucines et d'eau réparties à des ratios différents en fonction de la profondeur étudiée (13), (14).

1.1.3.3. Rôles du film lacrymal

Le film lacrymal possède plusieurs fonctions (8), (15) :

- L'alimentation des cellules épithéliales et du stroma par apport d'oxygène.
- La protection immunologique avec un rôle antimicrobien. La couche aqueuse est extrêmement riche en enzymes (lysozymes, lactoferrines), immunoglobulines (IgA sécrétoires, IgG, etc) mais aussi protéines. La couche mucoïde a des propriétés antibactériennes.
- Le nettoyage et l'élimination des corps étrangers et des cellules desquamées de la cornée. La couche lipidique permet l'élimination des poussières de faible diamètre. La fermeture des paupières entraine des changements rapides de pH, de pression d'oxygène, de température, empêchant ainsi le développement de micro-organismes. De plus, les clignements entrainent un balayage rapide des débris.
- La protection de la cornée en la gardant correctement humidifiée grâce à une bonne lubrification. En effet, la couche lipidique prévient l'évaporation de la phase aqueuse et mucoïde grâce à son caractère hydrophobe. Elle permet également d'obtenir un étalement et lissage corrects de l'ensemble du film lacrymal à la surface de l'œil lors des clignements palpébraux. La couche mucoïde quant à elle permet également la bonne adhérence, mouillabilité et stabilité du film lacrymal.

1.1.3.4. Régulation du film lacrymal

La production, composition et qualité du film lacrymal dépendent de plusieurs facteurs et régulations.

Une régulation neuronale permet une production rapide de larmes dans le cas d'une agression extérieure, comme un stress mécanique ou chimique. Cette régulation joue sur la glande lacrymale principale et les cellules à mucines présentes au niveau de la conjonctive.

Une régulation hormonale a un impact sur la glande lacrymale principale et sur les glandes de Meibomius (responsables de la production de lipides). Par exemple, une

déficience en œstrogènes peut entrainer une perte de qualité lors de la production des lipides.

Les facteurs environnementaux jouent également un rôle sur la quantité et qualité du film lacrymal. En effet, la température, la climatisation, une humidité élevée ou faible aura un impact sur l'évaporation plus ou moins importante du film lacrymal. D'autres facteurs externes comme une exposition prolongée aux écrans peuvent être responsables d'une évaporation excessive du film lacrymal et donc d'une sécheresse oculaire (8).

En résumé, tous les composants du globe oculaire et ses annexes sont interdépendants et assurent un rôle bien défini.

Le globe oculaire en lui-même joue principalement un rôle dans la vision et le maintien de la forme de l'œil.

La cornée, quant à elle, possède un rôle mixte : sa forme permet aux rayons lumineux de converger vers la rétine pour pouvoir interpréter correctement les images du monde extérieur. Sa composition joue un rôle de barrière pour le reste de l'œil, tant par une sélection dans le passage des molécules chimiques en fonction de leur taille et leurs caractères physico-chimiques, que par ses systèmes de défenses en collaboration avec le film lacrymal.

La production de larmes en quantité et qualité suffisantes et son étalement régulier sont des points essentiels afin de nourrir la cornée, d'éviter son assèchement et les nombreux effets indésirables qui y sont associés. De plus, le film lacrymal et les paupières ont un rôle dans la protection de l'œil de tout corps étranger.

1.2. Processus de cicatrisation et réparation de la cornée

Le renouvellement des cellules de la cornée s'effectue de façon physiologique, comme toutes cellules du corps humain. Lors d'une lésion oculaire, des mécanismes se mettent en place pour effectuer une réparation cellulaire le plus efficacement possible.

Toutefois, le mécanisme de renouvellement de l'épithélium cornéen n'est pas parfaitement connu ; de nombreuses théories se sont succédées et deux principales sont à ce jour exposées. La première et la plus répandue impliquerait les cellules souches limbiques, la deuxième ferait intervenir des cellules souches réparties sur l'ensemble de la cornée (8), (16).

1.2.1. Renouvellement cornéen physiologique

L'épithélium cornéen se renouvelle en permanence, un cycle complet durant en moyenne entre 7 et 15 jours. Des cellules souches (provenant du limbe ou de la couche basale de l'épithélium selon les théories) se différencient en cellules épithéliales, qui se déplacent ensuite progressivement jusqu'à la superficie, où elles se couvriront de microvillosités une fois arrivées à la partie la plus superficielle de l'épithélium. Enfin, les cellules superficielles desquament dans le film lacrymal où elles pourront être éliminées par les canaux lacrymaux (17).

La première théorie de renouvellement physiologique de la cornée (Schermer *et al*.) fait intervenir le limbe. Il correspond à la zone qui sépare la cornée de la sclère et la conjonctive. Cette frontière contient des cellules impliquées dans la défense de la cornée, empêche les vaisseaux sanguins de s'étaler sur la cornée, la gardant transparente, et, selon les théories, intervient donc dans le renouvellement physiologique des cellules cornéennes. Les palissades de Vogt, dans le limbe, seraient le réservoir des cellules souches limbiques. Ces cellules deviendraient des cellules d'amplification transitoires, migrant vers le centre de la cornée au niveau de la couche basale, tout en se divisant. Arrivées au niveau de l'épithélium cornéen, les cellules continueraient de se diviser et de s'amplifier (8).

La seconde théorie expose une idée selon laquelle l'épithélium cornéen se renouvellerait à partir de cellules souches réparties uniformément au niveau de sa couche basale. Celles-ci se diviseraient, s'amplifieraient et se déplaceraient ensuite selon le même mécanisme que dans la première théorie, la seule différence entre les deux étant le lieu de réserve des cellules souches (8).

Le renouvellement du stroma est plus lent et se fait par destruction des tissus par des phagocytes ou collagénases puis par synthèse de collagène *via* les fibroblastes (4).

Concernant l'endothélium, un stock définitif de cellules est présent dès la naissance. Ainsi, au fil des années, le nombre diminue progressivement. La cicatrisation se fait par

coalescence, entrainant ainsi une diminution de leur densité et une variabilité de leur forme (4).

1.2.2. Renouvellement cornéen après une lésion

Le renouvellement cornéen après une lésion comprend plusieurs phases successives qui sont : (i) la dégradation du tissu lésé, (ii) la prolifération et migration cellulaire, (iii) la réparation cellulaire et enfin (iv) l'arrêt progressif du processus de cicatrisation. Si la lésion est superficielle, c'est-à-dire au niveau de l'épithélium, la cicatrisation se fait en quelques heures voire quelques jours. De façon logique, plus la plaie sera importante, plus le temps de cicatrisation sera long. Si la lésion est plus profonde et se situe au niveau de la membrane de Descemet la cicatrisation se fait en plusieurs mois, au niveau du stroma la cicatrisation dure plusieurs années et au niveau de la membrane de Bowman aucune reconstruction cellulaire n'a lieu.

Pour réparer le tissu lésé, des cytokines produites par les cellules épithéliales environnantes diffusent vers les fibroblastes du stroma, causant leur transformation en myofibroblastes. Ces derniers sont des cellules du corps humain spécialisées dans la réparation tissulaire. Ils sécrètent des facteurs de croissance et des composants de la matrice extracellulaire (collagènes, protéoglycanes) dans l'objectif de guérir la plaie (18), (19), (20).

Une étude menée par Anu S. Maharjan, Darrel Pilling et Richerd H. Gomer ont étudié l'impact du poids moléculaire de l'acide hyaluronique (AH) présent au niveau de la cornée dans la différenciation des fibrocytes après une blessure (21). Les auteurs ont conclu que l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire potentialise la différenciation des fibrocytes, alors que l'acide hyaluronique de bas poids moléculaire l'inhibe. Le mécanisme expliquant comment la même molécule, mais de longueur variable, a des effets opposés sur un même type de cellule est cependant toujours inconnu.

En effet, comme expliqué dans le mécanisme général de réparation de la cornée après une lésion, les fibrocytes se différencient en différentes cellules (fibroblastes, puis myofibroblastes ou kératocytes, etc) et il y a production de facteurs de croissance, collagènes, métalloprotéinases, permettant la reconstruction des tissus.

Les cellules semblent être capables de faire la différence entre de l'AH de haut poids moléculaire et de l'AH de bas poids moléculaire. C'est le cas des macrophages qui sécrètent des cytokines inflammatoires lorsqu'ils sont stimulés par de l'AH de bas poids moléculaire. Les monocytes, les lymphocytes et cellules dendritiques se lient à l'AH grâce à des récepteurs Toll-like (TLR). L'AH de bas poids moléculaire déclenche alors une action pro-inflammatoire, tandis que l'AH de haut poids moléculaire atténue l'inflammation en inhibant la signalisation de ces récepteurs. La différenciation des fibrocytes, quant à elle, est inhibée par l'AH de bas poids moléculaire et activée par l'AH de haut poids moléculaire.

Ces mécanismes suggèrent que l'AH de bas poids moléculaire stimule les cellules qui interviennent dans l'élimination des déchets et agents infectieux. En inhibant les fibrocytes

et le dépôt de collagène, cela permet aux macrophages de se déplacer correctement pour éliminer ce qui est nécessaire. L'AH de haut poids moléculaire (dominant lors de cicatrisation) agit comme un signal de réparation. Au fur et à mesure que la cicatrisation progresse, le ratio entre AH de haut poids moléculaire et AH de bas poids moléculaire augmente, favorisant la réparation des tissus lésés.

En résumé, le renouvellement physiologique des cellules de la cornée est essentiel au bon fonctionnement de l'œil. Les mécanismes impliqués sont encore débattus, même si certaines étapes se recoupent entre les différentes théories. La figure 5 illustre les deux théories qui s'affrontent aujourd'hui.

Concernant le renouvellement cornéen après une lésion, le mécanisme est connu. L'acide hyaluronique, très présent dans les couches de la cornée mais majoritaire au niveau du stroma, joue un rôle important dans le cadencement et l'efficacité de la réparation.

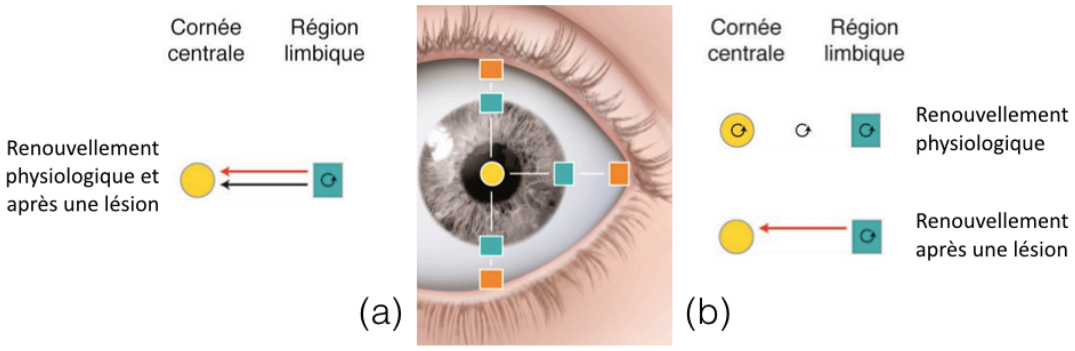


Figure 5 : Schéma représentant les deux théories principales impliquées dans le renouvellement cornéen (extrait de) (8).

Selon la théorie faisant intervenir le limbe (a), les cellules souches cornéennes se situeraient dans cette zone et diffuseraient vers l'épithélium lors d'un renouvellement physiologique (flèche noire) ou après une lésion (flèche rouge). Selon la deuxième théorie (b), les cellules souches sont réparties de façon homogène au niveau de la cornée et du limbe et se multiplient à partir de celles-ci, sans déplacement entre deux zones. Lors d'une blessure, la seconde théorie (b) est identique à la première (a) : les cellules souches du limbe diffusent vers l'épithélium cornée.

Rond jaune : épithélium central de la cornée ; carré vert : épithélium limbique ; carré orange : fornix ; flèche noire : migration physiologique ; flèche rouge : migration après une lésion ; flèche ronde noire : renouvellement des cellules souches.

1.3. Le syndrome de l'œil sec

La sécheresse oculaire, ou syndrome de l'œil sec, est une pathologie multifactorielle causée par un manque de quantité ou de qualité du film lacrymal à la surface de la cornée, entrainant une humidification insuffisante et un déséquilibre du film lacrymal. En effet, la sécrétion, l'étalement et la résorption des larmes ont lieu en continu et interviennent dans l'équilibre du film lacrymal. Un dysfonctionnement de ces éléments entraine des troubles au niveau de l'œil, dont une sécheresse oculaire.

Comme évoqué précédemment, le film lacrymal, composé de lipides, d'eau et de mucus est indispensable au bon fonctionnement de l'œil. Répartis par le clignement des paupières, ces composants permettent de garder la cornée humide et lisse. Ainsi, lorsque les larmes sont produites en plus faible quantité, de moindre qualité ou trop vite évaporées, les yeux deviennent secs, entrainant des brûlures, une vision floue et l'apparition de microlésions à la surface cornéenne (22).

Diverses méthodes de diagnostic existent pour cibler la cause exacte de cette sécheresse et ainsi pouvoir adapter la stratégie thérapeutique, l'objectif commun étant de retrouver une surface oculaire saine. L'utilisation de substituts lacrymaux est privilégiée, mais en cas d'intolérance ou d'efficacité insuffisance, d'autres traitements peuvent être instaurés, comme des traitements oraux.

1.3.1. Physiopathologie et étiologie

Le syndrome de l'œil sec est une pathologie qui atteint toute catégorie d'âge de la population et survient lorsque l'œil n'est plus suffisamment humidifié. Cette faible humidification est la résultante d'un manque de quantité du film lacrymal, soit par une sous-production soit par une hyper-évaporation de celui-ci, ou par un manque de qualité des larmes qui n'exercent alors plus leur fonction de protection et d'humidification. Les causes sont multifactorielles et peuvent être dues à des facteurs environnementaux ou à des facteurs physiopathologiques de l'œil (23).

Les symptômes d'une sécheresse oculaire sont principalement une sensation de douleur, brûlure et d'inconfort, des irritations et rougeurs mais également des larmoiements lorsque l'œil essaie de compenser le manque de larmes. De plus, les paupières peuvent être collantes au réveil, avec une gêne associée importante (22). Ces symptômes sont rarement graves, mais dans certains cas des complications peuvent apparaître comme des conjonctivites ou une inflammation de la cornée.

Les causes peuvent être externes au fonctionnement normal de l'œil, ou bien physiopathologiques avec des dysfonctionnements intervenant dans la production du film lacrymal. Quelle que soit la cause, des facteurs de risques comme un sexe féminin, un âge avancé, un régime alimentaire pauvre en acide gras essentiels ou des changements hormonaux ont un impact sur la sécheresse oculaire.

La cause externe la plus fréquente correspond aux facteurs environnementaux, comme la climatisation, l'humidité ou la température ambiante, la pollution, la fumée de cigarette, etc. La prise médicamenteuse a aussi un impact, les classes thérapeutiques les plus connues étant les antidépresseurs, les diurétiques, les β-bloquants ou encore les antihistaminiques. L'utilisation prolongée d'atropine, très fréquente chez la jeune population asiatique dans la prévention de la myopie, pourrait également provoquer une sécheresse oculaire (24). La prise de collyres contenant des conservateurs joue un rôle important dans la sécheresse oculaire par hyper-évaporation du film lacrymal. De plus, des infections et inflammations de la cornée ont un impact négatif, au même titre que des allergies ou maladies métaboliques comme le diabète de type I. Ensuite, le maquillage, le port de lentilles de contact ou des chirurgies oculaires diminuent l'humidification cornéenne. Enfin, le visionnage prolongé d'écran est une cause de sécheresse oculaire qui est de plus en plus fréquente et diagnostiquée lors de consultations chez un professionnel de santé (25), (26).

Les causes physiopathologiques de la sécheresse oculaire sont dues à une production trop faible de liquide lacrymal, une évaporation excessive ou un manque de qualité lors de la production, tous entrainant une instabilité du film lacrymal (13), (27).

Une atteinte de la glande lacrymale peut être responsable d'une sécrétion déficitaire, avec pour conséquence une diminution de la phase aqueuse du film lacrymal. C'est le cas dans le syndrome de Sjögren, qui est une pathologie entrainant des sécheresses lacrymales mais aussi buccales, salivaires, génitales, etc. Des déficits fonctionnels ou une obstruction des canaux en sont aussi responsables. Les conséquences sont, entre autres, l'augmentation de la viscosité des larmes et de la teneur en sel (15).

L'évaporation excessive des larmes peut être due à un dysfonctionnement des glandes de Meibomius, incapables de produire en qualité ou quantité suffisante la phase lipidique qui empêche normalement l'évaporation de la couche aqueuse. Dans ce cas, l'évaporation excessive entraine une diminution de la lubrification cornéenne (15).

Un mauvais étalement des larmes à la surface cornéenne peut être la conséquence d'une production insuffisante ou de mauvaise qualité du mucus mais aussi de maladies oculaires comme la formation d'un ptérygion, qui est une masse de tissu se développant le plus souvent dans le coin interne de l'œil.

Tous ces facteurs entraînent une déstabilisation, destruction du film lacrymal et altèrent la cornée, la conjonctive et les conditions physico-chimiques de l'œil. Parmi ces dernières, le changement le plus important et le plus impactant est l'apparition d'une

hyperosmolarité. Celle-ci, due à l'évaporation de l'eau, à un faible débit de production, ou une combinaison de ces deux phénomènes est considérée comme le mécanisme principal à l'origine des lésions et inflammations oculaires. En effet, cette hyperosmolarité, plus ou moins associée à une modification du pH, peut entrainer une souffrance puis l'apoptose des cellules de la surface oculaire. La stimulation nerveuse engendrée est responsable d'une inflammation, et de nombreux médiateurs chimiques (IL-1, IL-6, TNF-α) l'amplifient. Une inflammation palpébrale peut également avoir lieu par modification de la flore et libération de toxines. Les inflammations en chaines augmentant l'instabilité du film lacrymal, la sécheresse oculaire résulte d'un véritable cercle vicieux (13), (26), (28).

La figure 6 représente le cercle vicieux des mécanismes physico-chimiques intervenant dans la sécheresse oculaire, ainsi que les principales causes et facteurs de risques de cette pathologie.

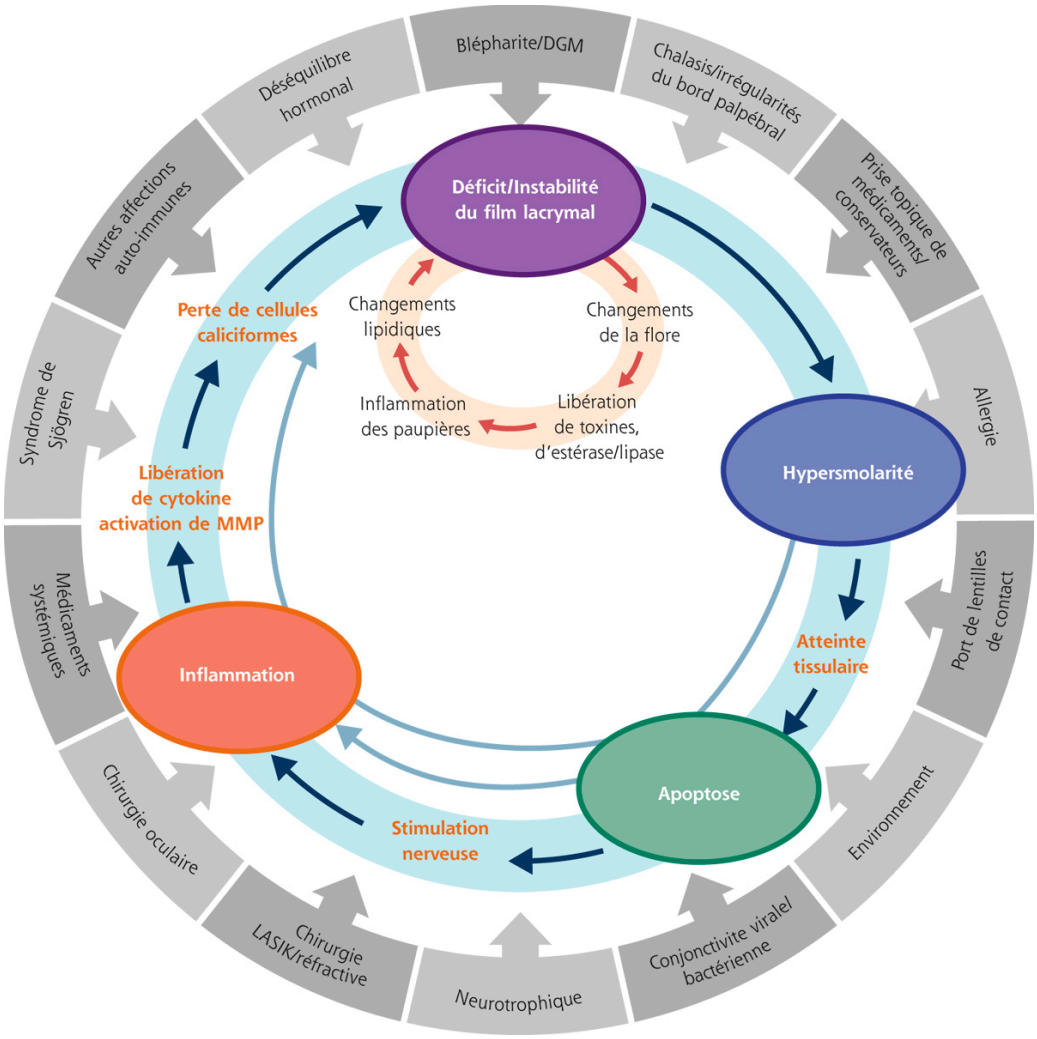


Figure 6 : Cercle vicieux de la sécheresse oculaire, causes et facteurs de risques intervenant dans la pathologie (image originale) (29).
DGM : dysfonctionnement des glandes de Meibomius, MMP : métalloprotéinases matricielles

1.3.2. Diagnostic

Le diagnostic de la sécheresse oculaire repose sur plusieurs méthodes (30), (31).

La première étape se base sur un questionnaire d'évaluation des symptômes, de leur fréquence et sévérité comme le questionnaire Standardized Patient Evaluation of Eye Dryness (SPEED) ou le questionnaire Ocular Surface Disease Index (OSDI). Le questionnaire SPEED est présenté en annexe 1 (32). En fonction des résultats, de plus amples investigations devront ou non être mises en place. Tous les tests ne sont pas obligatoires, le professionnel de santé sélectionnera celui qui semble le plus adapté aux symptômes du patient.

La mesure du temps de rupture du film lacrymal (Break-Up Time ou BUT en anglais) est un test simple et souvent pratiqué. Il s'agit d'instiller une goutte de fluorescéine et de chronométrer le temps entre le dernier clignement palpébral et la première rupture du film lacrymal. Un temps de rupture inférieur à 10 secondes sera considéré comme pathologique, un œil sain ayant un temps de rupture du film lacrymal supérieur à 15 secondes. Il existe aujourd'hui le Non-Invasive Break-Up Time (NIBUT), mis en place avec des équipements plus perfectionnés (33).

Ensuite, l'évaluation du dysfonctionnement meibomien peut-être réalisée. Il s'agit, entre autres, de regarder la morphologie de la paupière par biomicroscopie et de quantifier le nombre de glandes fonctionnelles.

Le test du fil rouge de phénol, beaucoup moins invasif que le test de Schirmer, consiste à accrocher au tiers latéral de la paupière inférieur un fil imprégné de teinture de phénol rouge. Les larmes, de pH neutre, vont induire un changement de couleur de ce fil. La longueur de la coloration du fil est alors mesurée après 15 secondes. Des valeurs inférieures à 10 mm sont signes d'une insuffisance lacrymale.

Un autre test relativement simple et considéré comme le meilleur test prédictif de diagnostic de l'œil sec est la mesure de l'osmolarité. Alors que les valeurs d'un patient sain se situent aux alentours de 304 mOsm/L, celles d'un patient atteint de sécheresse oculaire sont supérieures ou aux alentours de 330 mOsm/L. Une étude réalisée par Tomlinson *et al*. préconise d'établir la valeur seuil de l'œil sec à 316 mOsm/L (figure 7) (34).

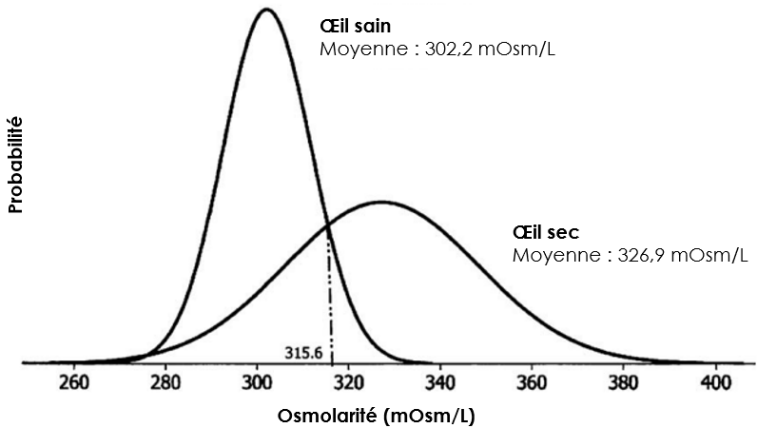


Figure 7 : Schéma représentant les valeurs de l'osmolarité du liquide lacrymal chez les patients atteints ou non du syndrome de l'œil sec, basé sur la méta-analyse de Tomlinson (extrait de) (34).

D'autres méthodes se développent comme la mesure de la viscosité extensionnelle du film lacrymal. Cette technique, jusqu'alors jamais utilisée dans le diagnostic du syndrome de l'œil sec, a démontré que les personnes atteintes de cette pathologie ont une viscosité extensionnelle du film lacrymal inférieure à des personnes saines, ce qui pourrait résulter d'une composition qualitative et quantitative anormale de lipides, protéines et électrolytes (figure 8) (35).

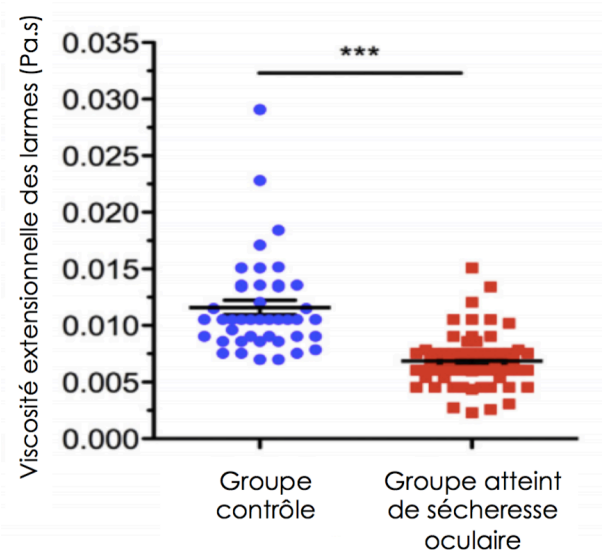


Figure 8 : Schéma représentant les valeurs de viscosités extensionnelles des larmes chez un groupe contrôle et un groupe atteint de sécheresse oculaire (extrait de) (35).

1.3.3. Stratégie thérapeutique

Chaque cause de sécheresse oculaire représente une stratégie thérapeutique distincte. Cependant, il n'y a pas de facteurs prédictifs d'efficacité, seul le patient pourra évaluer quel(s) traitement(s) il tolère le mieux et le(s)quel(s) répond(ent) le plus à ses exigences.

1.3.3.1. Stratégie environnementale

Avant d'orienter le patient vers un traitement médicamenteux, quelques pratiques de vie quotidienne doivent être mises en place. Par exemple, il est conseillé de limiter le temps passé devant un écran, d'éviter de s'exposer trop longtemps à la climatisation, à la pollution, à la fumée de tabac, etc. Certains médicaments anticholinergiques (antidépresseurs, antihistaminiques) doivent être diminués, si possible éliminés (36). Une alimentation riche en acide gras et une bonne hydratation sont également préconisées.

1.3.3.2. Stratégie médicamenteuse

Si les stratégies environnementales ne sont pas suffisamment efficaces, le praticien peut proposer au patient un traitement médicamenteux. Celui-ci est à adapter en fonction de l'objectif visé : est-ce qu'il est souhaité un apport hydrique, un remplacement de la couche mucoïde ou lipidique, une osmoprotection, un arrêt de l'inflammation, etc. La figure 9 illustre les traitements utilisés en fonction de la zone ciblée (37).

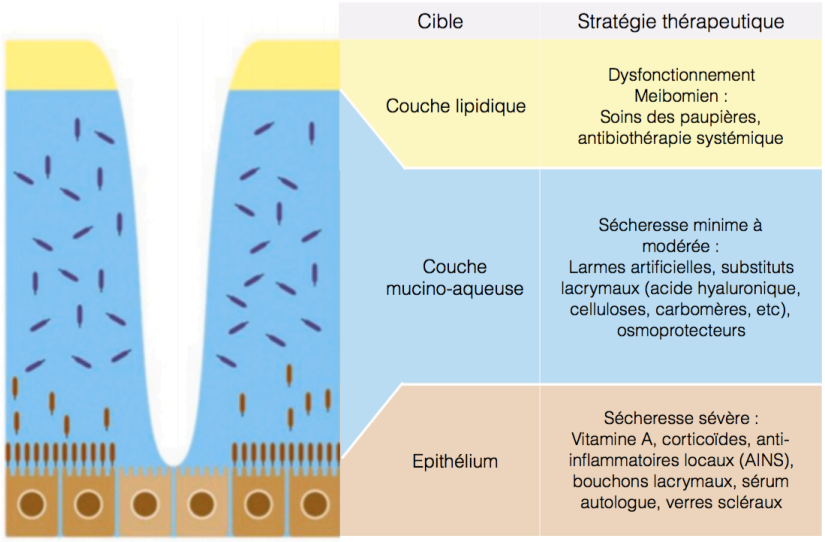


Figure 9 : Stratégies thérapeutiques médicamenteuses dans le traitement de l'œil sec en fonction de la cible du film lacrymal et de la cornée (extrait de) (38), (39).

La suite de ce chapitre se focalise sur les traitements médicamenteux à visée de la couche mucino-aqueuse.

Les traitements visant à réparer la couche mucino-aqueuse sont les substituts lacrymaux, communément appelés larmes artificielles. Les objectifs de ces traitements sont multiples : compenser le manque de larmes, protéger la surface oculaire en formant un film isolant, hydrater et lubrifier la cornée en augmentant le temps de rupture du film lacrymal, réduire les irritations, réparer les microlésions, améliorer le confort visuel (40). Ceci est possible en sélectionnant des matières premières qui ont des propriétés de rétention d'eau, de cicatrisation, et qui permettent d'avoir une bioadhésion et une viscosité optimisée (36).

L'observance et la tolérance des patients aux substituts lacrymaux étant très variables d'un individu à l'autre, il existe de nombreux médicaments présents sur le marché, avec chacun des propriétés propres. Il peut être intéressant de proposer au patient plusieurs traitements ayant des caractéristiques différentes (composition, viscosité), afin qu'il puisse évaluer quel substitut lacrymal (ou combinaison de substituts) et quel schéma d'administration est le plus adapté, tant au niveau de la tolérance par leurs ressentis subjectifs que de l'efficacité vis-à-vis de l'amélioration objective de la pathologie.

En effet, les caractéristiques physico-chimiques des larmes artificielles conditionnent en grande partie l'acceptation ou non du traitement et son efficacité. Par exemple, plus la viscosité d'un collyre est élevée, plus la rémanence est importante mais la vision peut être floutée et des dépôts peuvent apparaître dans les coins palpébraux et au niveau des cils. La rémanence est influencée par la viscosité du collyre mais aussi par les propriétés mucomimétiques des matières premières. La présence de lipides ou d'agents osmoprotecteurs est aussi à prendre en compte en fonction du stade avancé ou non de sécheresse oculaire (39).

Ainsi, le substitut lacrymal idéal se définit par une bonne mouillabilité épithéliale, un pH proche de la neutralité, une iso ou légère hypo-osmolarité (permettant de diminuer l'osmolarité et permettant un afflux d'eau vers la cornée et les couches profondes), une composition ionique proche de celle physiologique, et bien évidemment une bonne tolérance et innocuité pour l'œil (27).

L'association d'un collyre liquide à appliquer en journée et d'un collyre plus visqueux à appliquer le soir est régulièrement une stratégie thérapeutique qui donne de bons résultats chez les patients atteints du syndrome de l'œil sec.

1.3.3.2.1. Sérum physiologique

Le sérum physiologique est le traitement pour la sécheresse oculaire apparu en premier sur le marché, et encore très utilisé aujourd'hui. En plus de son utilisation pour le traitement symptomatique de la sécheresse oculaire dans les cas peu sévères, il peut être utilisé comme solution de rinçage, lors d'une agression extérieure par un corps étranger ou lors d'allergies.

Le sérum physiologique est composé d'électrolytes rétablissant l'osmolarité et humidifiant la cornée. Les sérums physiologiques les plus utilisés sont des solutions aqueuses de NaCl à 0,9 %, certains collyres étant concentrés à 1,4 %. En effet, l'utilisation d'une solution hypo-osmolaire pour rétablir l'osmolarité est sujette à controverse (37), (41).

L'avantage du sérum physiologique est qu'il n'a aucun impact visuel du fait de sa très faible viscosité et ne trouble donc pas la vision, mais cela entraîne un temps de résidence à la cornée relativement faible. Cela oblige le patient à faire des instillations répétées au cours de la journée, pouvant aller jusqu'à huit instillations par jour.

1.3.3.2.2. Alcool polyvinylique et dérivés

L'alcool polyvinylique (PVA pour polyvinyl alcohol) est un polymère synthétique de formule $(C_2H_4O)_n$ (figure 10), permettant d'augmenter la viscosité des solutions ophtalmiques sans troubler excessivement la vision. De façon logique, la viscosité de la solution augmente avec le poids moléculaire et la concentration. Soluble dans l'eau, l'alcool polyvinylique doit d'abord se disperser en solution aqueuse froide puis être chauffé aux alentours de 90°C pour se dissoudre. Les concentrations utilisables dans les formes ophtalmiques sont comprises entre 0,25 % et 3 %, la concentration typique étant de 1,4 % (37), (41), (42).

L'utilisation dans le syndrome de l'œil sec est réservée aux cas de sévérité légère à modérée, et lors de déficit en mucines. Il possède une bonne bioadhésivité, la rémanence étant toutefois inférieure à celle des solutions contenant des carbomères ou de l'acide hyaluronique. Non irritant, il permet la guérison des lésions de l'épithélium (43), (44).

La polyvinylpyrrolidone (PVP) également appelée povidone, est un dérivé de vinyl au même titre que le PVA. De formule $(C_6H_9O)_n$ (figure 10), elle est utilisée à des concentrations pouvant aller jusqu'à 10 %, la concentration typique des collyres pour le traitement de l'œil sec étant de 1,5 % à 5 %. La povidone à 2 % a montré un effet bénéfique sur la sécheresse oculaire durant l'utilisation d'un ordinateur chez des personnes ayant des lentilles de contact (41). À poids moléculaire égal, la viscosité de la PVP est inférieure à la viscosité du

PVA. Les deux molécules peuvent être formulées en association, dans l'objectif de diminuer la viscosité tout en ayant une bioadhésion importante (42).

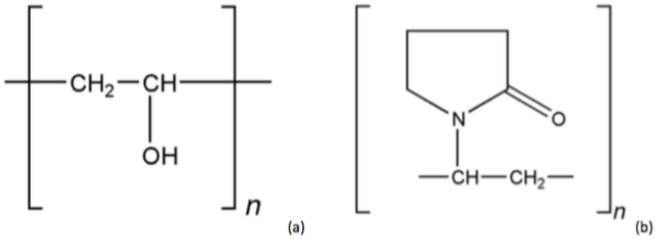


Figure 10 : Structures chimiques de l'alcool polyvinylique (a) et de la polyvinylpyrrolidone (b) (image originale) (42).

1.3.3.2.3. Dérivés de celluloses

Les dérivés de celluloses rassemblent, entre autres, la méthylcellulose (MC), l'éthylcellulose (EC), la carboxyméthylcellulose (CMC), l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC). Les deux derniers sont les plus utilisés dans les formes collyres pour le traitement de l'œil sec et prescrits dans les cas bénins. Ces polymères ont d'excellentes propriétés de rétention d'eau. La viscosité et le flou visuel associé sont dépendants du grade et de la concentration du dérivé cellulosique (37), (44).

La carboxyméthylcellulose (CMC) est un polymère chargé négativement, qui existe sous forme de carboxyméthylcellulose sodium (figure 11) et carboxyméthylcellulose calcium, la première étant utilisée dans les formes liquides, dont ophtalmiques. La CMC sodique se disperse facilement dans l'eau pour former des solutions colloïdales. Le grade de CMC influence sa viscosité : une solution à 1 % m/v de CMC peut donner une viscosité allant de 5 à 13 000 mPa.s. La CMC est stable pour des pH allant de 4 à 10, la stabilité étant maximale à pH neutre (42).

Les charges ioniques de la CMC augmentent les interactions avec les charges présentes à la surface cornéenne, favorisant ainsi la muco-adhésion. De plus, la CMC se fixe aux fibres de collagène et à la fibronectine présente à la cornée, ce qui favoriserait la migration des cellules épithéliales (41), (43).

L'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) est un polymère non ionique (figure 11) soluble dans l'eau qui possède une viscosité inférieure à celle de la CMC (15).

Comparé à la méthylcellulose, l'HPMC produit des formulations plus limpides, ce qui est privilégié pour les formulations ophtalmiques. Pour formuler une solution limpide, il faut en premier lieu disperser l'HPMC dans de l'eau chaude. En effet, elle est insoluble à chaud, ce qui lui permet de se disperser et de s'hydrater sans former d'agglomérats. Une fois l'HPMC correctement dispersée, la solution est refroidie, permettant au dérivé cellulosique de se solubiliser. En refroidissant, la viscosité de la solution augmente (42).

Selon les concentrations des produits sur le marché, les informations de différents fournisseurs ainsi que le grade des celluloses et la viscosité recherchée, les concentrations usuelles des dérivés cellulosiques dans les formes liquides sont en moyenne de 0,5 % à 5 %.

Concernant l'efficacité de ces dérivés sur la sécheresse oculaire, il a été démontré par Grene *et al.* qu'un collyre à base de CMC entrainait des résultats significativement meilleurs dans l'amélioration des symptômes qu'un collyre à base d'HPMC. Une autre étude (Simmons *et al*.) a également montré qu'une solution de CMC à 0,5 % et une solution de CMC à 1 % entrainaient des améliorations dans les tests colorimétriques, mais la solution à 1 % entrainait de plus grands troubles visuels (41).

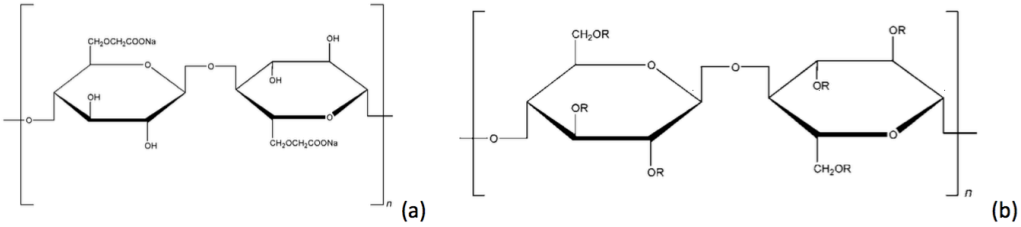


Figure 11 : Structures chimiques de la carboxyméthylcellulose sodique (a) et de l'hydroxypropylméthylcellulose (b) (image originale) (42).
R = H, CH_3 ou $CH_3CH(OH)CH_2$

1.3.3.2.4. Carbomères

Les carbomères sont des polymères synthétiques hydrophiles de haut poids moléculaire obtenus par réticulation de l'acide acrylique par des éthers, la réaction pouvant avoir lieu dans différents solvants (figure 12).

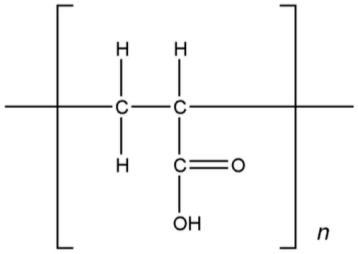


Figure 12 : Structure moléculaire des carbomères (image originale) (42).

En solution, les carbomères ont une capacité de rétention d'eau très élevée et s'organisent en réseaux tridimensionnels, leur conférant leurs propriétés de gélification. Ils ont des propriétés bio-adhésives en interagissant avec les charges négatives des mucines. Leur viscosité dépend du grade, même si celle-ci reste supérieure comparée aux autres substituts lacrymaux, ce qui leur confère un temps de résidence à la cornée très élevé et donc un nombre d'instillations diminué. L'impact sur la vision est toutefois non négligeable,

et des dépôts à la base des cils peuvent apparaître lorsque le collyre s'assèche au fil de la journée. Selon les fournisseurs, les carbomères les plus adaptés pour une application ophtalmique sont les Carbopol® 971P et 974P, à des concentrations entre 0,25 % et 1 % (37), (41).

Les carbomères ont une gélification maximale à un pH de 7. Etant très acides en solution ils doivent être neutralisés, la triéthanolamine ou l'hydroxyde de sodium étant le plus souvent utilisé. Ces polymères peuvent ainsi être adaptés pour la technologie sol-gel : dans le conditionnement à pH acide, la solution est à l'état liquide et permet une instillation de gouttes comme un collyre conventionnel. Au contact avec le pH neutre des larmes, la solution se gélifie, augmentant considérablement sa viscosité et le temps de rémanence à la cornée (42).

Les carbomères sont utilisés dans les formes modérées à sévères, ou en cas d'échec des traitements précédents. De nombreux essais ont comparé les carbomères à du hyaluronate de sodium, des solutions salines, du PVA et PVP, etc. Les résultats sortants sont en faveur d'une amélioration des symptômes, une augmentation du temps de résidence et du temps de rupture du film lacrymal pour les carbomères, la différence étant cependant quelquefois non significative entre les matières premières comparées (45).

1.3.3.2.5. Hyaluronate de sodium

Le hyaluronate de sodium (HS), de formule $(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n$ (figure 13) est le sel sodique de l'acide hyaluronique. Forme prédominante dans l'organisme au pH physiologique, c'est un glycosaminoglycane chargé négativement composé d'unités disaccharidiques. Le hyaluronate de sodium est extrait de la crête de coq ou est obtenu par fermentation de bactéries du genre *Streptococcus* (42), (46).

A noter que les termes hyaluronate de sodium et acide hyaluronique sont couramment utilisés pour désigner la même molécule.

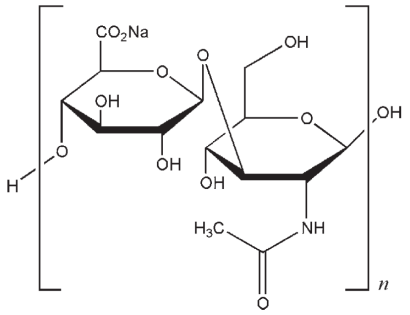


Figure 13 : Structure moléculaire du hyaluronate de sodium (image originale) (42).

Le poids moléculaire du hyaluronate de sodium varie entre 300 et 2 000 kDa. La molécule est soluble dans l'eau, cependant la vitesse de solubilisation est relativement lente, d'autant plus si le poids moléculaire est élevé (42).

L'acide hyaluronique, très bien toléré au niveau oculaire, est utilisé dans les formes ophtalmiques en tant que « principe actif », agent viscosifiant et mucoadhésif. Les concentrations usuelles dans les formulations pour la sécheresse oculaire sont de l'ordre de 0,1 % à 0,2 %. Il favorise la stabilité du film lacrymal et augmente le temps de résidence à la cornée de part sa forte viscosité et ses importantes propriétés bioadhésives. De plus, le hyaluronate est un excellent piège aqueux grâce à ses charges négatives, ce qui favorise l'hydratation et la lubrification cornéenne. Il intervient dans la cicatrisation épithéliale en facilitant la migration des cellules épithéliales tout en améliorant leur prolifération, grâce à des liaisons avec la fibronectine de la matrice extracellulaire. Ces propriétés cicatrisantes en font un substitut lacrymal de choix lors d'ulcères cornéens, que l'origine soit mécanique, inflammatoire ou infectieuse (41), (43), (47).

De nombreuses études ont évalué les effets du hyaluronate de sodium à d'autres polymères utilisés dans le traitement de la sécheresse oculaire. Une comparaison entre le HS à 0,18 % et la CMC à 1 % ont montré une amélioration des symptômes pour les deux solutions évaluées, mais une meilleure diminution de l'inflammation et un meilleur confort pour le collyre à base de HS (41). Les formulations à base de HS à 0,1 % et 0,3 % ont montré une durée des effets supérieure à une solution saline (48). Le HS à 0,1 % provoque une meilleure augmentation du temps de rupture du film lacrymal comparé à du sérum physiologique, tout comme le HS à 0,18 % présente une meilleure efficacité que le véhicule seul (49), (50). De plus, il a été démontré que le HS protège des effets cytotoxiques des conservateurs lorsqu'ils sont présents dans la formulation, au contraire de la carboxyméthylcellulose (51).

1.3.3.2.6. Autres substituts lacrymaux et osmorégulateurs

L'HP-Guar, pour hydroxypropyl-guar, est une gélatine non ionique qui se transforme en gel au contact de la surface oculaire. Il a été prouvé que l'HP-Guar réduisait considérablement l'osmolarité des larmes. De plus, elle possède un effet mucoadhésif et une très longue rémanence (37), (52).

La gomme Xanthane est également étudiée pour son utilisation dans la sécheresse oculaire (15).

Les osmoprotecteurs sont utilisés lors de la sécheresse oculaire pour rétablir une osmolarité physiologique et ainsi éviter une déshydratation excessive. Les solutions sont le plus souvent composées d'Erythritol, un polyol, de L-carnitine, un acide aminé, ou encore de tréhalose, un disaccharide. Une association de plusieurs agents osmoprotecteurs est

possible. Il est régulièrement ajouté un viscosifiant dans ces formulations, pour améliorer la rémanence (37), (40).

En résumé, la sécheresse oculaire est une pathologie fréquente diminuant de façon considérable le confort oculaire du patient. En effet, le manque d'humidification oculaire entraîne des microlésions cornéennes et une sensation de brûlure et de grains de sable dans l'œil. Le développement de nombreuses méthodes de diagnostic de plus en plus ciblées permet d'établir précisément les causes intervenant dans cette sécheresse oculaire.

Des traitements divers et variés sont disponibles sur le marché pour répondre aux besoins du patient en fonction, entre autres, des causes et des stades de sévérité de la sécheresse oculaire. Toutefois, la tolérance étant très subjective, seul le patient sera apte à dire quel traitement lui semble le plus adapté.

Les nombreuses études cliniques comparant les substituts lacrymaux ont montré que tous ont des caractéristiques propres, des avantages et inconvénients comparés à leurs concurrents. Cela confirme une fois de plus que le choix d'un traitement dans la sécheresse oculaire se fait en grande partie en fonction des ressentis du patient et de ses préférences, certains traitements étant relativement équivalents en termes d'efficacité. Le tableau 1 récapitule les caractéristiques des substituts lacrymaux les plus utilisés.

Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques des matières premières utilisées dans les substituts lacrymaux.

Famille	Molécule	Concentration typique (% m/v)	Caractéristiques	Exemples de médicaments
Sérum physiologique	NaCl	0,9	Peu rémanent, faible viscosité.	Larmabak®
Dérivés vinyliques	PVA	1,4	Lubrifiant, stabilisant, bioadhésif (PVA). Utilisables en association.	Dulcilarmes®
	PVP	1,5 - 5		
Dérivés cellulosiques	HPMC	0,15 - 1	Bonne rétention d'eau et rémanence.	Celluvisc®
	CMC sodique	2		
Carbomères	971P et 974P	0,25 - 1	Très grande viscosité et rémanence, bioadhésif, flou visuel.	Lacryvisc®
Acide hyaluronique	Acide hyaluronique / Hyaluronate de sodium	0,1 - 0,2	Bioadhésif, très bonne rémanence, très bien toléré, stabilisant.	Hyabak®

Les exemples de médicaments sont tirés du Vidal.

2. L'ŒIL VIS-A-VIS D'UN MEDICAMENT : FOCUS SUR LES FORMES TOPIQUES

Comme pour toute zone du corps humain, l'œil peut être affecté par diverses pathologies, il est alors indispensable de traiter l'organe avec un médicament adapté. Cependant, l'œil étant extrêmement fragile et sensible aux éléments étrangers, la formulation d'un médicament oculaire est très délicate. De plus, les mécanismes de défenses de l'œil sont responsables d'une biodisponibilité de la substance active très faible.

Pour traiter l'affection de manière ciblée, certaines formes ophtalmiques sont administrées dans l'objectif d'avoir uniquement une action de surface, d'autres sont privilégiées pour pénétrer les tissus oculaires et exercer une action thérapeutique en profondeur. En effet, la zone à traiter peut être plus ou moins profonde. La voie sanguine et la voie intraoculaire sont majoritairement utilisées pour des affections de l'œil relativement profondes, tandis que la voie transcornéenne (ou topique) est privilégiée pour des traitements plus superficiels comme au niveau de la cornée ou du segment antérieur.

A l'heure actuelle, différentes formes galéniques sont disponibles sur le marché (6).

Les formes aqueuses sont les plus courantes, avec une facilité d'utilisation avérée. C'est le cas du médicament Acular®, utilisé pour la prévention et le traitement de l'inflammation oculaire après chirurgie de la cataracte (53).

Les suspensions sont utilisées lorsque le principe actif est peu soluble, mais cela peut entraîner des irritations par un phénomène abrasif. Le Tobradex® est un exemple de collyre en suspension, utilisé en tant que traitement local anti-inflammatoire et antibactérien (54).

Les pommades permettent un temps de résidence à la cornée plus élevé, mais entraînent un trouble visuel qui peut être gênant pour le patient, diminuant son observance. Le Ciloxan® est une pommade oculaire utilisée en tant qu'antibactérien local (55).

Les gels peuvent permettre d'avoir une libération prolongée des principes actifs. Différents phénomènes permettent l'adhésion du gel à la cornée, dépendant du type de matière première utilisée. Ils sont également responsables de troubles visuels. Le gel Aquarest® est utilisé dans le traitement de la sécheresse oculaire (56).

Les inserts peuvent permettre eux aussi une libération prolongée de la substance active. Cependant, une sensation de gêne ou l'expulsion involontaire de l'insert diminuent considérablement l'observance du patient à ce type de traitement. Il existe l'insert Mydriasert® utilisé dans l'obtention d'une mydriase pré-opératoire et diagnostique (57).

Enfin, les injections permettent d'atteindre une zone plus profonde. Le médicament Lucentis® s'utilise en injection intra-vitréenne dans le traitement de la DMLA (53).

La suite de cette thèse ne portera que sur les instillations par voie topique.

La voie topique a l'avantage d'être simple d'utilisation et permet ainsi au patient une réelle autonomie dans la prise de son traitement. De plus, les concentrations atteignant la zone cible sont plus élevées avec une prise par voie topique que par voie générale. L'intérêt des formes topiques dans le traitement de pathologies oculaires paraît donc évident. Toutefois, ces formes se comportant pour l'œil comme un corps étranger, le globe oculaire met en place des mécanismes rapides d'élimination, diminuant considérablement la biodisponibilité du médicament.

Cette partie de la thèse détaillera les quatre étapes intervenant dans la pharmacocinétique des formes ophtalmiques topiques, la biodisponibilité qui en résulte et enfin la toxicité et tolérance associées à ces formes.

2.1. Pharmacocinétique

2.1.1. Absorption

L'absorption oculaire correspond à la pénétration du principe actif à travers la cornée ou la conjonctive.

Pour rappel, pour pénétrer dans le segment antérieur de l'œil, le médicament doit traverser trois barrières cornéennes : l'épithélium (lipophile, couche la plus externe), le stroma (hydrophile) et l'endothélium (lipophile, couche la plus interne).

Au niveau de l'épithélium, les molécules lipophiles traversent par un passage transcellulaire, au contraire des molécules hydrophiles qui se déplacent par passage paracellulaire. De plus, les macromolécules de taille supérieure à 10 Å sont fortement limitées dans l'absorption. En poids moléculaire, seules les molécules inférieures à 500 Da peuvent pénétrer, les molécules ayant un poids moléculaire plus élevé pouvant toutefois être utilisées pour des actions de surface. Au niveau du stroma, l'absorption de molécules hydrophiles est facilitée. De même pour l'endothélium, qui, constitué uniquement d'une monocouche de cellules, est moins restrictif dans le passage des molécules (6), (58), (59).

La conjonctive et la sclérotique, couches hydrophiles, sont beaucoup plus perméables que le stroma pour l'absorption de molécules polaires. De plus, du fait des jonctions cellulaires moins serrées qu'au niveau de la cornée, le passage de grosses molécules est facilité. Cependant, de nombreux vaisseaux sanguins entrainent très rapidement les molécules dans la circulation générale (60).

Ainsi, les propriétés moléculaires et physico-chimiques des principes actifs déterminent quel tissu va assurer le rôle de réservoir et quel tissu va assurer le rôle de barrière. Une molécule ayant des propriétés à la fois lipophile et hydrophile aura un passage cornéen plus aisé. Dans tous les cas, la pénétration du principe actif sera augmentée lors d'une lésion oculaire (43).

De plus, certains facteurs comme la sécrétion lacrymale, le drainage nasolacrymal, les clignements palpébraux diminuent nettement l'absorption. Plus précisément, après instillation d'une goutte de 50 µl, 80 % du volume est éliminé par voie nasolacrymale et 10 % est éjecté de l'œil à cause des clignements palpébraux. Ainsi, seule une faible fraction de la dose instillée atteint réellement son site d'action après la cornée (43).

2.1.2. Distribution

Une fois absorbée à travers la cornée ou la conjonctive, la substance active est distribuée vers les compartiments adjacents tels que le cristallin, l'iris, le corps ciliaire, etc.

Lors de la distribution locale, trois principaux mécanismes font obstacle à cette distribution : la fixation du principe actif à la mélanine contenue au niveau de l'iris et du corps ciliaire, la fixation à des protéines de l'humeur aqueuse, et enfin l'élimination rapide due à la vitesse élevée du renouvellement de l'humeur aqueuse. Seules les molécules de petit poids moléculaire peuvent être distribuées au niveau rétinien (61).

La distribution du médicament peut également se faire par voie systémique, ce qui peut entraîner des effets indésirables. En effet, la substance peut passer, parallèlement à la traversée de la cornée, dans la cavité nasale, la bouche puis le tube digestif (57).

2.1.3. Métabolisation

L'œil est un organe qui métabolise faiblement. Les quelques métabolisations ont lieu principalement dans l'épithélium et l'endothélium cornéen, le corps ciliaire et la rétine grâce à des systèmes enzymatiques comme des enzymes de biotransformation (6).

2.1.4. Excrétion

L'élimination du principe actif à la surface oculaire se fait essentiellement par voie systémique lors du passage dans les fosses nasales puis dans la circulation sanguine (6).

Les molécules de petites tailles qui ont réussi à atteindre la chambre antérieure sont éliminées *via* l'écoulement de l'humeur aqueuse et du flux sanguin de l'iris et du corps ciliaire. Les molécules de grosses tailles sont éliminées uniquement *via* l'écoulement de l'humeur aqueuse (60).

2.2. Biodisponibilité

La biodisponibilité correspond à la fraction de la dose administrée qui atteint le compartiment cible (6).

Lors de l'administration topique de médicaments, ces derniers peuvent être destinés à agir en surface, comme les antiseptiques, ou peuvent être destinés à agir en profondeur sur des structures plus internes.

Pour les substances actives devant agir en profondeur, comme évoqué précédemment, la plupart des principes actifs n'atteignent qu'en très faible quantité la zone à traiter après la cornée. Cette faible biodisponibilité s'explique en partie par les différences de perméabilité des couches de la cornée et de la conjonctive, mais également par d'autres facteurs comme les caractéristiques physico-chimiques du principe actif, un turnover des larmes important ou encore un passage systémique. Cependant, certains paramètres moléculaires permettent d'optimiser l'absorption de la molécule. Ces paramètres sont présentés dans la figure 14 (62), (58).

Toutefois, l'ensemble de ces facteurs font que la biodisponibilité du principe actif au niveau de son site d'action, après avoir traversé la cornée, ne dépasse pas 5 % (10 % chez certains auteurs). Cette quantité très faible oblige alors le patient à répéter de nombreuses fois les instillations au cours de la journée (43), (60), (63).

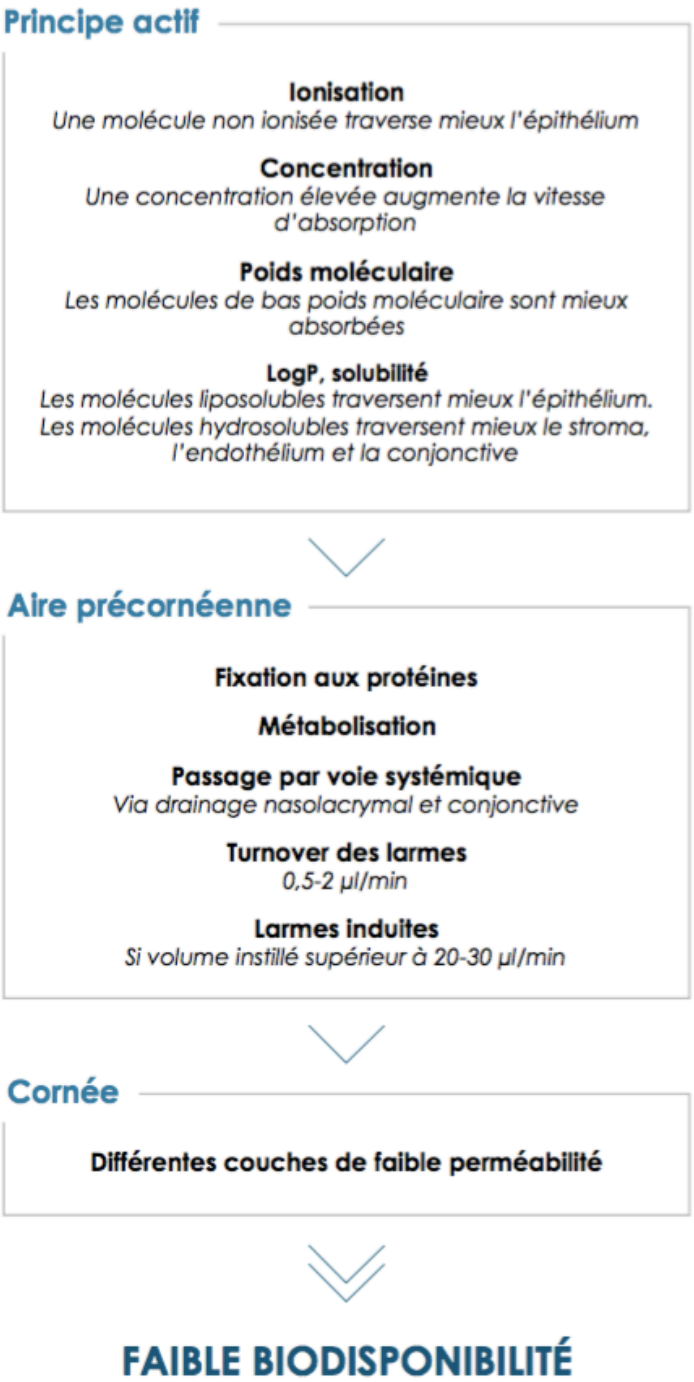


Figure 14 : Facteurs intervenant dans la biodisponibilité d'un médicament au niveau de l'œil (extrait de) (6), (58).

A titre d'illustration, une goutte de 5 µl restera à la surface cornéenne environ 7 minutes, tandis qu'une goutte de 50 µl sera éliminée au bout d'environ 2 minutes. L'idéal est d'instiller une goutte ne dépassant pas 30 µl, tout volume supérieur étant directement perdu dans les voies lacrymales, pour un potentiel passage en suivant dans la circulation sanguine (62).

Connaissant la biodisponibilité de la molécule et sa concentration requise pour être efficace au site d'action, la dose nécessaire dans la formulation peut être estimée par l'équation suivante (60) :

$$D = C_{ss,av} \times CL \times \tau / F$$

Avec D le dosage du PA dans la formulation, $C_{ss,av}$ la concentration moyenne à l'état stable au site cible, CL la clairance du compartiment cible, τ l'intervalle entre les doses, F la biodisponibilité du compartiment cible.

En résumé, la pharmacocinétique et la biodisponibilité des médicaments au niveau ophtalmique sont conditionnées par les caractéristiques physico-chimiques des substances actives, les mécanismes intervenant au niveau de l'aire pré-cornéenne ainsi que par la perméabilité des barrières biologiques.

Les petites molécules lipophiles traversent mieux la cornée, alors que les molécules hydrophiles de toutes tailles sont sujettes à un passage au niveau de la conjonctive et de la sclère, mais la grande vascularisation de ces dernières entraine une élimination rapide du principe actif. Ainsi, une molécule de petite taille étant à la fois hydrophile et lipophile est idéale pour atteindre un site d'action en profondeur. Toutefois, beaucoup de collyres nécessitent seulement une action de surface, et n'ont donc pas besoin d'être absorbés à travers la cornée ou la conjonctive. Dans tous les cas, que l'action désirée soit en surface ou en profondeur, les mécanismes d'élimination des médicaments ophtalmiques topiques obligent une instillation fréquente pour pouvoir traiter efficacement l'affection.

De plus, même si la biodisponibilité en profondeur est très faible, une faible quantité de substance active peut suffire pour exercer une action thérapeutique. Il faut alors savoir moduler dans la formulation la quantité de principe actif. En effet, celle-ci doit être la plus faible possible pour éviter les effets indésirables lors d'un passage systémique, mais elle doit être suffisante, après avoir été éliminée en partie par les mécanismes de défenses et retenue par les barrières physiologiques, pour exercer tout de même l'action thérapeutique désirée.

2.3. Toxicité et tolérance

L'œil étant un organe très sensible, la tolérance et l'innocuité du médicament administré sont deux paramètres indispensables. De plus, si le médicament est mal toléré ou irritant, des larmes sont produites et des clignements réflexes ont lieu, entraînant une élimination d'autant plus rapide du médicament ophtalmique. Ceci engendre alors une diminution de la quantité de principe actif absorbé et *in fine* une diminution de la biodisponibilité, bien que déjà très faible.

Les cellules oculaires ont une grande sensibilité et une détection précoce aux substances iatrogènes toxiques pour de très faibles concentrations. Elles possèdent et surexpriment des récepteurs de mort cellulaire et d'inflammation, comme le récepteur P2X7 ce qui peut engendrer, lors de l'instillation d'une substance nocive, des effets cytotoxiques (apoptose des cellules), une diminution définitive du nombre de cellules épithéliales ou encore des mécanismes inflammatoires importants. Certaines substances qui n'ont pas d'effet dans des formulations injectables peuvent être mal tolérées lorsque le médicament est administré par voie ophtalmique. Cette toxicité se traduit par des rougeurs, des gonflements, des lésions au niveau de la cornée ou encore une perte temporaire voire permanente de l'acuité visuelle (64), (65).

Certains principes actifs eux-mêmes peuvent entraîner une toxicité oculaire, même lorsque les instillations sont peu fréquentes. Les principales classes thérapeutiques concernées sont les anesthésiques locaux, les mydriatiques, les antibiotiques, les antiviraux, les antifongiques et les corticoïdes (66).

Outre les substances actives, certains excipients ont fait l'objet de beaucoup de recherches concernant leur toxicité oculaire. Ainsi, la littérature recense de nombreux toxiques avérés pour la cornée, dont les plus connus sont les conservateurs. En effet, l'usage répété et prolongé de collyres contenant des conservateurs peut engendrer une hypersensibilité, un ralentissement de la cicatrisation de la cornée, une déstabilisation du film lacrymal ou encore des réactions allergiques et toxiques des différentes couches cornéennes. Cela peut se manifester, entre autres, par une nécrose ou des œdèmes (67).

Un article comparant la tolérance oculaire de 3 spécialités ophtalmiques à base de timolol confirme ces propos. Des cornées de lapins traitées au Timabak®, au Timoptol® et au Timoptol® LP ont été analysées. Les résultats ont montré une bonne tolérance pour ces trois spécialités, avec toutefois des différences dans le degré de tolérance selon la composition (présence ou non de conservateur). Le collyre Timabak® (exempt de conservateur) ne modifie pas la surface cornéenne, alors qu'un traitement au Timoptol® et Timoptol® LP (contenant un conservateur) engendre un accroissement des microlésions à la surface cornéenne.

Une autre étude démontre que les conservateurs de la famille des ammoniums quaternaires, dont fait partie le chlorure de benzalkonium, améliorent la pénétration de la substance active grâce à la rupture de la barrière hydrophobe que représente l'épithélium. Cependant, l'apparition de rougeurs, inflammations et allergies est directement corrélée à leur présence. Une apoptose des cellules oculaires a été démontrée pour des concentrations de l'ordre de 0,005 % de chlorure de benzalkonium (BAK) dans le médicament ophtalmique. Il a également été démontré *in vitro* que le BAK inhibe la prolifération des cellules trabéculaires à des concentrations de 0,00002 %. De plus, le BAK entraine une hyper-évaporation lacrymale et une destruction des cellules à mucus, entrainant ou aggravant la sécheresse oculaire (68), (69).

Toutefois, certains excipients des formes ophtalmiques ont des effets non délétères sur les cellules cornéennes. C'est le cas des celluloses, des carbomères, de l'acide hyaluronique ou encore du PVA. Ce dernier permet de lubrifier la cornée, de régénérer les lésions cornéennes, de diminuer la tension interfaciale entre eau et huile, mais aussi de modifier la viscosité sans troubler la vision une fois le médicament instillé, augmentant ainsi le temps de contact du collyre avec l'œil (70).

En résumé, pour être tolérées par l'œil, les formes ophtalmiques doivent limiter ou éliminer les substances potentiellement toxiques pour la cornée, même à très faible concentration. D'autres stratégies galéniques et matières premières mieux tolérées sont à privilégier pour assurer la fonction principale souhaitée sans les effets indésirables associés.

Toutefois, la tolérance de l'œil aux collyres n'est pas seulement due à l'impact des principes actifs et des excipients, mais peut aussi être influencée par les propriétés des collyres comme le pH, la pression osmotique ou encore la taille des particules.

3. LA GALENIQUE APPLIQUEE AUX COLLYRES

Les préparations ophtalmiques, dont font partie les collyres, sont définies selon la Pharmacopée Européenne 10ème édition comme des « préparations liquides, semi-solides ou solides stériles destinées à être appliquées sur le globe oculaire et/ou les conjonctives ou à être introduites dans le cul-de-sac conjonctival ». Plus précisément, les collyres sont définis comme « des solutions, des émulsions ou des suspensions stériles, aqueuses ou huileuses, contenant une ou plusieurs substances actives (PA) et destinées à l'instillation oculaire ».

Comme le précise également la Pharmacopée Européenne, « les collyres peuvent contenir des excipients destinés, par exemple, à ajuster la pouvoir osmotique ou la viscosité de la préparation, à adapter ou stabiliser le pH, à augmenter la solubilité de la substance active ou à stabiliser la préparation. Ces excipients ne doivent pas nuire pas à l'action médicamenteuse recherchée et, aux concentrations choisies, ne provoquent pas d'irritation locale notable ».

Ainsi, lors du développement d'une forme ophtalmique, plusieurs critères de qualité sont à respecter. La formulation doit être limpide dans le cas d'une solution, ou respecter des limites de taille de particules dans le cas d'une suspension. Elle doit être idéalement neutre et de même pression osmotique que les larmes. L'instillation doit être indolore, c'est-à-dire que les excipients doivent être choisis en fonction de leur tolérance vis-à-vis de l'œil mais le pH doit également être adapté pour ne pas provoquer d'irritation supplémentaire. Enfin, il est obligatoire pour les collyres d'être stériles, qu'ils soient sous conditionnement unidose ou multidoses. De manière non obligatoire, la viscosité et la bioadhésion des collyres sont à prendre en compte en fonction de l'action recherchée.

Au vu du comportement physiologique de l'œil, de sa composition et des paramètres de formulation à respecter, le développement des formes ophtalmiques dont font partie les collyres est très délicat et complexe mais reste possible grâce à des améliorations galéniques. Ces dernières ont pour but d'améliorer l'observance et le confort du patient. En effet, l'objectif principal d'un traitement médicamenteux est de soigner la pathologie ciblée. Mais de nos jours, la stratégie de développement d'un médicament s'attache également à augmenter la tolérance, diminuer les effets indésirables, faciliter la prise médicamenteuse, idéalement la diminuer, grâce à un choix méticuleux de matières premières et une augmentation de l'efficacité.

Dans cette partie, il sera d'abord présenté les différentes propriétés d'un collyre et caractéristiques à respecter pour atteindre la qualité requise, ainsi que les composants utilisables dans cette forme. La deuxième partie sera centrée sur deux problématiques de formulation qui sont la faible solubilité des principes actifs dans les formes collyres et la

faible biodisponibilité de ces dernières, ainsi que les stratégies galéniques associées pour y remédier.

3.1. Propriétés et composition des collyres

Les collyres, comme tout médicament, doivent avoir une action thérapeutique. De plus, comme évoqué précédemment, les formes ophtalmiques doivent respecter des critères de qualité qui leur sont imposés.

Pour répondre à ces deux paramètres, les collyres peuvent contenir un ou plusieurs principes actifs nécessaires au traitement de la pathologie. La sélection des excipients se fera en fonction de la tolérance de l'œil, des compatibilités entre les matières premières, de la propriété recherchée vis-à-vis de l'objectif de formulation (collyre avec une grande viscosité, collyre multidoses qui nécessite l'emploi d'un conservateur, etc) mais aussi de la solubilité des matières premières, du pH, de la pression osmotique, etc.

3.1.1. Activité thérapeutique

Les principales classes pharmacologiques des formes ophtalmiques sont les anti-glaucomateux, les mydriatiques, les antiallergiques, les anti-inflammatoires, les anti-infectieux, les immunosuppresseurs, ainsi que les produits de suppléance lacrymale et de diagnostic (1).

La plupart des collyres ayant des concentrations de principe actif allant de 0,1 % à 2 % et le volume d'une goutte étant très faible, l'œil reçoit par instillation une quantité de substance active de l'ordre du microgramme (6).

3.1.2. Volume instillé

Une goutte de collyre est idéalement comprise entre 20 et 30 µL. Au-delà de ce volume instillé, l'excédent est directement éliminé dans le conduit nasolacrymal. De ce fait, si plusieurs gouttes doivent être instillées pour un même œil, il est recommandé d'espacer de 5 à 15 minutes l'administration entre chaque goutte (71).

Pour pouvoir formuler le principe actif et avoir un volume suffisant à l'instillation, l'utilisation d'un véhicule est indispensable. En effet, ce dernier permet au collyre d'être sous forme liquide lors de l'instillation. En fonction de celui-ci, on distingue les collyres

aqueux des collyres huileux. Il est choisi en fonction de différents critères comme le pouvoir solvant, la tolérance, l'inertie chimique, etc (1).

Le véhicule le plus couramment utilisé est l'eau. La Pharmacopée Européenne n'imposant pas l'utilisation d'eau pour préparation injectable (PPI), l'eau purifiée peut être privilégiée. Le choix du type d'eau est propre pour chaque formulation et stratégie associée, cependant la qualité microbiologique finale de l'eau purifiée doit être identique à celle de l'eau PPI.

Des solvants non aqueux peuvent également jouer le rôle de véhicule. Les co-solvants miscibles à l'eau sont souvent utilisés pour leur pouvoir solvant, mais en faibles quantités car ils peuvent causer des problèmes de tolérance et d'irritation. On retrouve par exemple le propylène glycol ou le polyéthylène glycol (PEG) de faible poids moléculaire. Enfin, les huiles peuvent être utilisées seules pour solubiliser des principes actifs peu hydrosolubles, ou en association avec l'eau pour la formulation, entre autres, de microémulsions (1).

3.1.3. Limpidité et taille des particules

La limpidité est un critère essentiel de qualité des collyres en solution. Dans le cas d'une suspension, les particules doivent être de telle sorte que la limpidité soit tout de même respectée. Les particules, de par leurs formes et dimensions, se doivent d'être le moins irritant possible pour l'œil.

La Pharmacopée Européenne impose que, dans le cas d'une suspension, sur 10 µg de substance active sous forme solide dans le collyre, au maximum 20 particules dépassent 25 µm, au maximum 2 particules dépassent 50 µm et aucune particule ne dépasse une taille de 90 µm.

Outre les suspensions, d'autres « objets » peuvent également être présents dans la solution et leur taille peut affecter la tolérance de la préparation. C'est le cas des liposomes, dont la taille varie entre 50 microns et quelques micromètres, des cyclodextrines, dont la taille est de l'ordre du nanomètre, ou encore des nanoparticules dont la taille est comprise entre 10 nm et 1 µm (43).

De façon logique, plus la taille des particules sera petite, meilleure sera la tolérance de l'œil. Idéalement, un diamètre maximal de 10 µm permet de ne pas avoir de sensation de corps étranger, ce qui évite des larmoiements et clignements réflexes (60).

Pour mesurer la taille des particules en solution, les méthodes les plus adaptées sont l'analyse granulométrique par diffraction laser ou diffusion dynamique de la lumière (DLS

pour Dynamic Light Scattering). Cette dernière est utilisée pour des particules de taille relativement faible (10^{-3} à 10 µm) comparé à la diffraction laser (10^{-2} à 10^{3} µm) (72).

3.1.4. Neutralité et pH toléré

Le pH physiologique du liquide lacrymal est compris entre 7,3 et 7,8, la valeur pouvant varier entre deux individus de la population ou au sein d'un même individu au fil du temps (1).

Lors du développement d'un collyre, il est recommandé de respecter la plage physiologique pour éviter des picotements (pH trop acide) ou une sensation de brûlure (pH trop basique), les deux entrainant des clignements réflexes des paupières et une sécrétion de larmes, aboutissant *in fine* à une élimination plus rapide du principe actif à la surface cornéenne. Toutefois, l'œil peut en réalité supporter de plus grands écarts de pH sans enclencher des mécanismes excessifs de défenses, allant de 4 à 8. Cela s'explique par le pouvoir tampon des larmes qui, même si faible, permet après instillation de garder un pH proche de la neutralité, permettant à la solution de rester stable avant administration tout en étant bien tolérée par l'œil lors de l'instillation (73), (74).

Ainsi, si la substance active n'est pas stable à un pH proche de la neutralité, le pH de la formulation peut être adapté grâce à des acides, bases ou encore des solutions tampons, dont le pH sera fixé. Il existe les tampons phosphate, borate (ayant en plus une action antiseptique), citrate ou encore une association de ces derniers comme le tampon phosphate-citrate. D'autres tampons comme le tampon phosphate modifié de Sorensen sont des tampons contenant des sels, permettant ainsi à la solution d'être isotonique.

Le pH de la formulation finale doit dans tous les cas permettre une solubilité et une stabilité du principe actif et des matières premières, ainsi qu'une tolérance vis-à-vis de l'œil lors de l'instillation.

La mesure du pH se fait simplement *via* un pH-mètre. Le principe est basé sur l'analyse de la différence de potentiel électrochimique qui s'établit entre deux électrodes plongées dans la solution. Une de ces électrodes possède un potentiel constant et sert de référence, l'autre possède un potentiel qui varie en fonction de la composition de la solution et de la quantité en ions H_3O^+. Cette différence entre les électrodes permet la mesure et l'interprétation du pH.

3.1.5. Pression osmotique

Les larmes sont composées de divers électrolytes (ions sodium, potassium, magnésium, calcium, chlorure, etc) qui permettent d'avoir une tonicité aux alentours de 300 mOsm/kg (certains auteurs évoquent 280 mOsm/kg dans la littérature). Cette tonicité s'apparente à celle d'une solution de NaCl 0,9 % (8).

L'isotonie est un facteur important à prendre en compte lors du développement galénique car il détermine la tolérance de l'œil. Ainsi, l'osmolalité cible sera celle physiologique, mais l'œil tolère des osmolalités entre 236 et 446 mOsm/kg, ce qui correspond à des solutions de 0,7 % à 1,4 % de NaCl. A noter qu'un œil pathologique sera plus sensible à la pression osmotique qu'un œil sain, d'où l'intérêt de se rapprocher le plus possible de la tonicité physiologique des larmes (75).

De plus, l'œil tolère mieux des solutions hypertoniques qu'hypotoniques, cependant, une solution hypotonique est souvent privilégiée car elle entraîne un flux d'eau à travers la cornée et permet donc une meilleure absorption des substances actives (58).

En plus du NaCl, il existe d'autres excipients comme le mannitol, qui est non ionique et peut s'avérer utile lorsque des excipients sont sensibles aux ions, le glycérol ou encore les sels tampons, ces derniers ajustant simultanément le pH et la pression osmotique.

La mesure de l'osmolalité s'effectue grâce à un osmomètre. Ce dernier, par mesure de l'abaissement du point de congélation, permet de chiffrer le nombre de particules osmotiques en solution. L'eau pure a un point de congélation à 0°C et la diminution de ce dernier est directement corrélée à la concentration en solutés. Ainsi, plus l'osmolalité est élevée, plus le point de congélation est bas.

3.1.6. Tension superficielle

Dans le cas d'un liquide, la tension superficielle, ou tension de surface, représente la force existante à sa surface, due à l'attraction entre les molécules qui s'opposent à la rupture de cette surface. Autrement dit, elle exprime la force par unité de surface avec laquelle les molécules sont attirées vers l'intérieur du liquide. Par exemple, plus la différence de tension superficielle est importante entre une phase liquide et solide, plus le liquide tend vers une forme sphérique pour minimiser les contacts. Au contraire, plus cette différence est faible entre les deux surfaces, plus le liquide peut s'étaler (76).

Au niveau de l'œil, la tension superficielle est un élément important. Alors que l'eau seule à la cornée tend à prendre la forme d'une goutte, les glycoprotéines et autres macromolécules présentent dans le liquide lacrymal permettent de diminuer la tension

superficielle de l'eau, l'amenant à 44 mN/m, se rapprochant ainsi de la tension superficielle de la cornée et permettant un meilleur étalement. Ainsi, plus la tension de surface entre le film lacrymal et l'épithélium sera similaire, plus l'hydratation de la cornée sera importante (8), (15), (77).

La tension interfaciale qui s'établit entre le collyre et l'œil doit donc permettre un étalement correct du médicament à la surface oculaire. Les tensioactifs peuvent diminuer la tension de surface en provoquant une destruction du film précornéen, ce qui permet également d'augmenter la perméabilité cornéenne. Ils ont de plus des propriétés mouillantes, dispersantes et solubilisantes. De par leur mécanisme d'action, les tensioactifs doivent être utilisés à de faibles concentrations. De plus, les tensioactifs non ioniques, moins toxiques, sont privilégiés pour la formulation. Cette catégorie comprend les Polysorbates (dont le Polysorbate 80), le Tyloxapol ou encore les Poloxamers (1).

La mesure de la tension superficielle se fait *via* un tensiomètre, dont le principe repose sur la mesure d'une force durant un déplacement. De ce fait, la tension superficielle s'exprime en $dyn.cm^{-1}$, en $N.m^{-1}$ ou en $J.m^{-2}$.

3.1.7. Comportement rhéologique et viscosité

Les larmes ont un comportement rhéofluidifiant, c'est-à-dire que la viscosité diminue lorsque le taux de cisaillement augmente. En effet, à un taux de cisaillement de 0,0175 s^{-1}, la viscosité des larmes est de 2,33 mPa.s, alors que pour un taux de cisaillement de 128,5 s^{-1}, la viscosité chute à 0,97 mPa.s, soit l'équivalent de la viscosité de l'eau. Cependant, lorsque les lipides sont retirés des larmes, le fluide devient newtonien avec une viscosité d'environ 1 mPa.s, ce qui démontre l'implication des lipides du film lacrymal dans son comportement rhéologique (78).

Le taux de cisaillement lors des mouvements de l'œil ouvert est d'environ 10 s^{-1} et le taux de cisaillement lors du clignement des paupières, variant entre chaque individu, est d'environ 1 000 à 10 000 s^{-1} (79), (80).

Les collyres administrés se doivent d'avoir un comportement rhéologique adapté. Une viscosité comprise entre 10 et 30 mPa.s permet une augmentation du temps de résidence à la cornée sans entrainer de flou visuel, une viscosité allant jusqu'à 60 mPa.s restant toutefois acceptable. Idéalement, la viscosité du fluide doit être comprise entre 5 et 15 mPa.s lors du clignement des paupières. Une viscosité plus faible (< 5 mPa.s) conduit à une évacuation rapide de la surface oculaire, une viscosité plus forte (> 60 mPa.s) entraine un flou visuel, un mauvais étalement à la surface de l'œil, un dépôt sur les bords palpébraux ainsi qu'une augmentation du renouvellement du liquide lacrymal responsable d'une élimination rapide, le tout entrainant une mauvaise tolérance (66), (81).

Ainsi, le choix de la viscosité du collyre repose sur un compromis entre tolérance et temps de résidence à la cornée, les deux devant être optimisés. De façon logique, la quantité de matière première dans la formulation du collyre conditionne la viscosité et ainsi le flou visuel plus ou moins important.

Les collyres aqueux ayant une viscosité très basse, l'ajout de viscosifiants peut être une stratégie galénique adéquate pour atteindre la valeur cible de viscosité, et ainsi augmenter le temps de résidence à la cornée et diminuer la vitesse d'élimination, dans l'objectif d'améliorer l'absorption du principe actif. Toutefois, l'ajustement de la viscosité doit être très bien contrôlé pour ne pas flouter la vision et entrainer une gêne. Les principaux viscosifiants utilisés en ophtalmologie sont les polymères tels que les dérivés cellulosiques, l'alcool polyvinylique, les carbomères ou encore l'acide hyaluronique. Les collyres huileux contiennent très peu d'agents viscosifiants du fait de la viscosité propre des huiles (1).

En fonction des viscosifiants utilisés, on distingue 3 comportements rhéologiques : les fluides newtoniens, les fluides rhéofluidifiants et les fluides à seuil d'écoulement (40), (80).

Les fluides newtoniens sont caractérisés par une viscosité constante quel que soit le taux de cisaillement appliqué (figure 15). Ainsi, lors d'un clignement de paupières, la viscosité ne varie pas. Ces fluides sont principalement composés de chlorure de sodium (NaCl) ou de dérivés vinyliques, avec des valeurs de viscosité ne dépassant généralement pas 5 mPa.s.

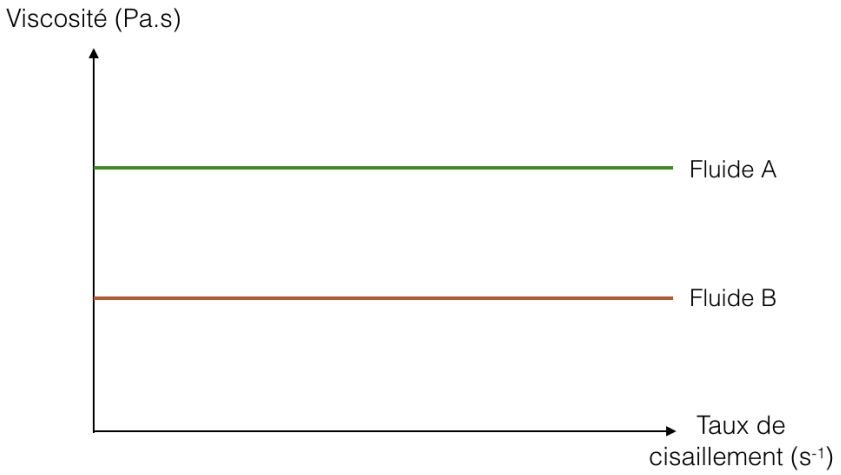


Figure 15 : Comportement d'un fluide newtonien.

Les fluides rhéofluidifiants ont une valeur de viscosité qui diminue lorsque le taux de cisaillement augmente (figure 16). Ainsi, la viscosité lors d'un clignement de paupières sera plus faible que la viscosité entre deux clignements. Les valeurs de viscosité restent 10 à 100 fois supérieures à celles des fluides newtoniens utilisés pour voie ophtalmique. Ces

formulations sont à base de dérivés cellulosiques tels que l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), la carboxyméthylcellulose (CMC), la méthylcellulose (MC) mais aussi à base de hyaluronate de sodium.

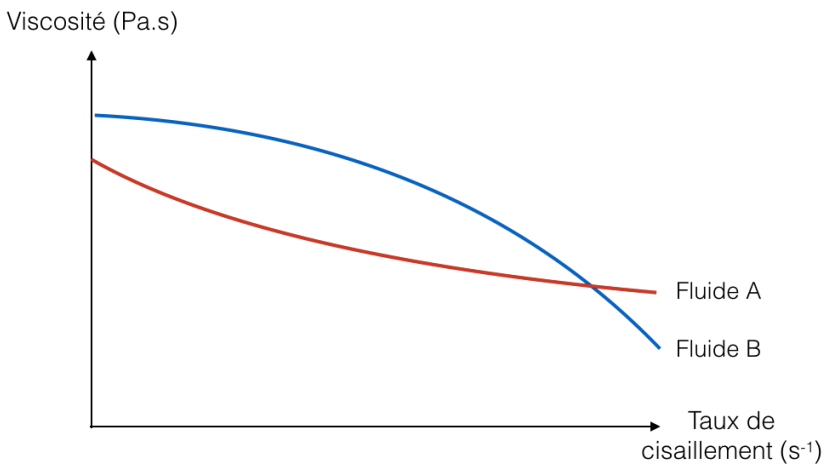


Figure 16 : Comportement d'un fluide rhéofluidifiant.

Enfin, les fluides à seuil d'écoulement sont caractérisés par une viscosité au repos très élevée (10^5 à 10^6 mPa.s) qui diminue avec un taux de cisaillement supérieur à un certain seuil, sans descendre en dessous d'une certaine valeur de viscosité (figure 17). Autrement dit, lorsque le fluide est soumis à une faible contrainte, la viscosité n'est pas modifiée, au contraire d'une forte contrainte. Toutefois, même sous forte contrainte, la valeur de viscosité ne descend pas un dessous d'un certain seuil, généralement 100 voire 1 000 mPa.s. Les polymères utilisés sont principalement les carbomères.

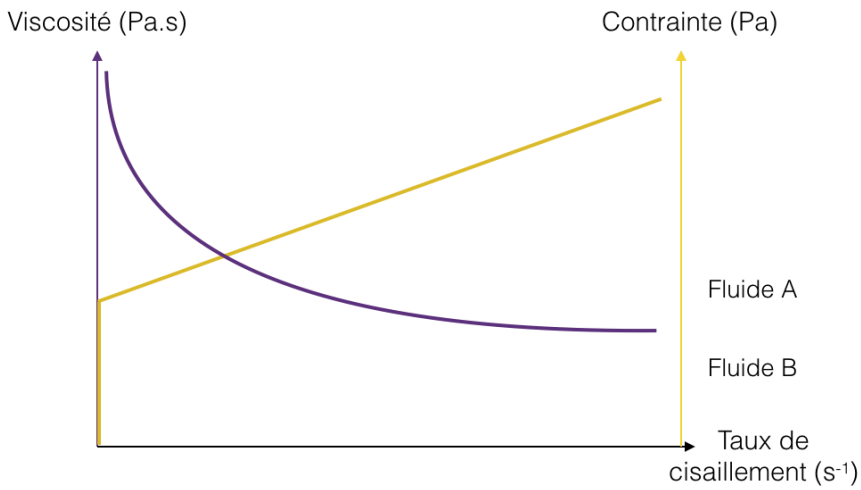


Figure 17 : Comportement d'un fluide à seuil d'écoulement.

En plus de ces comportements rhéologiques propres à chaque viscosifiant, certains peuvent voir leur viscosité modifiée en fonction des paramètres environnementaux. En effet, les carbomères ont une viscosité maximale à un pH neutre, les poloxamers et certaines

celluloses se gélifient à une température donnée, et les gommes Xanthane et Gellane voient leur viscosité influencée par la présence d'ions.

Différents équipements permettent de mesurer la viscosité et le comportement rhéologique d'un fluide. Les viscosimètres se déclinent, entre autres, en (i) viscosimètres rotatifs, les plus connus étant de type Brookfield, permettant de mesurer une viscosité relative, en (ii) viscosimètres capillaires, permettant une mesure précise mais étant applicables seulement aux fluides newtoniens, en (iii) viscosimètres à chute de billes, etc. Il existe des mobiles plus ou moins adaptés en fonction de la viscosité attendue. Par exemple, il existe des mobiles dits plongeants, dont la largeur du mobile dépend de la viscosité à analyser : plus le mobile est large, plus la viscosité à mesurer est faible. Les rhéomètres permettent quant à eux d'obtenir des valeurs de viscosités absolues. Il existe là aussi différentes géométries de mobiles, comme les géométries cône-plan, qui permettent une utilisation dans un volume réduit, plan-plan, ou encore les géométries à cylindre coaxial qui permettent une plus grande sensibilité de mesure (82), (83).

Chaque type de viscosimètres ou rhéomètres, ainsi que chaque type de géométries de mobiles présentent leurs avantages et inconvénients, que ce soit en fonction de l'application souhaitée, de la plage de viscosité, du volume à analyser, etc. Il convient alors de bien étudier l'application voulue pour pouvoir adapter l'équipement et avoir une mesure fiable et reproductible.

3.1.8. Bioadhésion et rémanence

La bioadhésion est un phénomène correspondant à la capacité d'un matériau, biologique ou synthétique, à adhérer à un substrat biologique pendant un certain temps. Lorsque le substrat est une muqueuse ou un mucus, le phénomène est appelé mucoadhésion (84).

Divers mécanismes permettent la mucoadhésion d'un polymère à la cornée : des interactions physico-chimiques comme des liaisons de type Van der Waals et liaisons hydrogènes, des interactions électrostatiques et ioniques, un contact étroit entre le polymère et la cornée ou encore une diffusion et interpénétration du polymère bioadhésif dans les espaces libres du mucus, jusqu'à la formation de liaisons adhésives. D'autres paramètres interviennent comme la température, le pH, la présence d'ions, les charges ou encore les excipients présents dans la formulation. Les polymères anioniques ont une meilleure adhésion que les cationiques (15), (85).

Les carbomères, par exemple, ont des propriétés mucomimétiques. Le polymère interagit avec le réseau de mucines en créant des interactions électrostatiques entre les

groupes chargés, des ponts hydrogènes, des inter-diffusions et interpénétrations des deux types de macromolécules (45). Le hyaluronate de sodium (sel de l'acide hyaluronique), chargé négativement, a des propriétés bioadhésives en interagissant avec les charges positives présentes dans le film lacrymal. Les dérivés cellulosiques présentent également des propriétés bio-adhésives, cependant moins importantes que les carbomères ou le hyaluronate de sodium.

Concernant la rémanence des collyres au niveau de la cornée, celle-ci dépend de la viscosité et de l'effet mucomimétique intervenant dans la bioadhésion. La rémanence peut se définir comme un phénomène qui perdure dans le temps, même après disparition de la cause. Autrement dit, après instillation d'un collyre, les matières premières à la surface oculaire exercent leur action sur un temps relativement long. Ainsi, plus la viscosité est élevée et plus la rémanence sera importante, de même pour la bioadhésion (39).

Le tableau 2 récapitule les caractéristiques de différentes matières premières ayant un rôle dans la viscosité et la bioadhésion des collyres (liste non exhaustive).

Tableau 2 : Caractéristiques de différentes matières premières concernant leur rémanence, bioadhésion et rétention d'eau (extrait de) (37).

Matière première	Comportement rhéologique	Rémanence	Bioadhésion	Rétention d'eau
NaCl (sérum physiologique)	Fluide newtonien	+	-	-
Polymères de vinyl (povidone, alcool polyvinylique)	Fluide newtonien	++	+	+
Dérivés cellulosiques (HPMC, CMC)	Fluide rhéofluidifiant	+++	+ à +++	+++
Carbomères (Carbopol®)	Fluide à seuil d'écoulement	+++	+++	++++
Acide hyaluronique	Fluide rhéofluidifiant	++++	++++	++++

- : nul + : faible ++ : moyen +++ : élevé ++++ : très élevé

Plusieurs méthodes permettent d'évaluer la bioadhésion, dont la mesure de la force d'arrachement ou encore le test de résistance au peeling. La première méthode permet, grâce à un texturomètre, d'évaluer l'adhésion des collyres à la surface cornéenne. Pour cela, la solution est appliquée sur un mobile spécifique, puis une force est exercée contre un matériau, idéalement un matériau mimant la cornée. Au retrait de ce mobile, il est possible d'évaluer la force d'adhésion. Toutefois, il est possible d'utiliser un matériau ne mimant pas exactement la cornée mais rassemblant ses caractéristiques majeures, par exemple en

utilisant un filtre imbibé de mucines. Des analyses comparatives entre plusieurs formulations permettent d'évaluer les différences d'adhésion (86).

3.1.9. Autres propriétés et excipients

En plus des excipients présentés précédemment, d'autres matières premières peuvent faire partie de la formulation pour leurs propriétés recherchées.

C'est le cas des agents chélatants, qui sont nécessaires lorsque les principes actifs sont sensibles et peuvent être altérés par certains métaux et/ou ions. L'utilisation d'un agent chélatant permet de capter ce métal et d'empêcher son interaction avec le principe actif, empêchant ainsi divers phénomènes indésirables, comme une oxydation. L'agent chélatant le plus utilisé est l'éthylènediaminetétraacétique, plus connu sous le nom d'EDTA. L'EDTA disodique est privilégié à l'EDTA, car ce dernier possède une solubilité dépendante au pH, aux alentours de 8.

Si le principe actif est sensible à l'oxydation et que celle-ci n'est pas causée par un métal, un agent antioxydant autre que l'EDTA devra être utilisé. Les sulfites comme le métabisulfite de potassium ou le sulfite de sodium peuvent être utilisés, au même titre que l'acide ascorbique ou encore l'alpha-tocophérol, ce dernier étant lipophile et utilisé dans les préparations huileuses (1).

3.1.10. Stérilité

La stérilité est définie dans la Pharmacopée Européenne 10ème édition comme « l'absence de micro-organismes viables, définie par un niveau d'assurance qualité de valeur inférieure ou égale à 10^{-6} ». Les préparations pharmaceutiques stériles les plus connues sont les préparations destinées à une voie injectable et ophtalmique. D'autres formes galéniques pour diverses voies d'administration (intra-mammaires, intra-utérines) peuvent également nécessiter une stérilisation.

La Pharmacopée Européenne précise que les préparations ophtalmiques doivent être stériles pour éviter la présence de micro-organismes non désirés et d'agents pyrogènes, et ainsi conserver la stabilité de la formulation. Pour les conditionnements multidoses, les collyres doivent obligatoirement contenir des conservateurs ou avoir des conditionnements permettant de bloquer une potentielle contamination microbiologique, sauf si les excipients présents dans la formulation possèdent déjà les effets recherchés (58).

Un contrôle de la stérilité doit être réalisé (chapitre 2.6.1 de la Pharmacopée Européenne 10ème édition). La nécessité et l'efficacité du conservateur antimicrobien

(chapitre 5.1.3 de la Pharmacopée Européenne 10ème édition) doivent également être démontrées.

Les conservateurs sont obligatoires uniquement pour les collyres conditionnés en multidoses. En effet, la conservation d'un collyre multidoses après ouverture étant en moyenne de 3 à 4 semaines, il est primordial de protéger la préparation de toute contamination microbienne extérieure. Le tableau 3 recense de façon non exhaustive les conservateurs utilisés dans les formes ophtalmiques.

Tableau 3 : Différents conservateurs utilisés dans les formes ophtalmiques (liste non exhaustive) (87).

Famille	Noms des conservateurs
Ammoniums quaternaires	Chlorure de benzalkonium, bromure de cétrimonium, bromure de benzododécinium, chlorure de cétylpyridinium
Dérivés mercuriels	Sels de phénylmercure, thiomersal
Alcools	Chlorobutanol, phényléthanol
Parabens	Méthylparaben, propylparaben
Autres	Acide borique, acide sorbique, acide édétique, sulfate d'argent

Le conservateur doit être choisi selon différents critères dont son spectre d'activité, son efficacité à faible dose, sa compatibilité avec les autres matières premières et sa tolérance vis-à-vis de l'œil. En raison de la toxicité des conservateurs, ceux-ci doivent être introduits dans la formulation en très faible quantité. Le chlorure de benzalkonium est le conservateur le plus utilisé de nos jours en ophtalmologie, car actif à très faible dose (pour des concentrations entre 0,004 % à 0,02 %) et sur une large plage de pH. Toutefois, son utilisation, au même titre que les autres conservateurs, tend à diminuer (1).

Pour limiter l'utilisation de conservateurs chimiques pouvant altérer la cornée, de nouveaux conditionnements sont développés pour les formes multidoses. C'est le cas par exemple du conditionnement ABAK®, développé par les laboratoires Théa, qui, grâce à une membrane de 0,2 µm présente dans le conditionnement, évite toute contamination extérieure (88). D'autres technologies comme Aptar® et fonctionnant sur le même principe de filtration sont également disponibles sur le marché.

Dans tous les cas, que le collyre soit unidose ou multi-doses, avec ou sans conservateur, la solution doit être stérile lorsqu'elle est disponible sur le marché. Plusieurs procédés de stérilisation existent, comme la stérilisation par chaleur humide, par chaleur sèche, la filtration stérilisante, la stérilisation par irradiation, par des gaz, etc. La préparation en milieu aseptique est également une pratique courante. L'efficacité d'un procédé de stérilisation est fonction de sa nature, des conditions opératoires (temps, température,

humidité, etc), du degré de contamination microbienne avant stérilisation et de la formulation du produit (Pharmacopée Européenne 10ème édition).

Un arbre décisionnel permettant d'évaluer la méthode de stérilisation la plus adaptée en fonction du produit et de ses caractéristiques est présenté en annexe 2 (89).

Les trois procédés les plus utilisés pour des préparations ophtalmiques (chaleur humide, filtration stérilisante et préparation aseptique) sont détaillés ci-dessous.

3.1.10.1. Stérilisation par chaleur humide

La stérilisation par chaleur humide est le procédé de stérilisation du produit fini le plus répandu et préconisé en première instance. Il résulte d'un transfert de chaleur intervenant lors de la condensation de l'eau contenue dans une phase de vapeur saturée. Le cycle de référence est une exposition de 15 minutes à 121°C (Pharmacopée Européenne). Toutefois, le temps de stérilisation peut être allongé. Le temps et la température nécessaires sont moins élevés en comparaison à la stérilisation par chaleur sèche qui nécessite au moins 2 heures de stérilisation à 160°C.

L'efficacité de ce procédé dépend de plusieurs paramètres, dont le premier est le nombre de germes initialement présent, appelé N_0. Plus il y a de micro-organismes au départ, plus le procédé de stérilisation sera long pour arriver à niveau d'assurance qualité de 10^{-6}. Ensuite, la sensibilité de l'espèce microbienne à la chaleur et leur forme. Chaque micro-organisme possède une sensibilité propre à la chaleur, la forme sporulée étant plus résistante que la forme végétative. De plus, la durée du traitement est un point déterminant, introduisant la notion de temps de réduction décimale D_T. En effet, le nombre de germes varie de façon logarithmique, et, à une température donnée, D_T représente le temps nécessaire pour réduire la population d'un facteur 10 (figure 18). Enfin, le choix de la température est important et introduit la notion de valeur d'inactivation thermique Z. Elle correspond à l'augmentation de température nécessaire pour réduire le temps de réduction décimale D_T d'un facteur 10 (figure 18) (90). Il ressort de ces graphiques la règle des trois « 10 » : tous les 10°C ou toutes les 10 minutes, la population microbienne est réduite de 10 % de sa valeur initiale.

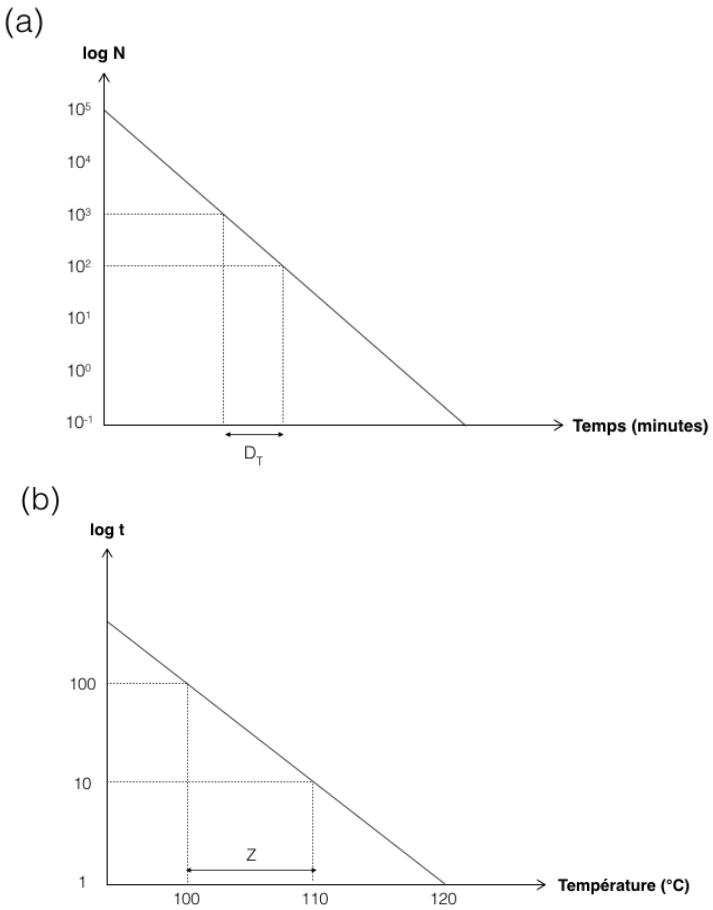


Figure 18 : Graphiques représentant les paramètres de temps de réduction décimale (a) et de valeur d'inactivation thermique (b) lors de la stérilisation par la chaleur.
N = nombre de micro-organismes, t = temps

L'équipement utilisé pour la stérilisation par chaleur humide est l'autoclave. Composé d'une enceinte en acier inoxydable hermétiquement fermée, il permet l'augmentation de la pression et l'obtention de vapeur d'eau par ébullition.

Le procédé présente de nombreux avantages : il est efficace, rapide, peu coûteux, les trois paramètres (température, pression et temps) sont facilement maitrisables. Le principal inconvénient de cette méthode est l'application seulement aux produits thermo et hydrorésistants. De plus, l'autoclave peut diminuer la viscosité des solutions ophtalmiques. Si tel est le cas, la concentration de viscosifiant devra être augmentée initialement, ou une autre méthode de stérilisation devra être privilégiée.

3.1.10.2. Filtration sur membrane

La filtration sur membrane pour les préparations liquides est utilisée lorsque la stérilisation par la chaleur est impossible. Contrairement à cette dernière, la filtration repose sur l'élimination du micro-organisme et non pas sur son inactivation (Pharmacopée Européenne 10ème édition). La filtration n'est pas considérée comme une stérilisation terminale car elle ne s'effectue pas dans le conditionnement final. De plus, seules les solutions fluides peuvent être filtrées, et non pas les solutions trop visqueuses, suspensions ou émulsions.

La filtration s'effectue sous pression d'un gaz inerte avec un filtre lui-même stérile. Le filtre est composé d'une membrane de porosité absolue égale à 0,22 µm, permettant ainsi d'éliminer tous types de micro-organismes connus à ce jour (Pharmacopée Européenne). Il existe différents types de filtres, et le choix se fait en fonction de la composition de la solution (hydrophile, hydrophobe), de la viscosité, de la filtrabilité, des interactions possibles entre le filtre et la solution.

Deux mécanismes de rétention des micro-organismes peuvent intervenir : le criblage et l'adsorption. Le criblage permet de retenir les microorganismes dont le diamètre est supérieur au diamètre des pores, les filtres seront appelés filtres écrans. L'adsorption permet de retenir par un phénomène physique les micro-organismes, les filtres seront caractérisés de « filtres en profondeur ». À noter que les filtres de 0,45 µm permettent une filtration clarifiante et non pas stérilisante.

Le tableau 4 présente les filtres stérilisants (0,22 µm) les plus utilisés lors de la production industrielle de formes ophtalmiques. En R&D, la filtrabilité peut être évaluée sur d'autres membranes en complément, comme des filtres à base de cellulose régénérée, d'acétate de cellulose, de polyester, etc (90).

Tableau 4 : Différents types de filtres stérilisants couramment utilisés pour l'industrialisation de formes ophtalmiques (liste non exhaustive) (91).

Type de membrane	Caractéristiques
PES	Composés de polyéther sulfone, les filtres PES sont hydrophiles et conviennent aux liquides aqueux et légèrement organiques. La capacité de rétention des protéines est très faible.
PVDF	Composés de difluorure de polyvinylidène, les filtres PVDF sont hydrophiles et conviennent pour des liquides aqueux, composés d'oligomères solubles dans l'eau et de polymères. La capacité de rétention des protéines est très faible.
Nylon	Les filtres en nylon, ou polyamide, sont utilisés pour la filtration de liquides organiques aqueux polaires. La capacité de rétention des protéines est moyennement haute.

La filtration stérilisante présente ainsi comme avantage principal de pouvoir stériliser les fluides thermosensibles. Ses inconvénients sont principalement la non-application de cette méthode pour des solutions de viscosité élevée.

3.1.10.3. Préparation en milieu aseptique

La préparation aseptique est utilisée lorsque les contenants, excipients, principes actifs ou tout autre matière première intervenant dans la formulation sont incompatibles entre eux en termes de méthodes de stérilisation. Chaque composant est stérilisé selon une méthode adaptée, et la réconciliation s'effectue au sein d'installations conçues pour empêcher la contamination microbienne, comme une Zone à Atmosphère Contrôlée (ZAC classe A) (Pharmacopée Européenne 10ème édition). Ici, la stérilisation n'est pas non plus terminale.

En résumé, la formulation d'une forme ophtalmique dépend de nombreux critères. En premier lieu, le choix de la quantité de principe actif s'effectue en fonction de l'objectif thérapeutique. Ensuite, les excipients sont sélectionnés pour permettre de répondre aux critères de qualité tout en assurant une stabilité et innocuité de la formulation. Pour ces dernières, cela implique que les matières premières doivent être compatibles entre elles, en plus d'être non toxiques. Pour respecter la qualité et la sécurité, quelques ajustements peuvent s'effectuer sur le pH et l'osmolalité. La présence d'autres excipients comme les viscosifiants, les conservateurs antimicrobiens, les agents chélatants, etc., devra être étudiée au cas par cas. Toutefois, la stérilité, limpidité et taille des particules dans le cas de suspensions sont des critères de formulation qui doivent être strictement respectés.

3.3. Problématiques de formulation des collyres et stratégies galéniques associées

De nos jours, de nombreux principes actifs produits par l'industrie pharmaceutique sont peu hydrosolubles et compliquent la formulation du médicament. Pourtant, aujourd'hui encore, la grande majorité des préparations ophtalmiques utilisées en pratique sont sous forme de solutions aqueuses. Il apparait donc une contradiction vis-à-vis de la composition des barrières anatomiques de l'œil mais aussi vis-à-vis de la formulation en général entre une solution aqueuse et une substance peu hydrosoluble. L'amélioration de la solubilité des principes actifs lors de la formulation est alors une problématique majeure à prendre en compte.

De plus, la faible biodisponibilité des collyres est influencée par la faible rémanence de ces formes et par la faible perméabilité de la cornée. L'utilisation de molécules viscosifiantes et de molécules bioadhésives permet d'augmenter la rémanence de façon plus ou moins importante. L'augmentation de la perméabilité de la cornée peut être optimisée, en utilisant par exemple des systèmes colloïdaux.

Diverses formes galéniques permettent d'augmenter la solubilité des principes actifs, tout en augmentant le temps de résidence des collyres à la surface de l'œil, dans l'objectif commun d'accroitre l'absorption et la biodisponibilité. Il est alors important de s'intéresser aux formulations qui peuvent améliorer simultanément plusieurs problématiques de formulation.

3.3.1. Amélioration de la solubilité des principes actifs

3.3.1.1. Salification du principe actif et pro-drogues

La salification du principe actif est une méthode largement répandue et répond plus à une amélioration physico-chimique de la molécule qu'à une amélioration purement galénique.

Les sels de PA sont utilisés le plus souvent dans l'objectif d'augmenter la vitesse de dissolution. Toutefois, une attention particulière doit être portée lorsque des sels sont en contact avec des polymères. La viscosité de ces derniers peut être modifiée, et des incompatibilités peuvent apparaître, ayant par exemple comme conséquence une précipitation du polymère (92), (93).

Les sels de PA rendent la molécule ionisée. Au niveau de la cornée, pour rappel, la première couche à traverser est une couche lipophile, laissant passer les molécules non ionisées et apolaires. Cette modification physico-chimique est donc adaptée lorsque le

médicament est à visée superficielle, mais l'est beaucoup moins lorsque l'action thérapeutique doit se faire en profondeur. Ce sont pour ces raisons que d'autres améliorations galéniques doivent être privilégiées.

La réalisation de pro-drogues, au même titre que la salification de principes actifs, est une amélioration physico-chimique de la substance active. Elle permet de rendre la molécule plus lipophile par ajout d'un groupement chimique spécifique, améliorant ainsi le passage à travers l'épithélium cornéen. Une fois la barrière lipophile traversée, le groupement sera hydrolysé par des enzymes présentes de façon physiologique au niveau de la cornée, redonnant à la molécule sa nature hydrophile (92).

Si l'augmentation de la lipophilie ne permet plus une solubilité aqueuse suffisante, les techniques permettant d'améliorer la solubilité de molécules peu hydrosolubles présentées dans la suite de cette thèse permettront d'optimiser la formulation.

3.3.1.2. Utilisation d'un co-solvant

Les co-solvants permettent de solubiliser des principes actifs peu hydrosolubles dans l'eau. En effet, le principe actif sera solubilisé dans le liquide organique, lui-même miscible avec l'eau. Au niveau ophtalmique, le polyéthylène glycol (PEG), le PEG 400 devant être privilégié, le glycérol ou encore le propylène glycol peuvent être utilisés. Toutefois, les co-solvants peuvent entraîner une toxicité oculaire après administration, la concentration dans la formulation doit donc être la plus basse possible (94).

3.3.1.3. Utilisation de cyclodextrines

Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides naturels cycliques pouvant contenir 6, 7 ou 8 résidus glucopyranose (correspondant respectivement à l'α-cyclodextrine, β-cyclodextrine et γ-cyclodextrine) (figure 19) (92).

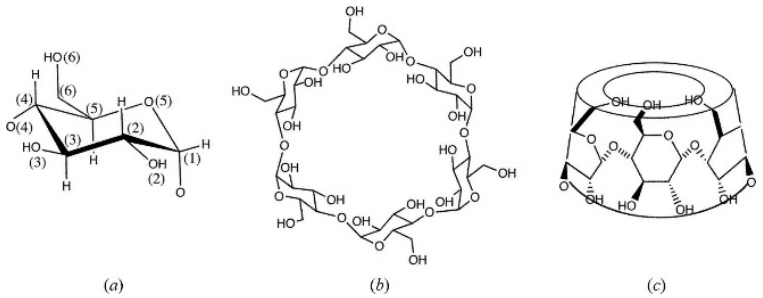


Figure 19 : Schéma d'une α-cyclodextrine. (a) : unité glucopyranose, (b) : α-CD en 2D, (c) : α-CD en 3D (image originale) (95).

L'agencement de ces résidus permet d'avoir une surface externe hydrophile, permettant à la CD d'être soluble dans l'eau, et une cage interne hydrophobe, permettant de former un complexe d'inclusion avec des principes actifs hydrophobes ou peu hydrosolubles, facilitant leur formulation et solubilisation en solution aqueuse. Cette complexation se fait *via* des interactions faibles non covalentes, permettant un relargage de la molécule facilité.

Le diamètre de la cavité varie entre chaque type de cyclodextrine, alors que la hauteur reste identique. En plus des cyclodextrines natives, des dérivés de cyclodextrines ont été développés ces dernières années. Les CD possèdent trois fonctions hydroxyles situées sur les positions 2, 3 et 6 des unités glucose, ce qui permet de substituer un ou plusieurs de ces groupements, modifiant ainsi les propriétés physico-chimiques de la cyclodextrine (figure 20) (96).

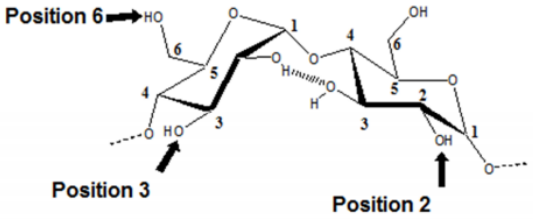


Figure 20 : Positions des fonctions hydroxyles sur les unités glucose (image originale) (96).

En fonction du type de substitution, il est ainsi possible de regrouper les dérivés de cyclodextrines en dérivés méthylés (exemple : β-CD diméthylée) en dérivés sulfatés (exemple : sulfobutyléther-β-CD) et en dérivés hydroxypropylés (HP-β-CD). L'impact de ces substitutions est considérable sur l'augmentation de la solubilité (tableau 6) (96).

Tableau 5 : Solubilité des différentes cyclodextrines (liste non exhaustive) (96), (97), (98).

Cyclodextrines	Solubilité aqueuse à 25°C
α-CD	145 g/L
β-CD	18,5 g/L
γ-CD	232 g/L
β-CD diméthylée	570 g/L
HP-β-CD	> 600 g/L
Sulfobutyléther-β-CD	> 500 g/L
2-HP-γ-CD	450 g/L

Ainsi, les cyclodextrines sont sélectionnées par rapport à la taille de la molécule à complexer, mais aussi par rapport à la solubilité propre de la cyclodextrine dans l'eau, la β-CD native étant la moins soluble.

En plus d'améliorer la solubilité en solution, elles permettent d'augmenter la perméabilité de la cornée, d'améliorer la stabilité de la molécule, de protéger le PA de potentielles hydrolyses et oxydations et de diminuer l'irritation oculaire du principe actif.

Les cyclodextrines sont non embryotoxiques, non tératogènes, non mutagènes ou cancérigènes. Les cyclodextrines natives sont biodégradables, au contraire des dérivés. Cependant, il a été démontré pour certaines cyclodextrines une toxicité au niveau de la cornée : une étude évaluant l'effet d'une ou plusieurs instillations chez le lapin d'hydroxypropyl-β-CD (HP-β-CD) à 12,5 %, de diméthyl-β-CD (DM-β-CD) à 5 % et 12,5 % a démontré une toxicité oculaire pour les deux concentrations de DM-β-CD, alors que l'HP-β-CD ne provoquait aucune intolérance. Une autre cyclodextrine, la sulfométhyléther-β-cyclodextrine, ne semble pas avoir d'effets négatifs sur la cornée (99), (100).

La quantité de CD à introduire dans les formes ophtalmiques est idéalement inférieure à 15 % (74). De plus, une étude a montré que la biodisponibilité des médicaments à partir de formulations contenant un complexe ternaire de PA/CD/polymère est supérieure à celle d'un complexe binaire de PA/CD comparable (101). Toutefois, les cyclodextrines n'ont pas de propriétés bioadhésives, il est alors indispensable d'ajouter un agent viscosifiant et/ou bioadhésif pour améliorer le temps de rétention à la surface oculaire (92).

3.3.1.4. Formulation de liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches de molécules lipidiques amphiphiles, comme les phospholipides (principalement phosphatidylcholine) ou les sphingolipides, entourant une cavité aqueuse. Le cœur du liposome est hydrophile, tandis que l'intérieur de la bicouche est lipophile (figure 21). Cette configuration permet d'encapsuler des molécules apolaires ou polaires dans chacun des compartiments, ou bien des molécules amphiphiles à l'interface entre la bicouche lipidique et le milieu aqueux (43), (102).

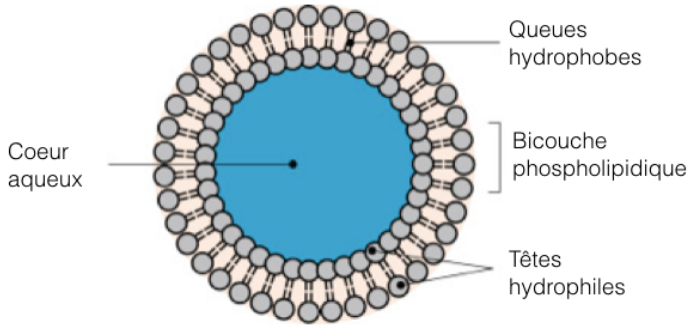


Figure 21 : Schéma représentant un liposome (extrait de) (103).

Leur taille peut varier entre 10 et 300 nm pour des liposomes unilamellaires, c'est-à-dire contenant une seule bicouche lipidique, ou être supérieures à 300 nm pour les liposomes multilamellaires. Les liposomes sont biocompatibles, biodégradables et peuvent réduire la toxicité de certains principes actifs, comme l'amphotéricine B. De plus, les liposomes peuvent se dégrader à une température ou un pH donné, permettant de cibler la zone d'action thérapeutique. Pour augmenter le temps de résidence des liposomes à la cornée, des charges peuvent être ajoutées, par exemple par utilisation de lipides positivement chargés permettant d'interagir avec les charges négatives des mucines. L'incorporation des liposomes au sein d'hydrogels permet également d'augmenter la viscosité pour un temps de rémanence augmenté, comme c'est le cas pour un collyre à base de timolol (104), (105), (106).

Différentes méthodes de fabrication de liposomes existent, mais trois étapes sont communes à tous les procédés : l'évaporation du solvant de la phase lipidique, la dispersion des lipides en milieu aqueux et la purification des liposomes formés. La taille de ces derniers est contrôlable, par exemple par extrusion, par ultrasons, etc (107), (108).

Une méthode répandue est celle de la dispersion mécanique des phospholipides (figure 22). Elle consiste à dissoudre les lipides et autres excipients lipophiles dans un solvant organique ou un mélange de solvants organiques, comme un mélange chloroforme/ méthanol. Une fois la solubilisation effectuée, le solvant est éliminé par évaporation, laissant un film sec de phospholipides. L'ajout d'un milieu aqueux contenant les excipients et principes actifs hydrophiles nécessaires à la formulation vient ensuite hydrater le film de phospholipides. Ces derniers s'associent au contact de l'eau en bicouche, laissant s'exposer uniquement leur tête hydrophile. (105), (109).

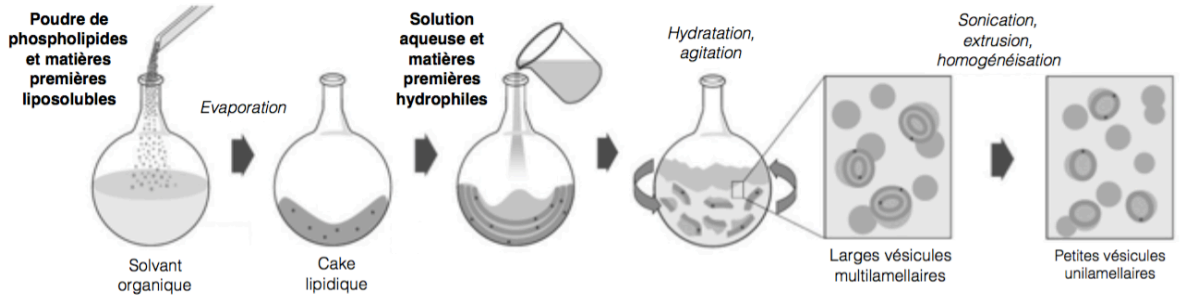


Figure 22 : Représentation schématique des étapes intervenant dans le procédé de réalisation des liposomes par la méthode de dispersion mécanique des phospholipides (extrait de) (109).

Quelle que soit la méthode de fabrication des liposomes, des paramètres critiques comme la température doivent être contrôlés. En effet, les phospholipides ont des températures de transition de phase T_c, qui correspond à la température à laquelle le phospholipide passera d'une forme gel, avec une faible fluidité, à une forme liquide, présentant une meilleure fluidité (102).

Cependant, les liposomes sont encore peu utilisés à ce jour, d'autant plus dans les formes ophtalmiques, dus à des problèmes de stabilité car sensibles à l'oxydation et à l'hydrolyse, et à des problèmes de stérilisation (43).

3.3.1.5. Formulation de nanoparticules

Les nanoparticules sont des systèmes colloïdaux de diamètre entre 10 et 1 000 nm (104). Deux types de nanoparticules sont à distinguer (figure 23) : les nanocapsules, qui ont une structure vésiculaire et dont la cavité centrale et entourée d'une capsule polymérique, et les nanosphères, qui ont une structure matricielle et dont le principe actif est soit incorporé à l'intérieur de la matrice, soit adsorbé à la surface (43). Ces deux types permettent d'encapsuler des molécules lipophiles, non ionisées, qui sont plus enclin à traverser la barrière cornéenne.

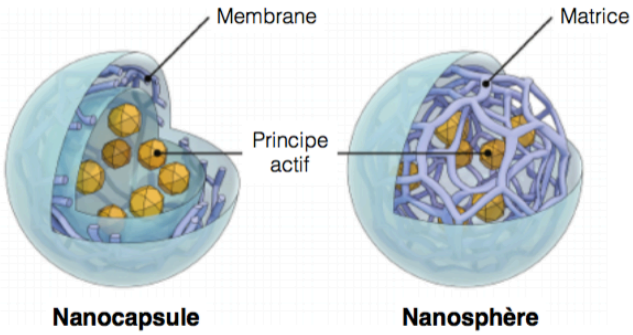


Figure 23 : Structure d'une nanocapsule et d'une nanosphère (extrait de) (110).

Les nanoparticules peuvent être formées de polymères biodégradables comme les polylactides, le poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), la poly ε-caprolactone, etc. Le PLGA a été étudié dans la littérature et sa sécurité a été démontrée : après administration, le PLGA se transforme en acide glycolique et acide lactique, ce dernier étant lui-même transformé en eau et dioxyde de carbone pour être éliminé. La poly ε-caprolactone présente l'avantage de pouvoir former un gel bioadhésif au contact de la cornée (92), (111), (112). Des polymères naturels sont aussi des composants de choix, comme la gélatine ou le sodium alginate (43).

Au niveau de l'œil, les nanoparticules permettent de protéger le principe actif, de cibler certaines cellules et peuvent pénétrer la cornée et la conjonctive sans altérer leur intégrité (43).

La taille des nanoparticules est un critère essentiel à prendre en compte : elles sont très bien tolérées si elles sont de petites tailles, permettant de diminuer l'irritation cornéenne, mais si la taille est trop petite (< 20 nm) les molécules sont éliminées rapidement. Ainsi, une taille supérieure à 200 nm permet un temps de résidence plus long, une augmentation de l'absorption du PA et une diminution du nombre d'instillations (63),

(104). Différentes études ont évalué l'efficacité des nanoparticules. Une étude de Marchal-Heussler *et al*. comparant des nanoparticules de Betaxolol à 0,1 % au médicament de référence contenant du Betaxolol à 0,56 % a révélé une efficacité supérieure en temps, stabilité et intensité pour les nanoparticules (113). Dans une autre étude au stade de développement préclinique, les nanoparticules ont permis de diviser par deux la dose de Gentamicine dans la forme ophtalmique, pour un même effet thérapeutique (1).

Concernant la formulation des nanoparticules, diverses méthodes existent à ce jour comme la nanoprécipitation, la méthode d'émulsion/évaporation ou encore la méthode d'émulsion/diffusion.

Par exemple, la méthode d'émulsion/évaporation permet de formuler des nanocapsules à cœur huileux (figure 24). L'objectif est de former une émulsion en dispersant deux phases non miscibles entre elles, appelées phase dispersée et phase continue. La phase dispersée est composée d'un polymère, du principe actif, d'un solvant volatil permettant de solubiliser correctement le polymère et le PA, et d'une huile non volatile, miscible au solvant volatil, bon solvant du PA et mauvais solvant du polymère. La phase continue contient généralement de l'eau et des stabilisants (tensioactifs). Après émulsification de ces deux phases, le solvant volatil est évaporé, entrainant la précipitation du polymère et la formation de la membrane polymérique, l'huile et le principe actif étant encapsulés à l'intérieur (114).

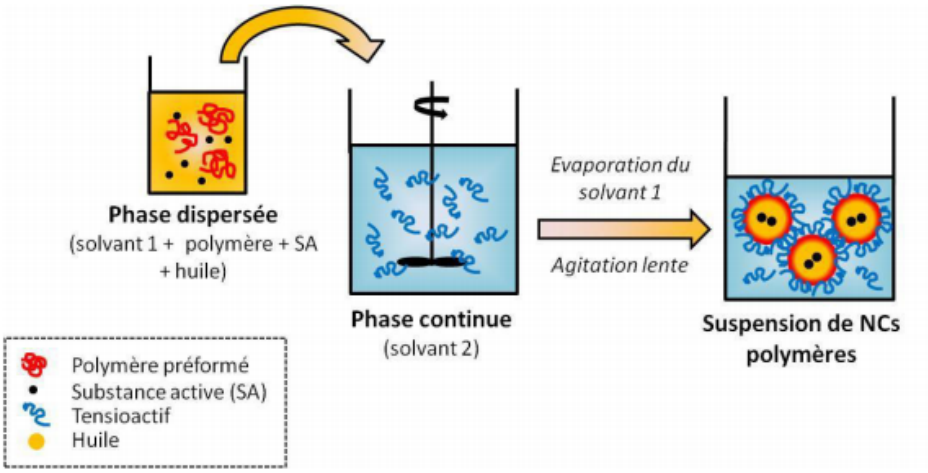


Figure 24 : Fabrication de nanocapsules à cœur huileux par la méthode d'émulsion/évaporation du solvant (image originale) (114).

Toutefois, l'utilisation de certains polymères dans les nanoparticules pour les formes ophtalmiques est compliquée, du fait de leur faible point de fusion (50°C pour la poly ε-caprolactone) qui rend la stérilisation par la chaleur impossible. Les collyres devant obligatoirement être stériles, les nanoparticules devront alors être stérilisées par filtration stérilisante si leur taille le permet, ou alors être fabriquées dans des conditions aseptiques (92).

3.3.1.6. Formulation de nanosuspensions

Les nanosuspensions correspondent à des particules pures de principe actif stabilisées par des tensioactifs ou polymères, dans un milieu aqueux ou non (huiles, etc…). La taille de ces particules est inférieure au micron ce qui permet d'augmenter, par accroissement de surface, la vitesse de dissolution et la solubilité à saturation en comparaison à une particule de taille supérieure. La solubilité à saturation, dépendante du composé, de la température, du pH, du milieu de dissolution, est impactée par la taille de la particule lorsque celle-ci est inférieure au micromètre. La formulation de nanosuspensions a donc un intérêt majeur pour les molécules peu hydrosolubles et peu liposolubles (115).

Ainsi, la quantité de PA introduite dans un collyre est supérieure lorsque celui-ci est sous forme de nanosuspensions, ce qui permet de limiter les instillations. Cela permet également de réduire la quantité de solvant organique ou co-solvant, diminuant l'irritation et la toxicité cornéenne (115).

Toutefois, les nanosuspensions sont instables et subissent de nombreux phénomènes tels que des agglomérations ou croissances de cristaux, des murissements d'Ostwald, le tout conduisant à un accroissement de la taille des particules, une diminution de leur solubilité et une recristallisation. Pour limiter ces phénomènes, l'utilisation de stabilisants est alors indispensable. Il existe des stabilisants ioniques, qui s'adsorbent à la surface des particules et provoquent des interactions électrostatiques répulsives entre le milieu de dissolution et la particule, ou des stabilisants stériques, qui, de part leur grand poids moléculaire (par exemple les polymères), provoquent une répulsion stérique (115).

Pour formuler des nanosuspensions, deux méthodes existent : la méthode « bottom up » et la méthode « top down ».

La technologie « bottom up » permet de reconstituer des cristaux présents initialement en solution. La première étape consiste à dissoudre le principe actif dans un solvant organique puis à le mélanger dans un non-solvant aqueux miscible. La solubilité dans ce milieu étant faible, il se forme des précipités composés de fines particules cristallines et amorphes. Un cisaillement de haute intensité est ensuite appliqué pour réduire la taille des précipités à une taille submicronique (115).

La technologie « top down » réduit directement la taille des particules volumineuses. Une des méthodes les plus utilisées est la méthode de broyage. Dans une chambre à broyeur contenant le PA, le milieu de dispersion et les stabilisants, des boulets broyeurs entrainés par une agitation exercent des chocs qui permettent de réduire la taille des particules en les « cassant ». Cette méthode est facile à monter en échelle, cependant le procédé peut durer plusieurs jours. Une autre méthode, appelée méthode d'homogénéisation à haute pression

(HHP) permet également d'aboutir à des nanosuspensions. L'utilisation par exemple d'un homogénéisateur par microfluidisation permet de propulser le principe actif à très haute vitesse à travers une chambre possédant une géométrie particulière, ce qui provoque de nombreux cisaillements et collisions. D'autres homogénéisateurs peuvent être utilisés comme l'homogénéisateur par piston-gap qui fonctionne, en plus du principe de cisaillement et de collision, par principe de cavitation (115).

3.3.1.7. Microémulsions

Les émulsions sont des formulations non transparentes et représentent la dispersion thermodynamiquement instable d'un liquide sous forme de gouttelettes dans un autre liquide, les deux étant non miscibles. Une phase est hydrophobe (organique, huileuse), l'autre est hydrophile (aqueuse). La phase discontinue ou dispersée représente les gouttelettes, la phase continue ou dispersante étant la phase dans laquelle sont dispersées ces dernières. Ainsi, les émulsions peuvent être dites eau dans huile (E/H), la phase dispersée étant l'eau, huile dans eau (H/E) la phase dispersée étant l'huile ou multiples c'est-à-dire huile dans eau dans huile (H/E/H) ou eau dans huile dans eau (E/H/E) (figure 25). Elles sont stabilisées par un ou plusieurs tensioactifs qui permettent de diminuer la tension interfaciale de deux liquides non miscibles, favorisant l'émulsification.

Les microémulsions représentent quant à elles un système thermodynamiquement stable de deux liquides, toujours immiscibles. Contrairement aux émulsions classiques, les microémulsions sont caractérisées par un système monophasique composé de micro-domaines labiles de phases aqueuse et organique (figure 25). Elles ont la particularité d'être transparentes, grand avantage pour la formulation de formes ophtalmiques. Tout comme les émulsions elles sont stabilisées par des tensioactifs, avec en plus des co-tensioactifs (souvent des alcools ou des molécules amphiphiles à courte chaine) étant très bénéfiques pour la stabilisation et permettant d'éviter la formation de gels et cristaux liquides au sein de la microémulsion (116).

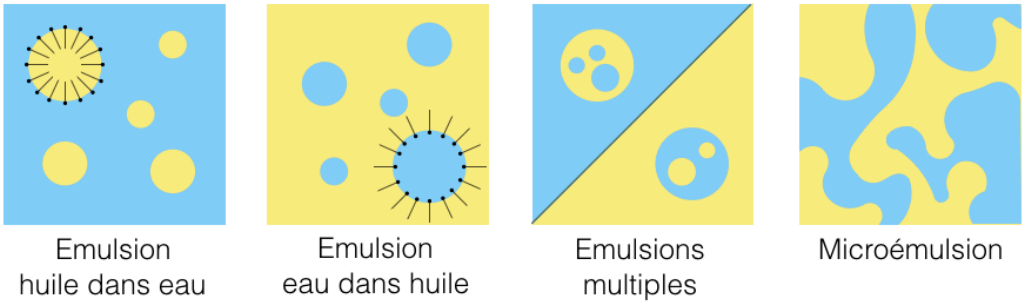


Figure 25 : Différents types d'émulsions et microémulsion.
Bleu : phase aqueuse ; jaune : phase huileuse ; noir : tensioactifs

L'avantage des émulsions et microémulsions est qu'elles permettent de solubiliser simultanément des principes actifs et matières premières ayant des affinités pour des solvants différents, représentées par leur logP. Une molécule avec un logP supérieur à 0 aura une tendance lipophile, alors qu'une molécule avec un logP inférieur à 0 aura une tendance hydrophile. Il est alors également possible d'insérer au sein d'une même formulation deux matières premières incompatibles entre elles. Toutefois, la grande quantité nécessaire de tensioactifs peut être responsable d'irritations oculaires.

La formulation de microémulsions stables est dépendante de différentes variables, dites de composition et de formulation physico-chimique. La première variable regroupe les proportions relatives des matières premières impliquées dans la formulation. Celles-ci peuvent être représentées dans un diagramme ternaire, chaque axe représentant, si les matières premières sont pures, les proportions d'eau, d'huile et de tensioactifs (seuls ou en mélange). En réalité, une microémulsion est composée d'autres matières premières (principes actifs, conservateurs, etc), ce qui oblige à regrouper les constituants en composés hydrophiles (phase aqueuse), lipophiles (phase huileuse) et tensioactifs. La deuxième variable regroupe les paramètres physiques et chimiques tels que la température, la pression, la nature des composants, etc (116).

Trois paramètres sont indispensables à prendre en compte pour choisir les bons composants à introduire dans la formulation et pour optimiser la stabilité de la microémulsion : le HLB, le HLD et le rapport de Winsor. L'ajustement de ces trois paramètres permet d'aboutir à un diagramme de phase spécifique à chaque formulation.

3.3.1.7.1. HLB : Hydrophilic-Lipophilic Balance

Le HLB, ou Hydrophilic-Lipophilic Balance, est un indicateur permettant d'évaluer l'affinité prédominante d'un tensioactif pour l'eau ou l'huile. En effet, les surfactants sont amphiphiles, c'est-à-dire ayant une tête polaire hydrophile et une queue apolaire hydrophobe. Ainsi, chaque tensioactif possède un ratio différent entre les pôles lipophiles et hydrophiles, donnant ainsi un HLB qui lui sera spécifique. Cette balance permet alors de caractériser une nature plutôt lipophile ou hydrophile d'un tensioactif. Plus la valeur du HLB est élevée (> 10), plus le tensioactif sera hydrophile et inversement, plus la valeur du HLB est faible (< 10) et plus le tensioactif sera lipophile. En fonction de ce HLB, les tensioactifs ont également des rôles différents et définis (figure 26).

La règle de Bancroft permet de prédire le sens d'une émulsion (eau dans huile ou huile dans eau) grâce aux propriétés du tensioactif et sa valeur de HLB. En règle générale, la phase dispersante (ou continue) de l'émulsion est la phase avec le plus d'affinité pour le tensioactif. Pour obtenir une émulsion huile dans eau, des tensioactifs de nature hydrophile

seront requis (en pratique, un HLB ≥ 8 est efficace), à l'inverse d'une émulsion eau dans huile où des tensioactifs de nature lipophile seront préférés (en pratique, un HLB ≤ 7) (117), (118).

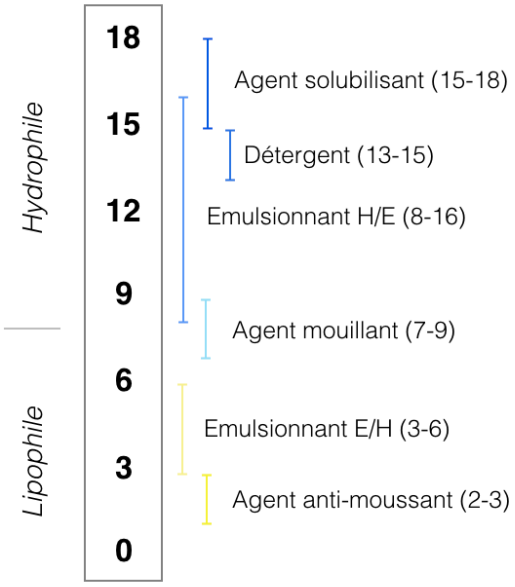


Figure 26 : Echelle de HLB des tensioactifs et rôles associés (extrait de) (119).

Ainsi, la valeur du HLB permet d'orienter le choix du tensioactif. De plus, il est admis que pour une phase lipophile donnée, celle-ci possède un HLB critique, c'est-à-dire une valeur de HLB préférentielle pour obtenir une émulsion ou microémulsion stable. En pratique, plusieurs tensioactifs sont alors introduits dans la formulation, permettant d'ajuster le HLB, nommé $HLB_{mélange}$. Pour obtenir une formulation stable, un tensioactif hydrophile et un tensioactif hydrophobe compatibles doivent être mélangés à des ratios spécifiques, le but étant d'obtenir une valeur de $HLB_{mélange}$ égale au HLB critique de la phase lipophile (118). Le $HLB_{mélange}$ peut être calculé par la formule mathématique présentée ci-dessous :

$$\text{HLB mélange} = (m_1 \times \text{HLB surfactant 1}) + (m_2 \times \text{HLB surfactant 2})$$

Équation 1 : Calcul du HLB mélange
Avec m_1 la proportion en masse de surfactant 1 et m_2 la proportion en masse de surfactant 2, la somme des deux proportions devant être égale à 1.

3.3.1.7.2. HLD : Hydrophilic-Lipophilic Difference

Le HLD, ou Hydrophilic-Lipophilic Difference, est un nombre adimensionnel qui traduit l'écart entre une formulation lambda et la formulation optimale. Le HLD prend en compte différents paramètres dont la salinité, la nature de l'huile, la température et la présence d'alcool. La formulation optimale équivaut à un HLD de 0, ce qui correspond à un

diagramme de Winsor de type III, pour lequel les phases aqueuses et huileuses en excès ont des volumes égaux. Un HLD < 0 équivaut à un diagramme de Winsor de type I, et un HLD > 0 équivaut à un diagramme de Winsor de type II (116).

3.3.1.7.3. Rapport de Winsor

Le rapport de Winsor, quant à lui, compare les interactions entre l'huile et les tensioactifs aux interactions entre l'eau et les tensioactifs (équation 2) (120).

$$R = \frac{A_{TH}}{A_{TE}}$$

Équation 2 : Calcul du rapport de Winsor
A = interactions moléculaires par unité d'aire interfaciale, TH = tensioactif-huile, TE = tensioactif-eau (120)

Si R est inférieur à 1, les interactions se font préférentiellement entre le tensioactif et la phase aqueuse. Cette préférence engendre un excès d'huile hors de la microémulsion. Si R est supérieur à 1, les interactions se font préférentiellement entre le tensioactif et l'huile, résultant d'un excès d'eau. Si R est égal à 1, les interactions du tensioactif sont équivalentes envers l'eau et l'huile, résultant d'un excès de phase aqueuse et de phase huileuse. De plus, si la concentration en tensioactif est très élevée, il en résulte une microémulsion sans excès de phases (figure 27) (120).

3.3.1.7.4. Diagramme ternaire

En application du rapport de Winsor, il est possible de distinguer à l'équilibre quatre types de microémulsions, chacune se formant en fonction de la composition en eau, en huile, en tensioactifs et co-tensioactifs. Ces microémulsions sont représentées par des diagrammes ternaires, ou diagrammes de phases, différents. Une microémulsion dite de Winsor IV représente une microémulsion complète, ou toutes les quantités de matières premières sont impliquées dans la formulation et la stabilisation. Une microémulsion de type Winsor I ou II représente une microémulsion avec respectivement un excès de phase huileuse ou aqueuse, cet excès étant toujours en équilibre avec la microémulsion. Enfin, une microémulsion de type Winsor III est caractérisée par une microémulsion en équilibre avec un excès de phase aqueuse et de phase huileuse (figure 27) (116).

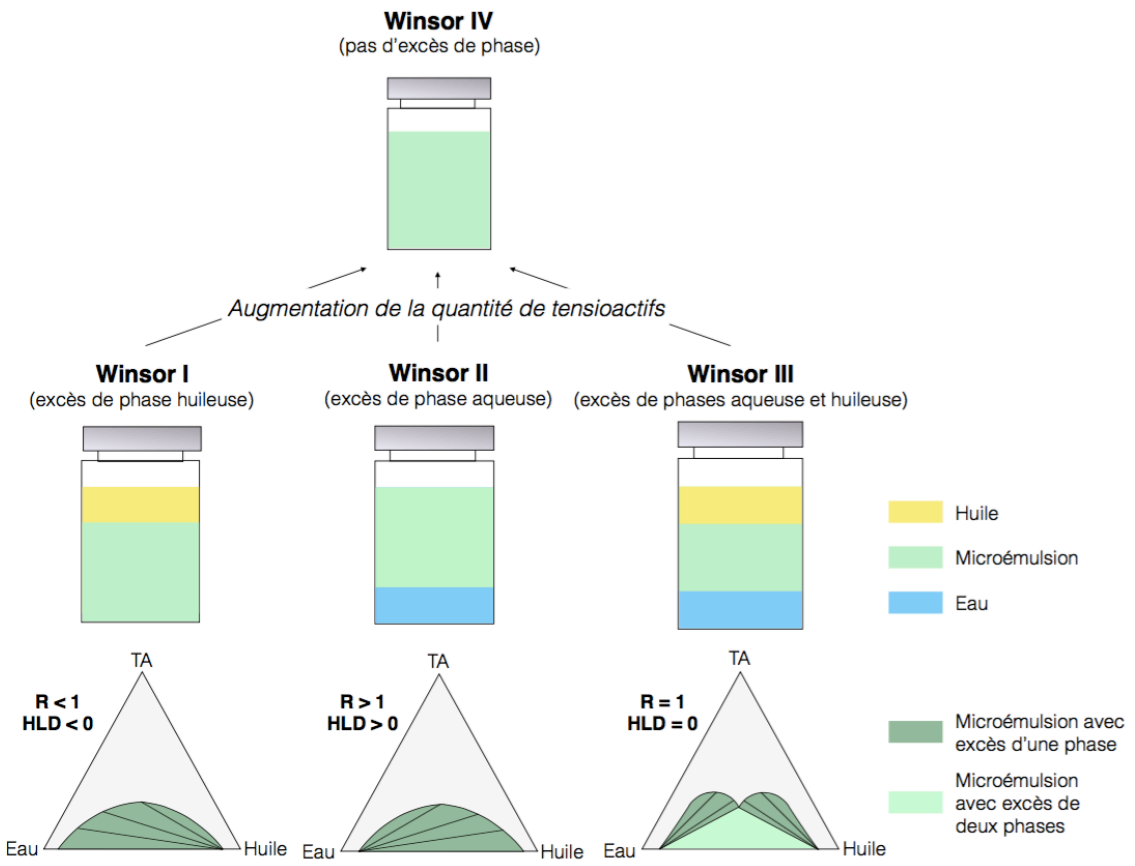


Figure 27 : Représentation des différents types de microémulsions à l'équilibre (extrait de) (121).

A noter qu'une aide à la lecture d'un diagramme ternaire est présentée en annexe 3.

3.3.1.8. Nano-émulsions

Les nano-émulsions correspondent à des émulsions dont la taille des gouttelettes est comprise en général entre 20 et 200 nm. Les plus répandues sont les nano-émulsions huile dans eau. Les avantages pour la voie ophtalmique par rapport aux émulsions classiques sont la transparence de la solution, la faible irritation oculaire du fait de la quantité moindre de tensioactifs et la possibilité de stérilisation à travers un filtre de 0,22 µm. Les nano-émulsions chargées positivement permettent une interaction avec les mucines de la cornée et donc une augmentation du temps de résidence à la surface oculaire (108), (122), (123).

Toutefois, même si les nano-émulsions peuvent se conserver pendant plusieurs mois voire années, elles sont sujettes à des problèmes de stabilité. En effet, la faible quantité de tensioactifs et leur faible viscosité engendrent une instabilité des gouttelettes, un phénomène de crémage et une opacification de la solution (108), (124).

Concernant le procédé de formulation, il existe des méthodes dites à haute énergie et des méthodes dites à basse énergie (123).

Les méthodes à basse énergie se basent sur la formation spontanée de nano-gouttelettes en solution en présence de tensioactifs ou lors d'un changement de conditions environnementales. Il existe, entre autres, la méthode d'émulsification spontanée et la méthode de température d'inversion de phase.

Le principe de la méthode de température d'inversion de phase est de provoquer une inversion de phase, en passant d'une émulsion H/E à E/H ou inversement, grâce à un changement de température (figure 28). En effet, en fonction du choix des tensioactifs, certains sont plus ou moins hydrophiles ou lipophiles à une température donnée. Par exemple, en augmentant la température, certains tensioactifs non ioniques deviennent moins solubles dans l'eau. Il peut alors être intéressant de formuler une émulsion E/H à une température supérieure à la température d'inversion de phase (PIT) du tensioactif, puis de procéder à un refroidissement de la température de la solution en dessous de la PIT, ce qui aboutit à un changement d'affinité de phase du tensioactif et une augmentation de sa solubilité dans l'eau, formant alors des nano-gouttelettes d'huile dans l'eau. Toutefois, cette méthode n'est pas applicable pour des substances actives thermosensibles.

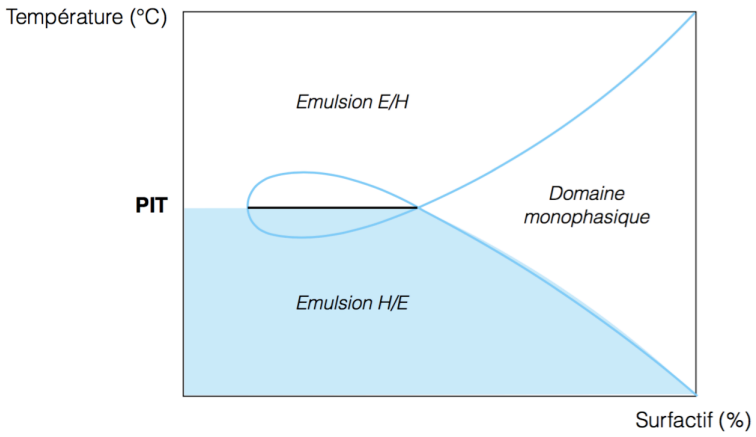


Figure 28 : Schéma représentant le type d'émulsion en fonction de la température et de la concentration en surfactif (image originale) (125).
Le trait noir correspond à la température d'inversion de phase.

Les méthodes à haute énergie utilisent une force mécanique intense fragmentant les gouttelettes. Les équipements utilisés peuvent être les homogénéisateurs, les microfluidiseurs ou encore les appareils à ultrasons. L'homogénéisation à haute pression est la méthode la plus répandue. Elle consiste à faire passer l'émulsion dans une chambre à haute pression contenant une valve étroite, où elle subira diverses forces disruptives tels que des cisaillements, des turbulences, le tout permettant de réduire la taille des grosses gouttelettes en gouttelettes de l'ordre du nanomètre. La taille de celles-ci peut être modulée en fonction du nombre de passage dans la valve et de la pression.

3.3.2. Amélioration de la biodisponibilité des collyres

Divers paramètres sont responsables de la faible biodisponibilité des collyres à la surface oculaire. C'est le cas de la faible concentration en principe actif, du faible temps de résidence à la cornée par une faible viscosité et faible bioadhésion des collyres, et d'une faible perméabilité de la cornée laissant passer principalement des molécules lipophiles de faible poids moléculaire.

L'amélioration de cette biodisponibilité apparaît alors comme un point indispensable à prendre en compte lors de la formulation des collyres.

3.3.2.1. Amélioration de la solubilité des principes actifs

L'amélioration de la solubilité des principes actifs dans la formulation permet de pouvoir incorporer une plus grande quantité de PA dans le collyre. Comme vu précédemment, plus la concentration dans le collyre est élevée, plus l'absorption et *in fine* la biodisponibilité est élevée.

3.3.2.2. Augmentation de la viscosité

Différents excipients permettent d'augmenter la viscosité du collyre pour un meilleur temps de résidence à la cornée. Certaines matières premières, en fonction de la concentration plus ou moins importante, interviennent dans la formation de solutions légèrement visqueuses ou de gels.

3.3.2.2.1. Utilisation de viscosifiants

Les viscosifiants les plus répandus sont les carbomères (971P et 974P étant les plus adaptés pour l'ophtalmologie), les dérivés cellulosiques (CMC, HPMC), les dérivés vinyliques (alcool polyvinylique, povidone) ou encore l'acide hyaluronique.

Toutefois, la concentration doit être adaptée pour avoir une viscosité idéalement comprise entre 10 et 30 mPa.s, tolérée jusqu'à 60 mPa.s. Une concentration plus élevée de ces polymères peut former en solution un gel, et non plus une solution liquide avec une viscosité légèrement augmentée. En effet, il faut distinguer une solution visqueuse d'une formulation ayant une configuration de gel.

3.3.2.2.2. Formulation d'organogels et d'hydrogels

La Pharmacopée Européenne définit les gels comme des liquides gélifiés à l'aide d'agent gélifiants. De façon plus générale, un gel peut être décrit comme un matériau semi-solide contenant un liquide (apolaire ou polaire) piégé dans un réseau réticulé tridimensionnel. Les gels lipophiles (organogels) sont généralement composés d'huile ou de paraffine et sont gélifiés par de la silice colloïdale. Les gels aqueux (hydrogels) sont quant à eux composés d'eau et gélifiés par des carbomères, celluloses, poloxamers, etc. Seuls les hydrogels seront détaillés dans cette partie (126).

Les gels présentent de nombreux avantages pour une application par voie ophtalmique : un pouvoir épaississant permettant un temps de résidence à la cornée augmenté et, pour certaines matières premières, un pouvoir bioadhésif. Une attention particulière doit être portée sur la méthode de stérilisation, beaucoup de gels voyant leurs propriétés modifiées après filtration ou stérilisation à la chaleur (1).

Les hydrogels sont ainsi un réseau à trois dimensions de polymères réticulés gonflés d'eau. La réticulation peut être chimique ou physique (figure 29). La première fait intervenir des liaisons covalentes qui seront irréversibles, obligeant le gel chimique à se déformer, à gonfler sous l'effet d'une contrainte extérieure sans jamais changer d'état. La température ou le pH ne sont donc pas des paramètres influençant la formation du gel. La deuxième fait intervenir des liaisons faibles, comme des liaisons hydrogènes, qui seront réversibles, permettant ainsi aux réticulations de se former et se déformer, passant d'un état liquide à un gel (transition sol-gel) ou l'inverse. Les facteurs environnements comme le pH et la température pourront donc ici influencer les caractéristiques du gel. Les gels physiques peuvent être subdivisés en gels préformés et gels formés *in situ* (127), (128).

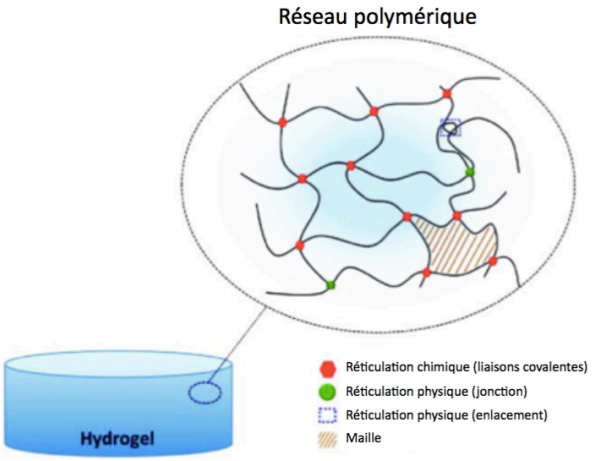


Figure 29 : Schéma représentant un hydrogel et les différents types de réticulation pouvant se former (extrait de) (129).

Les hydrogels préformés subissent peu de modifications après administration oculaire, si ce n'est une dilution par le liquide lacrymal. Les polymères les plus souvent utilisés sont les carbomères (à condition que la solution ait un pH proche de 7) ou certaines celluloses. La grande viscosité des solutions de carbomères leur permet également d'être utilisées pour des formulations à libération prolongée (130).

Les hydrogels formés *in situ* sont, dans le conditionnement du collyre, sous forme liquide. La solution se gélifie au contact d'un environnement particulier. En effet, la gélification peut se produire due à la variation d'un paramètre physico-chimique comme la force ionique, la température ou le pH de l'œil. Les polymères sensibles à la température sont typiquement les poloxamers, exerçant une transition sol-gel aux alentours de 30-35°C, correspondant à la température du liquide lacrymal. La gomme gellane est un polymère sensible aux ions, plus précisément les cations comme Na^+ ou Ca^{2+}. Enfin, les carbomères, qui peuvent être des hydrogels préformés si la solution a un pH de 7, peuvent aussi être utilisés pour former des gels *in situ* sensibles au pH. En effet, la solution préparée peut être acide (environ pH 5), ce qui permettra, lors de l'instillation et du contact au pH neutre de la cornée, de former un gel (1). Les principaux avantages des hydrogels formés *in situ* sont la facilité d'instillation et la précision de la dose administrée.

Concernant la formulation des hydrogels, diverses méthodes existent. Les gels chimiques, irréversibles, peuvent être formés par réticulation chimique ou radiation des polymères, par copolymérisation, etc. Les hydrogels physiques, réversibles, peuvent être formés par chauffage ou refroidissement, par changement de pH, par ajout d'ions (131).

Pour mettre en solution les gélifiants, ils doivent avant tout être finement dispersés sous agitation rapide, comme avec l'utilisation d'un rotor stator. Cette dispersion permet la bonne hydratation des polymères et permet ainsi d'éviter la formation d'amas. Attention toutefois à ne pas disperser la solution trop longtemps, ce qui pourrait dégrader certaines matières premières comme les carbomères. Certains polymères étant insolubles à chaud (HPMC), il peut être judicieux d'incorporer la matière première en solution à une température élevée, permettant sa dispersion et son hydratation, puis de refroidir la solution permettant sa solubilisation et la formation du gel. De façon générale, l'incorporation des gélifiants est une des premières étapes de formulation, avant d'ajouter les autres matières premières nécessaires (principe actif, conservateurs, ajusteurs de pH, etc) (132).

3.3.2.3. Optimisation de la bioadhésion

Certains polymères modifiant la viscosité jouent aussi sur la bioadhésion, il est donc intéressant d'utiliser ces excipients pour la multiplicité des bénéfices qu'ils apportent. C'est

le cas par exemple de la carboxyméthylcellulose, du hyaluronate de sodium ou encore des carbomères.

Les propriétés de ces excipients et les mécanismes de bioadhésion généraux ont été détaillés précédemment dans cette thèse.

3.3.2.4. Amélioration de la perméabilité

La faible perméabilité de la cornée est également un facteur intervenant dans la faible biodisponibilité des collyres à la surface oculaire. A ce jour, différentes stratégies de formulations permettent de l'améliorer.

Les surfactants, en plus d'augmenter la solubilisation de certaines substances actives, ont la propriété de diminuer la tension interfaciale entre deux milieux. En perturbant le film lacrymal et les mucines, les tensioactifs diminuent l'intégrité de l'épithélium en relâchant les jonctions serrées et modifiant les membranes des cellules épithéliales, supprimant ainsi leur effet protecteur et permettant un meilleur passage du principe actif. Les surfactants non ioniques, comme les Tweens ou les Spans, le Tween 80 et le Span 60 étant communément utilisés, perturbent les chaines phospholipidiques présentent à la surface oculaire. Comparés aux surfactants ioniques, ils présentent une moindre toxicité et irritation oculaire. Le chlorure de benzalkonium est un surfactant cationique permettant d'augmenter la perméabilité tout en ayant une action de conservateur, toutefois son utilisation est controversée car il présente une forte toxicité. D'autres surfactants, comme le Transcutol P® à des concentrations entre 0,005 % et 0,03 % ou encore le Labrasol® à des concentrations entre 0,5 % et 3,0 % permettent d'augmenter la perméabilité de la cornée sans entrainer d'irritations oculaires (59).

Les acides gras améliorent la perméabilité cornéenne en altérant les propriétés cellulaires des membranes, tout comme les surfactants, mais aussi en induisant des complexations d'ions avec des matières premières chargées positivement. Les acides capriques et capryliques sont des exemples d'acides gras utilisés pour les formes ophtalmiques (59).

Les cyclodextrines permettent d'améliorer la perméabilité de la cornée, en plus d'améliorer la solubilité de la molécule. La lipophilie de la cornée et la grande taille des cyclodextrines empêchent leur passage à travers la membrane de la cellule. Ainsi, les principes actifs lipophiles, qui traversent facilement l'épithélium cornéen, sont simplement relargués et pénètrent facilement la membrane. Les principes actifs hydrosolubles, eux, peuvent traverser la cornée grâce aux modifications structurelles de la cornée qu'engendrent les cyclodextrines. En effet, ces dernières interagissent avec le cholestérol

présent au niveau de l'épithélium, permettant d'augmenter la fluidité de la membrane, diminuant la résistance au passage de molécules hydrophiles. Dans tous les cas, la cyclodextrine est éliminée *via* les canaux lacrymaux (104), (133).

D'autres matières premières permettent d'augmenter la perméabilité cornéenne, comme les agents chélatants (EDTA), certains peptides ou composés amphiphiles ou encore le chitosan et ses dérivés polycationiques (77). De plus, certains systèmes colloïdaux comme les liposomes améliorent la perméabilité cornéenne.

Toutefois, certaines matières premières pouvant présenter une réelle toxicité cornéenne, le nombre de stratégies pour améliorer la perméabilité sans endommager la cornée reste alors faible. Ainsi, pour améliorer ce facteur responsable d'une faible biodisponibilité, l'idéal est d'avoir une molécule qui est à la fois lipophile et hydrophile. Pas trop hydrophile pour ne pas passer exclusivement au niveau de la conjonctive et de la sclère et ainsi être éliminée rapidement dans le réseau sanguin, mais pas trop lipophile non plus pour pouvoir être formulée de manière optimisée et pouvoir traverser efficacement l'épithélium puis le stroma.

En résumé, les collyres sont en grande majorité sous forme aqueuse ce qui impose un nombre d'instillations très élevé, pouvant être contraignant pour le patient. Ainsi, un des objectifs des améliorations galéniques dans les formes collyres est la diminution de prises médicamenteuses au cours d'une journée par augmentation de l'efficacité du collyre.

Pour cela, diverses stratégies galéniques sont aujourd'hui mises en place : l'amélioration de la solubilité des principes actifs, l'augmentation du temps de résidence des collyres par modification de la viscosité et utilisation de molécules bioadhésives, ainsi que l'augmentation de la perméabilité de la cornée, le tout permettant une meilleure biodisponibilité et efficacité du médicament oculaire. Certaines formulations, comme l'utilisation de cyclodextrines, ou encore l'ajout de liposomes ou nanoparticules dans des formulations sol-gel permettent d'optimiser simultanément plusieurs des facteurs cités précédemment.

La faisabilité de la stratégie galénique doit de plus être adaptée aux caractéristiques physico-chimiques du principe actif et des excipients. Il doit également être pris en compte les critères de qualité des collyres, dont principalement la stérilisation, ce paramètre étant critique lors de la formulation.

4. CONCLUSION

L'œil est un organe sensible sujet à différentes pathologies, toutes handicapantes pour le confort quotidien du patient. Sa complexité anatomique et les différentes barrières cornéennes engendrent une difficulté pour le traitement.

La sensibilité oculaire oblige le respect strict de différents critères de qualité lors du développement d'une forme ophtalmique : l'isotonie, la neutralité, la stérilité, etc. Pour une bonne tolérance et innocuité de la formulation, les matières premières pouvant être toxiques, comme c'est le cas des conservateurs, doivent être diminuées, idéalement supprimées de la formulation. Le confort du patient lors de l'instillation est également à prendre en compte, c'est pourquoi la viscosité est un paramètre à contrôler : dans l'idéal, la formulation ne doit pas troubler la vision et doit se fluidifier lors du clignement des paupières.

Le médicament étant ressenti par l'œil comme un corps étranger, les mécanismes de défenses tels que des clignements palpébraux et larmoiements sont rapidement et efficacement mis en place après une instillation oculaire. Ainsi, même si le principe actif est chimiquement idéal, c'est-à-dire de petite taille, à la fois hydrophile et lipophile, l'absorption médicamenteuse et la biodisponibilité restent extrêmement faibles.

Cette faible biodisponibilité, régulièrement inférieure à 5%, oblige le patient à répéter de nombreuses fois dans la journée les instillations, diminuant au fil du temps son observance. Pour y remédier, plusieurs stratégies galéniques sont mises en place pour augmenter la solubilité des principes actifs, améliorer le temps de résidence à la cornée, sa perméabilité, permettant ainsi un meilleur passage cornéen du principe actif et *in fine* une meilleure biodisponibilité et efficacité. Toutefois, certaines formulations n'ont besoin d'agir qu'à la surface, comme c'est le cas pour le traitement de la sécheresse oculaire. Cette seule action en surface permet de s'exempter du problème anatomique responsable d'un faible passage cornéen.

La sécheresse oculaire est une pathologie très répandue qui rend le confort quotidien du patient difficile. L'hyperosmolarité, l'inflammation et les microlésions cornéennes amplifient dans un réel cercle vicieux cette sécheresse, rendant difficile son traitement définitif. Les médicaments contre l'œil sec sont à ce jour nombreux et variés, dans l'objectif de répondre à chaque besoin spécifique du patient. En effet, la diversité des matières premières utilisées dans ces médicaments permet de trouver la formule la plus adaptée et la mieux tolérée. Toutefois, la problématique de cicatrisation des microlésions et de réparation de la cornée reste majeure, même si l'hydratation temporaire de la cornée permet de soulager sur le court terme l'inconfort du patient.

Même si les médicaments oculaires sont de plus en plus adaptés, la recherche constante de la formulation idéale, c'est-à-dire efficace grâce à une biodisponibilité élevée, bien tolérée par le patient avec peu d'effets indésirables et avec un schéma thérapeutique simple et sans contrainte reste un véritable défi.

Dans la suite de cette thèse, le développement d'un collyre pour le traitement de la sécheresse oculaire est présenté. Les critères de qualité indispensables au développement et les caractéristiques des matières premières ont été pris en compte dans la rédaction du cahier des charges. L'objectif principal est d'évaluer la diminution de l'inflammation et la réparation des microlésions cornéennes, par rapport à d'autres produits présents sur le marché.

CHAPITRE 2 : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE - DÉVELOPPEMENT D'UN COLLYRE DANS LE TRAITEMENT DE L'ŒIL SEC : PREUVE DE CONCEPT

1. PRÉSENTATION DE L'OBJECTIF DE DÉVELOPPEMENT

L'objectif de ce développement est d'effectuer une preuve de concept (POC en anglais) pour l'efficacité d'un nouveau collyre destiné au traitement de l'œil sec. En général, et comme c'est le cas pour cette thèse, une POC intervient à un stade très en amont du développement pharmaceutique, lorsque l'on souhaite évaluer si les molécules sélectionnées et leur concentration ont un impact positif sur le traitement de la pathologie, ou si la forme galénique est adaptée.

Comme évoqué dans la partie bibliographique, le manque d'hydratation cornéenne et l'augmentation de l'osmolarité entrainent une inflammation, une érosion de la cornée et *in fine* des lésions oculaires. Cette pathologie étant un véritable cercle vicieux, il est d'autant plus difficile de traiter ces microlésions et d'effectuer une cicatrisation. A la différence de nombreux collyres commercialisés, l'attendu dans l'efficacité de cette formulation n'est pas seulement une hydratation temporaire de la cornée permettant de diminuer l'inconfort du patient, mais également un traitement et une réparation efficace des lésions cornéennes, ainsi qu'une diminution de l'inflammation.

La formulation développée correspond à une association de deux matières premières jusqu'alors jamais réalisée. L'une des matières premières est déjà utilisée en France dans le traitement de la sécheresse oculaire, l'autre n'existe pas à ce jour dans des formes ophtalmiques sur le marché français. L'innovation de ce médicament se trouvant dans cette association, l'objectif est de démontrer que **les deux molécules en combinaison sont plus efficaces dans le traitement de la sécheresse oculaire que chacune des molécules utilisées seules et séparément**. Autrement dit, il est recherché une synergie.

Des formulations contenant peu de matières premières ont été réalisées. En effet, au stade de POC, l'optimisation de la formulation n'est pas essentielle, d'autant plus que les matières premières sont hydrophiles et se solubilisent dans l'eau.

Concernant le cahier des charges, la solution se doit d'être **limpide et homogène**. Le pH ciblé du tampon est aux alentours de **7,2 ± 0,2**, pour être proche du pH physiologique de l'œil. De plus, une des matières premières possède un point isoélectrique entre 6 et 8, il est donc indispensable d'être dans cette plage de pH pour ne pas interférer avec les charges de l'autre matière première et ainsi éviter une éventuelle précipitation. L'osmolalité est idéalement **inférieure à 300 mOsm/kg** pour avoir une solution hypotonique, préférable pour le traitement de l'œil sec. Ainsi, certains médicaments sur le marché comme Vismed® ont une osmolalité pouvant descendre jusqu'à 150 mOsm/kg (134). La viscosité visée quant à elle est dans l'idéal comprise **entre 10 et 30 mPa.s pour une solution au repos**, et **entre 5 et 15 mPa.s pour une solution soumise à un taux de cisaillement représentatif du cisaillement des paupières**.

Différentes analyses ont été réalisées pour observer les propriétés et le comportement des solutions développées, l'objectif étant de répondre au cahier de charges.

L'aspect (limpidité, couleur) a été observé pour chaque solution formulée. Concernant les critères de qualité indispensables, le **pH** et **l'osmolalité** ont été mesurés. La **taille des gouttes** a été évaluée, et des corrélations ont été faites avec la **densité** mesurée pour estimer un volume instillé. La **viscosité** étant un paramètre clé, des mesures à différents taux de cisaillement ont été réalisés. Les solutions ophtalmiques ayant l'obligation d'être stériles, il a été observé l'impact de la **méthode de stérilisation** sur les matières premières, par observation du changement de viscosité. Enfin, il a été évalué la **reconstruction cellulaire *in vitro*** pour estimer l'efficacité des formulations dans le traitement de la pathologie.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Matières premières

Deux matières premières sont utilisées en association. La première correspond à du **hyaluronate de sodium** de haut poids moléculaire (environ 2 100 kDa). C'est un glycosaminoglycane hydrosoluble chargé négativement, biodégradable et naturellement présent dans le corps humain. Pour des raisons de confidentialité, la seconde matière première ne sera pas explicitement nommée. Celle-ci sera appelée « **molécule UDB** » dans la suite de cette thèse. C'est une molécule hydrosoluble, avec un point isoélectrique compris entre 6 et 8.

Concernant les excipients, de **l'eau PPI** (pour préparation injectable) ou un **tampon phosphate** ont été utilisés en tant que solvant. Le tampon phosphate a été sélectionné car il est connu pour être bien toléré par l'œil, est souvent employé dans des formes ophtalmiques (Artelac®, Dulcilarmes®, Fluidabak®) et est préférentiellement utilisé quand la neutralité de la solution est désirée.

2.2. Formulations

Initialement, chaque matière première à une concentration élevée a été introduite seule en solution aqueuse pour évaluer la solubilité et la cinétique de solubilisation (tableau 6). La concentration en hyaluronate de sodium a été choisie en fonction des médicaments déjà présents sur le marché ; la concentration maximale utilisée est de 0,2 %. La concentration maximale de la molécule UDB a été définie grâce à différents brevets. Pour des raisons de confidentialité, les références de ces brevets ne pourront pas être communiquées.

La solubilité des matières premières a été complète mais relativement lente : plusieurs heures pour le hyaluronate de sodium (minimum 4 heures), et environ 30 minutes pour la molécule UDB.

Tableau 6 : Concentrations testées des matières premières seules en solution aqueuse (eau PPI).

N° d'essai	Hyaluronate de sodium (% m/v)	N° d'essai	Molécule UDB (% m/v)
E01	0,2	E02	10

Dans un second temps, d'autres concentrations de chaque matière première ont été testées dans un tampon phosphate, visant les concentrations extrêmes (inférieures et supérieures) et une concentration intermédiaire (tableau 7). Les concentrations minimales ont été sélectionnées de la même façon que les concentrations maximales pour chacune des matières premières.

La concentration de la molécule UDB a été diminuée pour la deuxième étape car l'aspect, au niveau coloration et viscosité n'était pas satisfaisant. En effet, à l'œil nu, la solution à 10 % de molécule UDB semblait trop visqueuse pour une application ophtalmique aisée et n'entrainant pas de flou visuel.

Tableau 7 : Concentrations testées des matières premières seules dans un tampon phosphate.

N° d'essai	Hyaluronate de sodium (% m/v)	N° d'essai	Molécule UDB (% m/v)
E03	0,1	E06	0,1
E04	0,15	E07	1
E05	0,2	E08	5

La troisième étape de ces formulations consistait à effectuer les mélanges des deux matières premières, toujours dans un tampon phosphate (composition présentée dans le tableau 8). La formulation à 2 % de hyaluronate de sodium ayant à elle seule des valeurs de viscosité aux bornes supérieures tolérées pour une forme ophtalmique, il a été choisi de ne pas utiliser cette concentration pour faire les associations avec la molécule UDB. Ainsi, trois concentrations de la molécule UDB ont été sélectionnées : 0,1 %, 1 % et 5 %, en combinaison avec deux concentrations de hyaluronate de sodium : 0,1 % et 0,15 %. Le tableau 9 récapitule les six formulations réalisées.

Tableau 8 : Formulation du tampon phosphate

Matières premières	Rôle	Concentration (% m/v)
Sodium dihydrogénophosphate dihydraté (NaH_2PO_4 2 H_2O)	Acide	0,4684
Disodium hydrogénophosphate anhydre (Na_2HPO_4)	Base	0,9947
Eau PPI	Solvant	Qsp 100 mL

Tableau 9 : Concentrations testées des matières premières en association dans un tampon phosphate.

N° d'essai	Hyaluronate de sodium (% m/v)	Molécule UDB (% m/v)
E09	0,1	0,1
E10	0,1	1
E11	0,1	5
E12	0,15	0,1
E13	0,15	1
E14	0,15	5

2.3. Procédé de fabrication

Le procédé de fabrication pour une taille de lot de 200 mL est présenté dans la figure 30. En couleurs sont présents les différents paramètres critiques : en vert les paramètres critiques des attributs matières (CMA), en bleu les paramètres critiques du process (CPP) et en rouge les paramètres critiques des attributs qualité (CQA).

Après avoir pesé séparément chacune des matières premières, il est introduit dans un bécher de volume adapté environ 80 % du solvant (tampon phosphate). La totalité du hyaluronate est ensuite ajoutée en pluie fine, sous agitation magnétique pendant minimum 4 heures pour que la solubilisation soit complète. Vient ensuite l'introduction de la totalité de la molécule UDB, toujours en pluie fine et sous agitation magnétique pendant minimum 30 minutes. Après solubilisation complète, lorsque la solution est limpide, la solution est transvasée dans une fiole jaugée. Le tampon phosphate est ajouté pour atteindre un volume total de 200 mL (qsp pour quantité suffisante pour). Enfin, la caractérisation, la stérilisation et une nouvelle caractérisation sont effectuées.

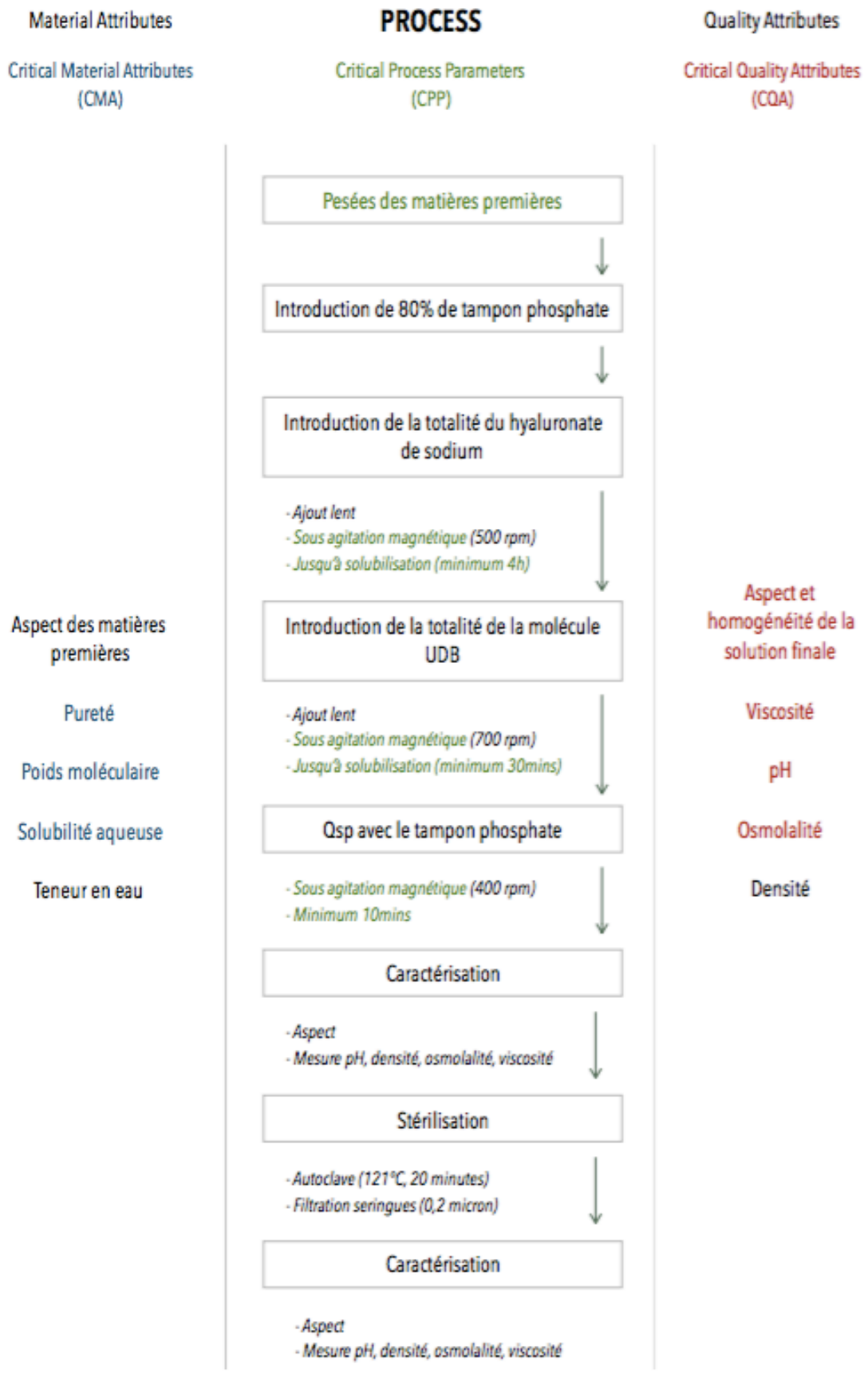


Figure 30 : Procédé de fabrication des formulations.

2.4. Description des tests de caractérisation de la formulation

Toutes les formulations, qu'elles soient dans l'eau ou dans un tampon phosphate, ont été caractérisées concernant l'aspect, le pH et l'osmolalité. Pour des raisons de confidentialité, l'aspect ne pourra pas être détaillé dans cette thèse. La taille des gouttes a été évaluée sur les formulations contenant les matières premières en combinaison, dans l'objectif d'estimer si la viscosité permet d'instiller une taille de goutte « standard », c'est-à-dire entre 20 et 30 µL. Les formulations dans un tampon phosphate ont été caractérisées au niveau de la viscosité, avant et après différentes méthodes de stérilisation. L'évaluation de la viscosité permet de faire une corrélation avec la taille des gouttes, d'estimer le temps de résidence à la cornée et d'observer l'impact de la méthode de stérilisation sur les propriétés des matières premières. Parmi ces formulations, certaines ont été sélectionnées pour évaluer l'efficacité de la reconstruction cellulaire *in vitro*.

2.4.1. Mesure du pH et de l'osmolalité

Le pH a été mesuré grâce à un pH-mètre Mettler Toledo Seven Compact S210. L'osmolalité a été évaluée grâce à un osmomètre automatique Löser.

2.4.2. Évaluation de la taille des gouttes

Le volume d'une goutte de formulation conditionnée dans un collyre multidoses a été évalué. Pour chaque formulation ayant des matières premières en combinaison (essais E09 à E14), 5 gouttes ont été pesées l'une après l'autre avec un angle d'application de 45 degrés, et 5 gouttes ont été pesées avec un angle d'application de 90 degrés (figure 31). Ainsi, la masse moyenne pour chaque angle d'application a pu être calculée puis, grâce à la densité de la formulation mesurée à l'aide du DensitoPro (Mettler Toledo), le volume moyen d'une goutte a pu être déduit.

Figure 31 : Angle d'application du collyre pour la mesure de taille des gouttes.
Source : Unither Pharmaceuticals

2.4.3. Mesure de la viscosité

La viscosité a été mesurée grâce à un viscosimètre Brookfield DV3T, avec un mobile cône plan CP42, utilisé en routine pour des formulations de faible viscosité. Au vu des résultats présentés dans la suite de ce rapport, les mesures devront être effectuées de nouveau grâce au mobile cône plan CP40, plus adapté pour les solutions d'encore plus faible viscosité.

Différents taux de cisaillement ont été testés, pour se rapprocher au maximum des valeurs des taux de cisaillement de la paupière (10 s^{-1} pour l'œil ouvert et 1 000 à 10 000 s^{-1} lors du clignement des paupières). Au vu des formulations et des capacités du mobile CP42, il a été choisi comme valeurs extrêmes des taux de cisaillement de 19,2 s^{-1} et 960 s^{-1}. Des valeurs intermédiaires ont également été sélectionnées, pour évaluer plus précisément le comportement du fluide. Les valeurs des taux de cisaillement obtenues sont présentées dans le tableau 10.

Tableau 10 : Valeurs des taux de cisaillement appliqués aux formulations développées (de gauche à droite).

Taux de cisaillement (en s^{-1})									
19,2	38,4	192	384	576	768	960	384	38,4	19,2

2.5. Impact de la stérilisation

Les formulations dans un tampon phosphate, avec les matières premières seules ou en association, ont été stérilisées par différentes méthodes. Chaque formulation a subi un autoclavage à 121°C pendant 20 minutes (modèle Advantage Lab AL02-03), une filtration *via* un filtre seringue PVDF et *via* un filtre seringue PES.

Le filtre PVDF est composé de difluorure de polyvinylidène, utilisé pour filtrer des solutions hydrophiles pouvant contenir des oligomères solubles dans l'eau et des polymères. Le filtre PES est constitué de polyéther sulfone, utilisé pour la filtration de solutions aqueuses et légèrement organiques.

En complément, une étude de filtrabilité a été effectuée sur la solution contenant les matières premières aux concentrations les plus élevées (0,15 % de hyaluronate de sodium et 5 % de molécule UDB). Une filtration stérilisante sur filtre PES et une filtration en 2 étapes contenant une pré-filtration (filtre en fibres de verre non chargées de porosité d'environ 0,8 µm) puis une filtration stérilisante (filtre PES) ont été réalisées.

2.6. Évaluation de la reconstruction cellulaire *in vitro*

2.6.1. Intérêt de la culture cellulaire

L'objectif de l'étude est de démontrer qu'un modèle cellulaire *in vitro* représentant la sécheresse oculaire peut être utilisé pour montrer les effets positifs d'une application d'un collyre sur la reconstruction cornéenne. Pour cette évaluation, une collaboration a été réalisée avec l'entreprise Oroxcell, spécialisée dans la culture cellulaire.

Une étude comparative sur différents collyres permet d'évaluer le meilleur candidat parmi les formules développées. En effet, grâce à diverses analyses comme une évaluation de la viabilité cellulaire, de la résistance épithéliale, un dosage des cytokines inflammatoires ou encore une analyse histologique, il est possible d'évaluer si le collyre développé est efficace *in vitro* pour réparer les lésions cellulaires causées par l'inflammation. Grâce à différentes formules analysées, ces tests permettent également d'évaluer si les matières premières en combinaison sont plus efficaces *in vitro* que les deux molécules utilisées seules et séparément.

Les cellules utilisées proviennent de chez Episkin®. Le modèle SkinEthic HCE® (Human Corneal Epithelium) est utilisé pour cette étude. La superficie des inserts est de 0,5 cm^2. Ces cellules sont des cellules épithéliales cornéennes immortalisées, cultivées 5 jours à l'interface air-liquide dans un milieu chimiquement défini, dont la composition exacte n'est pas dévoilée par le fournisseur. Le modèle final après culture est un épithélium cornéen reconstruit similaire en termes de morphologie, d'épaisseur et de fonctionnalité à l'épithélium cornéen humain : il est composé d'environ 6 couches cellulaires pour une épaisseur aux alentours de 60 µm. Trois zones peuvent être distinguées sur cet épithélium : (i) une lame basale composée de cellules polarisées, c'est-à-dire des cellules qui ont une composition différente à leur extrémité basale et apicale les rendant allongées verticalement, (ii) une matrice intermédiaire composée de 4-5 couches de cellules et enfin (iii) une fine couche externe (figure 32). Ce modèle est dénué de stroma, mais l'épithélium synthétise et sécrète des mucines associées à la membrane, plus précisément des mucines MUC4 qui interviennent dans la bioadhésion.

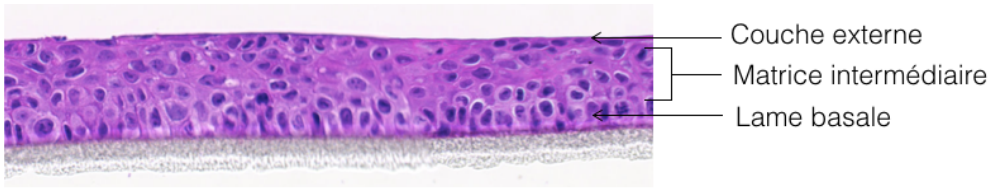


Figure 32 : Coupe histologique de cellules SkinEthic HCE® saines. Grossissement x40.

Le milieu de culture des cellules est renouvelé régulièrement. Les inserts cellulaires sont conservés durant la totalité de l'essai dans un incubateur à 37 ± 2°C avec 5 ± 1 % de CO_2 et une humidité saturée.

Le schéma d'un insert cellulaire est présenté en figure 33. L'insert cellulaire est un rond, avec à sa base un insert en polycarbonate. Cet insert permet l'accrochage des cellules et possède une perméabilité spécifique. Le nombre de cellules contenu dans un insert n'est pas communiqué par le fournisseur. Dans la suite de cette partie, cellules et tapis cellulaire désignent de la même façon l'épithélium reconstruit du modèle SkinEthic® HCE.

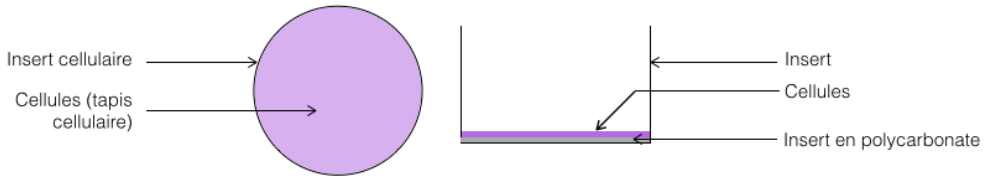


Figure 33 : Schéma représentant un insert cellulaire contenant un tapis cellulaire. A gauche vue de haut, à droite vue de profil

2.6.2. Protocole

La mise en place du protocole se fait en 3 phases :

- **La conception du modèle cellulaire pathologique :** une inflammation est induite sur les cellules. Des biomarqueurs et comportements cellulaires spécifiques de la sécheresse oculaire sont évalués (apparition de cytokines inflammatoires, diminution de la viabilité cellulaire, etc).
- **La validation du modèle précédemment développé :** il faut démontrer que le modèle permet de mettre un évidence une réparation cellulaire après application d'un contrôle positif.
- **Les essais sur les formulations développées :** le modèle pathologique est exposé à différents traitements réparateurs, dont les formules développées, pour permettre une étude comparative.

2.6.2.1. Phase I : mise en place du modèle pathologique

Les cellules étant initialement saines, la première étape indispensable est de changer leurs caractéristiques en créant un environnement spécifique, les rendant ainsi représentatives de l'état cellulaire lors d'une sécheresse oculaire. Pour rappel, l'hyperosmolarité lors de la sécheresse oculaire entraine une inflammation cornéenne, le tout responsable de microlésions.

De ce fait, une sécheresse oculaire sera simulée en créant un état inflammatoire au niveau de la culture cellulaire. Pour cela, différentes concentrations de Sodium Dodécyl Sulfate SDS (0,1 %, 0,01 % et 0,001 %), connu pour entrainer une inflammation cellulaire à ces taux, sont appliquées sur les cellules. L'intensité de l'inflammation est évaluée 24h et

48h après. Les effets de ces trois concentrations de SDS sont comparés à un contrôle n'induisant pas d'inflammation, contenant uniquement du PBS (tampon phosphate salin).

Cette intensité est évaluée grâce à différentes analyses :

- **Évaluation de la résistance épithéliale** (TEER) à T0, T+24h et T+48h. La résistance des cellules au passage d'un courant électrique entre deux électrodes situées de part et d'autre de la couche cellulaire est mesurée. Des cellules saines ne laissent pas passer le courant, donc la résistance est élevée. Au contraire, plus un tissu est lésé, plus cette résistance est faible. Ainsi, l'augmentation de l'inflammation entraine une diminution de la résistance épithéliale, et inversement. Ces mesures sont réalisées en triplicat (n = 3), grâce à l'équipement EVOM2 (VMI).
- **Évaluation de la viabilité cellulaire** (appelé test MTT pour le nom du réactif utilisé : sel de tétrazolium MTT) à T0, T+24h et T+48h. Ce test est une méthode colorimétrique permettant d'évaluer la viabilité cellulaire. En effet, après application du sel de tétrazolium au niveau des cellules, celui-ci est réduit par les mitochondries des cellules vivantes en formazan, qui est une substance violette. Ainsi, la quantité de cette dernière est proportionnelle à la quantité de cellules viables. Il est alors possible de déterminer dans le visible par spectrophotométrie (570 nm) le pourcentage de cellules ayant survécu à l'inflammation. Le test est réalisé sur une seule coupe cellulaire (n = 1). Ce test permet d'indiquer si les quantités de SDS testées sont trop cytotoxiques et entrainent une trop grande mortalité cellulaire, ou si la quantité de SDS appliquée permet d'entrainer une inflammation similaire à celle *in vivo* lors d'une sécheresse oculaire, tout en gardant les cellules vivantes.
- **Évaluation du relargage des cytokines** (test ELISA pour Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) à T+24h et T+48h. Les cytokines TNFα et IL-1α interviennent dans l'inflammation cornéenne (28). Leur augmentation ou diminution est un marqueur fiable de l'augmentation ou diminution de l'inflammation et donc de l'apparition de microlésions. Les kits utilisés sont les kits Human IL-1α Simple Step ELISA kit (abcam, ab178008) et Human TNF-α quantikine ELISA kit (RetD systems, DTA00D). Chaque mesure est réalisée en triplicat (n = 3).
- **Évaluation histologique** à T+24h et T+48h. Les microlésions obtenues après l'inflammation sont observées et comparées à des coupes histologiques connues d'œil sain. Après fixation des cellules dans du formol à 10 %, une inclusion en paraffine est effectuée. Deux coupes sont réalisées (n = 2), chacune d'une épaisseur d'environ 3-4 µm. Une coloration à l'hématoxyline et l'éosine est ensuite réalisée, rendant les coupes d'une couleur rosée. Enfin, la digitalisation est effectuée grâce au scanner de lame Nanozoomer (Hamamatsu), avec un grossissement d'objectif x40.

Toutes ces analyses visent à déterminer la concentration de SDS et la durée d'exposition nécessaire des cellules pour mimer une inflammation identique à celle d'une sécheresse oculaire.

Le tableau 11 récapitule la chronologie des essais.

Tableau 11 : Chronologie des essais pour la mise en place du protocole inflammatoire.

Temps	Activité	Traitement des cellules	Mesure TEER	Test MTT	Test ELISA	Histologie
T0	Mise en place du protocole inflammatoire	30 µl de SDS à 3 concentrations	X	X	/	/
T+24h		NA	X	X	X	X
T+48h		NA	X	X	X	X

X : essais réalisés / : essais non réalisés

2.6.2.2. Phase II : validation du modèle pathologique

Une fois ce modèle développé, il y a une nécessité de le valider. C'est à cette étape qu'il est évalué si le modèle inflammatoire précédemment créé est capable de donner des résultats fiables. Pour cela, l'objectif principal est de montrer qu'un produit déjà présent sur le marché, connu pour fonctionner contre la sécheresse oculaire, entraine une amélioration sur les cellules significativement supérieure au témoin négatif. Ainsi, plusieurs formulations sont analysées :

- Le premier test consiste à instiller uniquement du PBS en tant que témoin négatif.
- Le deuxième test consiste à appliquer un second témoin négatif, qui ne devrait avoir aucun effet et donc présenter les mêmes résultats qu'avec le PBS. Or, lors de la sécheresse oculaire, même une simple solution isotonique composée d'eau et de NaCl présente un effet positif sur la cornée. Toutefois, il y a obligation d'instiller une solution isotonique et non pas seulement de l'eau PPI pour ne pas avoir de lyse cellulaire. Il a donc été choisi comme témoin « négatif » une formulation présentant le moins d'effets positifs sur la sécheresse oculaire, c'est-à-dire une solution de NaCl à 0,9 % (Unilarm®).
- Le troisième test consiste en l'instillation d'un produit sur le marché connu pour avoir un effet bénéfique sur la sécheresse oculaire. Il a été choisi la solution Hyabak®, car composée à 0,15 % de hyaluronate de sodium, donc avec le même pourcentage que pour certaines des formulations développées.

Toutes ces formulations sont instillées selon le même protocole : 15 µl par instillation, 2 fois par jour avec un intervalle de 4 à 6 heures, sur une durée de 7 jours. Le volume d'instillation a été choisi par rapport à la superficie du tapis cellulaire et les instillations habituellement faites sur ces dernières. Le nombre d'instillations par jour a été choisi en considérant la taille d'une goutte de collyre lors d'une instillation chez l'humain, soit 30 µl instillés au total. A noter que les 15 µl par instillation sont retirés quelques minutes après, pour simuler au maximum des conditions réelles, et ainsi éviter l'accumulation de

solution. Enfin, la durée de 7 jours a été choisie par rapport à la durée de vie des cellules (environ une dizaine de jours).

Les analyses présentées lors de la phase I (TEER, viabilité cellulaire, relargage des cytokines et analyse histologique) sont là aussi réalisées et permettent d'évaluer l'efficacité des formulations instillées. Ces analyses sont effectuées à J0, correspondant au début du traitement réparateur, puis à J3, J5 et J7.

Le tableau 12 ci-dessous récapitule la chronologie des essais pour la deuxième étape. J0 correspond au début de l'application du traitement pour la réparation cellulaire. J-1 et J-2 correspondent au protocole inflammatoire développé à l'étape précédente. En fonction du choix de la durée d'exposition des cellules au SDS, le protocole démarrera à J-1 (protocole inflammatoire de 24h) ou J-2 (protocole inflammatoire de 48h).

Tableau 12 : Essais de validation du protocole de culture cellulaire lors de la mise en place d'une inflammation puis évaluation de la reconstruction cellulaire après application d'un traitement réparateur.

Temps	**Activité**	**Traitement des cellules**	**Mesure TEER**	**Test MTT**	**Test ELISA**	**Histologie**
J-1 ou J-2	Protocole inflammatoire	SDS à la concentration choisie à la phase I	/	/	/	/
J0	Traitement réparateur	15 µl 2 fois par jour	X	X	X	X
J1			/	/	/	/
J2			/	/	/	/
J3			X	X	X	X
J4			/	/	/	/
J5			X	X	X	X
J6			/	/	/	/
J7			X	X	X	X

X : essais réalisés / : essais non réalisés

2.6.2.3. *Phase III : évaluation de l'efficacité de la reconstruction cellulaire*

Une fois qu'il a été démontré que le modèle développé fonctionne, la dernière étape consiste à tester les solutions développées et montrer que la combinaison des molécules entraine une synergie dans le traitement de la sécheresse oculaire. Pour cela, quatre formulations dans un tampon phosphate sont testées :

- La molécule UDB à 5 % seule.
- Une combinaison de 0,15 % de HS et 0,1 % de molécule UDB.
- Une combinaison de 0,15 % de HS et 1 % de molécule UDB.
- Une combinaison de 0,15 % de HS et 5 % de molécule UDB.

La formulation contenant du hyaluronate de sodium seul à 0,15 % ayant été testée à l'étape précédente, il n'est pas nécessaire de refaire cet essai lors de la phase III.

Ces formulations sont instillées selon le même protocole qu'à la phase II (15 µl, 2 instillations par jour pendant 7 jours) et ont également les mêmes analyses (TEER, viabilité, relargage des cytokines et histologie).

Ainsi, grâce au protocole et analyses identiques entre ces phases, différentes formulations sont comparables entre elles : une solution de PBS, une solution de NaCl 0,9 %, une solution contenant le hyaluronate de sodium à 0,15 %, une solution contenant la molécule UDB à 5 % ou encore les formulations contenant chacune 0,15 % de HS et 0,1 %, 1 % ou 5 % de molécule UDB. Ces comparaisons permettront d'évaluer l'efficacité des traitements sur la réparation cellulaire et de pouvoir se positionner quant aux prochaines étapes pour le projet.

2.6.3. Avantages et limites

Les avantages de ces modèles cellulaires sont nombreux. Ils permettent de faire un screening des formulations développées et de pouvoir comparer de façon quantitative et qualitative l'efficacité *in vitro* du traitement appliqué.

Les nombreuses analyses qui peuvent être effectuées permettent d'avoir une vision globale des mécanismes intervenant dans la réparation cellulaire et d'observer la variation des médiateurs impliqués dans celle-ci.

Une étude *in vitro* a une durée plus courte qu'une étude *in vivo*, ces études permettent donc un gain de temps lors du développement d'un projet.

Enfin, les méthodes *in vitro* permettent de ne pas utiliser de modèles animaux et répondent ainsi à un enjeu éthique de plus en plus important dans le milieu scientifique et pharmaceutique.

Concernant les limites, le modèle cellulaire utilisé est composé uniquement d'un épithélium multicellulaire et ne possède pas de stroma. Or ce dernier joue un rôle très important dans les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire pour la réparation cornéenne (20).

De plus, les corrélations entre un modèle cellulaire *in vitro* et un modèle *in vivo* au niveau oculaire ne sont pas encore bien définies. Il faut donc être conscient que le protocole d'application (nombre de gouttes, volume de gouttes, durée de traitement, etc) lors des essais *in vitro* ne correspond pas au protocole *in vivo* et nécessitera de plus amples essais pour établir un protocole efficace *in vivo*. De plus, l'œil et ses nombreux mécanismes de défense (sécrétion lacrymale, clignements des paupières) ne peuvent pas être représentés dans un modèle *in vitro*.

Enfin, le coût relativement élevé de ces modèles peut être un frein à leur utilisation.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Mesure du pH et de l'osmolalité

Les résultats du pH et de l'osmolalité des formulations développées sont présentés dans le tableau 13. Hormis pour les solutions contenant 5 % de molécule UDB (en rouge dans le tableau), les solutions dans un tampon phosphate ont un pH proche de 7,2, sont hypotoniques et répondent ainsi au cahier des charges pour ces critères.

Tableau 13 : Résultats du pH et de l'osmolalité des solutions formulées.

N° d'essai	Composition	pH final	Osmolalité (mOsm/kg)
Tampon phosphate	0,99 % Na_2HPO_4 et 0,47 % NaH_2PO_4	7,32	232
E01	0,2 % HS (eau PPI)	6,48	89
E02	10 % molécule UDB (eau PPI)	4 ,73	150
E03	0,1 % HS	7,25	242
E04	0,15 % HS	7,17	233
E05	0,2 % HS	7,25	310
E06	0,1 % molécule UDB	7,26	228
E07	1 % molécule UDB	7,18	240
E08	5 % molécule UDB	6,95	292
E09	0,1 % HS et 0,1 % molécule UDB	7,24	230
E10	0,1 % HS et 1 % molécule UDB	7,16	242
E11	0,1 % HS et 5 % molécule UDB	6,94	311
E12	0,15 % HS et 0,1 % molécule UDB	7,28	234
E13	0,15 % HS et 1 % molécule UDB	7,26	253
E14	0,15 % HS et 5 % molécule UDB	7,03	311

HS = hyaluronate de sodium

3.2. Évaluation de la taille des gouttes

Les résultats de taille des gouttes sont assez hétérogènes et ne montrent pas une réelle corrélation. En effet, certaines formulations ayant des concentrations en matières premières élevées ont une taille de goutte moyenne inférieure à des formulations ayant des concentrations en matières premières plus faibles. C'est le cas par exemple pour les essais E10 et E13 (tableau 14). Or de façon logique, plus la viscosité est élevée, plus la taille de goutte devrait être importante.

De plus, l'angle d'instillation joue un rôle important. Un angle à 45° devrait relarguer une goutte de taille inférieure comparé à un angle d'instillation à 90°, due à la force appliquée par le liquide en lui-même pour faire sortir la goutte. Or, comme c'est le cas pour l'essai E10, la taille de goutte lors d'une instillation à 45° est supérieure à la taille de goutte lors d'une instillation à 90°.

Toutefois, la taille des gouttes reste dans les limites de valeurs attendues, c'est-à-dire autour de 25-30 µl.

Tableau 14 : Résultats de la mesure du volume moyen des gouttes.

N° d'essai	Composition	Densité	Volume à 45°	Volume à 90°
E09	0,1 % HS et 0,1 % molécule UDB	1,011	24,2 µl	32,2 µl
E10	0,1 % HS et 1 % molécule UDB	1,014	38,4 µl	34,1 µl
E11	0,1 % HS et 5 % molécule UDB	1,026	26,3 µl	31,9 µl
E12	0,15 % HS et 0,1 % molécule UDB	1,012	27,3 µl	32,3 µl
E13	0,15 % HS et 1 % molécule UDB	1,014	30,0 µl	29,9 µl
E14	0,15 % HS et 5 % molécule UDB	1,027	30,3 µl	32,6 µl

3.3. Mesure de la viscosité

L'impact de chaque molécule sur la viscosité a été évalué. Deux comportements différents sont observés lorsque les matières premières sont formulées séparément ; la viscosité des solutions de HS augmente avec l'augmentation de la concentration, alors que la viscosité des solutions contenant la molécule UDB est relativement identique quelle que soit la concentration (figures 34 et 35). En effet, cette dernière est responsable d'une certaine viscosité de base, mais l'augmentation de la concentration d'un facteur 50 n'augmente pas la viscosité. Pour les solutions ayant les matières premières en combinaison, la viscosité augmente avec l'accroissement des concentrations des composants (figures 36 et 37).

Dans tous les cas, les formulations ont un comportement rhéofluidifiant ; la viscosité diminue avec l'augmentation du taux de cisaillement, et inversement. Ce comportement est conservé même après application d'un fort taux de cisaillement, ce qui signifie que le réseau polymérique formé n'est pas « cassé ». Le fluide peut également être qualifié de thixotrope car, à contrainte constante (correspondant à un taux de cisaillement constant), la viscosité du fluide évolue ; en effet, au repos (contrainte constante), le fluide revient à sa valeur de viscosité initiale. Ces deux comportements sont très intéressants pour une application ophtalmique car le confort du patient sera plus important lors du clignement de l'œil

(fluidification de la solution), et la viscosité augmentera jusqu'à sa viscosité basale après ouverture des paupières, pour un temps de rétention à la surface oculaire élevé.

A noter que ces essais de viscosité doivent être effectués de nouveau avec un mobile cône plan plus adapté aux faibles viscosités. En effet, le mobile CP42 utilisé est adapté pour des viscosités légèrement plus élevées. Cela se confirme après lecture du couple de torsion ; pour avoir une valeur de viscosité interprétable, le couple de torsion doit être compris entre 10 % et 90 %. Cette valeur dépend de la force appliquée sur un ressort présent dans les viscosimètres et rhéomètres rotatifs. Plus le ressort est soumis à une force importante, plus le couple de torsion sera élevé. Ainsi, par exemple, si le couple de torsion affiché est supérieur à 90 %, cela signifie que le ressort reçoit une force supérieure à ce qu'il est capable de supporter ; il faut alors utiliser un mobile adapté pour des viscosités plus élevées.

Lors des essais réalisés avec le CP42, pour des faibles taux de cisaillement, le couple de torsion était régulièrement inférieur à 10 %. Lorsque tel était le cas, les valeurs de viscosité ont été représentées par un point noir sur les graphiques des figures 34 à 37. Les futures mesures seront donc réalisées avec le mobile CP40. Elles seront effectuées en triplicat sur chacune des formulations développées, pour pouvoir évaluer la répétabilité des résultats.

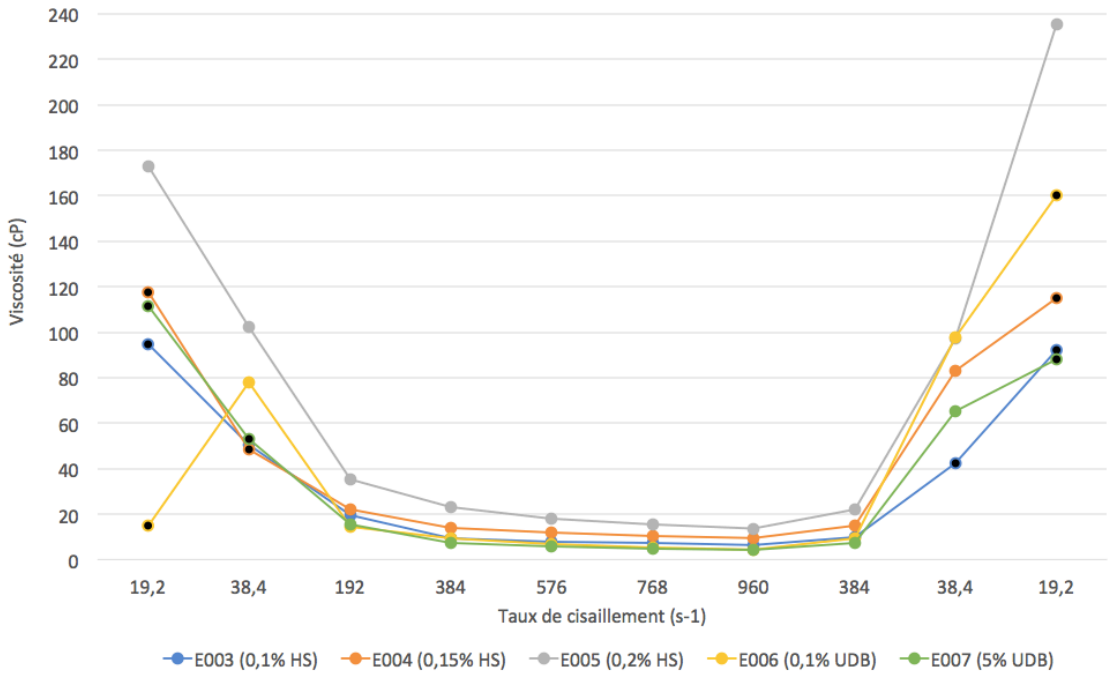


Figure 34 : Résultats de viscosité des formulations contenant une seule matière première à différentes concentrations (n = 1).
En noir sont représentées les valeurs de viscosité pour lesquelles le couple de torsion associé au taux de cisaillement était inférieur à 10 %.

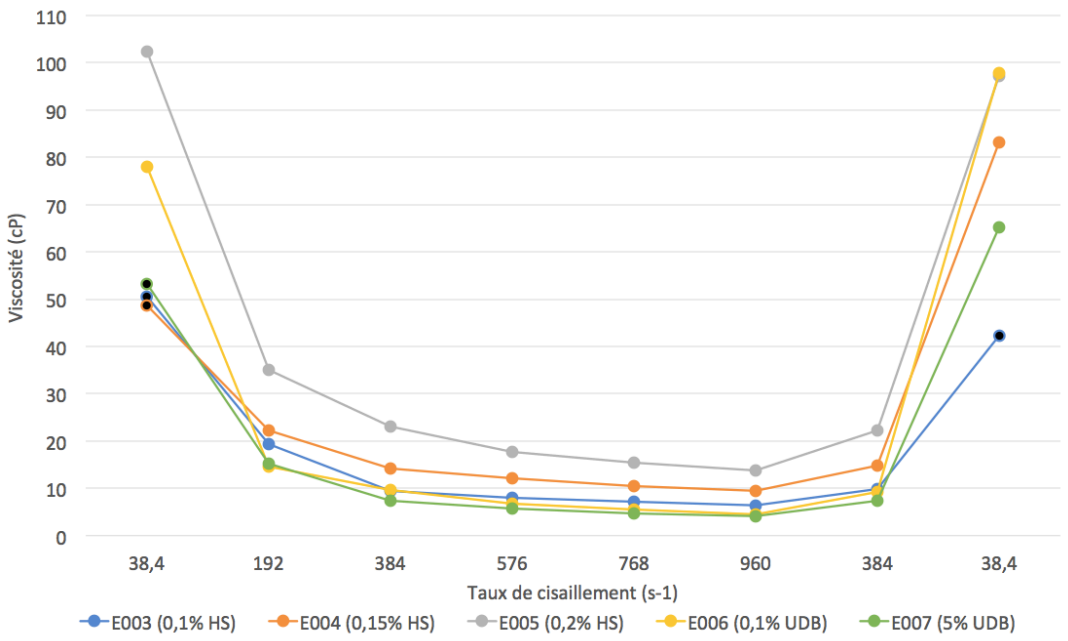


Figure 35 : Résultats de viscosité des formulations contenant une seule matière première à différentes concentrations, pour des taux de cisaillement ayant un couple de torsion associé interprétable (n = 1).

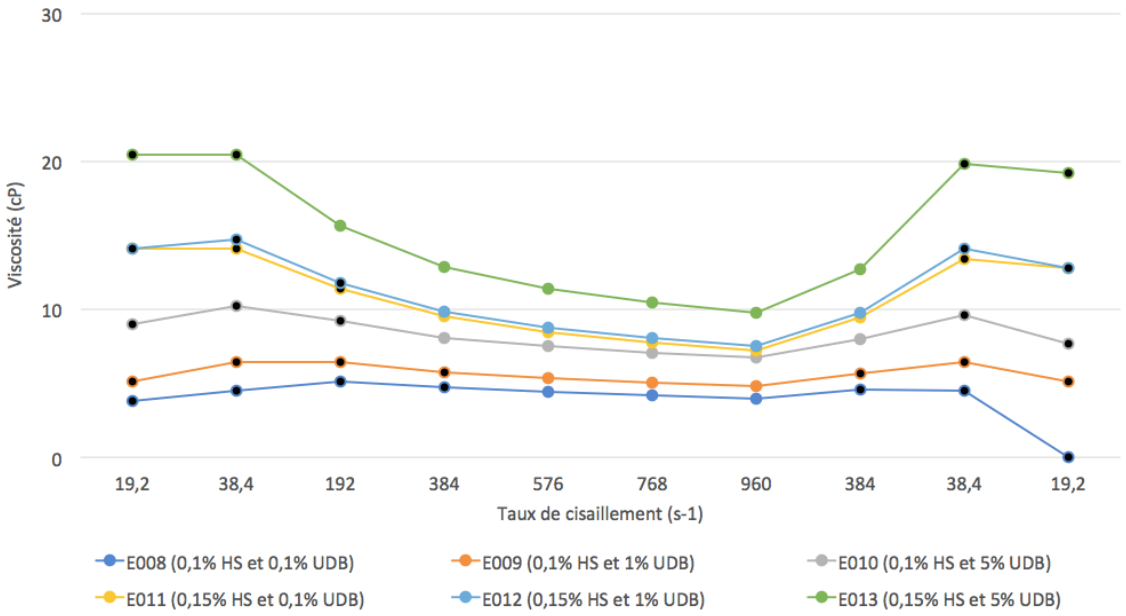


Figure 36 : Résultats de viscosité des formulations contenant les matières premières en combinaison à différentes concentrations (n = 1).

En noir sont représentées les valeurs de viscosité pour lesquelles le couple de torsion associé au taux de cisaillement était inférieur à 10 %.

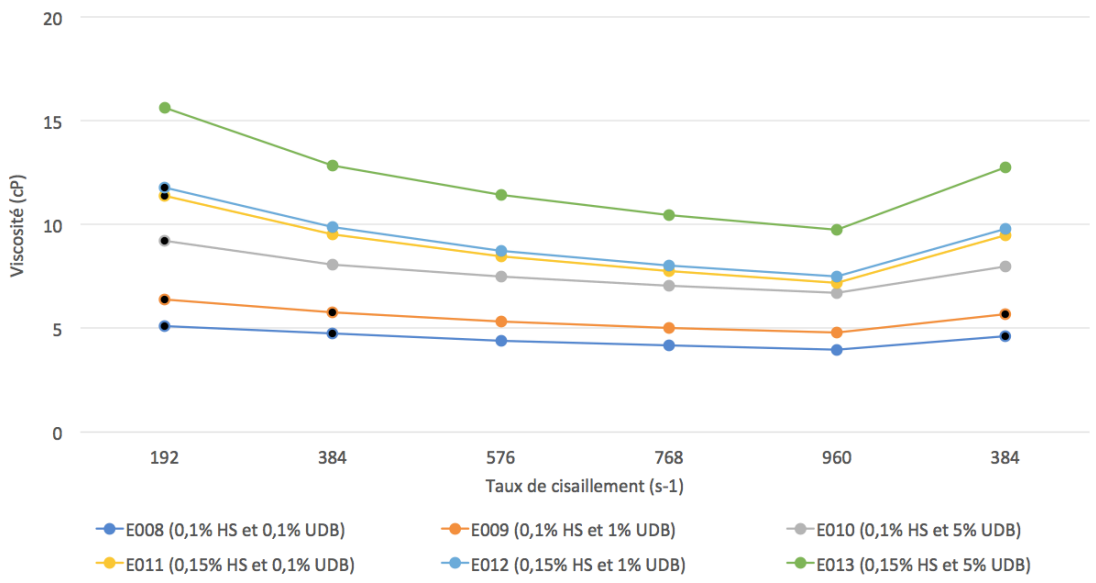


Figure 37 : Résultats de viscosité des formulations contenant les matières premières en combinaison à différentes concentrations, pour des taux de cisaillement ayant un couple de torsion associé interprétable (n = 1).

Concernant le cahier des charges et les valeurs de viscosité ciblées (entre 10 et 30 mPa.s pour une solution au repos, et entre 5 et 15 mPa.s pour une solution soumise à un taux de cisaillement représentatif du cisaillement des paupières), les formulations prometteuses sont les trois formulations contenant 0,15 % de hyaluronate de sodium en combinaison avec la molécule UDB. Ces trois formulations seront également comparées par la suite à la viscosité de produits ophtalmiques présents sur le marché.

3.4. Impact de la stérilisation

En temps normal lors d'un développement, un dosage avant et après stérilisation est réalisé pour évaluer l'impact de la méthode sur la conservation de l'intégrité du principe actif. Pour ce projet, les méthodes analytiques n'ayant pas encore été développées, l'impact de la stérilisation se base uniquement sur les valeurs de viscosité. Cela permet de faire une première interprétation de la destruction ou non des propriétés des matières premières.

Les trois méthodes de stérilisation testées ont été :

- Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes
- Filtration à la seringue par filtre PES
- Filtration à la seringue par filtre PVDF

Les graphiques présentés ci-dessous exposent les taux de cisaillement pour lesquels le couple de torsion associé est majoritairement supérieur à 10 %.

Concernant le HS, l'autoclavage détruit ses propriétés au vu de la viscosité de la formulation diminuée. La filtration par PES et PVDF semble diminuer très légèrement la viscosité de la solution, toutefois le comportement rhéofluidifiant (indispensable pour un confort lors du clignement des paupières) est conservé (figure 38).

La molécule UDB semble quant à elle résister à l'autoclavage et à la filtration. En effet, les valeurs de viscosité sont sensiblement similaires et le fluide reste ici aussi rhéofluidifiant (figure 39).

De façon logique, les formulations en combinaison autoclavées voient leur viscosité diminuer considérablement du fait de la présence de HS. Les formulations filtrées conservent une viscosité similaire à la viscosité initiale (figure 40).

Ainsi, la stérilisation par autoclavage ne semble donc pas adaptée. Cela sera à confirmer grâce à une méthode analytique.

A noter que quel que soit le type de stérilisation effectué, il n'y a eu aucun impact sur le pH, l'osmolalité ou la densité des solutions (annexe 4).

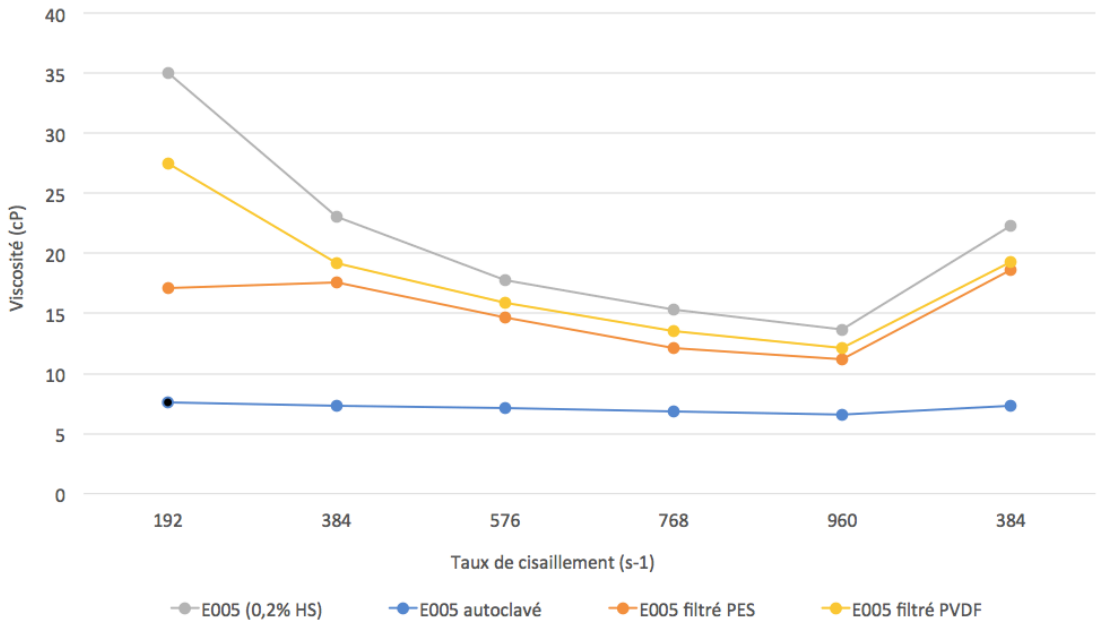


Figure 38 : Résultats de viscosité de la solution de HS seul (0,2 %) après autoclavage et filtration comparé à la viscosité initiale (n = 1).

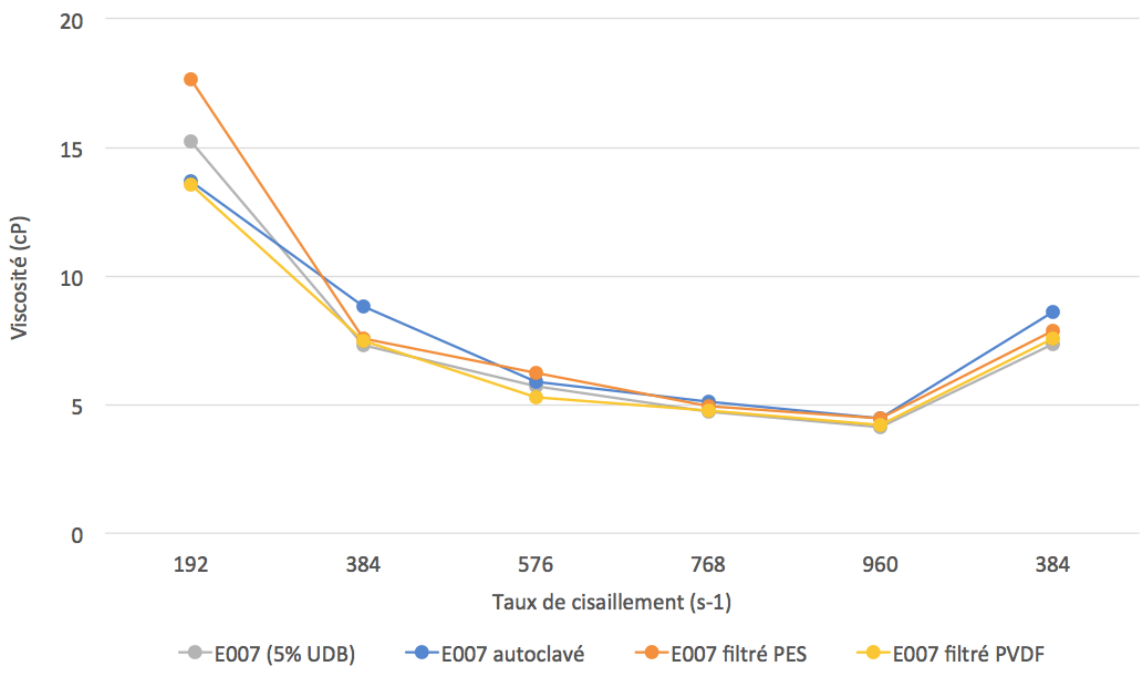


Figure 39 : Résultats de viscosité de la solution de molécule UDB (5 %) après autoclavage et filtration comparé à la viscosité initiale (n = 1).

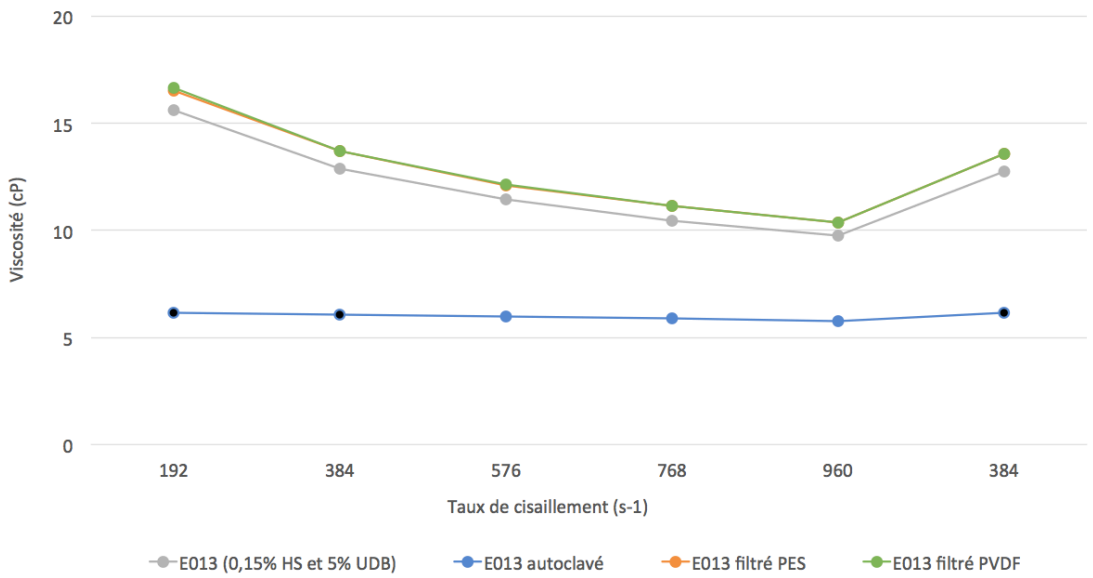


Figure 40 : Résultats de viscosité de la solution contenant les matières premières en combinaison (HS 0,15 % et molécule UDB 5 %) après autoclavage et filtration comparé à la viscosité initiale (n = 1).

Toutefois, les filtrations à la seringue ont été difficiles (colmatage, grande résistance), un test de filtrabilité a ainsi été réalisé pour s'assurer de la faisabilité industrielle.

Cet essai a été réalisé sous pression constante, et l'objectif est d'observer la perte de débit pour estimer un colmatage. En effet, l'évolution du débit sortant est suivie au cours du temps jusqu'au colmatage de la membrane de test, soit un débit en fin de test inférieur à 10 % du débit initial. Les essais ont montré que :

- Après 183,5 minutes de filtration *via* un filtre PES uniquement, le débit est passé de 15,3 mL/min à 4,1 mL/min. Ce débit moyen de 8,4 mL/min équivaut lors d'un passage à plus grande échelle à un débit de 383 L/h sur un filtre de taille 10'' (surface de 5800 cm^2).
- Après 183,5 minutes de filtration *via* un pré-filtre en fibres de verre et un filtre PES, le débit est passé 16,7 mL/min à 10 mL/min. Ce débit moyen de 12,1 mL/min équivaut à un débit de 364 L/h sur un pré-filtre de taille 10'' et un débit de 555 L/h sur un filtre PES de taille 10''.

Ainsi, la filtration *via* un filtre PES uniquement serait plus avantageuse. Toutefois pour tenter de filtrer industriellement une solution de 2 litres en moins de 2 heures, le dimensionnement 20'' d'un filtre PES, doublant ainsi la surface de filtration, pourra être testé.

3.5. Évaluation de la reconstruction cellulaire *in vitro*

3.5.1. Phase I : mise en place du modèle pathologique

Pour rappel, il a été évalué après inflammation à trois concentrations de SDS différentes (0,1 %, 0,01 % et 0,001 %) : la résistance épithéliale, la viabilité cellulaire, le relargage de deux cytokines et les modifications histologiques.

3.5.1.1. Résultats de résistance épithéliale

La résistance épithéliale des cellules permet de mettre en avant une diminution ou non des jonctions serrées entre les cellules. Cette diminution peut être due à un environnement particulier, comme c'est le cas pour ce développement avec la mise en place de l'inflammation. Toutefois, cet indicateur est peu sensible, c'est-à-dire qu'il est significatif uniquement lorsque la résistance épithéliale est diminuée de façon importante. Pour comparaison des valeurs, la destruction complète du tapis cellulaire entraine une TEER inférieure à 120 Ω/cm^2.

Le schéma montrant la résistance des cellules au bout de 24h au contact du SDS est présenté dans la figure 41. Ici, le traitement a débuté à h24, pour finir à h48. L'augmentation de la résistance entre h0 et h24, c'est-à-dire lorsque les cellules n'étaient pas soumises à du SDS, s'explique par la croissance cellulaire dans le milieu de culture. La diminution qui s'en suit à partir de 24h est due à l'inflammation provoquée par le SDS. A partir de h24, la résistance épithéliale diminue faiblement pour les cellules contrôles et celles ayant été en contact avec 0,01 % et 0,001 % de SDS. En revanche pour les cellules en contact avec 0,1 % de SDS, la perte de résistance apparaît de façon plus importante.

Pour formuler autrement, après transport et réception des cellules, celles-ci sont remises dans un milieu de culture neuf (h0). Les cellules, affaiblies le temps du transport, peuvent alors se multiplier, recréant un tapis cellulaire plus important ; la résistance épithéliale augmente. Une fois ces cellules revenues à un état basal, l'apparition d'une inflammation (h24) détruit de façon plus ou moins intense, en fonction de la concentration, les cellules ; la résistance épithéliale diminue.

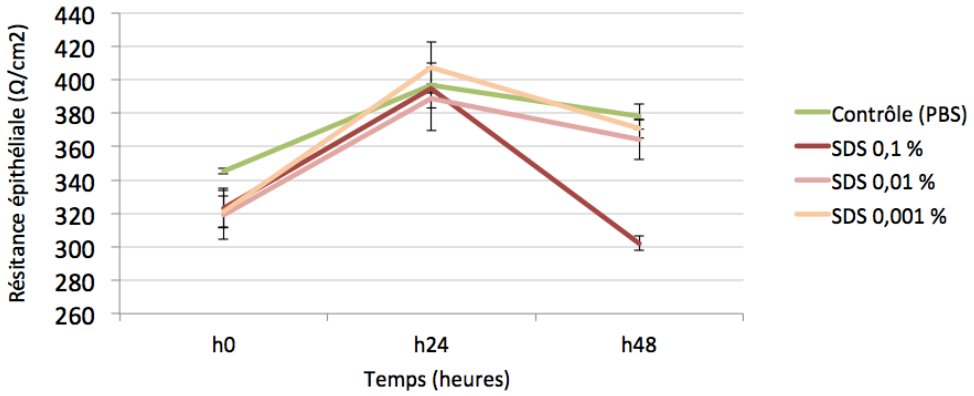


Figure 41 : Résultats de la TEER des cellules ayant été traitées pendant 24h avec du SDS comparé aux cellules contrôles (n = 3).

Le schéma montrant la résistance des cellules après 48h au contact du SDS est présenté dans la figure 42. Le traitement a débuté à h0. De la même façon que le traitement sur 24h, après réception des cellules celles-ci vont se multiplier au contact du nouveau milieu de culture. Or ici l'inflammation est provoquée directement ; une compensation se crée entre le renouvellement cellulaire et l'inflammation tout au long de l'essai. Ainsi, la résistance épithéliale ne diminue pas pour les cellules contrôles et celles soumises à du SDS 0,001 % et 0,01 %. Toutefois, pour les concentrations de SDS à 0,1 %, correspondant à la plus forte inflammation étudiée, la perte cellulaire due à l'inflammation est plus importante que la croissance cellulaire.

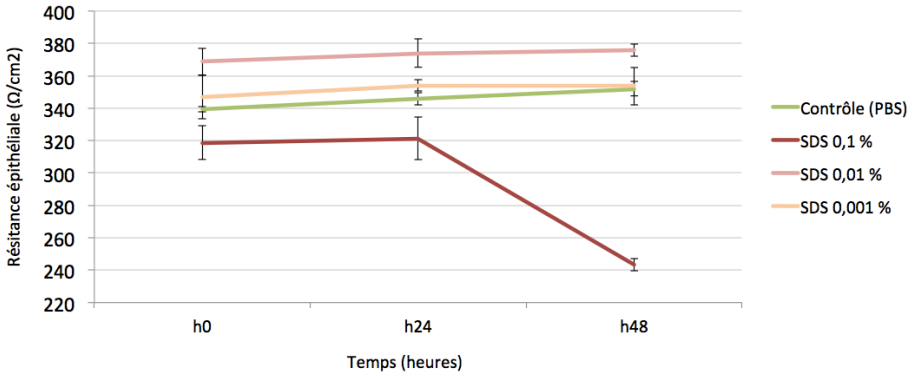


Figure 42 : Résultats de la TEER des cellules ayant été traitées pendant 48h avec du SDS comparé aux cellules contrôles (n = 3).

Toutefois, comme dit précédemment, les valeurs de TEER sont peu sensibles, très dépendantes des conditions de manipulations et les résultats sont donc à étudier avec attention et à coupler à d'autres évaluations.

3.5.1.2. Résultats de viabilité cellulaire

Concernant la viabilité cellulaire, après application de 30 µl de SDS à 0,1 %, celle-ci diminue de 15 % après 24h et d'environ 95 % après 48h. La viabilité diminue d'environ 5 % au bout de 24h et 15 % au bout de 48h pour une quantité de SDS appliquée de 0,01 %. Enfin, après application de 0,001 % de SDS, la viabilité est identique à celle du contrôle à 24h et diminue d'environ 4 % au bout de 48h.

Cela indique que la concentration de SDS à 0,001 % est trop faible pour induire une inflammation significative. Au contraire, l'inflammation causée par la concentration à 0,1 % au bout de 48h est trop importante. En effet, il est souhaité que la viabilité cellulaire soit au-dessus de 50-60 %. La concentration idéale se situe donc entre 0,01 % et 0,1 % de SDS. De ce fait, il a été choisi d'augmenter légèrement la concentration de SDS à 0,02 % pour les étapes suivantes.

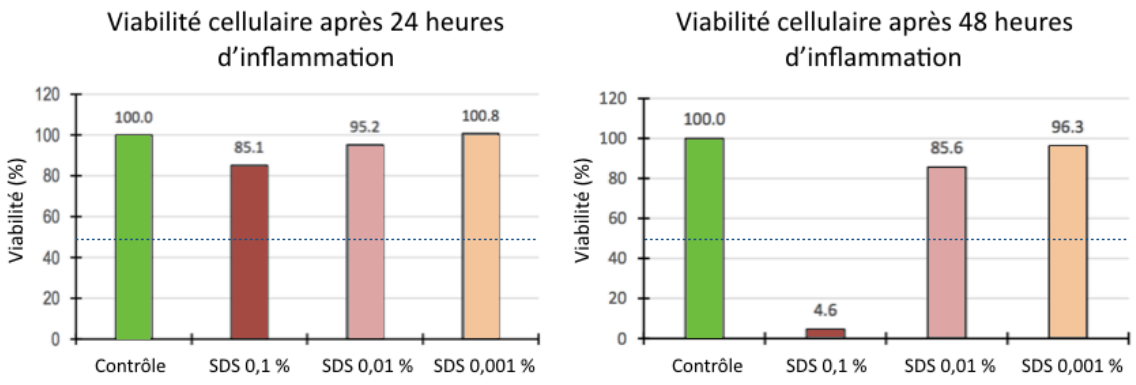


Figure 43 : Résultats de la viabilité cellulaire après 24 ou 48 heures d'inflammation par du SDS (% par rapport au contrôle traité uniquement au PBS) (n = 1).
Les pointillés bleus représentent la limite inférieure tolérée pour une valeur de viabilité cellulaire.

3.5.1.3. Résultats du relargage des cytokines

Concernant le relargage des cytokines, leur concentration présente dans le milieu de culture après 24h et 48h d'inflammation causée par les 3 concentrations de SDS a été dosée. Ce relargage est comparé à un relargage pour des cellules contrôles (figure 44). A l'état basal, l'épithélium cornéen sécrète de l'IL-1 (8), mais les schémas ci-dessous révèlent que la cytokine IL-1α augmente considérablement lors d'une inflammation. De plus, cette augmentation est plus significative que pour la cytokine TNFα. En effet, à des concentrations

de SDS de 0,1 % au bout de 48h, la concentration d'IL1-α relarguée dans le milieu de culture est de 350 pg/ml, contre 8,5 pg/ml pour le TNF-α. Il a donc été choisi de doser uniquement l'IL1-α pour la suite des essais.

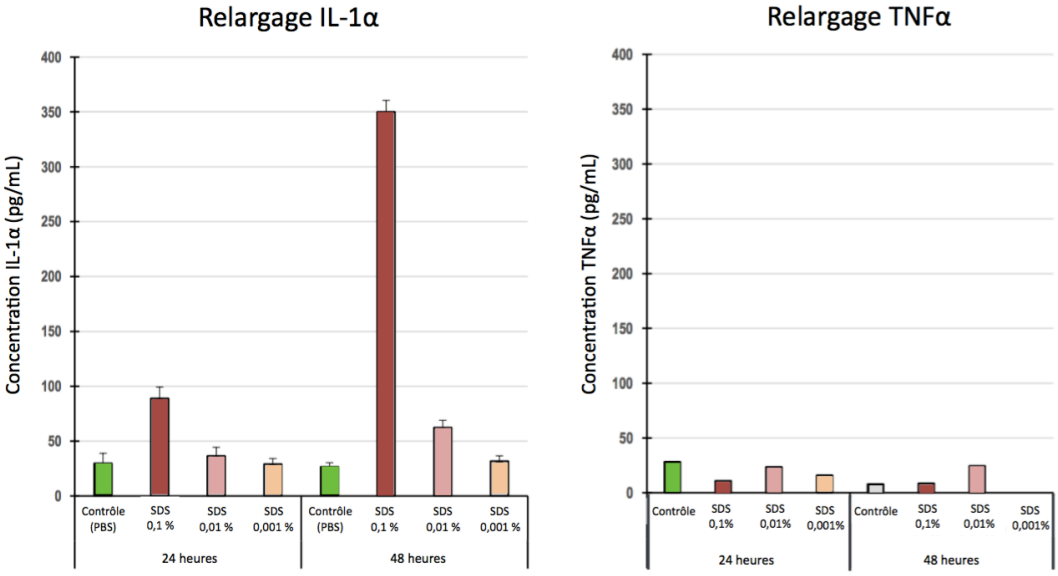


Figure 44 : Résultats des tests ELISA : évaluation de la quantité de cytokines (IL-1α et TNFα) relarguée dans le milieu de culture après 24 et 48h d'inflammation (n = 3).

3.5.1.4. Comparaison des coupes histologiques

L'analyse histologique, au contraire des trois analyses précédentes, permet d'évaluer l'inflammation de façon qualitative. Deux coupes histologiques ont été réalisées à 24h et 48h pour chaque concentration de SDS testée. Elles ont été comparées au contrôle n'ayant reçu que du PBS sur les mêmes durées.

Les résultats à 24 heures sont présentés dans la figure 45. Pour des concentrations de 0,1 %, les cellules se sont déjà séparées de l'insert de culture. Pour des concentrations de 0,01 %, il apparaît de légères vacuoles, synonyme d'un début de dégradation. Les cellules ayant reçu du SDS à 0,001 % sont intactes.

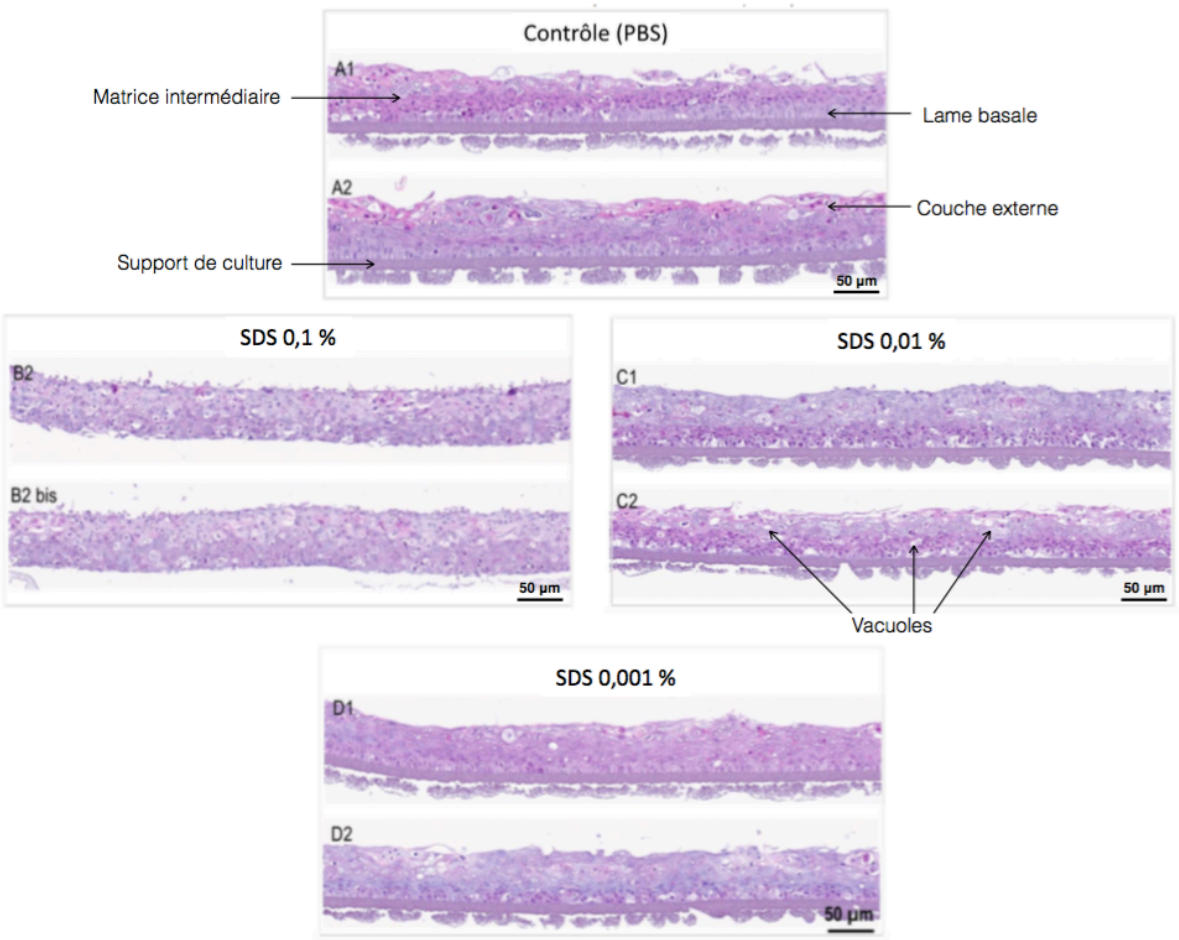


Figure 45 : Coupes histologiques des cellules ayant subi une inflammation pendant 24h (n = 2). Grossissement x40.

Les cellules contrôles traitées au PBS ont une lame basale intacte. La matrice intermédiaire contient 4 à 6 couches cellulaires. L'application de SDS à 0,1 % pendant 24h entraine un décollage des cellules de l'insert, avec l'apparition de vacuoles. La distinction entre la lame basale, la matrice intermédiaire et la couche externe est impossible. La dégradation est moins importante pour des concentrations de SDS inférieures à 0,1 %. Les cellules inflammées avec 0,001 % de SDS semblent intactes.

Les résultats après 48 heures d'inflammation sont présentés dans la figure 46. Les cellules ayant reçu du SDS à 0,1 % ont un épithélium totalement dégradé. Les vacuoles présentent pour les cellules ayant reçu 0,01 % de SDS sont présentes en plus grand nombre comparé à l'état cellulaire au bout de 24 heures. Enfin, les cellules ayant reçu 0,001 % de SDS commencent à se dégrader. Cela confirme que 24h supplémentaires d'inflammation ont amplifié la destruction cellulaire. Ces résultats sont en corrélation avec les résultats de viabilité.

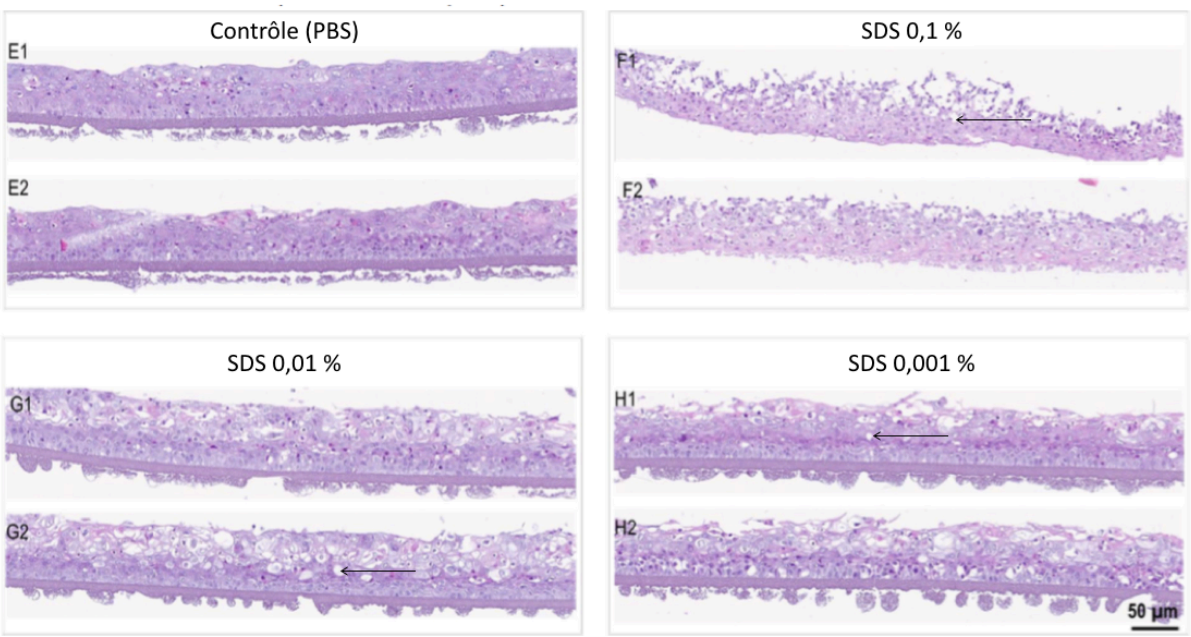


Figure 46 : Coupes histologiques des cellules ayant subi une inflammation pendant 48h (n = 2). Grossissement x40.

De la même façon que sur la figure 45, les cellules contrôles sont intactes. La dégradation cellulaire s'est amplifiée pour toutes les cellules ayant été en contact avec le SDS 24 heures supplémentaires, et ce quelle que soit la concentration de SDS appliquée. Les flèches pointent des vacuoles.

3.5.1.5. Conclusion

Au vu de tous ces résultats, le protocole d'inflammation sélectionné pour la suite des essais consiste en l'inflammation des cellules grâce à du SDS à 0,02 %, sur une durée de 48 heures. Il a été décidé de ne suivre qu'une seule cytokine pour les étapes suivantes, l'IL-1α, car plus sensible aux changements inflammatoires.

3.5.2. Phase II : validation du modèle pathologique

Comme évoqué précédemment, cette étape consiste à démontrer une réparation du tissu cellulaire inflammé après application de formulations connues pour avoir un effet positif dans la sécheresse oculaire.

3.5.2.1. Résultats de résistance épithéliale

Le graphe montrant les résultats de TEER est présenté figure 47. Entre le début et la fin de l'inflammation par SDS (de J-2 à J0), le TEER augmente alors qu'il serait attendu une

diminution. Cela peut s'expliquer par une compensation cellulaire et une multiplication importante des cellules pour contrer cette inflammation. Toutefois, la résistance épithéliale ne varie pas de la même façon que lors de la phase I. Cette différence importante démontre que la variation de résistance épithéliale n'est pas un marqueur fiable, avec une variabilité trop importante et une faible reproductibilité entre deux essais. Entre la fin de l'inflammation (J0) et le 3ème jour de traitement réparateur (J3), la compensation cellulaire ne semble plus avoir lieu et l'inflammation se manifeste par une diminution de la résistance épithéliale. Enfin, sur la fin du traitement (J7), la TEER augmente car les traitements sont efficaces et permettent une amélioration de la cohésion cellulaire. De plus, la tendance dans ces valeurs est similaire quel que soit la condition de traitement.

Comme les valeurs de TEER ne permettent pas de mettre en évidence une différence dans l'efficacité entre les trois traitements testés, il a été décidé de ne pas refaire ce test pour la phase III du projet, qui consiste à évaluer l'efficacité des formulations développées dans la reconstruction cellulaire.

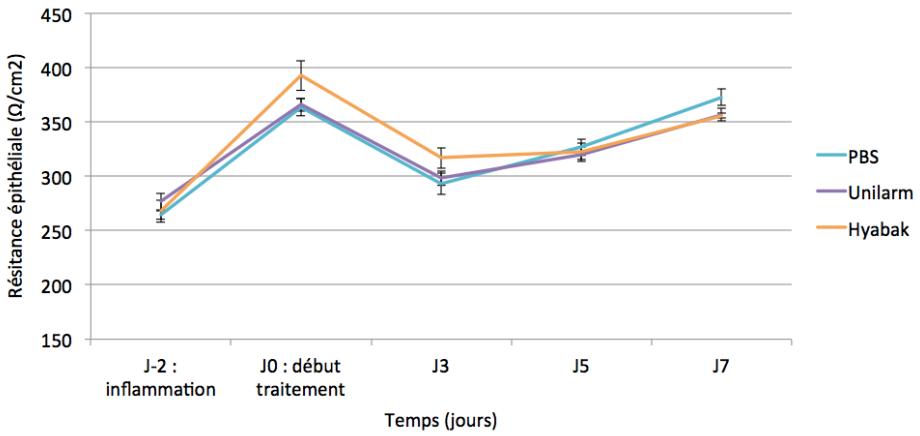


Figure 47 : Résultats de la TEER des cellules après 2 jours de protocole inflammatoire et 7 jours de traitement (n = 3).

3.5.2.2. Résultats de viabilité cellulaire

Les résultats de viabilité cellulaire, présentés dans la figure 48, permettent de faire une meilleure interprétation du comportement cellulaire après application de différentes formulations. Normalisés par rapport au témoin négatif PBS, ils montrent que le PBS et l'Unilarm® ont une efficacité similaire quant à la reconstruction cellulaire. Le Hyabak® semble montrer son efficacité plus lentement : au J5 de traitement, la viabilité cellulaire est inférieure au témoin négatif, pour arriver à une valeur relativement similaire à J7.

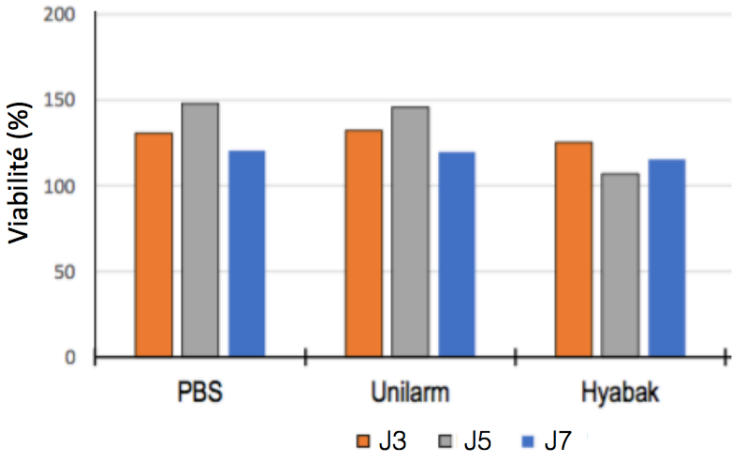


Figure 48 : Résultats de la viabilité cellulaire après application de différents traitements réparateurs durant 7 jours (n = 1).

Les résultats ont été normalisés par rapport à la valeur de viabilité cellulaire à la fin du protocole inflammatoire (J0). Plus explicitement, la valeur de viabilité à la fin de l'inflammation a été ramenée à 100%. Les valeurs sur le graphique supérieures à 100% montrent donc une amélioration, et celles inférieures à 100% une diminution de la viabilité.

3.5.2.3. Résultats du relargage des cytokines

La troisième analyse réalisée est l'évaluation du relargage de la cytokine sélectionnée, l'IL-1α (figure 49). Pour rappel, la quantité basale de cette cytokine est de 29,7 pg/ml (figure 44). À J0, soit à la fin du protocole inflammatoire, la quantité moyenne d'IL-1α est de 98,80 pg/ml. La quantité de cytokine diminue ensuite au début du traitement réparateur (*ie*. J5) puis augmente à J7. La cicatrisation cellulaire étant un mécanisme physiologique faisant intervenir des molécules inflammatoires (135), cette légère augmentation était attendue. Cette analyse démontre toutefois que, malgré ce phénomène physiologique, les trois formulations testées permettent de diminuer l'inflammation.

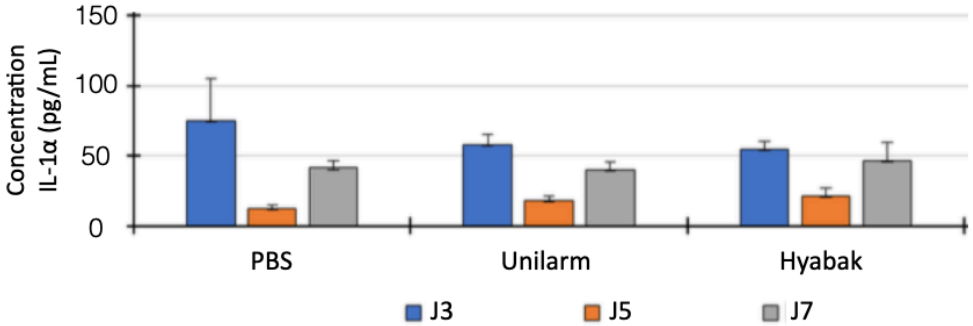


Figure 49 : Résultats des tests ELISA : évaluation de la quantité d'IL-1α relarguée dans le milieu de culture à J3, J5 et J7 de traitement (n = 3).

3.5.2.4. Comparaison des coupes histologiques

L'histologie permet d'observer visuellement la réparation cellulaire et de comparer l'évolution entre nos traitements. Pour rappel, l'efficacité de la reconstruction cellulaire au niveau histologique repose sur 3 observations :

- L'état de la lame basale et la polarisation des cellules.
- La présence d'une matrice intermédiaire, composée d'environ 4-5 couches de cellules.
- L'état de la couche la plus externe, qui, lorsque la réparation cellulaire est complètement efficace, doit se retrouver intacte à la fin du traitement.

L'état cellulaire à la fin du protocole inflammatoire (J0) est présenté dans la figure 50. De nombreuses vacuoles sont observées sur la totalité de l'épaisseur, l'absence de matrice intermédiaire et une lame basale en mauvais état. Cela confirme l'efficacité du protocole inflammatoire sélectionné à l'étape précédente.

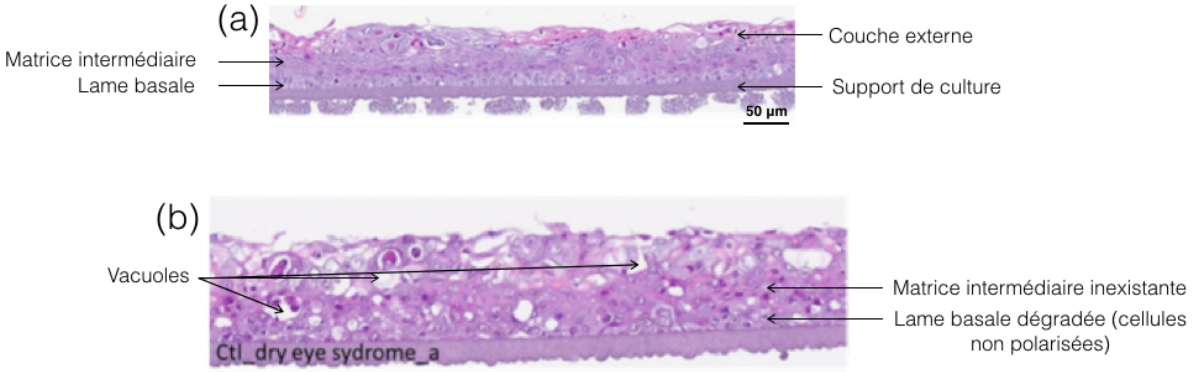


Figure 50 : Coupes histologiques contrôles à J-2 (a) et à la fin du protocole inflammatoire J0 : 0,02 % de SDS pendant 48 heures (b) (n = 2). Grossissement x40.
Comparé aux cellules contrôles (a), les cellules ayant été en contact avec 0,02 % de PBS pendant 48 heures présentent de nombreuses vacuoles. La matrice intermédiaire est inexistante et la lame est dégradée.

Les coupes cellulaires après traitements réparateurs sont présentées dans les figures 51, 52 et 53 et sont comparées aux coupes histologiques de la figure 50.

Le traitement au PBS (figure 51) montre une amélioration cellulaire à J7 : les cellules de la lame basale sont polarisées et la matrice intermédiaire est presque intégralement formée. Toutefois, la couche la plus externe présente toujours des vacuoles.

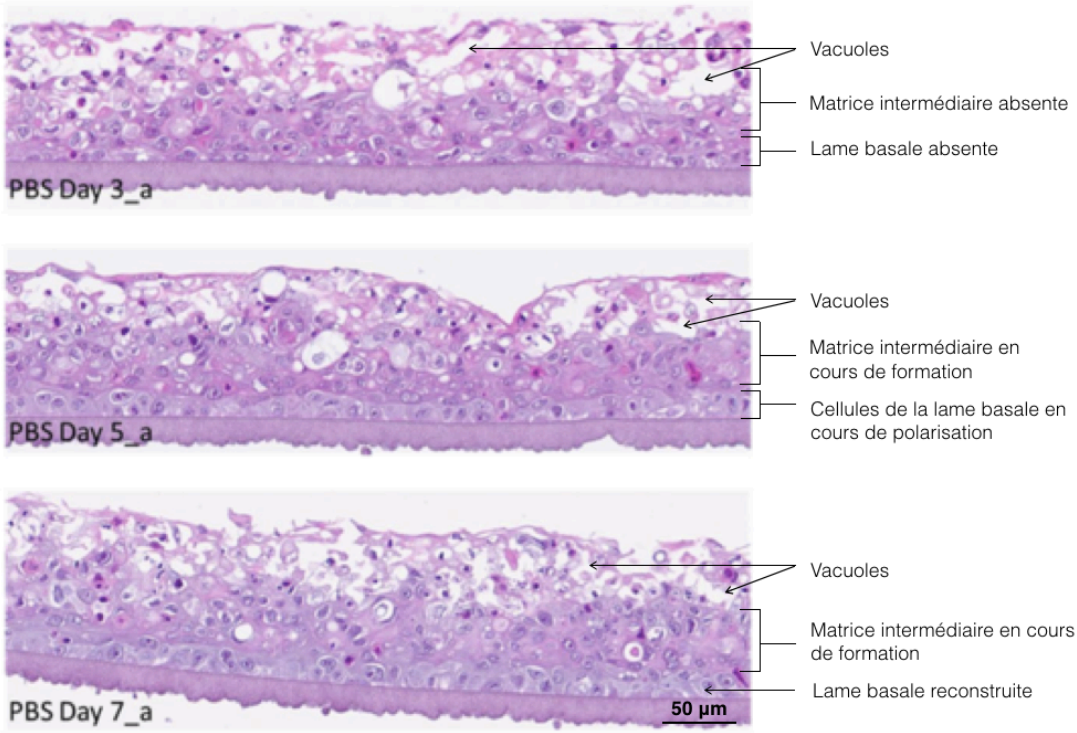


Figure 51 : Coupes histologiques à J3, J5 et J7 de traitement par du PBS (n = 2). Grossissement x40.
La reconstruction cellulaire augmente avec la durée du traitement par du PBS. En effet, entre J3 et J7, la quantité de vacuoles a diminué, la matrice intermédiaire est en partie formée et la lame basale est en bon état.

Le traitement au NaCl 0,9 % (Unilarm®) (figure 52) montre également des résultats satisfaisants au niveau de la lame basale (polarisation des cellules) et la matrice intermédiaire commence à se former. De même qu'avec le PBS, la couche externe n'est pas intacte.

En comparant le PBS et l'Unilarm®, il est toutefois observable que les coupes histologiques ayant été traitées 7 jours avec de l'Unilarm® sont sensiblement similaires aux coupes histologiques ayant été traité avec du PBS pendant 5 jours, ce qui pourrait démontrer une légère infériorité de l'Unilarm®.

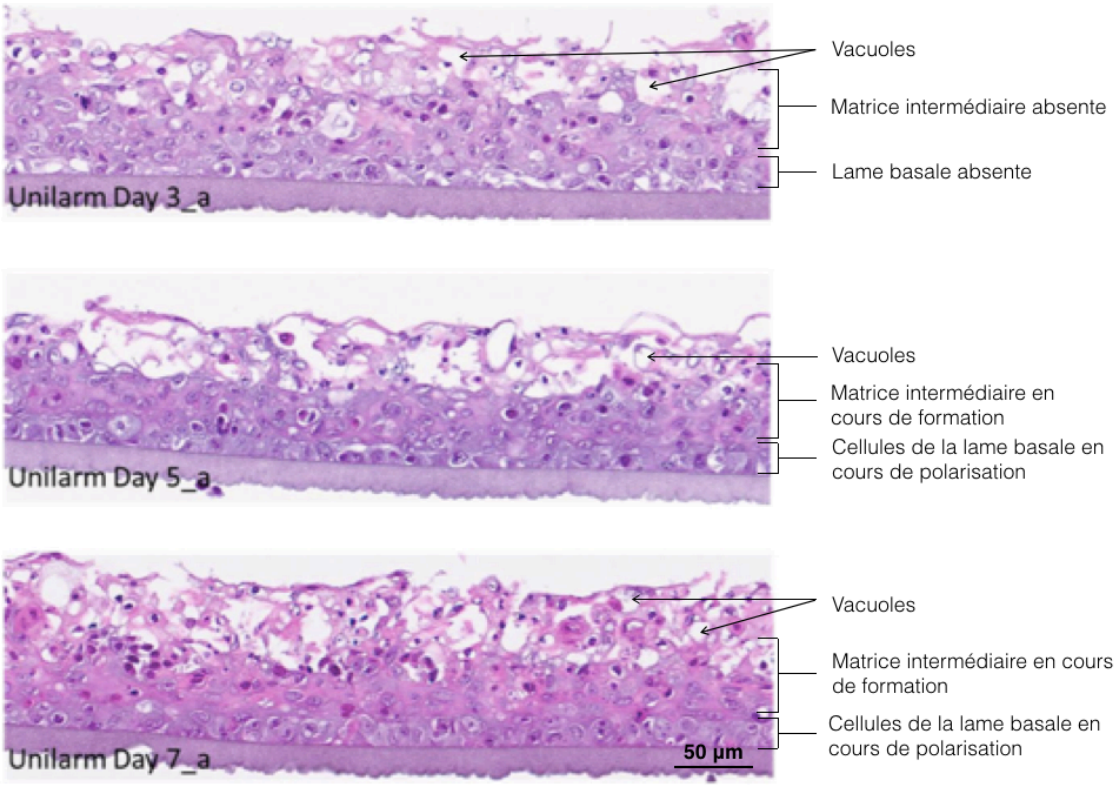


Figure 52 : Coupes histologiques à J3, J5 et J7 de traitement par de l'Unilarm® (n = 2). Grossissement x40.

La reconstruction cellulaire augmente avec la durée du traitement par de l'Unilarm®. En effet, à J5 et J7, la matrice intermédiaire est en cours de formation. Les cellules de la lame sont en cours de polarisation à J7, alors que cette lame basale est inexistante à J3.

Pour les cellules ayant été traitées au Hyabak® (figure 53), la reconstruction cellulaire au niveau histologique est moins concluante, mais concordante avec les résultats de viabilité. En effet, à J5, les cellules sont peu reconstruites. A J7, la lame basale commence à se former lentement avec un début de construction de matrice intermédiaire. La couche externe présente des vacuoles, comme avec le PBS et l'Unilarm®.

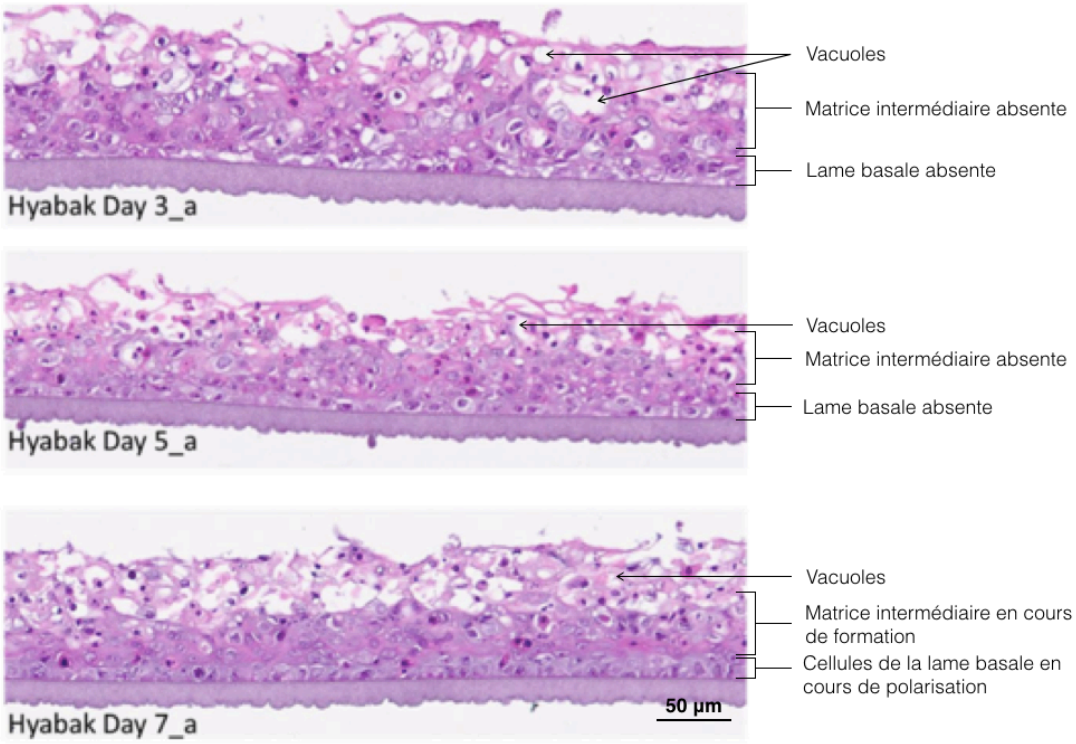


Figure 53 : Coupes histologiques à J3, J5 et J7 de traitement par du Hyabak® (n = 2). Grossissement x40.

La reconstruction cellulaire avec le Hyabak ® est plus lente qu'avec le PBS et l'Unilarm®. A J3 et J5, de nombreuses vacuoles sont présentes, la matrice intermédiaire et la lame basale sont absentes. A J7, les cellules de la lame basale commencent à se polariser et la matrice intermédiaire commence à apparaître. De nombreuses vacuoles sont toujours présentes.

3.5.2.5. Conclusion

Tous ces résultats montrent que le modèle développé lors de la phase I semble fonctionner. En effet, les cellules se régénèrent après une inflammation exogène lorsque l'on applique des formulations connues pour améliorer l'état cellulaire.

Toutefois, le PBS et l'Unilarm® montrent une efficacité à peu près similaire. Le Hyabak® permet une réparation cellulaire plus lente, même si à J7 les valeurs de viabilité sont sensiblement similaires. Deux questions apparaissent :

- Le PBS et l'Unilarm® donnent des résultats positifs dans la réparation cellulaire. Alors que considérés témoins négatifs mais également connu pour être utilisés dans la sécheresse oculaire, ces produits permettent-il un meilleur renouvellement cellulaire comparé à aucune instillation de produit ? En effet, il est considéré que le NaCl 0,9 % apporte un effet bénéfique dans le syndrome de l'œil sec (d'où son utilisation en première intention), mais comment prouver que cette réparation cellulaire est liée à l'instillation de ce produit ? L'objectif est de pouvoir démontrer, si tel est le cas,

qu'un simple renouvellement cellulaire physiologique n'est pas autant efficace dans la réparation cellulaire qu'un traitement connu.

- Le Hyabak® est-il autant ou moins efficace que l'Unilarm, ou est-ce le modèle développé qui ne permet pas de montrer une meilleure efficacité ? Après de plus amples recherches bibliographiques pour essayer de comprendre ces résultats, des documents de la Haute Autorité de Santé (HAS) indiquent que, pour la réparation cellulaire, le HS à 0,15 % ou 0,18 % comparé à une solution saline à 0,9 % n'entraine pas une meilleure amélioration (différence non significative). La différence entre ces deux matières premières et l'intérêt du HS par rapport à une solution saline résulte dans la capacité de rétention d'eau très élevée du HS (136), (137). Ceci pourrait permettre une meilleure efficacité du hyaluronate de sodium à 0,15 % comparé à des formulations n'en contenant pas, comme une solution saline (138).

Le modèle cellulaire développé semble donc réellement adapté. Pour répondre aux questions persistantes, des améliorations sur cette étape doivent être effectuées. Tout d'abord, la durée du protocole de 7 jours se révèle être trop courte ; un allongement à 10 jours permettra d'évaluer la reconstruction sur du plus long terme.

Ensuite, il faut démontrer que l'Unilarm® et le PBS amènent une réelle amélioration et ne sont donc pas de « vrais témoins négatifs ». Des analyses seront faites sur des cellules ne recevant aucun produit.

Enfin, des recherches bibliographiques seront réalisées pour trouver un médicament ayant été démontré, lors de différentes analyses *in vitro*, comme plus efficace dans la reconstruction cellulaire que du NaCl 0,9 %. L'efficacité de cette molécule sera testée afin de mettre en évidence une différence significative d'efficacité avec le NaCl 0,9 %.

Ainsi, dues aux incertitudes qui sont apparues sur cette phase II, il a été décidé stratégiquement de refaire cette étape avec les nouveaux paramètres cités ci-dessus.

3.5.3. Phase III : évaluation de l'efficacité de la reconstruction cellulaire

Cette étape n'a pas été encore réalisée, au vu des résultats obtenus lors de la phase II. L'objectif de cette phase III sera de démontrer, grâce au modèle cellulaire développé, un réel intérêt de nos formulations contenant une combinaison de HS et de molécule UDB. En effet, la molécule UDB est connue pour posséder d'importantes capacités de reconstruction cellulaire et jouer un rôle indispensable dans la composition cellulaire de la cornée. Une potentielle synergie entre ces deux molécules peut donc être une avancée majeure dans le traitement de la pathologie.

4. CONCLUSION

A ce stade du projet, de nombreuses informations concernant la faisabilité de la formulation et son potentiel intérêt dans le syndrome de l'œil sec ont été obtenues.

En effet**, les formulations développées contenant les matières premières en combinaison répondent en grande partie au cahier des charges initialement fixé.** Même en dehors des limites fixées, le pH et l'osmolalité des formulations restent dans les valeurs tolérées par l'œil. Ainsi, en fonction de l'avancée du projet et des formulations les plus prometteuses, des ajustements pourront être faits par rapport au cahier des charges initial.

Pour rappel, les formulations réalisées contiennent 0,1 % ou 0,15 % de hyaluronate de sodium, en combinaison avec 0,1 %, 1 % ou 5 % de molécule UDB. Ces deux molécules sont solubilisées dans un tampon phosphate. Le procédé de fabrication établi permet une solubilisation aisée de chacune des matières premières, même si un des paramètres les plus critiques reste le temps de solubilisation de chaque composé.

Concernant la **caractérisation des formulations**, les gouttes sortant du conditionnement d'un collyre ont un volume aux alentours de 25-30 µl, ce qui correspond à la taille de goutte idéale lors d'une instillation oculaire. La mesure de la viscosité a donné des résultats intéressants : le collyre est rhéofluidifiant et, même si les essais seront à réaliser avec un mobile cône plan plus adapté, les premières valeurs répondent au cahier des charges pour les formules contenant 0,15 % de HS. Cela signifie que le collyre n'entrainera pas de flou visuel important et qu'il se fluidifiera lors du clignement des paupières, le tout pour un confort optimal du patient. De plus, la formulation devrait rester à la surface cornéenne suffisamment longtemps pour permettre aux matières premières d'interagir avec l'épithélium et ainsi avoir une action thérapeutique. Les essais de stérilisation ont permis de montrer que nos solutions contenant les matières premières en combinaison ne tolèrent pas un autoclavage mais peuvent être filtrées, *via* un filtre PES. Cela permet de conclure que la filtrabilité au niveau industriel est réalisable.

Les **résultats de culture cellulaire et les incertitudes associées** montrent la difficulté de développer un modèle cellulaire pathologique. De nombreux ajustements sont nécessaires avant d'arriver à un modèle fiable, efficace et reproductible. Toutefois, la phase I qui consistait à mettre en place le modèle représentant une sécheresse oculaire a été réalisée avec succès. En effet, le relargage dans le milieu de culture de cytokines, la diminution de la TEER et de la viabilité cellulaire ainsi que les analyses histologiques ont permis de mettre en évidence la dégradation du tapis cellulaire après une inflammation provoquée par du SDS. La phase II, qui consistait à montrer que les cellules peuvent se régénérer après applications de traitements réparateurs a montré des résultats moins concluants. C'est pour cela que cette phase sera réalisée une seconde fois, avec des

modifications dans le protocole (allongement de la durée de l'essai, ajout d'un contrôle, tests de nouvelles formulations).

Un point important qui n'a pas pu être évalué lors de ce projet est le **dosage analytique des deux matières premières**. En effet, le site Unither Développement Bordeaux n'est pas équipé à ce jour pour pouvoir doser le HS ou la molécule UDB. Il n'a pas non plus été possible de sous-traiter ces dosages. Ce manque peut impacter les résultats pour les essais de reconstruction cellulaire *in vitro* car il a été fourni au sous-traitant Oroxcell des solutions stériles qui ont été préalablement filtrées par un filtre PES, et il n'y a aucune certitude quant à la quantité finale de matières premières dans la solution. Toutefois, les essais de filtrabilité basés sur une mesure de viscosité montrent que les molécules semblent passer à travers le filtre sans y être retenues, pour se retrouver dans la solution finale.

Les prochaines étapes consistent principalement à obtenir **la suite des résultats de l'évaluation de la reconstruction cellulaire *in vitro* (phase II et III),** et à **développer une méthode de dosage fiable et reproductible**. Si ces résultats sont positifs et encourageants, la formule galénique pourra être optimisée (choix de différents tampons, choix des concentrations définitives, ajustement définitif du pH, de l'osmolalité). De plus, des essais de bioadhésion et des mesures du temps de résidence à la cornée pourront être réalisés. De même pour des essais tribologiques, consistant en l'évaluation des frottements entre la paupière et la cornée sans et avec application de la formulation, et ainsi permettant d'évaluer le pouvoir lubrifiant de cette dernière. Enfin, la toxicité oculaire pourra être évaluée, *in vivo* ou *in vitro*.

CONCLUSION GENERALE

La fragilité et la complexité anatomique de l'œil obligent le galéniste à faire face à de nombreux challenges lors du développement d'une forme oculaire. Composée de trois couches cellulaires distinctes, la cornée effectue une sélection stricte dans le passage de molécules chimiques ; un passage cornéen optimal a lieu pour une molécule ayant des propriétés à la fois lipophile et hydrophile. De plus, ensembles, la cornée, le film lacrymal et les paupières permettent une première protection contre les agressions extérieures, et l'instillation oculaire est considérée comme telle. Mais en connaissant de mieux en mieux les barrières anatomiques ainsi que les caractéristiques et intérêts des matières premières utilisées, le formulateur arrive aujourd'hui à surpasser de nombreux problèmes, autrefois bloquants pour le développement d'un médicament.

Comme évoqué dans l'étude bibliographique, les pathologies peuvent atteindre toutes les zones de l'œil ; un niveau superficiel comme dans la sécheresse oculaire ou un niveau plus profond comme la rétine, cette dernière étant impliquée dans la DMLA.

En fonction de la pathologie et de la zone impactée, le choix de la voie d'administration se révèle très important. Une application topique grâce à des collyres pour une action superficielle est le choix le plus adapté ; moins visqueux que les gels et les pommades, ils sont mieux tolérés par le patient. Au contraire, dans les maladies rétiniennes, la forme privilégiée sera l'injection intra-vitréenne. Cette forme est efficace pour son administration directement au site d'action souhaité, mais elle est aussi responsable d'effets indésirables qui peuvent avoir de graves conséquences. C'est pourquoi la forme sélectionnée dans le développement d'un médicament oculaire doit être évaluée avec attention, en prenant en compte chaque avantage et inconvénient que cela apporte, tout en garantissant une réelle efficacité et une bonne observance.

Un des objectifs principaux des développements ophtalmiques reste l'amélioration de la biodisponibilité oculaire lors d'une instillation par voie topique. En effet, le faible passage cornéen impose un nombre d'instillations très élevé. Ressenti par le patient comme contraignant et pouvant entrainer une diminution de l'observance, il apparaît inévitable des optimisations lors du développement des formes ophtalmiques. Pour cela, diverses stratégies galéniques sont mises en place : l'amélioration de la solubilité des principes actifs, l'augmentation du temps de résidence des collyres par modification de la viscosité et utilisation de molécules bioadhésives, ainsi que l'augmentation de la perméabilité de la cornée. Ainsi, les objectifs sont d'augmenter l'efficacité du médicament et de diminuer le nombre d'applications, le tout en diminuant les effets indésirables.

En plus d'une forme adaptée et d'une biodisponibilité élevée, le médicament oculaire doit être bien toléré par l'œil et se doit de respecter de nombreux critères de qualité comme, entre autres, la stérilité. Idéalement, les matières premières pouvant être toxiques

pour l'œil doivent être éliminées ; il existe désormais de nombreuses alternatives à ces composants controversés.

À ce jour, beaucoup de systèmes oculaires permettent d'améliorer le confort du patient, tant dans le mode d'administration (formes topiques à libération prolongée) que dans la tolérance (formes sans conservateur) ou encore dans l'efficacité du médicament, comme cela a été le cas dans la partie expérimentale de cette thèse.

La pathologie développée dans cette seconde partie était la sécheresse oculaire. Très fréquente et très invalidante au quotidien, elle est caractérisée par un manque d'humidification de l'épithélium cornéen, entrainant une hyperosmolarité et des microlésions oculaires. Cela entraine un renouvellement cellulaire physiologique plus lent et moins efficace, amplifiant la moindre humidification et la dégradation cellulaire ; la sécheresse oculaire résulte d'un véritable cercle vicieux. De nombreux traitements peuvent être proposés au patient en fonction des causes et du stade de la pathologie. La tolérance étant très subjective, seul le patient sera apte à dire quel traitement lui convient le mieux. Toutefois, les microlésions cornéennes sont peu réparées avec les traitements actuels, ce qui oblige souvent le patient à se traiter sur du très long terme. Cette thèse avait ainsi pour objectif de développer une forme contenant une matière première jusqu'alors jamais utilisée. Celle-ci, en combinaison avec le hyaluronate de sodium, pourrait permettre une synergie et une meilleure efficacité dans la réparation des lésions cornéennes. Le projet n'ayant pas encore touché à sa fin, certaines interrogations quant à l'efficacité subsistent.

Pour conclure, le développement galénique dans sa généralité est une discipline faisant face à des challenges permanents. Comme l'a montré la partie expérimentale, de nombreux ajustements sont à faire tout au long d'un projet de développement pour aboutir à un médicament qui sera stable et optimisé. En effet, étape indispensable pour la mise sur le marché d'un médicament, le développement galénique, et *in fine* le développement d'un médicament se déroulent sur plusieurs mois voire plusieurs années. Cette période est nécessaire et permet d'avoir un produit sortant qui respecte les critères de qualité, efficacité et sécurité. L'objectif final étant de transposer le développement à une plus grande échelle et de produire le médicament de façon reproductible.

Les techniques de développement évoluant chaque jour, il est indispensable pour le galéniste de se renseigner continuellement sur les nouvelles approches existantes. Le formulateur se doit d'avoir une vision globale des problématiques, challenges, enjeux et opportunités qui se trouvent autour de lui, pour pouvoir développer un médicament adapté au patient. Ainsi, chaque secteur de l'industrie pharmaceutique travaille en collaboration étroite avec les secteurs du développement, pour pouvoir proposer de nouveaux médicaments personnalisés permettant de traiter de nombreuses pathologies, dont certaines étaient jusqu'alors laissées de côté.

BIBLIOGRAPHIE

1. BROSSARD D, CRAUSTE-MANCIET S. Formes ophtalmiques. Bioméd Pharma - Médicam Prod Pharm [Internet]. 10 déc 2014 [cité 17 mars 2021]; Disponible sur: https://www-techniques-ingenieur-fr.docelec.u-bordeaux.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/mise-en-forme-des-medicaments-et-autres-produits-de-sante-42611210/formes-ophtalmiques-pha2018/
2. Bonnet G, Furelaud G. L'œil : structure, origine et propriétés physiques [Internet]. Planet-Vie. 2004 [cité 13 mars 2021]. Disponible sur: https://planet-vie.ens.fr/thematiques/animaux/systeme-nerveux-et-systeme-hormonal/l-oeil-structure-origine-et-proprietes
3. Anatomie de l'œil [Internet]. microbiologiemedicale.fr. [cité 13 mars 2021]. Disponible sur: https://microbiologiemedicale.fr/anatomie-oeil/
4. DARIE M. Oeil, collyres et conservateurs : le chlorure de benzalkonium : conséquences et alternatives de conservation des collyres à usage domestique. Bordeaux; 2020.
5. La cornée [Internet]. Centre de la cornée et du kératocône. [cité 14 avr 2021]. Disponible sur: https://www.centre-cornee-keratocone.com/content/la-corn%C3%A9e
6. Dupin O, Trinquand C. Les voies de pénétration endoculaire. J Fr Ophtalmol. juin 2000;23(5):501-4.
7. Allouch-Nahmias C, Goldschmit P, Borderie V. Anatomie de la cornée [Internet]. EM-Consulte. 2011 [cité 15 mars 2021]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/article/292150/anatomie-de-la-cornee
8. Pisella P jean, Baudouin C, Hoang-Xuan T. Le concept de surface oculaire. In: Surface oculaire [Internet]. Elsevier Masson; 2015 [cité 21 mars 2021]. (Société Française d'ophtalmologie). Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100012.html
9. Bourges J-L. Chapitre 1 - Anatomie de la cornée. In: Bourges J-L, éditeur. La Cornée [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2020 [cité 15 avr 2021]. p. 1-9. Disponible sur: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978229476748700001X
10. Tsubota K. Tear dynamics and dry eye. Prog Retin Eye Res. 1 oct 1998;17(4):565-96.
11. Cheminement des larmes : un schéma pour comprendre [Internet]. Docteur Michael GENSBURGER. [cité 13 avr 2021]. Disponible sur: http://ophtalmo.gensburger.docvitae.fr/8/post/2013/10/cheminement-des-larmes-un-schema-pour-comprendre.html
12. Sécheresse oculaire - description et causes de la maladie | URSAPHARM [Internet]. Evotears BEFR. [cité 1 avr 2021]. Disponible sur: https://evotears.com/befr/secheresse-oculaire/
13. Lozato P-A, PIsella P-J, Baudouin C. Phase lipidique du film lacrymal : physiologie et pathologie. J Fr Ophtalmol. juill 2001;24(6):643.
14. Demouveaux B, Gouyer V, Magnien M, Plet S, Gottrand F, Narita T, et al. La structure des mucines conditionne les propriétés viscoélastiques des gels de mucus. médecine/sciences. 1 oct 2018;34(10):806-12.
15. Lerroux N. La sécheresse oculaire [Internet]. [Grenoble]: Unviersité Joseph Fourier; 2002 [cité 2 mars 2021]. Disponible sur: https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01242834/document
16. Muraine M, Gueudry J, Duchesne B, Majo F. Ulcères chroniques de la cornée. Laboratoires Théa. :15-27.
17. Gatinel D. La cornée [Internet]. 2014 [cité 18 avr 2021]. Disponible sur: https://www.gatinel.com/recherche-formation/la-cornee/
18. Borderie V, Touzeau O, Bourcier T, Laroche L. Physiologie de la cornée. Emc - Ophtalmol. 1 mai 2005;2:103-17.
19. Couture C. Etude de la guérison des plaies cornéennes grâce à la cornée reconstruite par génie

tissulaire [Internet] [Mémoire]. Université Laval; 2016 [cité 8 avr 2021]. Disponible sur: https://corpus.ulaval.ca/jspui/bitstream/20.500.11794/27112/1/32726.pdf
20. Carrier P. Reconstruction in vitro de cornées humaines par génie tissulaire : étude de la variabilité des cellules épithéliales de cornées humaines en culture primaire, de la réépithélialisation cornéenne et du rôle des fibroblastes dans la différenciation et la stratification des cellules épithéliales. [Québec]: Université de Laval; 2006.
21. Maharjan AS, Pilling D, Gomer RH. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially regulate human fibrocyte differentiation. PloS One. 2011;6(10):1-10.
22. Hopitaux Universitaires Genève. Le syndrome de l'oeil sec [Internet]. 2018 [cité 24 mars 2021]. Disponible sur: https://www.hug.ch/sites/interhug/files/documents/oeil_sec.pdf
23. Définition de la sécheresse oculaire [Internet]. Théa. [cité 2 avr 2021]. Disponible sur: https://www.laboratoires-thea.com/fr/definition-de-la-secheresse-oculaire
24. Zhao F, Ma J. Will the long-term use of atropine eye drops in children increase the risk of dry eye? Med Hypotheses. 1 nov 2019;132:109331.
25. Smith JA. The Epidemiology of Dry Eye Disease: Report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). Ocul Surf. 1 avr 2007;5(2):93-107.
26. Lemp MA, Baudouin C. The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). Ocul Surf. 1 avr 2007;5(2):75-92.
27. DUPREZ J. Traitements innovants dans la sécheresse oculaire: revues de la littérature et des études en cours [Internet]. Université de Picardie Jules Verne; 2017 [cité 12 avr 2021]. Disponible sur: https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01997113/document
28. Pisella P-J, Baudouin C, Hoang-Xuan T. L'oeil sec. In: Surface oculaire [Internet]. Elsevier Masson; 2015. (Société Française d'ophtalmologie). Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100015.html
29. Baudouin C, Rousseau A, Tahiri Joutei Hassani R, Labetoulle M. Stratégies thérapeutiques dans la sécheresse oculaire. In: Surface oculaire [Internet]. Elsevier Masson; 2015 [cité 14 sept 2021]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100035.html
30. Casse DG. Approche moderne du syndrome sec oculaire. Prat En Ophtalmol. janv 2015;9(79):18-22.
31. Albou-Ganem C, Amar R. Nouvelle approche diagnostique et thérapeutique de l'oeil sec. Prat En Ophtalmol. janv 2012;6(50):23-9.
32. Official SPEED Questionnaire.pdf [Internet]. [cité 16 avr 2021]. Disponible sur: https://dryeyeandmgd.com/wp-content/uploads/2017/04/Official-SPEED-Questionnaire.pdf
33. PIsella P jean, Baudouin C, Hoang-Xuan T. Explorations. In: Surface oculaire [Internet]. Elsevier Masson; 2015 [cité 1 avr 2021]. (Société Française d'ophtalmologie). Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100013.html
34. Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear Film Osmolarity: Determination of a Referent for Dry Eye Diagnosis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1 nov 2006;47:4309-15.
35. McDonnell A, Lee J, Makrai E, Yeo LY, Downie LE. Tear Film Extensional Viscosity Is a Novel Potential Biomarker of Dry Eye Disease. Ophthalmology. 1 août 2019;126(8):1196-8.
36. Pflugfelder SC. Management and Therapy of Dry Eye Disease: Report of the Management and Therapy Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). Ocul Surf. 1 avr 2007;5(2):163-78.
37. Doan S. Les substituts lacrymaux : quand et quelle molécule pour quelle situation. Cah Ophtalmol. oct 2013;(173):43-5.
38. Kojima T, Dogru M, Kawashima M, Nakamura S, Tsubota K. Advances in the diagnosis and treatment of dry eye. Prog Retin Eye Res. 1 sept 2020;78:1-26.

39. Doan S. Prise en charge thérapeutiques de l'oeil sec. Réal Ophtalmol. mars 2013;(201):45-7.
40. De Loubens C. La rhéologie des substituts lacrymaux au service de l'olphtamologiste. Comptes Rendu Société Olphtamologie Paris. 1 oct 2009;Octobre:1-23.
41. PIsella P jean, Baudouin C, Hoang-Xuan T. Substituts lacrymaux. In: Surface oculaire [Internet]. Elsevier Masson; 2015 [cité 12 avr 2021]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100027.html
42. Rowe R, Sheskey P, Owen S. Handbook of Pharmaceuticals Excipients. Fifth Edition.
43. PIsella P-J, Baudouin C, Hoang-Xuan T. Principes thérapeutiques : galénique. In: Surface oculaire [Internet]. Elsevier Masson; 2015 [cité 16 avr 2021]. (Société Française d'ophtalmologie). Disponible sur: https://www.em-consulte.com/em/SFO/2015/html/file_100026.html
44. Kanski JJ. Chapitre 7 - Œil sec. In: Kanski JJ, éditeur. Précis D'Ophtalmologie Clinique (Deuxième Édition) [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2012 [cité 16 avr 2021]. p. 115-20. Disponible sur: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9782810101542000070
45. Pouliquen P. Les gels de carbomère dans le traitement de l'œil sec. J Fr Ophtalmol. sept 1999;22(8):903.
46. Sodium (hyaluronate de) [Internet]. EDQM - European Pharmacopoeia 10.4. [cité 12 avr 2021]. Disponible sur: https://pheur.edqm.eu/app/10-3/content/default/1472F.htm
47. Saettone MF, Chetonie P, Tilde Torracca M, Burgalassi S, Giannaccini B. Evaluation of muco-adhesive properties and in vivo activity of ophthalmic vehicles based on hyaluronic acid. Int J Pharm. 1 mai 1989;51(3):203-12.
48. Johnson M, Murphy P, Boulton M. Effectiveness of sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eye. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Für Klin Exp Ophthalmol. 1 févr 2006;244:109-12.
49. Mengher L, Pandher K, Bron A, Davey C. Effect of sodium hyaluronate (0·1%) on break-up time (NIBUT) in patients with dry eyes. Br J Ophthalmol. 1 juill 1986;70:442-7.
50. Vogel R, Crockett RS, Oden N, Laliberte TW, Molina L. Demonstration of Efficacy in the Treatment of Dry Eye Disease with 0.18% Sodium Hyaluronate Ophthalmic Solution (Vismed, Rejena). Am J Ophthalmol. 1 avr 2010;149(4):594-601.
51. Debbasch C, Salle S, Brignole F, Rat P, Warnet J-M, Baudouin C. Cytoprotective effects of hyaluronic acid and Carbomer 934P in ocular surface epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1 déc 2002;43:3409-15.
52. Ng A, Keech A, Jones L. Tear osmolarity changes after use of hydroxypropyl-guar-based lubricating eye drops. Clin Ophthalmol. 10 avr 2018;12:695-700.
53. LUCENTIS 10 mg/ml sol inj en seringue préremplie [Internet]. VIDAL. [cité 14 sept 2021]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/medicaments/lucentis-10-mg-ml-sol-inj-en-seringue-preremplie-140079.html
54. TOBRADEX collyre susp [Internet]. VIDAL. [cité 14 sept 2021]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/medicaments/tobradex-collyre-susp-16514.html
55. CILOXAN 0,3 % pom ophtalm [Internet]. VIDAL. [cité 14 sept 2021]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/medicaments/ciloxan-0-3-pom-ophtalm-19500.html
56. AQUAREST 0,2 % gel opht en récipient unidose [Internet]. VIDAL. [cité 14 sept 2021]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/medicaments/aquarest-0-2-gel-opht-en-recipient-unidose-91233.html
57. MYDRIASERT insert opht [Internet]. VIDAL. [cité 14 sept 2021]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/medicaments/mydriasert-insert-opht-11399.html
58. Wehrlé P. Forme ophtalmique. In: Pharmacie galénique : formulation et tecnologie pharmaceutique. 2ème édition. Maloine; p. 152-9. (Etudes et diplômes en pharmacie).
59. Moiseev RV, Morrison PWJ, Steele F, Khutoryanskiy VV. Penetration Enhancers in Ocular Drug

Delivery. Pharmaceutics. juill 2019;11(7):321.
60. Subrizi A, del Amo EM, Korzhikov-Vlakh V, Tennikova T, Ruponen M, Urtti A. Design principles of ocular drug delivery systems: importance of drug payload, release rate, and material properties. Drug Discov Today. 1 août 2019;24(8):1446-57.
61. Le Van Gong L. Les collyres : intérêts et application en officine [Internet]. [Bordeaux]: Université de Bordeaux; 2017 [cité 12 mars 2021]. Disponible sur: https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01551870/document
62. Creuzot-Garcher C. Surface oculaire et pharmacocinétique. EM-Consulte. avr 2007;30(4):410-3.
63. Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK. Ocular Drug Delivery. AAPS J. 1 mai 2010;12(3):348-60.
64. Rat P. Toxicité des formulations ophtalmiques [Internet]. European Society of Hospital pharmaceutical technologies. 2010 [cité 19 avr 2021]. Disponible sur: http://www.gerpac.eu/toxicite-des-formulations-oculaires
65. LOMBARD A. Comment se traduit l'action localisée des substances chimiques sur l'organisme ? [Internet]. Ref : TIP112WEB - « Sécurité et gestion des risques ». Editions T.I. | Techniques de l'Ingénieur; 2014 [cité 19 avr 2021]. Disponible sur: https://www-techniques-ingenieur-fr.docelec.u-bordeaux.fr/fiche-pratique/environnement-securite-th5/maitriser-le-risque-chimique-management-sante-et-securite-dans-l-entreprise-dt118/comment-se-traduit-l-action-localisee-des-substances-chimiques-sur-l-organisme-1170/
66. Burstein NL. Corneal cytotoxicity of topically applied drugs, vehicles and preservatives. Surv Ophthalmol. 1 juill 1980;25(1):15-30.
67. 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. Journal Français d'Ophtalmologie. janv 2001;24(1):13.
68. Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. Prog Retin Eye Res. 1 juill 2010;29(4):312-34.
69. Ravet O. Les effets délétères de certains collyres sur la surface oculaire. 2007;304:145-9.
70. Krishna N, Brow F. Polyvinyl Alcohol as an Ophthalmic Vehicle: Effect on regeneration of corneal epithelium. Am J Ophthalmol. 1 janv 1964;57(1):99-106.
71. OMEDIT (Observatoire des Médicaments Dispositifs médicaux Innovations Thérapeutiques. Liste préférentielle de collyres et gels ophtalmiques - Fiche de bonne pratique et bon usage [Internet]. 2016 juin [cité 1 mai 2021]. Disponible sur: www.omedit-centre.fr
72. Choosing Laser Diffraction or Dynamic Light Scattering [Internet]. [cité 1 juin 2021]. Disponible sur: https://www.horiba.com/fra/products/scientific/particle-characterization/particle-education/choosing-laser-diffraction-or-dynamic-light-scattering/, https://www.horiba.com/fra/products/scientific/particle-characterization/particle-education/choosing-laser-diffraction-or-dynamic-light-scattering/
73. Le Hir A. Voie ophtalmique : collyres. In: Pharmacie galénique. 6ème édition. Masson; p. 337-45.
74. Baranowski P, Karolewicz B, Gajda M, Pluta J. Ophthalmic Drug Dosage Forms: Characterisation and Research Methods. Sci World J. 18 mars 2014;2014:1-15.
75. VOYRON E. Formulation de collyre de ciclosporine à 2% [Internet]. [Lyon]: Unviersité Claude Bernard - Lyon; 2016. Disponible sur: http://bibnum.univ-lyon1.fr/nuxeo/nxfile/default/8ec65545-fa7e-4121-a144-54474e9ec422/blobholder:0/THph_2016_VOYRON_Eric.pdf
76. LE NEINDRE B. Tensions superficielles et interfaciales : [Internet]. Techniques de l'ingénieur. 1993 [cité 3 mai 2021]. Disponible sur: https://www-techniques-ingenieur-fr.docelec.u-bordeaux.fr/base-documentaire/sciences-fondamentales-th8/constantes-mecaniques-et-viscosite-42339210/tensions-superficielles-et-interfaciales-k475/

77. Zambito Y, Di Colo G. Polysaccharides as Excipients for Ocular Topical Formulations. In: Biomaterials Applications for Nanomedicine [Internet]. Prof. Rosario Pignatello. InTech; 2017 [cité 30 juin 2021]. Disponible sur: https://www.intechopen.com/books/biomaterials-applications-for-nanomedicine/polysaccharides-as-excipients-for-ocular-topical-formulations
78. Gouveia SM, Tiffany JM. Human tear viscosity: An interactive role for proteins and lipids. Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics. 1 déc 2005;1753(2):155-63.
79. Simmons PA, Vehige JG. Investigating the potential benefits of a new artificial tear formulation combining two polymers. Clin Ophthalmol Auckl NZ. 12 sept 2017;11:1637-42.
80. Rhéonova. Pouvoir couvrant des substituts lacrymaux selon leur rhéologie [Internet]. [cité 5 mars 2021]. Disponible sur: https://www.rheonova.fr/wp-content/uploads/2015/12/etude_de_cas_pharmaceutique.pdf
81. Maurin F, Latour E, Coquelet C. Collyre destiné notamment au traitement de l'oeil sec [Internet]. EP0780121A1, 1997 [cité 21 avr 2021]. Disponible sur: https://patents.google.com/patent/EP0780121A1/fr?q=collyre&oq=collyr+e
82. LE NEINDRE B. Viscosité - Définitions et dispositifs de mesure [Internet]. Techniques de l'ingénieur. 2004 [cité 3 juin 2021]. Disponible sur: https://www-techniques-ingenieur-fr.docelec.u-bordeaux.fr/base-documentaire/sciences-fondamentales-th8/constantes-mecaniques-et-viscosite-42339210/viscosite-k478/differents-types-de-viscosimetres-k478niv10003.html#niv-sl2843486
83. DUPUIS D. Mesure de la viscosité - Viscosimètres et rhéomètres [Internet]. 2008 [cité 3 juin 2021]. Disponible sur: https://www-techniques-ingenieur-fr.docelec.u-bordeaux.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/metrologie-relative-aux-fluides-vitesses-et-debits-42402210/mesure-de-la-viscosite-r2351/description-de-quelques-appareils-commerciaux-r2351niv10002.html#niv-sl4992404
84. Ferrari F, Rossi S, Martini A, Muggetti L, De Ponti R, Caramella C. Technological induction of mucoadhesive properties on waxy starches by grinding. Eur J Pharm Sci. 1 sept 1997;5(5):277-85.
85. MALHAIRE H. Mise au point de microparticules bioadhésives à libération modifiée en vue d'un ciblage intestinal [Internet]. Unviersité de Angers; 2012. Disponible sur: https://dune.univ-angers.fr/fichiers/20061887/2012PPHA405/fichier/405F.pdf
86. Mikos AG, Peppas NA. Bioadhesive analysis of controlled-release systems. IV. An experimental method for testing the adhesion of microparticles with mucus. J Controlled Release. 1 mars 1990;12(1):31-7.
87. Keratis. Conservons nos yeux, pas nos collyres ! Interdisons les conservateurs dans les préparations ophtalmiques [Internet]. Disponible sur: http://associationgeniris.free.fr/docs/dossier_de_presse_conservateurs.pdf
88. Laboratoires Théa. ABAK : un concentré de technologie dans un flacon [Internet]. [cité 5 avr 2021]. Disponible sur: https://www.laboratoires-thea.com/medias/abak_brochure_fr.pdf
89. European Medicines Agency, CHMP, CVMP. Guideline on the sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container [Internet]. 2019 [cité 11 mars 2021]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-sterilisation-medicinal-product-active-substance-excipient-primary-container_en.pdf
90. Bouguerra A. La stérilisation : Procédés et Validations [Internet]. 2017. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/326044672_La_sterilisation_Procedes_et_Validations
91. Filtres seringue [Internet]. MACHEREY-NAGEL. [cité 15 sept 2021]. Disponible sur: https://www.mn-net.com/fr/filtration/filtres-seringue/
92. Sirbat D, Marchal-Heussler L, Hoffman M, Maincent P. Moyens d'amélioration de la biodisponibilité pour la voie topique. EM-Consulte. 2000;23(5):150.
93. Lancelot S, Micallef J, Blin O. Conséquences cliniques de la salification des principes actifs et

des excipients - Clinical consequences of active drugs salification. Lett Pharmacol. 2003;17(4):130-2.

94. Ménard N. Tensioactifs d'origine naturelle pour la solubilisationn de principes actifs : synthèse, physico-chimie et toxicité [Internet]. Paris Sud - Paris XI; 2011. Disponible sur: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00693156/document
95. Gallois-Montbrun D, Le Bas G, Mason SA, Prangé T, Lesieur S. A highly hydrated α-cyclodextrin/1-undecanol inclusion complex: crystal structure and hydrogen-bond network from high-resolution neutron diffraction at 20 K. Acta Crystallogr Sect B Struct Sci Cryst Eng Mater. 1 avr 2013;69(2):214-27.
96. Bouchalta N. Les cyclodextrines : applications en science pharmaceutique [Internet]. Mohammed V; 2017 [cité 9 juin 2021]. Disponible sur: http://ao.um5.ac.ma/xmlui/handle/123456789/15939
97. Caligur V. Cyclodextrins [Internet]. Merck. [cité 9 juin 2021]. Disponible sur: https://www.sigmaaldrich.com/FR/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cyclodextrins
98. Jacquet R. Cyclodextrines hydrophiles : caractérisation et étude de leurs propriétés énantiosélective et complexante. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse. Orléans;
99. CRINI G, FOURMENTIN S, FOURMENTIN M, MORIN-CRINI N. Principales applications des complexes d'inclusion cyclodextrine/substrat [Internet]. Techniques de l'ingénieur. 2019 [cité 22 juin 2021]. Disponible sur: https://www-techniques-ingenieur-fr.docelec.u-bordeaux.fr/base-documentaire/innovation-th10/innovations-en-materiaux-avances-42186210/principales-applications-des-complexes-d-inclusion-cyclodextrine-substrat-in232/presentation-des-cyclodextrines-in232niv10001.html
100. Jansen T, Xhonneux B, Mesens J, Borgers M. Beta-cyclodextrins as vehicles in eye-drop formulations: an evaluation of their effects on rabbit corneal epithelium. Lens Eye Toxic Res. 1990;7(3-4):459-68.
101. Loftsson T, Másson M. The effects of water-soluble polymers on cyclodextrins and cyclodextrin solubilization of drugs. J Drug Deliv Sci Technol. 31 déc 2004;14:35-43.
102. Guimarães D, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. Int J Pharm. 15 mai 2021;601:1-15.
103. Deb PK, Al-Attraqchi O, Chandrasekaran B, Paradkar A, Tekade RK. Chapter 16 - Protein/Peptide Drug Delivery Systems: Practical Considerations in Pharmaceutical Product Development. In: Tekade RK, éditeur. Basic Fundamentals of Drug Delivery [Internet]. Academic Press; 2019 [cité 22 juin 2021]. p. 651-84. (Advances in Pharmaceutical Product Development and Research). Disponible sur: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128179093000169
104. Souto EB, Dias-Ferreira J, López-Machado A, Ettcheto M, Cano A, Camins Espuny A, et al. Advanced Formulation Approaches for Ocular Drug Delivery: State-Of-The-Art and Recent Patents. Pharmaceutics. 6 sept 2019;11(9):460.
105. BOBO GH. L'utilisation de liposomes comme vecteurs médicamenteux [Internet]. Picardie Jules Verne; 2017. Disponible sur: https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01974084/document
106. Zhang H, Luo Q, Yang Z, Pan W, Nie S. Novel ophthalmic timolol meleate liposomal-hydrogel and its improved local glaucomatous therapeutic effect in vivo. Drug Deliv. oct 2011;18(7):502-10.
107. Gierden A. Administration par voie orale des composés BCS classe II : réponses galéniques au problème de la faible solubilité aqueuse [Internet]. Université de Lorraine; 2016. Disponible sur: . https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01734470/document
108. Couffin A-C, Delmas T. Vecteurs lipidiques en tant que nanomédicaments [Internet]. 2013 [cité 24 mai 2021]. Disponible sur: https://www-techniques-ingenieur-fr.docelec.u-

bordeaux.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/mise-en-forme-des-medicaments-et-autres-produits-de-sante-42611210/vecteurs-lipidiques-en-tant-que-nanomedicaments-j2310/systemes-lipidiques-developpes-en-recherche-et-en-clinique-j2310niv10002.html

109. Méthodes de préparation des liposomes et synthèse des liposomes [Internet]. liposome. [cité 24 juin 2021]. Disponible sur: https://liposometpe.wixsite.com/liposome/blank-wnrr5
110. Suffredini G, East J, Levy L. New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging. AJNR Am J Neuroradiol. 28 mars 2013;35:6.
111. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Polymers. 1 sept 2011;3(3):1377-97.
112. Meng T, Kulkarni V, Simmers R, Brar V, Xu Q. Therapeutic implications of nanomedicine for ocular drug delivery. Drug Discov Today. 1 août 2019;24(8):1524-38.
113. Marchal-Heussler L, Sirbat D, Hoffman M, Maincent P. Nanocapsules of beta-blocking agents: a new drug carrier in ophthalmology. Application to medical treatment of glaucoma in rabbits. J Fr Ophtalmol. 1991;14(6-7):371-5.
114. Poltorak K. Conception de nanocapsules biodégradables recouvertes de dextrane par réaction « click » interfaciale. Université de Lorraine; 2015.
115. LI X. Intérêt de la réduction de taille des principes actifs peu hydrosolubles : étude bibliographique et expérimentale [Internet]. Université de Lorraine; 2014. Disponible sur: https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732106/document
116. Salager J-L, Antón RE, Andérez JM, Aubry jean-marie. Formulation des micro-émulsions par la méthode HLD. Tech Ing. 1 janv 2001;1-20.
117. Larpent C. Tensioactifs [Internet]. 1995 [cité 24 juin 2021]. Disponible sur: https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/sciences-fondamentales-th8/constantes-chimiques-des-solvants-et-produits-42337210/tensioactifs-k342/
118. Stauffer F. La préparation d'émulsions doubles par un système microfluidique. Université de Lorraine; 2014.
119. Dhananjav J. Surfactants and its application in pharmaceuticals : an overview [Internet]. Pharmatutor. [cité 24 juin 2021]. Disponible sur: https://www.pharmatutor.org/articles/surfactants-and-its-applications-in-pharmaceuticals-overview
120. Paruta Tuarez EA. Emulsions inverses très concentrées : formulation, comportement rhéologique et modélisation [Internet]. Institut National Polytechnique de Lorraine; 2010. Disponible sur: https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748794/document
121. Rataj V. Formulation des microémulsions - propriétés et exemples d'application. Actual Chim. mai 2016;(407):31-3.
122. Michel E. L'utilisation de la technologie Microfluidizer dans l'élaboration de médicaments injectables insolubles [Internet]. Microfluidics. [cité 28 juin 2021]. Disponible sur: http://www.microfluidics.fr/nano-emulsions-steriles-homogeneisateur-haute-pression/
123. ALI A. Nanoémulsions d'intérêt pharmaceutique stabilisées par la beta-lactoglobuline [Internet]. Paris-Saclay; 2016 [cité 2 févr 2021]. Disponible sur: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01486119/document
124. Simonnet J-T, Richart P, Aubrun O, L'alloret F. Nanoformulation des corps gras. Nanocapsules, nanoémulsions. Ol Corps Gras Lipides. nov 2004;11(6):448-53.
125. Balès N. Les PEGs [Internet]. Université du Québec à Chicoutimi (UQAC); 2014. Disponible sur: https://docplayer.fr/20062799-Dess-de-cosmetologie-les-pegs.html
126. Pereira Camelo SR. Encapsulation de molécules hydrophobes par des structures bi-gels générées par prilling : relation structure-propriétés [Internet]. Université de Toulouse; 2015 [cité 20 déc 2020]. Disponible sur: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01178199/document
127. Dictionnaire de l'académie nationale de Pharmacie. Gel [Internet]. [cité 5 janv 2021]. Disponible sur: https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Gel

128. Les matériaux intelligents : les polymères stimulables - III. Hydrogels [Internet]. [cité 28 juin 2021]. Disponible sur: http://les-polymeres-stimulables.e-monsite.com/pages/iii-hydrogels.html
129. Fajardo A, Pereira A, Rubira A, Valente A, Muniz E. Stimuli-Responsive Polysaccharide-Based Hydrogels. In: Polysaccharide Hydrogels : characterization and biomedical applications. 2015. p. 325-66.
130. Behar-Cohen F. Systèmes de délivrance des médicaments pour le segment antérieur : bases fondamentales et applications cliniques. J Fr Ophtalmol. avr 2002;25(5):537-44.
131. Rolland L. Propriétés physico-chimiques de capsules d'hydrogel à coeur liquide [Internet]. Université Pierre et Marie Curie; 2013 [cité 12 mars 2021]. Disponible sur: https://pastel.archives-ouvertes.fr/tel-00919083/document
132. BOLZINGER M-A, BRIANÇON S, CHEVALIER Y, PUEL F. Formulation des systèmes pâteux ou préparations semi-solides. Bioméd Pharma - Médicam Prod Pharm. 10 mars 2015;1-23.
133. Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. AAPS PharmSciTech. juin 2005;6(2):E329-57.
134. VISMED - 07 décembre 2010 (3053) avis [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 31 juill 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_1010211/fr/vismed-07-decembre-2010-3053-avis
135. Olivier. Le processus de cicatrisation d'un point de vue histologique [Internet]. cicatrisation.info. 2006 [cité 15 nov 2021]. Disponible sur: https://www.lacicatrisation.com/notions-de-base/histologie-de-la-cicatrisation.html
136. Haute Autorité de Santé. Commission d'évaluation des produits et prestation - Avis de la commission - Vismed. 2005 déc.
137. Haute Autorité de Santé. Avis sur les dispositifs médicaux - Elixya. 2021 mai.
138. Yang Y-J, Lee W-Y, Kim Y, Hong Y. A Meta-Analysis of the Efficacy of Hyaluronic Acid Eye Drops for the Treatment of Dry Eye Syndrome. Int J Environ Res Public Health. 1 mars 2021;18(5):2383.

ANNEXES

Annexe 1 : Questionnaire SPEED pour déterminer les symptômes, leur fréquence et gravité dans la sécheresse oculaire.

Annexe 2 : Arbre décisionnel permettant de choisir la méthode de stérilisation la plus adaptée en fonction du produit et de ses caractéristiques.

Annexe 3 : Comment lire un diagramme ternaire ?

Annexe 4 : Résultats de pH, d'osmolalité et de densité des solutions développées, avant et après différentes méthodes de stérilisation.

Annexe 1 : Questionnaire SPEED pour déterminer les symptômes, leur fréquence et gravité dans la sécheresse oculaire.

SPEED™ QUESTIONNAIRE

Name: _____ **Date:** ___/___/___ **Sex:** M F (Circle) **DOB:** ___/___/___

For the Standardized Patient Evaluation of Eye Dryness (SPEED) Questionnaire, please answer the following questions by checking the box that best represents your answer. Select only one answer per question.

1. Report the type of SYMPTOMS you experience and when they occur:

	At this visit		Within past 72 hours		Within past 3 months	
Symptoms	**Yes**	**No**	**Yes**	**No**	**Yes**	**No**
Dryness, Grittiness or Scratchiness						
Soreness or Irritation						
Burning or Watering						
Eye Fatigue						

2. Report the FREQUENCY of your symptoms using the rating list below:

Symptoms	**0**	**1**	**2**	**3**
Dryness, Grittiness or Scratchiness				
Soreness or Irritation				
Burning or Watering				
Eye Fatigue				

0 = Never **1** = Sometimes **2** = Often **3** = Constant

3. Report the SEVERITY of your symptoms using the rating list below:

Symptoms	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Dryness, Grittiness or Scratchiness					
Soreness or Irritation					
Burning or Watering					
Eye Fatigue					

0 = No Problems
1 = Tolerable - not perfect, but not uncomfortable
2 = Uncomfortable - irritating, but does not interfere with my day
3 = Bothersome - irritating and interferes with my day
4 = Intolerable - unable to perform my daily tasks

4. Do you use eye drops for lubrication? ☐ YES ☐ NO **If yes, how often?** _____

Cornea. 2013 Sep;32(9):1204-10
© 2011 TearScience, Inc. All rights reserved.
13-ADV-123 A

For office use only
Total SPEED score (Frequency + Severity) = ____/28

Annexe 2 : Arbre décisionnel permettant de choisir la méthode de stérilisation la plus adaptée en fonction du produit et de ses caractéristiques.

Figure 1 Decision tree for sterilisation choices for aqueous products

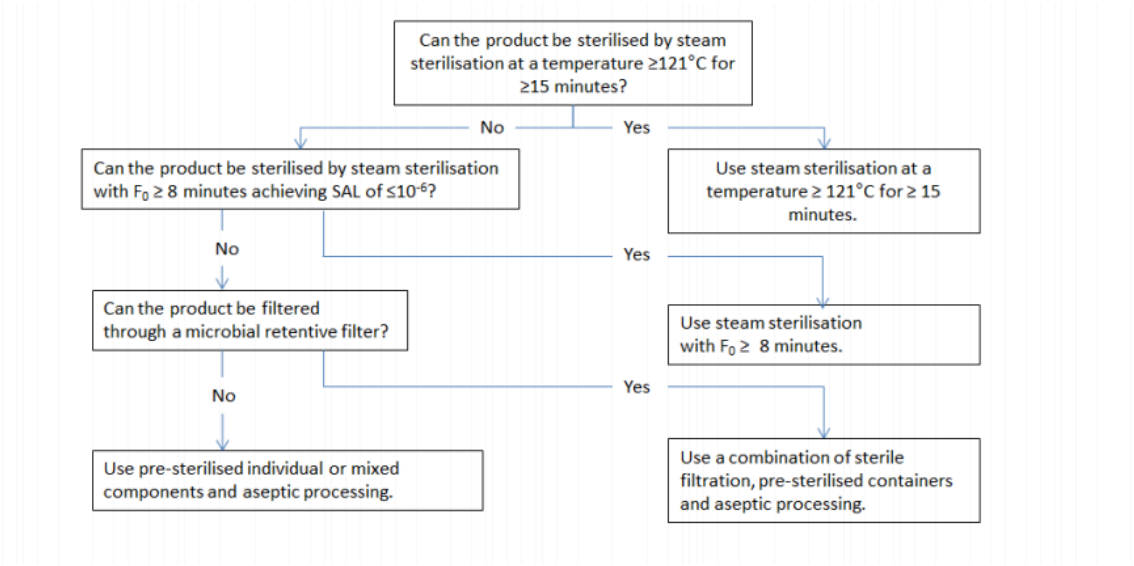
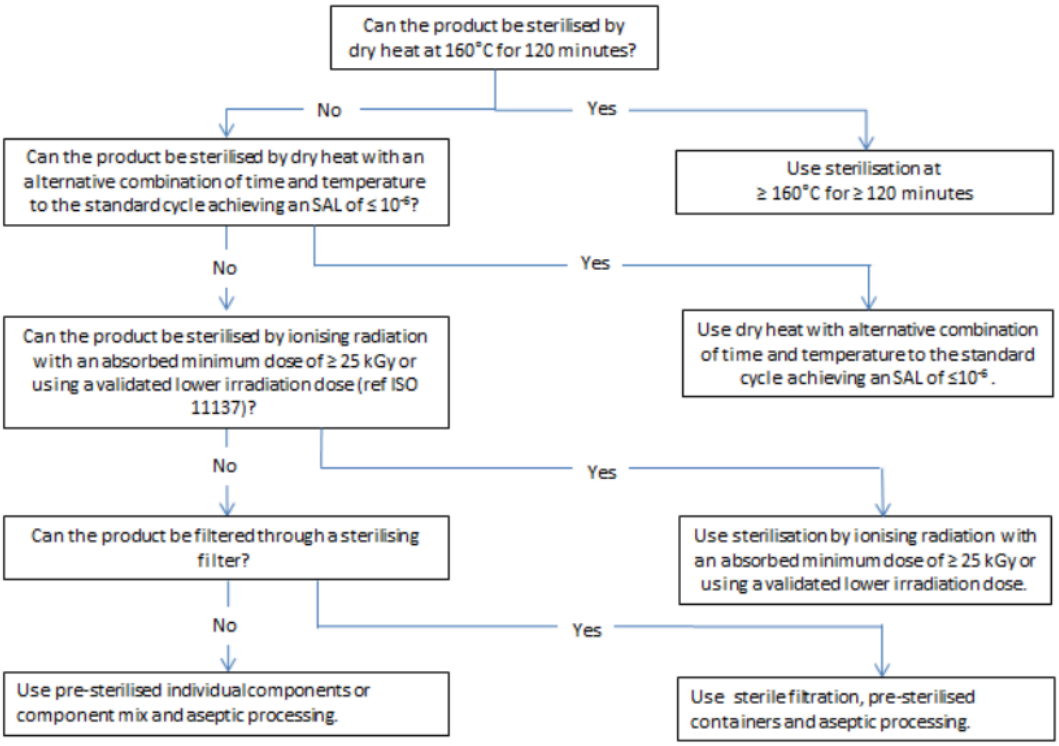
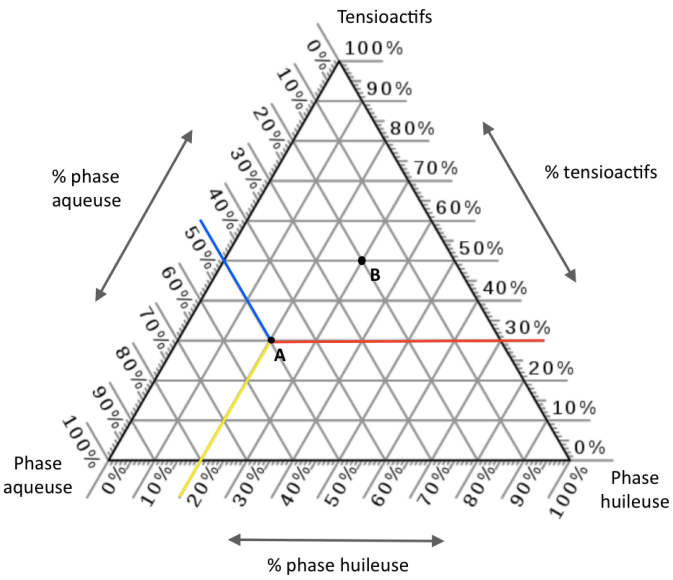


Figure 2 Decision tree for sterilisation choices for dry powder products, non-aqueous liquid or semi-solid products



Annexe 3 : Comment lire un diagramme ternaire ?



Un diagramme ternaire est composé de trois axes. Appliqués aux émulsions et microémulsions, ces derniers regroupent les tensioactifs, la phase huileuse (composés lipophiles) et la phase aqueuse (composés hydrophiles).

Chaque axe représente une proportion variant de 0 % à 100 %. De ce fait, chacun des trois composants doit avoir une proportion de telle sorte que la somme soit égale à 1, soit 100 %.

Pour interpréter le pourcentage d'un composé, la ligne à suivre doit être parallèle à la base du sommet (100 % de la matière première) du triangle associé. Par exemple, pour connaître le pourcentage en tensioactifs, la base du triangle ayant pour sommet le tensioactif est une ligne horizontale. Ainsi, toutes les lignes horizontales permettent de connaitre le pourcentage en tensioactifs.

Ainsi, le point A représenté sur le schéma correspond à une formulation composée de 30 % de tensioactifs (ligne rouge), 20 % de phase huileuse (ligne jaune) et 50 % de phase aqueuse (ligne bleue).
Une formulation composée à 50 % de tensioactifs, 20 % de phase aqueuse et 30 % de phase huileuse correspond au point B.

Annexe 4 : Résultats de pH, d'osmolalité et de densité des solutions développées, avant et après différentes méthodes de stérilisation.

N° d'essai	Composition	pH	Osmolalité (mOsm/kg)	Densité
E03	0,1 % HS	7,25	242	1,011
E03 autoclavé		7,29	256	1,010
E03 filtration PES		7,39	242	1,011
E03 filtration PVDF		7,38	242	1,011
E04	0,15 % HS	7,17	233	1,011
E04 autoclavé		7,31	259	1,013
E04 filtration PES		7,27	239	1,010
E04 filtration PVDF		7,30	239	1,010
E05	0,2 % HS	7,25	310	1,011
E05 autoclavé		7,28	269	1,010
E05 filtration PES		7,30	286	1,010
E05 filtration PVDF		7,32	274	1,011
E06	0,1 % molécule UDB	7,26	228	1,011
E06 autoclavé		7,23	255	1,013
E06 filtration PES		7,41	238	1,011
E06 filtration PVDF		7,33	237	1,010
E07	1 % molécule UDB	7,18	240	1,014
E07 autoclavé		7,09	262	1,014
E07 filtration PES		7,29	250	1,013
E07 filtration PVDF		7,29	249	1,013
E08	5 % molécule UDB	6,95	292	1,025
E08 autoclavé		6,86	326	1,027
E08 filtration PES		6,92	301	1,023
E08 filtration PVDF		6,88	308	1,025
E09	0,1 % HS et 0,1 % molécule UDB	7,24	230	1,011
E09 autoclavé		7,19	255	1,012
E09 filtration PES		7,23	230	1,011
E09 filtration PVDF		7,29	246	1,011
E10	0,1 % HS et 1 % molécule UDB	7,16	242	1,014
E10 autoclavé		7,18	270	1,015
E10 filtration PES		7,20	250	1,014
E10 filtration PVDF		7,24	251	1,014
E11	0,1 % HS et 5 % molécule UDB	6,94	311	1,026
E11 autoclavé		6,96	339	1,028
E11 filtration PES		6,95	319	1,026
E11 filtration PVDF		6,91	321	1,025

E12	0,15 % HS et 0,1 % molécule UDB	7,28	234	1,012
E12 autoclavé		7,35	262	1,013
E12 filtration PES		7,21	259	1,012
E12 filtration PVDF		7,24	256	1,011
E13	0,15 % HS et 1 % molécule UDB	7,26	253	1,014
E13 autoclavé		7,40	268	1,015
E13 filtration PES		7,16	252	1,014
E13 filtration PVDF		7,14	253	1,014
E14	0,15 % HS et 5 % molécule UDB	7,03	311	1,027
E14 autoclavé		7,07	334	1,028
E14 filtration PES		7,13	312	1,026
E14 filtration PVDF		7,17	313	1,027

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(e) 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(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

TITRE : STRATÉGIES GALÉNIQUES ACTUELLES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE FORMES OPHTALMIQUES : APPLICATION AU SYNDROME DE L'ŒIL SEC

RESUMÉ :
L'œil est un organe très sensible et complexe du corps humain. La cornée est en contact direct avec l'environnement extérieur et peut être soumise à de nombreuses agressions et pathologies. Pour les traiter, de nombreuses formes ophtalmiques sont développées et présentes sur le marché. Cependant, en raison de divers mécanismes de défense et d'une complexe anatomie de l'œil, le passage de principes actifs à travers la cornée est réduit. Cela entraîne une très faible biodisponibilité du médicament, nécessitant un nombre élevé d'instillations pour atteindre une efficacité thérapeutique. Ainsi, la recherche constante d'améliorations galéniques pour surmonter ces problèmes est un véritable défi. Plusieurs approches existent et sont présentées dans cette thèse.
L'œil sec est un syndrome très répandu dans la population mondiale. Il correspond à un manque de liquide lacrymal présent à la surface de la cornée, qui lui permet normalement d'être nourrie, hydratée et protégée. Cette pathologie est responsable d'une gêne permanente pour le patient. Il est donc essentiel de traiter ce trouble oculaire en comprenant parfaitement ses causes et mécanismes afin d'adapter le traitement et d'avoir une guérison efficace. Ce rapport présente le développement d'un collyre pour le traitement de l'œil sec ; l'innovation réside dans la combinaison de deux molécules jamais utilisées ensemble auparavant. L'objectif est de démontrer la synergie cette combinaison et son efficacité supérieure comparé aux autres produits déjà sur le marché.

TITLE : CURRENT GALENIC STRATEGIES FOR THE DEVELOPMENT OF OPHTHALMIC FORMS: APPLICATION TO DRY EYE DISEASE

SUMMARY :
The eye is a very sensitive and complex organ of the human body. The cornea is in direct contact with the external environment and can be subjected to numerous attacks and pathologies. To treat them, many ophthalmic forms are developed and commercialized. However, due to various defense mechanisms and the complex anatomy of the eye, the passage of therapeutic molecules through the cornea is reduced. This results in a very low bioavailability of the API, requiring a high number of instillations to achieve therapeutic efficacy. Thus, the constant search for galenic improvements to overcome these problems is a real challenge. Several approaches exist and are presented in this thesis.
Dry eye disease is a very common syndrome in the world population. It corresponds to a lack of tear fluid present on the surface of the cornea, which normally allows it to be nourished, hydrated and protected. This pathology is responsible for a permanent discomfort for the patient. It is therefore essential to treat this eye disorder by fully understanding its causes and mechanisms in order to adapt the treatment and have an effective cure. This report presents the development of an eye drop for the treatment of dry eye; the innovation is in the combination of two molecules never used together before. The objective is to demonstrate the synergy of this combination and its superior efficacy compared to other products already on the market.

DISCIPLINE : développement pharmaceutique
MOTS-CLÉS : formes ophtalmiques, collyres, sécheresse oculaire, développement galénique
INTITULÉ ET ADRESSE DE L'U.F.R. : UFR de Pharmacie – Université de Bordeaux. 146 Rue Léo Saignat 33076 Bordeaux Cedex.