



HAL
open science

Développement et étude de stabilité de solutions ophtalmiques d'atropine à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.01%) pour la prévention de l'évolution de la myopie en pédiatrie

Baptiste Berton

► **To cite this version:**

Baptiste Berton. Développement et étude de stabilité de solutions ophtalmiques d'atropine à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.01%) pour la prévention de l'évolution de la myopie en pédiatrie. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-03616940

HAL Id: dumas-03616940

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03616940>

Submitted on 23 Mar 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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2022

**DÉVELOPPEMENT ET ÉTUDE DE STABILITÉ DE SOLUTIONS
OPHTALMIQUES D'ATROPINE À 100 µg/mL (0.01%) POUR LA
PRÉVENTION DE L'ÉVOLUTION DE LA MYOPIE EN PÉDIATRIE**

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
PHARMACIE HOSPITALIÈRE - PRATIQUE ET RECHERCHE
TENANT LIEU DE

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par M. Baptiste BERTON

[Données à caractère personnel]

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le 18/03/2022

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président du jury :

M. le Professeur Benoît ALLENET

Membres :

M. le Docteur Philip CHENNELL (directeur de thèse)

M. le Docteur Julien LEENHARDT (tuteur universitaire)

Mme le Docteur Karine PALOMBI

Mme le Docteur Roseline MAZET

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

ENSEIGNANTS - CHERCHEURS Année 2021 / 2022

Doyen de la Faculté - **Pr. Michel SEVE**
Vice-Doyen Pédagogie - **Mr Pierre CAVAILLES**
Vice-Doyen Recherche – **Pr. Walid RACHIDI**

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE	HDR
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx	Oui
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS	Oui
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	Oui
CDD	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS	
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055	
PU-PH	BEDOUCHE	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS	Oui
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042	Oui
MAST	BELLET	BEATRICE	-	
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS	
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	LRB /INSERM U 1039	Oui
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	TIMC	
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA	Oui
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042	Oui
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS	Oui
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309	Oui
Professeur Emérite	CALOP	JEAN		Oui
MCF	CAVAILLES	PIERRE	IAB	
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309	
AHU	CHEVALIER	SIMON	TIMC IMAG	
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS	
MCU-PH	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS	
MAST	COMBE	JEROME	-	
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx	Oui
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-	Oui
Professeur Emérite	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON	équiv.
MCF	DEMEILLERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	Oui
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408	Oui
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	Oui
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	Oui
PU-PH	FAURE	PATRICE	DPM – UMR5063	Oui
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042	Oui

Mise à jour le 06/09/2021 Sana HACHANI

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE	HDR
PRCE	FITE	ANDREE	-	
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-	
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	Oui
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
MCF Emérite	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS	équiv.
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042	Oui
MCF	GONINDARD	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553	
Professeure Emérite	GRILLOT	RENEE	-	Oui
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR 5063 CNRS	
CDD	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055	
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR 51042	
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
AHU	LEENHARDT	JULIEN	INSERM – U1039	
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	Oui
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	Oui
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-	
AHU	MINOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042	
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055	Oui
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209	Oui
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS	Oui
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS	
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR 5525 CNRS, THEMAS	
PU	RACHIDI	WALID	BGE/BIOMICS/ CEA	Oui
PU	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042	Oui
Professeure Emérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	-	Oui
PU-PH	SEVE	MICHEL	TIMC	Oui
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE	HDR
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	
CDD	TRUFFOT	AURELIE		
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR 5063 CNRS	
MCF	WARTHER	DAVID	DPM	
Professeur Emérite	WOUESSIDJEWÉ	DENIS	-	Oui

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
 ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
 BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
 CHU : Centre Hospitalier Universitaire
 CIB : Centre d'Innovation en Biologie
 CRI : Centre de Recherche INSERM
 CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
 DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
 DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
 HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
 IAB : Institute for Advanced Biosciences
 IBS : Institut de Biologie Structurale
 LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
 LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
 LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
 LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
 LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
 LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique
 LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
 MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel
 MCF : Maître de Conférences des Universités
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
 PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
 PRAG : Professeur Agrégé
 PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
 PU : Professeur des Universités
 PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
 SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
 TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
 UMR : Unité Mixte de Recherche
 UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

DEDICACES

A C et R,

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Benoît Allenet,

Je te remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse et de juger mon travail. Je voulais également te remercier une fois encore pour ta disponibilité, ton aide, tes conseils précieux et ta bienveillance que tu as su m'accorder au cours de mon internat et notamment lors du semestre que j'ai réalisé dans ton unité au SSR de cardiologie de l'hôpital sud. C'est notamment grâce à toi que j'ai pu développer cet intérêt si cher que j'ai pour la pharmacie clinique, pour les patients, pour l'humain.

A Monsieur le Docteur Philip Chennell,

Philip, je tiens particulièrement à te remercier pour toutes les choses que tu as su m'apprendre et m'enseigner depuis le semestre que j'ai passé au LCD avec toi. Cette étude de stabilité et la rédaction de l'article nous auront bien occupés : c'était un beau challenge, il faut le dire ! Merci encore pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, d'avoir toujours été disponible et à l'écoute quand j'en avais besoin dans ces longs moments de rédaction et lors des entraînements pour la soutenance. Tu m'as permis de développer ce goût que tu as, d'aller jusqu'au bout des choses et d'être toujours plus consciencieux et exigeant dans tes projets.

A Monsieur le Docteur Julien Leenhardt,

Je te remercie d'avoir bien voulu être mon tuteur universitaire pour m'accompagner dans la réalisation de ma thèse. Tu es celui qui représente la spécialité pour laquelle j'ai tant d'intérêt et vers laquelle je m'oriente : la radiopharmacie. Ce sera avec plaisir que j'échangerais avec toi en tant que confrère dans cette spécialité.

A Madame le Docteur Karine Palombi,

Je tiens à vous remercier de me faire l'honneur d'être membre de mon jury de thèse en tant que référente en ophtalmologie pédiatrique et d'avoir exprimé votre intérêt pour le sujet. Merci d'avoir accepté de juger mon travail et d'y apporter vos remarques grâce à votre expérience clinique.

A Madame le Docteur Roseline Mazet,

Roseline, je voulais te remercier d'avoir accepté avec tant d'entrain de faire partie de mon jury de thèse. Tes conseils et recommandations ont été précieux et m'ont permis d'avancer dans la réalisation de ce travail. Je tenais également à te remercier tout particulièrement pour ta bonne humeur et ton enthousiasme qui sont, à mon sens, une réelle source de motivation au quotidien pour ceux que tu encadres.

A mes parents,

Je ne saurais jamais comment vous remercier pour tout ce que vous avez fait et tout ce que vous faites encore pour moi aujourd'hui... . Merci d'avoir été présents pour me soutenir chaque jour, pour me supporter, me conseiller, et, pour m'aimer comme vous le faites, tout simplement... . Chaque instant passé à vos côtés est un véritable cadeau !

A mes grands-parents,

Par où commencer à vrai dire ..., les mots sont bien faibles par rapport à ce que l'on ressent intensément à l'intérieur.... Vous me dites souvent de ne pas vous remercier, mais je vais quand même vous le dire encore une fois : merci ! Merci pour tous ces moments de joie passés ensemble dans notre si chère campagne de Haute-Loire. Pour tout ce que vous m'avez appris sur la vie et la perception de ce qui nous entoure. De toujours être positif dans n'importe quel moment, de prendre les choses du bon côté et d'aimer cette vie : pour nous, mais également pour ceux qui étaient là avant nous et qui l'ont quitté. Je n'oublierais jamais tout ce que vous m'avez apporté et ce que vous m'apportez encore maintenant. C'est grâce à vos valeurs et à ce que vous m'avez transmis depuis toujours que j'en suis arrivé là aujourd'hui.

A ma sœur et mon beau-frère,

Morgane, t'avoir comme grande sœur n'a pas de prix... Quelle belle enfance nous avons eu la chance de partager ensemble. Merci d'avoir su m'écouter, me comprendre, m'épauler et m'accompagner pendant toutes ces années. Je n'oublierais jamais la bienveillance que tu as toujours eue pour moi. Enfin, merci d'être là avec Théo désormais, que j'apprécie tant. C'est un réel plaisir à chaque fois de vous retrouver tous les deux.

A mon oncle, ma tante et mes cousines,

Philippe, Corinne, Justine et Cloé, merci pour tous ces bons moments passés ensemble en famille, toujours très conviviaux et pleins d'entrain.

A ma marraine,

Vanessa, même si la distance à fait que nous ne nous sommes pas vu très régulièrement, je tenais à te remercier pour ce lien que tu as toujours su entretenir avec moi grâce à tes cartes, tes mots, tes messages et tes superbes photos autour du monde, dans toutes les îles où tu t'es arrêtée. Tu as su me faire voyager aussi avec toi par ce biais. Et désormais, dans quelques mois, je viendrais te retrouver sous les tropiques où se dessineront je pense, de belles aventures... .

A mes cousines et cousin du Puy,

Valérie, tu sais toute l'affection que je te porte. Je ne saurais expliquer ce sentiment si particulier qui nous lie quand on se retrouve... Merci d'être la belle et pétillante personne que tu es. Tu resteras toujours ma cousine « doudou » préférée.

Karine, tu sais également que tu comptes beaucoup à mes yeux. Merci pour toutes ces discussions et ces moments passés ensemble au Puy, à Lyon et ailleurs... .

Merci à vous deux pour tous ces fou-rires et ces moments de joie passés ensemble et que nous passerons encore et encore ! Vous êtes des cousines uniques et votre binôme est de loin inégalable !

Merci à Jules, Pauline, Marius, Tatiana, Charles et tous les autres.

A tous les membres de la famille Berton pour qui j'ai beaucoup d'affection et d'estime,

Nanou, Geneviève, Robert, Henri, Laurent, Laetitia, Marie-Paule, Jean-Louis, Mathieu, Pierrot, Madeleine, Agnès, Fabienne et tous les autres... A tous ceux qui nous ont quittés mais qui vivent encore à travers nous... .

A tous mes Chierois,

Quelle chance j'ai pu avoir de grandir avec vous tous ! Coralie, Morgane, Martin, Thomas, Marine, Jérémy, Rémi et Théo, comment ne pas avoir le sourire aux lèvres en repensant à tous ces étés et ces vacances de la Toussaint passés ensemble, ces

fou-rires, ces soirées, ces week-end et road-trip ici et ailleurs... . Merci pour ces moments de bonheur, d'hier, d'aujourd'hui et de demain. Parfois, certains liens d'amitiés sont plus forts que ceux du sang... .

A mes amis Beauvallonais,

Vincent, Mickaël, Sylvain, Jonathan, Florian et Kévin merci d'être toujours au rendez-vous depuis que nous nous sommes rencontrés à l'école de Beauvallon, dans notre village qui nous est si cher, où nous avons grandi et quasiment tout fait ensemble. Toutes ces années n'ont pas eu raison de notre amitié, bien au contraire... Merci de toujours être au rendez-vous et d'être les belles personnes que vous êtes.

A tous mes amis de Valence,

Les amitiés qui durent depuis tout ce temps sont rares et sans doute uniques... !
Combien de moments, de soirées et de week-end avons-nous passés ensemble... ?
Ces semaines de vacances d'été et au ski sont à chaque fois inoubliables ! Nous avons grandi côte à côte à travers notre jeunesse en partageant nos histoires, nos réussites, nos peines, nos revers, mais surtout, surtout, en partageant notre bonne humeur et notre joie à chaque fois qu'on se retrouvait. Merci d'avoir été là et d'être toujours et on ne peut plus présent !

Vincent, Alban, Quentin, Simon, Anaïs, Rachel, Maude, Mathieu, Rémy, Thomas, Myléna, Barbara, Charlotte, Anaïs, Sylvain, Alexandre, Anaïs, Neil, Léo et tous les autres.

A William et Romain,

Comment expliquer ce qui nous lie... ? Une rencontre, des années d'études, d'innombrables soirées pharmas et virées Lyonnaises, des semaines à l'étranger inoubliables... et bien d'autres choses encore... ! Mes « Guys », merci d'avoir fait partis de tous ces moments et d'avoir su agrémenter toute la série de dossiers qu'on a en commun ! Ce trio est, si on peut le dire : énorme !

Aux pharmas,

Mes années de pharma Lyonnaises avec vous ont été...épiques ! Merci d'avoir été là en amphi, en ED/TP, en exams, en concours, en soirées... et aussi pour cette semaine de ski avec vous qui était vraiment au top ! Impossible de compter tous les fou-rires et les bêtises qu'on a pu faire ou dire ! A toutes nos sorties Lyonnaises et à toutes celles qu'on passera réunis.

Alexia, Bénédicte, Laëtitia, Manon, Rémi, Vianney, Louis, Alban, Marion et Alexane.

A tous mes collègues internes (Steffi, Mégane, Baptiste, Léa, Renan, Joëlle, Audrey, Cécilia, Manon, Marlène, Perrine, Victoria, et tous les autres..., merci à toi Sarah pour tes conseils précieux d'ophtalmo), chef(fe)s, préparateurs et préparatrices depuis Thonon-les-Bains, en passant par Clermont-Ferrand, Grenoble et jusqu'à Lyon.

A toutes celles et ceux que j'ai pu croiser, rencontrer et découvrir pendant mes études et mes années d'internat.

A toi, ma si chère Audrey,

Je t'ai dit une fois que tu avais su me guider vers toi comme la lumière du jour....

J'espère que tu sauras être cette lumière sur tous les horizons qui se dessinent face à nous....

TABLE DES MATIERES

Dédicaces.....	5
Remerciements	6
Table des matières	14
Liste des tableaux et figures	16
Liste des abréviations, acronymes, symboles, unités	17
Abréviations officielles	18
Introduction générale.....	19
La myopie : pathologie et prise en charge.....	22
A. Données épidémiologiques actuelles	22
B. Physiopathologie de la myopie	23
1. Principe général de la réfraction optique	24
2. Définitions d'optique	25
3. Les amétropies	27
4. L'accommodation	28
5. La myopie : anomalie de la réfraction	29
C. Moyens préventifs et thérapeutiques actuels.....	30
1. Moyens préventifs limitant l'instauration de la myopie	30
2. Moyens correcteurs et moyens thérapeutiques limitant la progression de la myopie après son instauration	32
D. Les collyres à base d'atropine, une thérapeutique d'avenir	39
E. Règlementation PUI et préparation hospitalière	42
1. Règlementation des différentes missions des PUI soumises à autorisation	42
2. Les préparations hospitalières : statut et règlementation	46
Etude de stabilité de collyres d'atropine A 100µg/mL (0.01%) pour la prévention de l'évolution de la myopie en pédiatrie	51
A. Mise en valeur des résultats : publication scientifique dans la revue international « <i>Pharmaceutics</i> » et études complémentaires	52
1. Lien hypertexte d'accès à la version en ligne de l'article.....	52
2. Article manuscrit publié dans « <i>Pharmaceutics</i> »	52
3. Etudes complémentaires	72
B. Résultats complémentaires obtenus après publication	73

1. Extrapolation des résultats obtenus jusqu'à M6	73
2. Résultats complémentaires obtenus jusqu'à M9.....	75
Discussion générale	84
A. Thérapeutiques de la myopie : actuelles et futures	84
B. Choix galéniques pour la formulation des collyres faiblement concentrés en atropine.....	85
1. Choix de la MPUP sous forme de poudre.....	85
2. Choix du solvant de dilution	86
3. Choix du pH de la solution	87
4. Choix du tampon de la solution	89
5. Choix du conservateur	91
C. Résultats complémentaires à M9.....	94
D. Dégradation de la molécule d'atropine	96
1. Processus de dégradation de l'atropine et produits résultants	96
2. Molarité de la réaction de dégradation de l'atropine	98
3. La tropine : produit de dégradation de l'atropine	100
E. Perspectives futures	102
Conclusion Générale	104
Bibliographie	106
Annexes	110
Serment de Galien	115
Resumé	116
Abstract.....	117

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableaux

Tableau I : Evolution de la turbidité au cours du temps.

Tableau II : Evolution du pH et de l'osmolalité au cours du temps.

Tableau III : Evolution de la concentration en atropine au cours du temps jusqu'à M9 pour les deux formulations : sans (NOVELIA®) et avec conservateur (CAT®).

Tableau IV : Evolution de la concentration en acide tropique au cours du temps jusqu'à M9 pour les deux formulations : sans (NOVELIA®) et avec conservateur (CAT®).

Tableau V : Différence de concentration observée entre PDD supposés de l'atropine et celle de l'acide tropique à M9.

Figures

Figure 1 : Structure chimique de la molécule d'atropine.

Figure 2 : Extrapolation depuis M6 de l'évolution de la concentration en atropine au cours du temps.

Figure 3 : Extrapolation depuis M6 de l'évolution de la concentration du produit de dégradation principal de l'atropine (acide tropique) au cours du temps.

Figure 4 : Evolution de la concentration en atropine au cours du temps jusqu'à M9.

Figure 5 : Chromatogramme de l'évolution de la concentration en acide tropique au cours du temps.

Figure 6 : Evolution de la concentration du produit de dégradation principal de l'atropine (acide tropique) au cours du temps jusqu'au M9.

Figure 7 : Structure chimique de la molécule de tropine.

LISTE DES ABREVIATIONS, ACRONYMES, SYMBOLES,

UNITES

D/yr : « *Dioptrie per year* » ou dioptrie par année

g/L : gramme par litre

mg/mL : milligramme par millilitre

mol/mL : mole par millilitre

mOsm/kg : milliosmole par kilogramme

% : pourcents

µm : micromètre

µg/mL : microgramme par millilitre

yr : « *year* » ou année

ABREVIATIONS OFFICIELLES

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

ARS : Agence régionale de santé

BPP : Bonnes pratiques de préparation

BSS : « *Balanced salt solution* »

CHU : Centre hospitalier universitaire

CSP : Code de la Santé Publique

CLHP/HPLC : Chromatographie liquide haute performance / « *High performance liquid chromatography* »

LASIK : « *Laser assisted in situ keratomileusis* »

LCD : Laboratoire de contrôles et de développement

MPUP : Matière première à usage pharmaceutique

PDD : Produit de dégradation

PEBD : Polyéthylène de basse densité

PP : « *Punctum proximum* »

PR : « *Punctum remotum* »

SNOF : Syndicat National des Ophtalmologistes de France

ZAC : Zones à atmosphère contrôlée

INTRODUCTION GENERALE

De nos jours, la myopie est la plus répandue des pathologies oculaires à travers le monde. En effet, elle touche plus d'un quart de la population américaine adulte et, il a été rapporté que dans certaines populations asiatiques sa prévalence avoisinerait les 90% (1). Les moyens préventifs et thérapeutiques actuels pour cette pathologie restent encore limités, aussi bien physiquement que chimiquement. En effet, ces moyens ne s'avèrent pas satisfaisants en termes d'efficacité pour limiter l'instauration puis la progression de la myopie, et ce, depuis le plus jeune âge.

Au sein du bassin Clermontois, de nombreux jeunes patients myopes sont recensés et les consultations concernant la myopie s'effectuent de plus en plus précocement et de manière croissante en ville comme à l'hôpital. C'est pourquoi le service d'ophtalmologie et celui de la pharmacie à usage intérieure (PUI) du centre hospitalier universitaire (CHU) de Clermont-Ferrand se sont mis en accord afin de statuer sur la nécessité et la possibilité de mettre au point une formulation pharmaceutique pour apporter une réponse thérapeutique à ce besoin clinique grandissant.

L'atropine (figure 1) est un antagoniste cholinergique agissant en bloquant les récepteurs de l'acétylcholine au niveau du système nerveux central et périphérique.

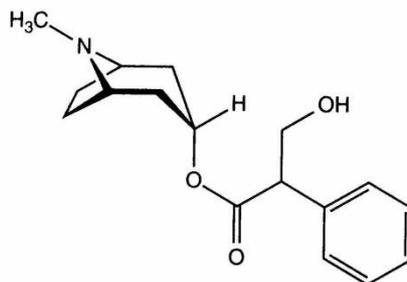


Figure 1 : Structure chimique de la molécule d'atropine.
Source : <https://stabilis.org/Monographie.php?IdMolecule=121>, consultée le 05/12/2021.

Cette molécule s'avère être prometteuse dans le ralentissement du développement de la myopie. C'est pourquoi, nous verrons comment une préparation pharmaceutique à base d'atropine, sous forme d'un collyre, a été formulée et développée au sein du laboratoire de contrôles et de développement (LCD) de la PUI. Depuis la conception, en passant par la formulation, jusqu'à l'obtention du collyre final et la réalisation de son étude de stabilité, c'est tout un processus et une démarche scientifique qui a dû être entrepris.

Par ailleurs, afin de réaliser ce type de préparations pharmaceutiques, les PUI doivent respecter une réglementation précise pour disposer d'autorisations spécifiques d'exercices. Nous aborderons donc le cadre réglementaire qui régit la réalisation de préparations pharmaceutiques hospitalières.

Une fois ces études préliminaires effectuées, la synthèse pharmaceutique a pu débuter. Nous verrons comment elle a été réalisée et nous détaillerons la démarche suivie. Une méthode de dosage analytique et des essais de dégradation ont dû être validés en amont pour la réalisation des différentes analyses effectuées durant notre étude. C'est par la suite que l'étude de stabilité a pu débuter et être menée sur

plusieurs mois. Nous détaillerons et analyserons les résultats de cette étude de stabilité et ce qu'ils ont pu évoquer. Un article scientifique sur le sujet a été publié dans une revue scientifique internationale que nous présenterons.

Enfin, nous discuterons notre travail, ses avantages et inconvénients, les points importants qui ont suscité de l'intérêt lors de sa réalisation et ce qu'il en est finalement ressorti. Puis, nous verrons les questionnements qui s'en sont ensuite dégagés, les axes d'amélioration, les critiques et les perspectives futures que cette étude a pu susciter localement mais également au sein de la communauté scientifique.

LA MYOPIE : PATHOLOGIE ET PRISE EN CHARGE

A. Données épidémiologiques actuelles

La myopie est le plus répandu des troubles réfractifs à travers le monde puisqu'il touche plus d'un quart de la population américaine adulte. Dans certaines populations asiatiques sa prévalence avoisinerait les 90% (1). Des données épidémiologiques récentes affirment que le nombre de patient myope passerait de 1.95 milliards en 2010 à 4.76 milliards d'ici à 2050 (2). Une méta-analyse affirme également que la prévalence mondiale de la myopie ne va cesser de croître jusqu'en 2050 et qu'à cette échéance le nombre de personnes atteintes de myopie dite sévère serait de plus de 1 milliard (3,4). Cette « épidémie » de myopie est désormais un réel problème de santé publique mondial. En effet, à Singapour, le coût direct de prise en charge de la myopie est estimé à 755 millions de dollars sur une année, et de manière globale à 328 milliards de dollars par an (2). La nécessité de trouver des moyens préventifs et thérapeutiques pour lutter contre cette pathologie est donc un enjeu majeur.

De nombreux facteurs de risques favorisent le déclenchement et par la suite le développement de la myopie tel que le fait de faire peu d'activité en plein air ou peu d'activités sportives, la faible exposition à la lumière du jour et aux rayons lumineux (5,6) ou le fait de stimuler uniquement la vision de près (2). Ces facteurs de risques sont bien souvent corrélés avec le niveau d'éducation des populations considérées et notamment le quotient intellectuel. En effet, une étude a démontré

une relation entre l'équivalent sphérique, valeur optique permettant d'apprécier le degré de la myopie, et le niveau d'éducation. Il est rapporté que plus le niveau d'étude est élevé, plus l'équivalent sphérique augmente se traduisant par une augmentation de la sévérité de la myopie. Par ailleurs, aucune corrélation n'a été démontrée entre astigmatisme (trouble réfractif parfois associé à la myopie) ou courbure cornéenne (paramètre en lien avec la longueur axiale de l'œil et donc la myopie) et niveau d'éducation (7).

En termes de degrés de sévérité, les myopies fortes sont souvent associées à des risques de complications majeures. Celles les plus fréquemment rencontrées chez des sujets présentant des myopies à des degrés avancés sont notamment des dégénérescences rétiniennes et maculaires, des décollements de la rétine ou encore des glaucomes secondaires (8). Ces différentes pathologies secondaires à la myopie peuvent induire des altérations temporaires voir des troubles de la vision irréversibles chez l'homme. La prise en charge de cette pathologie de la réfraction est donc une nécessité et un réel enjeu de santé publique mondial.

Afin de mieux comprendre comment elle se met en place et se développe, nous allons désormais aborder le versant physiopathologique de cette amétropie.

B. Physiopathologie de la myopie

La myopie fait partie des troubles ophtalmologiques classés dans les anomalies de la réfraction (9). Afin de définir sa physiopathologie et ses caractéristiques spécifiques, nous allons aborder différentes notions d'optique.

1. Principe général de la réfraction optique

Sur le plan anatomique, l'œil est composé de milieux transparents d'avant en arrière : la cornée, l'humeur aqueuse, le cristallin, l'humeur vitrée (Annexe 1). Les rayons lumineux les traversent successivement et parviennent jusqu'à la rétine où ils sont transformés en signal électrique. Ces signaux sont transmis via le nerf et les voies optiques jusqu'au cortex occipital où ils seront interprétés en image par le cerveau.

Lorsque la lumière rencontre une surface séparant deux milieux transparents d'indice différent comme ce qu'il se produit au niveau de l'œil, elle ne se propage alors plus en ligne droite mais sa direction est modifiée, c'est ce qu'on appelle le phénomène de réfraction. Au niveau de l'œil, plusieurs surfaces de réfraction et milieux réfringents sont traversés par les rayons lumineux, on peut donc qualifier cet organe d'appareil dioptrique ou système optique.

L'étude de la réfraction est fondamentale lors d'un examen d'ophtalmologie afin de distinguer les anomalies de la réfraction (où l'acuité visuelle peut être améliorée par le port d'appareil de correction optique) des maladies des voies optiques (où l'acuité visuelle ne peut pas être améliorée).

2. Définitions d'optique

a) L'œil emmétrope

L'œil emmétrope est un œil défini comme optiquement normal. Les rayons lumineux possédant une direction parallèle viennent se concentrer au niveau de la rétine et produisent une image nette (Annexe 2).

b) L'œil amétrope

L'œil dit amétrope est un œil possédant une anomalie de réfraction. Un objet situé à l'infini ne forme pas une image nette au niveau de la rétine, il est donc vu de manière flou. On parlera d'amétropies sphériques dans le cas de la myopie et de l'hypermétropie.

c) Le « *punctum remotum* »

Le *punctum remotum* (PR) est le point le plus éloigné que l'œil peut voir de manière nette.

d) Le « *punctum proximum* »

Le *punctum proximum* (PP) est le point le plus proche que l'œil peut voir de manière nette en accommodant (environ 7 centimètres pour l'œil emmétrope).

e) L'acuité visuelle

L'acuité visuelle est définie par le pouvoir de discrimination de l'œil : plus petite distance séparable visuellement ou minimum séparable entre deux points. C'est le paramètre fonctionnel de la macula, partie anatomique de l'œil situé en avant de la rétine. La macula permet également la distinction des couleurs et des contrastes d'un objet.

C'est l'acuité visuelle qui est le plus souvent mesurée lors des examens d'ophtalmologie pour caractériser les troubles de la vision. Elle est mesurée de loin et de près grâce à différentes échelles (l'échelle de *Monoyer*, graduée en dixième pour l'acuité visuelle de loin, et, l'échelle de *Parinaud* pour l'acuité visuelle de près) (Annexe 3).

3. Les amétropies

a) La myopie

La myopie est une anomalie de réfraction caractérisée par un œil trop convergent ou « trop long » par rapport à sa convergence qui est donc anormale. L'objet observé de loin est vu de manière flou, son image se forme en avant de la rétine.

b) L'hypermétropie

L'hypermétropie est une anomalie de réfraction caractérisée par un œil qui n'est pas assez convergent ou « trop court » par rapport à sa convergence qui est donc anormale. L'objet observé est vu de manière flou, son image se forme en arrière de la rétine.

c) L'astigmatisme

L'astigmatisme est une anomalie de réfraction dite non plane : la réfraction de l'œil n'est pas la même que l'on se situe dans tel ou tel plan de l'espace à la différence de la myopie ou de l'hypermétropie. Elle est souvent en lien avec un défaut de sphéricité de la cornée. L'objet observé est déformé, un point apparaît sous la forme d'une tâche : l'image vue est donc floue.

4. L'accommodation

a) Physiopathologie

L'accommodation servant à la vision de près comme de loin est permise par un composant essentiel de l'œil : le cristallin (Annexe 1). A travers la contraction ou le relâchement du muscle ciliaire, la forme du cristallin est modifiée, ce qui augmente son pouvoir de convergence ou de réfraction permettant ainsi une vision nette de loin comme de près pour un œil emmétrope.

L'amplitude d'accommodation est définie par la différence du pouvoir dioptrique de l'œil de loin et de près. Elle est très importante chez l'enfant et diminue avec l'âge de manière progressive pour devenir infime aux alentours de 70 ans.

b) Pathologie

La presbytie est la principale pathologie caractérisée par des troubles de l'accommodation. Pathologie du sujet âgé, elle résulte de l'épaississement du cristallin, de l'affaiblissement du muscle ciliaire et de la perte d'élasticité de l'enveloppe cristallinienne. Ainsi, un objet observé de près formera une image floue, il faut l'éloigner afin de le voir distinctement : la lecture de près est difficilement réalisable.

5. La myopie : anomalie de la réfraction

Ce trouble réfractif concerne environ un cinquième de la population occidentale. Un patient atteint de myopie possède un œil trop puissant par rapport à sa longueur, c'est-à-dire qu'il est trop convergent (Annexe 4). Son degré de sévérité s'apprécie en dioptrie (unité de mesure de réfraction des systèmes optiques).

Le *punctum remotum* se situe à une distance finie de l'œil, un objet observé situé au-delà est vu de manière flou, son image ou point focal se forme en avant de la rétine. En revanche, le *punctum proximum* est quant à lui plus proche de l'œil myope que de l'œil emmétrope, la vision d'un myope est donc nette de près (Annexe 5).

Cliniquement, la distinction est faite entre :

a) La myopie faible

C'est une anomalie simple de la réfraction qui se stabilise rapidement chez le jeune adulte. Cette myopie n'excède pas une variation de 6 dioptries.

b) La myopie forte

C'est une anomalie héréditaire qui débute chez l'enfant jeune et qui évolue pendant plusieurs années. Le globe oculaire s'allonge de manière progressive accentuant par

conséquent la myopie. Cette myopie est caractérisée par une anomalie réfractive supérieure à 6 dioptries.

Elle peut s'accompagner de complications oculaires telles que la cataracte, le glaucome à angle ouvert ou encore le décollement rétinien.

Après avoir énoncé les grands principes physiopathologiques de la myopie, nous allons à présent faire un tour d'horizon des moyens préventifs et thérapeutiques actuellement disponibles pour ralentir son évolution.

C. Moyens préventifs et thérapeutiques actuels

Des moyens préventifs permettant de retarder la mise en place de la myopie avant son instauration existent mais restent de faible efficacité. Après son instauration, différents moyens sont actuellement employés pour la corriger et pour ralentir son développement, certains bien connus et utilisés depuis longtemps, d'autres assez récents présentant des résultats encourageants et prometteurs concernant le futur.

1. Moyens préventifs limitant l'instauration de la myopie

Concernant les moyens de prévention du développement de la myopie, le temps passé à faire des activités à l'extérieur est souvent cité. En effet, il est rapporté (5)

que le temps passé à réaliser des activités en plein air diminuerait le risque de mise en place de la myopie en ralentissant la modification de réfraction causant ces troubles visuels. Cependant, ce temps passé en extérieur ne permettrait pas de diminuer le développement de la myopie chez des patients qui présenteraient déjà ce trouble réfractif. Le temps nécessaire au ralentissement de la mise en place de la pathologie reste à déterminer. Il est toutefois rapporté que 2 à 3 heures d'activités en plein air pourraient apporter une protection considérable, ou encore, que chaque heure de plus passée en extérieur par semaine diminuerait le risque de développement de la myopie (6).

D'autres théories ont évoqué le fait qu'une exposition plus importante à la lumière pourrait être un facteur de ralentissement de développement de la myopie, notamment en augmentant le relargage de dopamine au niveau de la rétine ce qui diminuerait l'élongation axial oculaire, responsable du développement de la myopie (5,6). Toutefois, d'après *Sanchez-Gonzalez et al.* ce temps passé à l'extérieur en étant exposé à une lumière importante ne serait pas un moyen de prévention concluant dans le développement de la myopie en tant que tel (10).

Par conséquent, des moyens physiques correcteurs et/ou thérapeutiques doivent être employés afin de corriger et/ou freiner la progression de cette pathologie comme nous allons le voir.

2. Moyens correcteurs et moyens thérapeutiques limitant la progression de la myopie après son instauration

a) Les moyens physiques

(1) Les appareils de correction optique

➤ Les lunettes de correction et lentilles de contact

Le traitement de la myopie peut s'effectuer via le port de lunettes composées de verres sphériques concaves ou de lentilles de contact concaves, à bords épais, rigides ou souples. La correction apportée est fonction du degré d'intensité de la pathologie (unité d'évaluation : la dioptrie (dixième)).

Une étude originale évaluant la progression de la myopie et l'élongation pathologique de l'œil dans une population pédiatrique (8 à 11 ans) sur 2 ans a permis de mettre en évidence un ralentissement significatif de ces 2 paramètres chez les sujets porteurs de lentilles de contact multifocales. En effet, le port de ces lentilles multifocales sur plusieurs mois suggère qu'elles permettraient de ralentir le développement de la myopie (50% par rapport au port de lentilles à vision dite « simple ») et que leur effet sur la diminution de l'élongation axiale de l'œil (29% par rapport au port de lentilles à vision dite « simple ») augmenterait au-delà de la

première année de port. Toutefois, ce dispositif ne serait pas adapté pour tous les patients myopes (11).

➤ Les verres de lunettes composés de microlentilles asphériques

Récemment, une technique innovante a été développée par plusieurs laboratoires : les verres de lunettes composés de microlentilles asphériques (Stellest™ et MiYOSmart™). Ces verres sont composés d'une zone centrale corrigeant l'amétropie et d'une zone périphérique constituée d'une succession d'anneaux concentriques de microlentilles asphériques permettant de ralentir le développement de la myopie chez l'enfant :

- La première zone permet de créer une zone de vision unifocale focalisant la lumière sur la rétine ce qui a pour effet de corriger le trouble de réfraction du patient et qui garantit son confort visuel.
- La seconde zone permet de ralentir significativement l'allongement de l'œil (ralentissement de l'augmentation de la longueur axiale et ralentissement de la diminution de l'équivalent sphérique) grâce à la concentration du signal visuel en avant de la rétine et donc de freiner le développement de la myopie.

Deux études cliniques menées sur 1 puis 2 ans viennent appuyer ces propos : en effet, le port de verres composés de microlentilles asphériques dans une population pédiatrique, et ce pendant au moins 12 heures par jour, permettrait de ralentir de manière significative le développement de la myopie (60% en moyenne) par rapport au port de verres standards (12,13).

Ce moyen correcteur très récent s'avère être prometteur mais encore coûteux dans le ralentissement de cette amétropie chez l'enfant.

➤ L'orthokératologie

D'après l'encyclopédie du Syndicat National des Ophtalmologistes de France (SNOF) (14) : l'orthokératologie est une méthode de correction physique qui consiste au port de lentilles flexibles pendant la nuit pour remodeler la surface cornéenne et ainsi annuler pendant 24 à 48 heures les effets cliniques de la myopie. L'emploi de ces lentilles à géométrie inversée pendant un minimum de 6 heures chaque nuit permet d'améliorer le phénomène de réfraction grâce au remodelage cornéen.

Cette technique ne s'adresse qu'aux myopies faibles, inférieures ou égales à 4 dioptries et n'apporte qu'une correction temporaire puisque l'arrêt du port des lentilles induit la réapparition des troubles de réfraction chez les patients : la cornée reprend peu à peu sa forme originelle.

Il est également rapporté à plusieurs reprises que l'orthokératologie serait une méthode de traitement efficace de la myopie en retardant son développement, notamment en diminuant l'élongation axiale progressive de l'œil en comparaison au port de lentille simple (possédant un seul foyer) (15,16). Ses effets bénéfiques seraient plus marqués dans les deux premières années de traitement, c'est-à-dire lors du développement oculaire des jeunes patients traités, mais, seraient moins marqués

au-delà (15). L'orthokératologie est une technique particulièrement employée et approuvée dans l'est de l'Asie (16).

En France, l'orthokératologie a du mal à se développer du fait des risques infectieux permanents, de son utilisation contraignante et de son effet réversible (14). Les ophtalmologues lui préfèrent davantage les techniques de chirurgie réfractive.

(2) La chirurgie réfractive

Proposée pour le traitement des myopies faibles à moyennes stabilisées à l'âge adulte (non indiquée en pédiatrie), la chirurgie réfractive repose sur différentes techniques (9) :

- Le laser « *femtoseconde* » est un laser infrarouge avec un temps d'impulsion très court (expliquant sa dénomination). Il induit une vaporisation des tissus cornéens permettant des découpes tissulaires fines : création de charnière ou « capot cornéen » préalable à la correction chirurgicale des anomalies réfractives (technique LASIK : « *Laser assisted in situ keratomileusis* »). Ce laser, employé préalablement au laser « *Excimer* », permet d'obtenir l'ablation tissulaire sans dégrader l'épithélium cornéen et les tissus annexes.
- Le laser « *Excimer* » repose quant à lui sur la technique de photo-ablation (impulsions de lumière ultraviolette). Il permet l'abrasion de l'épithélium cornéen par vaporisation tissulaire remodelant ainsi sa structure et corrigeant le trouble

réfractif. L'emploi du laser « *Excimer* » intervient suite à la création d'une charnière cornéenne ou « capot cornéen » grâce au laser « *femtoseconde* ».

Ces techniques permettent de modifier la courbure initialement pathologique de la cornée et ainsi modifier la puissance réfractive de l'œil qui devient alors moins convergent. Les techniques lasers sont purement « correctives » et réservées à l'adulte myope stabilisé, elles ne permettent en aucun cas de ralentir le développement de la myopie.

b) Les moyens thérapeutiques freinateurs

L'atropine est un alcaloïde tropanique, antagoniste non sélectif des récepteurs muscariniques à l'acétylcholine. Cette molécule est utilisée depuis quelques années dans le contrôle du développement de la myopie. En effet, par voie ophtalmique, elle bloque les réponses aux stimulations cholinergiques du sphincter irien et du muscle ciliaire responsable de l'accommodation. Elle produit ainsi une dilatation de la pupille (mydriase) et une paralysie de l'accommodation (cycloplégie). Sur le plan thérapeutique, les collyres faiblement dosés en atropine se font progressivement une place dans l'arsenal des traitements préventifs freinateurs des myopies fortes du jeune enfant puisqu'ils ont montrés leur efficacité clinique à plusieurs reprises.

C'est notamment le cas pour des collyres dosés à 0.05, 0.025 et 0.01% en atropine : l'étude LAMP a démontré que leur utilisation permettait de contrôler le

développement de la myopie de manière significative dans les 3 conditions de concentration par rapport à un placebo, et ce, avec une relation de dose à effet (17). Sur une période de 1 an, la concentration la plus efficace serait celle à 0.05% puisqu'elle permettrait d'obtenir les meilleurs résultats concernant les mesures d'équivalent sphérique et de longueur axiale, paramètres anatomiques oculaires clés dans le développement de la myopie.

Cependant, les résultats d'une autre étude ont démontré que la concentration maximum en atropine tolérable en termes de sécurité d'emploi par rapport à la survenue d'éventuels effets indésirables (dilatation de la pupille induisant une photophobie, troubles de l'accommodation majeurs provoquant une altération de la vision de près, augmentation du risque de cataracte) était de 0.02%. De plus, la diminution de concentration à 0.01% n'entraînerait pas de différences majeures en termes d'efficacité et de tolérance clinique par rapport à celle à 0.02% (18).

Dans l'étude ATOM1 (19), comparant sur 2 années l'efficacité et la sécurité d'emploi de trois collyres faiblement dosés en atropine (0.5%, 0.1% et 0.01%), la progression de la myopie et l'élongation axiale de l'œil chez des sujets asiatiques jeunes (6 à 12 ans) traités respectivement par l'une des trois concentrations ne seraient pas différentes significativement. En effet, il est rapporté que l'atropine dosée à 0.01% serait tout aussi efficace et présenterait de moindres effets secondaires (troubles de l'accommodation liées à la dilatation pupillaire engendrée, diminution de l'acuité visuelle en vision de près) que de plus fort dosage à 0.1% et 0.5%. Par ailleurs, aucunes dermatites ou conjonctivites allergiques n'ont été déclarées avec l'atropine dosée à 0.01% contre 16 cas rapportés pour les plus forts

dosages. Une seconde étude menée par la même équipe (ATOM2) mais sur 5 ans cette fois-ci (20), indique que la progression globale moyenne de la myopie est inférieure dans le groupe traité avec la concentration à 0.01% que celle observée dans les groupes traités avec des concentrations plus importantes 0.1 et 0.5%, qui présentaient un effet rebond en terme de progression de la myopie après arrêt du traitement. Les concentrations faiblement dosées en atropine à 0.01% seraient donc plus efficaces en termes cliniques avec moins d'effets indésirables sur une longue période de traitement (4).

Une étude anglaise cette fois-ci, a comparé l'efficacité et la sécurité d'emploi de collyre à l'atropine dosés à 0.01% par rapport à l'utilisation d'un placebo sur 2 ans dans une population pédiatrique européenne (enfants de 6 à 12 ans) (21). Elle a également mis en lumière l'efficacité d'action, la fiabilité d'emploi de la molécule à de faibles concentrations et un faible effet rebond en termes de progression de la myopie à l'arrêt du traitement.

c) Combinaison des moyens physiques et thérapeutiques freinateurs

La combinaison de moyens correctifs et freinateurs pour limiter le développement de la myopie est de plus en plus considérée. En effet, ni les moyens physiques tel que l'orthokératologie ou les moyens chimiques comme les collyres à l'atropine ne permettent de ralentir avec succès la progression de la myopie. Ces derniers

devraient être utilisés à de plus fortes concentrations que celle de 0.01% pour avoir un effet freinateur significatif, mais qui engendrerait de nombreux effets indésirables (15). C'est pourquoi, l'emploi des deux méthodes en simultanées, pour obtenir le bénéfice de chacune sans effets indésirables, apparaît comme une potentielle piste à exploiter.

Une récente revue de la littérature a confronté plusieurs articles qui concluaient tous que l'orthokéatologie associée à l'emploi de collyres d'atropine faiblement dosés permettait de ralentir de manière plus efficace le développement de la myopie grâce à leur synergie d'action comparé à l'orthokéatologie seule (10,22). Le mécanisme en jeu est encore mal élucidé mais il se pourrait que la mydriase induite par l'atropine permette une illumination plus importante de la rétine engendrant un ralentissement du développement de la myopie au niveau rétinien et potentialisant ainsi l'effet de l'orthokéatologie. Toutefois, ces résultats restent à prouver sur des périodes de traitements plus importantes.

L'emploi des collyres faiblement dosés en atropine, seuls ou en association, apparaît donc comme un moyen thérapeutique freinateur innovant à l'heure actuelle.

D. Les collyres à base d'atropine, une thérapeutique d'avenir

Les collyres à base d'atropine se détachent largement des moyens préventifs et thérapeutiques freinateurs puisqu'ils ont fait leur preuve en termes d'efficacité et de sécurité d'emploi dans plusieurs études scientifiques.

En effet, une étude ayant comparée la progression de la myopie sur un échantillon de 46 jeunes patients (de 5 à 10 ans), présentant une myopie forte, traités ou non avec des collyres faiblement dosés à l'atropine (1% soit 10 mg/mL) à raison d'une fois par jour pendant 1 an, a montré qu'il existait une différence significative en termes de progression de la myopie entre les deux groupes (1). Il était rapporté que la progression de la myopie de -0.50 dioptries voir de -1.0 dioptries ou plus, touchait plus de patients du groupe sans traitement que ceux étant dans le groupe traitement à base de collyres à l'atropine 1%. De plus, la modification de longueur axiale était statistiquement différente dans les deux groupes puisqu'elle était de 0.09 mm dans le groupe traité contre 0.70 mm dans le groupe non traité. Les enfants traités avec les collyres à l'atropine présentaient une progression annuelle de leur longueur axiale oculaire nettement inférieure à celle de ceux du groupe contrôle. Le traitement à base de collyre à l'atropine 1% apparaît donc comme efficace et sûr dans le ralentissement de la progression de la myopie chez des enfants présentant une myopie forte dans cette étude. Cette concentration de 1% n'a pas engendré de réactions allergiques majeures sur cet échantillon de patients et, le traitement présentait dans sa globalité une bonne tolérance clinique. Toutefois, il faut relever qu'une réaction allergique, réversible à l'arrêt du traitement, s'est manifestée chez 1 sujet et que 12 enfants (52.2%) présentaient une photophobie en lien avec la dilatation pupillaire engendrée par ce collyre mydriatique. Ce sont ici des exemples d'effets indésirables rencontrés lors de l'emploi de collyres à l'atropine qui demeurent, bien que déjà faiblement dosés, à des concentrations trop importantes engendrant des problèmes de tolérance. Problèmes à prendre particulièrement en

compte vis-à-vis de la population pédiatrique cible de cette thérapeutique. Par conséquent, la concentration à 1% s'avère être trop élevée compte tenu des effets indésirables engendrés. Comme précédemment énoncé, la concentration maximale en atropine tolérable était de 0.02% et la diminution de celle-ci à 0.01% n'entraînerait pas de différences significatives majeures en termes d'efficacité et de tolérance clinique par rapport à celle à 0.02% (18,19).

Par ailleurs, sur 5 ans (ATOM2), la progression moyenne globale de la myopie était inférieure avec la concentration à 0.01% que celle observée avec celles de 0.1 et 0.5% (20), qui présentaient un effet rebond plus important après arrêt du traitement. La concentration faiblement dosée en atropine à 0.01% serait donc plus efficace en terme clinique avec moins d'effets indésirables sur une longue période de traitement.

Efficacité d'action et fiabilité d'emploi sont les deux caractéristiques principales ressortant des articles concernant la molécule d'atropine à 0.01% ainsi qu'un faible effet rebond en termes de progression de la myopie à l'arrêt du traitement (21).

Actuellement, il n'existe pas de spécialités commerciales d'atropine faiblement dosées sur le marché ayant une AMM (autorisation de mise sur le marché) dans l'indication du ralentissement du développement de la myopie. La mise à disposition d'un collyre efficace et sûre est donc une nécessité thérapeutique réelle. La production d'une spécialité pharmaceutique et des études menées à plus grandes échelles s'avèrent donc être des perspectives d'avenir pour le devenir de cette thérapeutique.

Par conséquent, au vu des différentes données bibliographiques, la concentration des collyres à base d'atropine à 0.1 mg/mL ou 0.01% semble être la plus pertinente dans un projet de développement, au vu de son efficacité et de sa tolérance clinique. Il nous reste désormais à aborder le cadre réglementaire et législatif pour leur réalisation pharmacotechnique en tant que préparation hospitalière puisqu'aucune spécialité commerciale n'est actuellement disponible.

E. Règlementation PUI et préparation hospitalière

Dans le cadre de la réalisation de préparations hospitalières, les PUI doivent disposer d'autorisations spécifiques d'exercice. Ces dernières sont délivrées par les agences régionales de santé (ARS) pilotées par le ministère des solidarités et de la santé. Pour les obtenir, les PUI sont dans l'obligation de répondre à un cahier des charges établi par les autorités compétentes.

1. Règlementation des différentes missions des PUI soumises à autorisation

Selon l'article R5126-1 du Code de la Santé Publique (CSP) relatif aux missions des PUI (23) :

« I. - Les pharmacies à usage intérieur répondent aux besoins pharmaceutiques des personnes prises en charge par l'établissement, service ou organisme dont elles relèvent, ou au sein d'un groupement hospitalier de territoire ou d'un groupement de coopération sanitaire dans lequel elles ont été constituées. A ce titre, elles ont pour missions :

1° D'assurer la gestion, l'approvisionnement, la vérification des dispositifs de sécurité, la préparation, le contrôle, la détention, l'évaluation et la dispensation des médicaments, produits ou objets mentionnés à l'article L. 4211-1, des dispositifs médicaux stériles et des médicaments expérimentaux ou auxiliaires définis à l'article L.5121-1-1, et d'en assurer la qualité;

II. - Ces missions peuvent être exercées par la pharmacie à usage intérieur pour son propre compte, et dans le cadre de coopérations, pour le compte d'une ou plusieurs autres pharmacies à usage intérieur. »

Concernant la préparation, le contrôle, la détention, l'évaluation et la dispensation des médicaments, l'article L. 4211-1 définit les activités sous monopole pharmaceutique (24) :

« 1° La préparation des médicaments destinés à l'usage de la médecine humaine ;

2° La préparation des objets de pansements et de tous articles présentés comme conformes à la pharmacopée ;

3° La préparation des générateurs, trousseaux ou précurseurs mentionnés à l'article L. 5121-1 ;

4° La vente en gros, la vente au détail, y compris par internet, et toute dispensation au public des médicaments, produits et objets mentionnés aux 1°, 2° et 3° ; »

Le récent décret n°2019-489 sur les pharmacies à usage intérieur paru au journal officiel de la République française est entré en vigueur le 24 mai 2019 pour faire suite aux précédents. Il reprend les différentes actions de la pharmacie hospitalière à usage intérieur au sein des structures hospitalières citées précédemment. Il aborde notamment le régime d'autorisation des activités et liste celles comportant des risques particuliers dont l'autorisation est délivrée pour une durée de cinq ans.

Selon l'article R5126-9 du CSP, les pharmacies à usages intérieurs sont soumises à autorisation concernant plusieurs activités (25) :

« I. - Pour assurer une ou plusieurs des activités prévues aux 1° à 3° suivants, la pharmacie à usage intérieur est tenue de disposer d'une autorisation mentionnant expressément cette ou ces activités ou délivrée tacitement à la suite d'une demande mentionnant expressément cette ou ces activités :

1° La préparation de doses à administrer de médicaments mentionnés à l'article L. 4211-1 ou des médicaments expérimentaux ou auxiliaires définis à l'article L. 5121-1-1 ;

2° La réalisation des préparations magistrales à partir de matières premières ou de spécialités pharmaceutiques ;

3° La réalisation des préparations hospitalières à partir de matières premières ou de spécialités pharmaceutiques ; »

Il est donc également important de noter que selon l'article R5126-33 du CSP (26), les activités comportant des risques particuliers concernées sont notamment :

« Les préparations stériles, les préparations magistrales produites à partir de matières premières ou de spécialités pharmaceutiques contenant des substances dangereuses pour le personnel et l'environnement ; la reconstitution de spécialités pharmaceutiques, y compris celle concernant les médicaments de thérapie innovante ; la réalisation des préparations hospitalières, de médicaments radiopharmaceutiques, de médicaments expérimentaux. »

La préparation des collyres d'atropine relève des missions soumises à autorisation des PUI puisqu'il s'agit de préparation hospitalière sous monopole pharmaceutique dont la production est à risque puisqu'il s'agit de préparations stériles. Nous allons maintenant aborder le statut et la réglementation relative aux préparations hospitalières.

2. Les préparations hospitalières : statut et réglementation

Les préparations hospitalières doivent répondre à certains critères d'exigence et répondre à des normes qui sont établies dans le guide des bonnes pratiques de préparation (BPP) publié en 2007 par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) et en cours de révision actuellement par l'Agence National de Sécurité du Médicament (ANSM).

Ce guide définit de manière générale les lignes directrices concernant les préparations et leurs contrôles, et de manière plus spécifique celles concernant les préparations de médicaments stériles. Ces dernières abordent notamment les procédés de préparations, les locaux et les équipements nécessaires, le personnel, les préparations en elles-mêmes ainsi que les contrôles qualités à effectuer.

D'après l'article L.5121-1 du CSP (27), une préparations hospitalières est définit comme :

« Tout médicament, à l'exception des produits de thérapies génique ou cellulaire, préparé selon les indications de la pharmacopée et en conformité avec les bonnes pratiques mentionnées à l'article L. 5121-5, en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations ou d'un cadre de prescription compassionnelle mentionnés aux articles L. 5121-9-1, L. 5121-12 et L. 5121-12-1 , d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un

établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, par une pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé, ou par l'établissement pharmaceutique de cet établissement de santé autorisé en application de l'article L. 5124-9 ou dans les conditions prévues à l'article L. 5126-6. Les préparations hospitalières sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients par une pharmacie à usage intérieur dudit établissement. Elles font l'objet d'une déclaration auprès de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, dans des conditions définies par arrêté du ministre chargé de la santé ; »

En ce qui concerne les collyres à base d'atropine, nous avons à faire à des préparations pharmaceutiques rentrant dans le cadre des préparations de médicaments stériles dont les exigences sont définies dans les BPP (28), à savoir :

a) Principe

La préparation des médicaments stériles impose des exigences particulières en vue de réduire les risques de contamination microbienne, particulaire et pyrogène. La garantie de la stérilité et des autres aspects qualitatifs des médicaments ne dépend pas uniquement de contrôles réalisés en fin de fabrication ou sur les préparations terminées, mais également de la qualité des matières premières et des articles de conditionnement, de la validation et la maîtrise des procédés de préparation et des

contrôles microbiologiques et particulaires de l'environnement, ainsi que de la qualification du personnel.

b) Procédés de préparation

Dans notre cas, les matières premières utilisées pour la préparation des médicaments stériles sont des matières premières à usage pharmaceutique (MPUP). Le procédé employé pour la réalisation des collyres d'atropine est la filtration stérilisante. Elle est à effectuer aussi près que possible du point de remplissage des flacons. Chaque solution est filtrée à travers un filtre stérile à pores de diamètre nominal inférieur ou égal à 0,22 μm , ou sur un autre type de filtre possédant des propriétés de rétention bactérienne équivalentes. Les opérations qui suivent la filtration stérilisante, dont notamment la mise en flacon, sont réalisées dans des conditions aseptiques afin de préserver la stérilité de chacune des solutions finales.

c) Locaux et équipements

Les zones d'atmosphère contrôlée (ZAC) sont constituées de locaux et/ou d'équipements dont les qualités microbiologiques et particulaires sont maîtrisées. Les préparations stériles sont réalisées dans des ZAC qui sont classées selon leur niveau de contamination. Chaque opération de préparation requiert un niveau approprié de propreté de l'environnement de façon à réduire le risque de

contamination particulaire ou microbienne des matières premières et des préparations terminées.

d) Personnels et préparations

Le nombre de personnes présentes dans les zones de préparation est minimum. L'accès aux différentes zones est limité, le déplacement du personnel dans ces zones est maîtrisé. Toutes les personnes employées dans ces zones reçoivent une formation appropriée et évaluée. Cette formation comporte notamment des éléments d'hygiène et de microbiologie.

Une propreté et une hygiène personnelle de haut niveau sont essentielles. Un vêtement protecteur propre et stérile, ainsi que masques, gants et autres protections sont portés par chaque opérateur et leurs qualités sont adaptées aux préparations et aux classes des zones de travail. Ils sont portés de façon à protéger le produit des contaminations. Les montres bracelets, le maquillage et les bijoux sont à exclure de ces zones.

Des précautions sont prises aux différents stades de la préparation pour diminuer les risques de contamination. Les activités et les mouvements sont limités au minimum dans les ZAC, et particulièrement lors de préparations aseptiques.

e) Contrôles de qualité

Quelle que soit la taille du lot, la garantie de la stérilité est assurée par le respect d'un ensemble de conditions et de paramètres couvrant en particulier la qualification des installations et des équipements, la qualité des matières premières et des articles de conditionnement, la validation et la maîtrise des procédés de préparation et de stérilisation, les contrôles microbiologiques et particuliers de l'environnement et la formation initiale et continue du personnel. L'essai de stérilité appliqué à la préparation terminée est considéré comme le dernier d'une série de contrôles permettant de garantir la stérilité. Les échantillons prélevés pour l'essai de stérilité sont représentatifs du lot dans les conditions prévues par la pharmacopée européenne et les BPP dans le cas de production en série.

Ce préambule épidémiologique et clinique effectué, poursuivi de la présentation du statut réglementaire et législatif encadrant les préparations hospitalières nous conduit à présent à la réalisation de la formulation du collyre puis à son étude de stabilité. C'est ce à quoi nous allons nous intéresser dans la seconde partie de notre travail.

ETUDE DE STABILITE DE COLLYRES D'ATROPINE A 100 μ G/ML (0.01%) POUR LA PREVENTION DE L'EVOLUTION DE LA MYOPIE EN PEDIATRIE

L'objectif des études de stabilité est d'étudier comment une formulation pharmaceutique ou une substance active se comporte dans des conditions données (température, humidité, lumière) pendant une période définie. Les résultats déterminent la durée de vie et les conditions de stockage recommandées d'une substance active ou d'un médicament.

L'étude de stabilité de collyres d'atropine pour la prévention de l'évolution de la myopie en pédiatrie de sa conception jusqu'aux résultats sera le propos que nous allons développer à présent. Cette étude porte sur deux formulations de collyres d'atropine à 100 μ g/mL (0.01%), avec et sans conservateurs, dans deux types de flacons en polyéthylène de basse densité (PEBD). Elle a notamment fait l'objet d'une publication dans une revue internationale que nous allons tout d'abord présenter, puis, nous aborderons les résultats complémentaires obtenus à posteriori de la publication.

A. Mise en valeur des résultats : publication scientifique dans la revue international « *Pharmaceutics* » et études complémentaires

1. Lien hypertexte d'accès à la version en ligne de l'article

<https://www.mdpi.com/1999-4923/12/8/781/htm>

[doi : 10.3390/pharmaceutics12080781](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080781)

2. Article manuscrit publié dans « *Pharmaceutics* »



pharmaceutics



Article

Stability of Ophthalmic Atropine Solutions for Child Myopia Control

Baptiste Berton ¹, Philip Chennell ^{2,*}, Mouloud Yessaad ¹, Yassine Bouattour ²,
Mireille Jouannet ¹, Mathieu Wasiak ¹ and Valérie Sautou ²

¹ CHU Clermont-Ferrand, Pôle Pharmacie, F-63003 Clermont-Ferrand, France;
baptiste-berthon@hotmail.fr (B.B.); myessaad@chu-clermontferrand.fr (M.Y.);
mjouannet@chu-clermontferrand.fr (M.J.); mwasiak@chu-clermontferrand.fr (M.W.)

² Université Clermont Auvergne, CHU Clermont-Ferrand, CNRS, SIGMA, ICCF, 63000 Clermont-Ferrand,
France ; ybouattour@chu-clermontferrand.fr (Y.B.) ; vsautou@chu-clermontferrand.fr (V.S.)

* Correspondence: pchennell@chu-clermontferrand.fr

Received: 25 June 2020; Accepted: 7 August 2020; Published: date

Abstract: Myopia is an ophthalmic condition affecting more than 1/5th of the world population, especially children. Low-dose atropine eyedrops have been shown to limit myopia evolution during treatment. However, there are currently no commercial industrial forms available and there is little data published concerning the stability of medications prepared by compounding

pharmacies. The objective of this study was to evaluate the stability of two 0.1 mg/mL atropine formulations (with and without antimicrobial preservatives) for 6 months in two different low-density polyethylene (LDPE) multidose eyedroppers. Analyses used were the following: visual inspection, turbidity, chromaticity measurements, osmolality and pH measurements, atropine quantification by a stability-indicating liquid chromatography method, breakdown product research, and sterility assay. In an in-use study, atropine quantification was also performed on the drops emitted from the multidose eyedroppers. All tested parameters remained stable during the 6 months period, with atropine concentrations above 94.7% of initial concentration. A breakdown product (tropic acid) did increase slowly over time but remained well below usually admitted concentrations. Atropine concentrations remained stable during the in-use study. Both formulations of 0.1 mg/mL of atropine (with and without antimicrobial preservative) were proved to be physicochemically stable for 6 months at 25 °C when stored in LDPE bottles, with an identical microbial shelf-life.

Keywords: atropine; ophthalmic solution; stability; myopia

1. Introduction

Myopia (or short-sightedness) is an ophthalmic condition that leads to blurred long-distance vision, generally characterized by a refractive error of -0.5 or -1 diopters. Overall, it has been estimated that currently 1.4 billion people in the world are myopic (22.9% of the population), and crude estimations suggest that, by 2050, there will be 4.7 billion people affected (nearly 50% of world population) [1]. The prevalence of myopia is variable between countries, affecting for example about 30% of young adults in Europe [2], 59% in North America [3], to more than 95% in some student populations of Asian countries [4,5], with onset of the disease occurring during childhood and adolescence. Many risk factors have been suggested or clearly identified, such as time spent performing close-vision activities, such as reading or looking at smart-device screens [6], lack of physical exercise, or exposure to sunlight [3,7], often all linked to higher education rates [8]. If left uncorrected, myopia has been shown to have major consequences on children's level of education, quality of life, and personal and psychological well-being [9], and its economic impact on society has been estimated at US\$244 billion from global potential productivity loss [10]. Several recommendations have been proposed to limit the onset of myopia, like encouraging children spending time outside, limiting close-vision activities, and adapting light conditions [11], but whilst fundamental, they might not be sufficient or easily implemented. Current therapeutic options all have limitations; for example, orthokeratology (reshaping of the cornea by a hard, hydrophilic, gas-permeable contact lens worn during sleep and removed during the day) does not stop disease progression to returning to its previous rate after treatment discontinuation and requires high levels of patient compliance [12]. The use of correction glasses or lenses does not address the root-cause, refractive surgery is only curative, and its cost-effectiveness is still uncertain [13]. Pharmacological treatments have however shown some very promising potential. Of these, mydriatic agents such as atropine or tropicamide gained interest early on [14], with atropine being the most studied. Its biological action has been surmised as involving a complex interplay with receptors on different ocular tissues at multiple levels, leading to a decrease in change in the cycloplegic refraction and axial length elongation [15]. Initially tested at 1% concentration during the ATOM1 trial, atropine eyedrops were proved to be effective in controlling myopic progression but caused important visual side effects resulting from cycloplegia and mydriasis [16]. Since then, several clinical trials have evaluated the safety and efficiency of atropine eye drops at lower concentrations. The ATOM2 trial studied myopia progression in 400 children 2 years after treatment with 0.01%, 0.1%, and 0.5% and found the 0.01% concentration to be the concentration causing the least side effects for comparable efficacy in controlling myopia

progression [17,18]. Very recently, the LAMP phase 2 trial report confirmed that concentrations ranging from 0.01% to 0.05% were well tolerated in 383 children after two years of treatment, with patients experiencing rare and mild side effects [19], even if the need for photochromatic glasses was higher than 30% for treated patients. The ATOM1, ATOM2, and LAMP trials were all conducted on Asian patients, and some have highlighted the need for high-quality evidence from European populations on atropine effectiveness in controlling myopia progression [20]. However, a smaller study on European paediatric patients also concluded that 0.01% atropine eye drops slowed the rate of myopia progression whilst retaining a favourable safety profile [21].

Despite all this recent and very favourable clinical data, there is still currently no commercially available low dose formulation of atropine eyedrops. In order to treat patients, hospital and compounding pharmacies could produce the desired ophthalmic solution, but the lack of long-term validated stability data severely limits their conservation period by imposing short expiration dates after preparation [22,23]. Indeed, few studies have been published concerning atropine eyedrops stability, but the analyses were either lacking several tests or suffered from shortcomings concerning breakdown product research [24–26]. As single-dose container technology is not readily available to compounding pharmacies, multidose eyedroppers (often in low dose polypropylene) are the most used container and therefore the most studied [27–30]. However, not all of those devices possess a system allowing their content to be preservative-free, and their contents must therefore be preserved. Because 0.1 mg/mL is the concentration with currently the most data concerning safety and efficacy, the aim of this study was therefore to assess the physicochemical stability and to control the sterility of two 0.1 mg/mL atropine ophthalmic solutions (with and without an antimicrobial conservative) in two different low-density polyethylene (LDPE) multidose eyedroppers (one with a sterility-preserving technology allowing the absence of an antimicrobial preservative in the formulation and the other without such a system in order to allow choice of container depending on stability data) at 25 °C for six months in unopened eyedroppers.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation and Storage of Atropine Solution Formulations

Two different formulations of 0.1 mg/mL (0.01%) atropine ophthalmic solutions were prepared:

- atropine solution with an antimicrobial preservative (cetrimide) for use with ethylene oxide sterilized white opaque LDPE squeezable multidose eyedroppers (reference VPLA25B10; Laboratoire CAT®, Lorris, France)
- atropine solution without the preservative for use within gamma-sterilized white opaque LDPE squeezable multidose eyedropper (reference 10002134) equipped with sterility preserving Novelia® caps (reference 20050772; Nemera, La Verpillère, Cedex France).

The details of each formulation are presented in Table 1. All compounds that were used were of pharmaceutical grade.

Table 1. Composition of the tested atropine ophthalmic formulations. q.s: quantity sufficient.

Chemical Components	Formulation (mg)	
	Without Preservative	With Preservative
Atropine sulphate (batch 18276508, exp. 31/01/2021, Inresa, France)	100	100
Natrium dihydrogenophosphate dihydrate (NaH ₂ PO ₄) (batch 190298040, exp. 30/11/2021, Inresa, France)	7800	7800
Dinatrium monohydrogenophosphate dodecahydrate (Na ₂ HPO ₄) (batch 18129611, exp. 30/04/2023, Inresa, France)	4480	4480
Cetrimide (batch 16F08-B01-334049, exp. 05/2020, Fagron, Netherlands)		100
Sodium chloride (NaCl) 0.9% (Versylene®; Fresenius Kabi France, Louviers, France)	q.s 1000 mL	q.s 1000 mL

The formulations were prepared by dissolving atropine into the 0.9% sodium chloride solution at room temperature under gentle agitation before adding the hydrogenophosphate buffer and, finally, if needed, the preservative (cetrimide). For the purpose of the study, batch size was 1 L for both formulations. Cetrimide at a concentration of 0.01% was chosen because it is a preservative commonly used for the antimicrobial preservation of ophthalmic solutions, with an efficacy similar to benzalkonium chloride [31,32].

The obtained atropine solutions were filtered through a 0.22- μ m filter (Stericup® Sterile Vacuum Filtration Systems, Merck Millipore, MC2, Clermont-Ferrand, France) and then sterilely distributed (6 mL per unit, for a maximum filling capacity of 8 mL for both multidose eyedroppers) into the eyedroppers under the laminar airflow of an ISO 4.8 microbiological safety cabinet using a conditioning pump (Repeater pump, Baxter, Guyancourt, France). The solution was distributed into the two different low-density polyethylene (LDPE) eyedroppers.

2.2. Study Design

The stability of the 0.1 mg/mL atropine solutions was studied for 180 days at 25 °C in unopened eyedroppers and in simulated use conditions for 6 days.

2.2.1. Stability of 0.1 mg/mL Atropine in Unopened Multidose Eyedroppers

The eyedroppers containing atropine were stored upwards in an ICH Q1B compliant climate chamber (BINDER GmbH, Tuttlingen, Germany) at 25 °C \pm 2 °C and 60 \pm 5% residual humidity until analysis.

Immediately after preparation (day 0) and at days 8, 15, 30, 90, and 180, five units per kind of eyedropper were submitted to the following analyses: visual inspection, chromaticity analysis, atropine quantification, breakdown products (BPs) research (i.e., looking specifically for products resulting from the degradation of atropine), osmolality, pH, and turbidity. Sterility was also assessed using five units for each kind of eyedropper and storage temperature immediately after preparation and after 60 and 180 days of storage. Initial day 0 analyses were performed immediately after conditioning within 4 h after the end of the preparation of the solutions to have results as representative as possible of initial conditions (least degradation or modification of parameters).

2.2.2. Evaluation of Atropine Concentrations in Eye Drops during Simulated Use

Thirty eyedroppers were subjected to simulated patient use: every day for 6 days, one drop from each eyedroppers was manually emitted (i.e., the drop was squeezed out of the bottle as if to be administered to the eye, but instead of being administered, it was collected for analysis) at room temperature. Atropine quantification was then realized in triplicate from 10 collected and pooled drops. In between use, the bottles were stored vertically at 25 °C.

2.3. Analyses Performed on the Atropine Solutions

2.3.1. Visual Inspection

The multidose eyedroppers were emptied into glass test tubes, and the atropine solutions were visually inspected under day light and under polarized white light from an inspection station (LV28, Allen and Co, Liverpool, United Kingdom). Aspect and colour of the solutions were noted, and a screening for visible macroparticles, haziness, or gas development was performed.

2.3.2. Chromaticity Analysis

Chromaticity and luminance were measured with a UV-visible spectrophotometer (V670, Jasco®, Lisses, France) using the mode Color Diagnosis of the built-in software (Spectra Manager®, version 2.12.00). The xyY CIE colorimetric system was used. Chromaticity was presented as a two-dimensional diagram (x and y axes) representing the whole the colour system independently of luminance. Luminance is defined as the visual sensation of luminosity of a surface measured by the ratio of the colour's luminosity (in cd.cm⁻²) over the luminosity of pure white (reference colour) times 100; its value Y ranges therefore between 0 (no luminosity) and 100 (maximum luminosity).

2.3.3. Atropine Quantification and BPs Research

Chemicals and instrumentation

For each unit, atropine was quantified and BPs were detected using the liquid chromatography (LC) method described by the European Pharmacopeia, Atropine monography [33]. The LC system that was used was a Prominence-I LC2030C 3D with diode array detection (Shimadzu France SAS, Marne La Vallée, France), and the associated software used to record and interpret chromatograms was LabSolutions® version 5.82. The LC separation column used was a C18 Synergi® Fusion-RP 80 (150 × 4.6 mm, 4 µm) with an associated guard column (Phenomenex, Le Pecq, France).

The mobile phase was a gradient mixture of phases A and B. Phase A consisted of an aqueous solution of 3.5 g of sodium dodecyl sulphate (SDS) (CAS 1561-21-3, purity > 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 606 mL of a 7 g/L solution of potassium dihydrogen phosphate (CAS 10049-21-5, purity > 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) previously adjusted to pH 3.3 with orthophosphoric acid (20624.295, purity > 85%, Normapur, Prolabo, Paris, France) and mixed with 320 mL of acetonitrile (34851-2, purity > 99.9%, Honeywell, Charlotte, NC, USA). The final pH of phase A was of 3.9. Phase B consisted of 100% acetonitrile. The gradient used is presented in Table 2. All solvents were of analytical grade.

Table 2. Gradient used for the liquid chromatography (LC) mobile phase.

Time (min)	Mobile Phase (%)	
	A	B
0	95	5
2	95	5
20	70	30
21	95	5
25	95	5

The flow rate through the column for the analysis was set at 1 mL/min, with column thermo-regulation set to a temperature of 30 °C. The injection volume was of 20 µL. The quantification wavelength was set up at 210 nm. BP detection was realized by screening with a diode array detector (DAD) detector from 190 nm to 800 nm.

2.3.3.4. Method Validation

Linearity was initially verified by preparing one calibration curve daily for three days using five concentrations of atropine (European Pharmacopoeia reference standard Y0000878 (Sigma-Aldrich, MC2, Clermont-Ferrand, France) at 10, 20, 60, 100, and 140 µg/mL, diluted in deionized water. Each calibration curve should have a determination coefficient R^2 equal or higher than 0.999. Homogeneity of the curves was verified using a Cochran test. ANOVA tests were applied to determine applicability. Each day for three days, six solutions of atropine 0.1 mg/mL were prepared, analysed, and quantified using a calibration curve prepared the same day. To verify the method precision, repeatability was estimated by calculating relative standard deviation (RSD) of intraday analysis and intermediate precision was evaluated using an RSD of inter-days analysis. Both RSDs should be less than 5%. Specificity was assessed by comparing the UV spectra DAD detector. Method accuracy was verified by evaluating the recovery of five theoretical concentrations to experimental values found using mean curve equation, and results should be found within the range of 95–105%. The overall accuracy profile was constructed according to Hubert et al. [34–36].

The matrix effect was evaluated by reproducing the previous methodology with the presence of all excipients present in the formulation (including the preservative) and by comparing the calibration curves and intercepts.

Atropine impurities described in European Pharmacopoeia (atropine impurity B CRS, atropine for peak identification CRS (containing impurities A, D, E, F, G, and H) and tropic acid R (impurity C)) were identified with the same method. Their retention times were collected for potential identification and quantification during stability studies.

In order to exclude potential interference of degradation products with atropine quantification, atropine 0.1 mg/mL solutions was subjected to the following forced degradation conditions: 0.1, 0.5, and 1 N hydrochloric acid for 150 min at 25 °C; 0.1, 0.5, and 1 N chloride acid for 150 min at 90 °C; 0.1, 0.5, and 1 N sodium hydroxide for 30 min at 25 °C; 15% hydrogen peroxide for 60 min at 60 °C and 90 °C; and 30% hydrogen peroxide for 60 and 180 min at 90 °C. Susceptibility to light was performed 3 times after solution preparation for 180 min and 4 and 8 days using an UVA light in climatic chamber (25 °C).

Tropic acid was quantified at 210 nm using the same method as for atropine quantification in the presence of a phosphate buffer, using a calibration curve ranging from 0.1 to 5.0 µg/mL validated using the same methodology as previously described for the validation of the atropine quantification method.

2.3.4. Osmolality, pH, and Turbidity Measurements

For each unit, pH measurements were made using a SevenMulti™ pH-meter with an InLab™ Micro Pro glass electrode (Mettler-Toledo, Viroflay, France). Measures were preceded and followed by instrument validation using standard buffer solution of pH 4 and pH 7 (HANNAH® Instrument, Tannerries, France). Osmolality was measured for each solution using an osmometer Model 2020 Osmometer® (Advanced instruments Inc, Radiometer, SAS, Neuilly Plaisance, France). Turbidity was measured using a 2100Q Portable Turbidimeter (Hach Lange, Marne La Vallée, France), by pooling the five samples per analysed experimental condition and assay time to obtain the necessary volume for the analysis. The results were expressed in Formazin Nephelometric Units (FNU).

2.3.5. Sterility Assay

Sterility was assessed using the European Pharmacopoeia sterility assay (2.6.1). Multidose eyedroppers were opened under the laminar air flow of an ISO 4.8 microbiological safety cabinet, and the contents were filtered under vacuum using a Nalgene® analytical test filter funnel onto a 47-mm diameter cellulose nitrate membrane with a pore size of 0.45 µm (ref 147-0045, Thermo Scientific, purchased from MC2, Clermont-Ferrand Cedex, France). The membranes were then rinsed with 500 mL deionized water (Versylene®; Fresenius Kabi, France, Louviers, France) and divided into two equal parts. Each individual part was transferred to each of a fluid thioglycolate and soya tripcase medium and incubated at 30–35 °C or 20–25 °C, respectively, for 14 days. The culture medium was then examined for colonies.

2.4. Data Analysis – Acceptability Criteria

The stability of diluted atropine solutions was assessed using the following parameters: visual aspect of the solution, turbidity, pH, osmolality, atropine concentration, and presence or absence of BPs.

The study was conducted following methodological guidelines issued by the International Conference on Harmonisation for stability studies [37] and recommendations issued by the French Society of Clinical Pharmacy (SFPC) and by the Evaluation and Research Group on Protection in Controlled Atmosphere [38]. A variation of concentration outside the 90–110% range of initial concentration (including the limits of a 95% confidence interval of the measures) was considered as being a sign of instability. Presence of BPs and the variation of the physicochemical parameters were also considered a sign of atropine instability but were interpreted with regards to quantities found in commercial ophthalmic atropine solution (see Supplementary data file S1). The observed solutions must be limpid, of unchanged colour, and clear of visible signs of haziness or precipitation. Since there are no standards that define acceptable pH or osmolality variation, pH measures were considered acceptable if they did not vary by more than one pH unit from the initial value [38], and osmolality results were interpreted considering clinical tolerance of the preparation.

3. Results

3.1. Atropine Quantification and Breakdown Products (BP) Research

Atropine retention time was of 9.7 ± 0.3 min (Figure 1). The chromatographic method used was found linear for concentrations ranging from 0.5 to 140 µg/mL. Average regression equation was $y = 22429.5x - 13.6$, where x is the atropine concentration (in µg/mL) and y is the surface area of the corresponding chromatogram peak. Interception was not significantly different from zero, and average determination coefficient R^2 of three calibration curves was 0.99999. No matrix effect was detected.

The relative mean trueness bias coefficients were less than 2.75%, except for the 0.5 µg/mL calibration point, for which it was of 3.75%. Mean repeatability RSD coefficient and mean intermediate precision RSD coefficient were less than 2%. The accuracy profile constructed with the data showed that the limits of 95% confidence interval coefficients were all within 3% of the expected value, except for the 10 µg/mL calibration point, for which the lower range limit was -8.8%. The limit of detection was evaluated at 0.05 µg/mL (signal-to-noise ratio of 3.03 and experimentally confirmed by visual analysis of the chromatograms), and the limit of quantification was fixed at 0.5 µg/mL, even if the signal-to-noise ratio was 46, thus potentially indicating that a lower quantification limit could be reached.

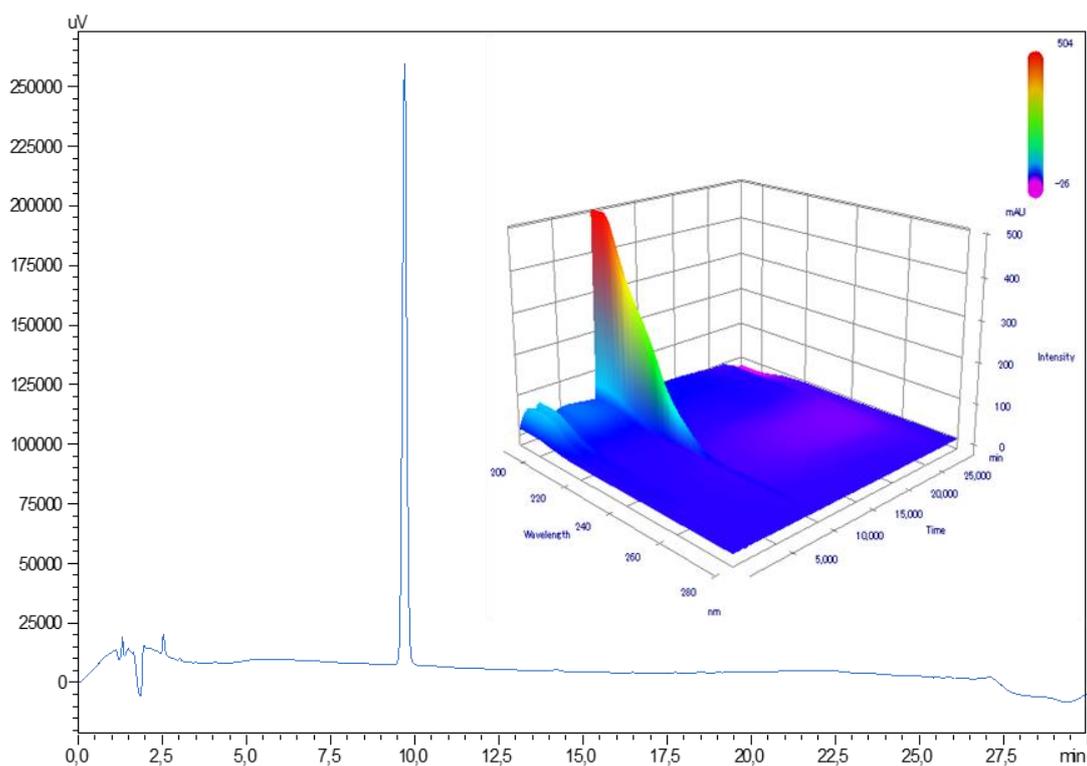


Figure 1. Reference chromatogram of a 0.1 mg/mL atropine solution at 210 nm and with diode array detector screening.

No impurities were visible in the initial atropine solution on the reference chromatogram at 210 nm in Figure 1. All the impurities specified by the European Pharmacopeia were detected and identified in Figure 2. The chromatograms presented show separately different impurities as they come from different European Pharmacopoeia reference solutions and were thus analysed sequentially in order to be able to correctly identify each peak using the relative retention times provided in the atropine monography. They were all visible at 210 nm, which allowed maximum sensitivity. No other impurities were detected at other wavelengths.

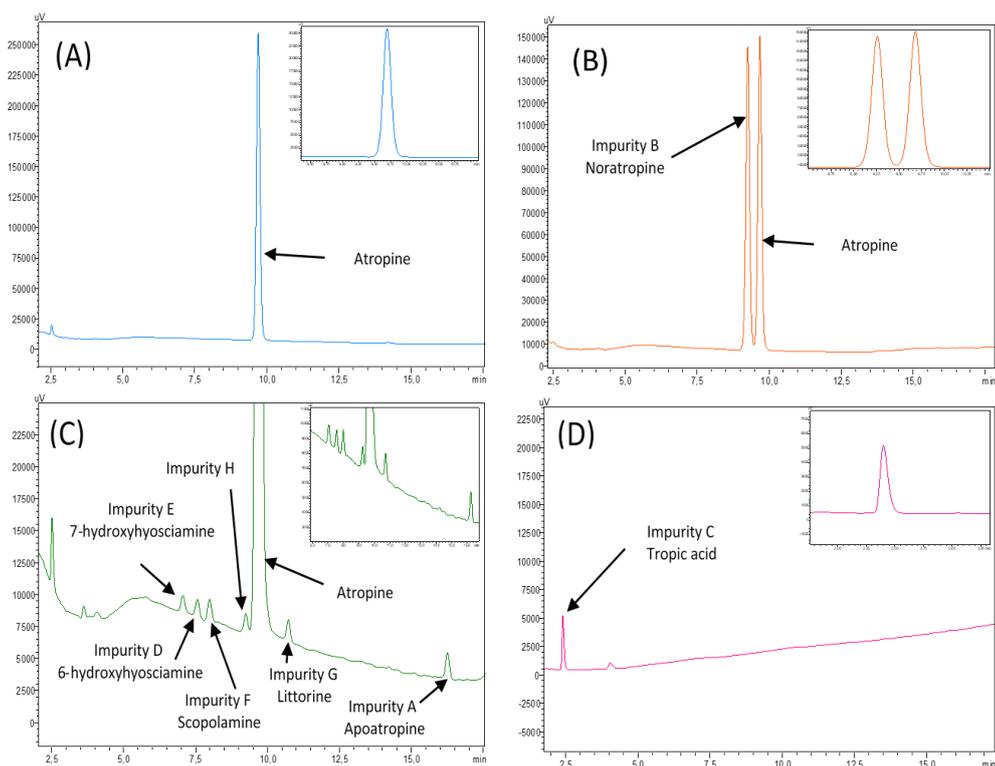


Figure 1. Chromatograms of atropine impurities at 210 nm: (A) reference atropine chromatogram, (B) chromatogram of the atropine impurity B CRS solution, (C) chromatogram of atropine for the peak identification CRS (containing impurities A, D, E, F, G, and H) solution, and (D) chromatogram of the tropic acid R (impurity C) solution. The insets represent a close up of the chromatograms.

A summary of the impurity retention times and relative retention times (relative to atropine) is presented in Table 3.

Table 3. Atropine impurities retention times and relative retention times.

Impurity Retention Times		
	Experimental Absolute Retention time (min)	Relative Retention Time
Atropine	9.7	1
Impurity A	16.2	1.7
Impurity B	9.3	0.9
Impurity C	2.5	0.3
Impurity D	7.6	0.8
Impurity E	7.1	0.7
Impurity F	8.0	0.8
Impurity G	10.8	1.1
Impurity H	9.3	0.9

After forced degradation, BPs were detected with a resolution higher than 1.5 of the atropine peak to all its BPs and particularly in alkaline forced conditions. No BPs were detected when

atropine solutions were exposed to UVA light, and atropine concentration did not vary after 8 days of UV-Vis exposure. After 1 hour at 15% H₂O₂ exposure at 60 °C, no loss of atropine concentration was detected. After 1 h at 90°, a loss of 7.9% of atropine was noticed, without any breakdown products being detected. Chromatogram results are showed in Figure 3.

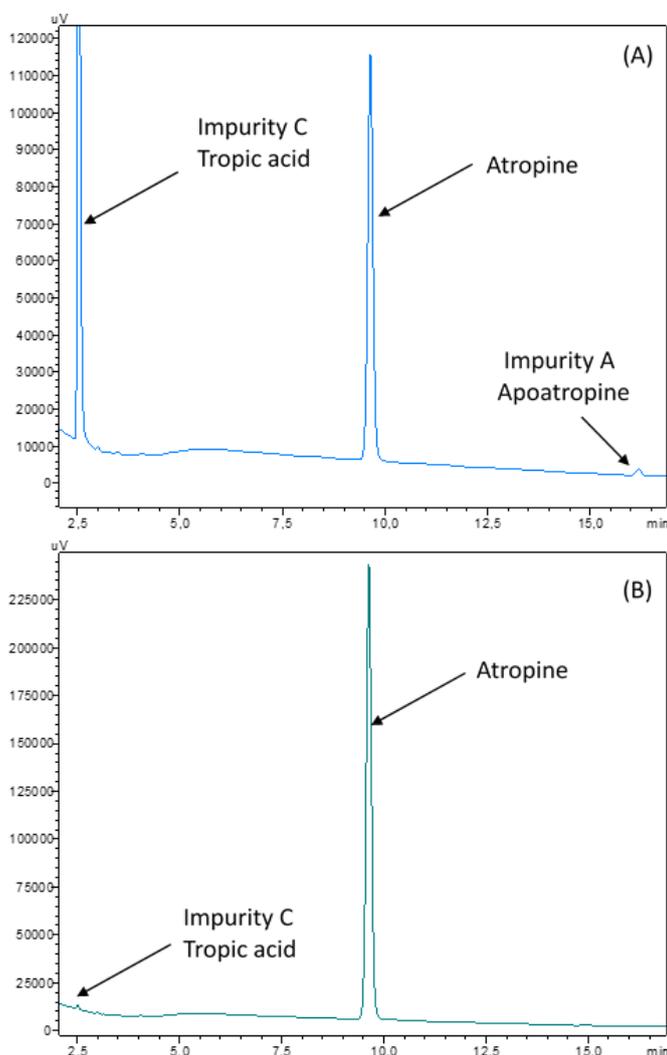


Figure 3. Chromatograms at 210 nm of breakdown products (BPs) obtained after forced degradation: (A) alkaline conditions of NaOH 0.5 N for 0.5 h and (B) acid conditions of HCl 0.1 N for 1 h at 90 °C.

Detailed results of tropic acid quantification are presented in Supplementary data.

3.2. Stability of Atropine in Unopened Multidose Eyedroppers

3.2.1. Physical Stability

All samples stayed limpid and uncoloured; chromaticity and luminance were unchanged during the study for both tested kind of eyedroppers; and there was no appearance of any visible particulate matter, haziness, or gas development. Initial turbidity was 0.33 and 0.32 FNU respectively for the atropine formulation with and without preservatives and did not vary by more than 0.6 FNU for the formulation with antimicrobial preservative or 0.32 FNU for the formulation without preservative (Table 4).

Table 4. Evolution of turbidity over time. $n = 1$ (pooled volume from 5 units). FNU: Formazin Nephelometric Units.

	Turbidity (FNU)						
	Day 0	Day 8	Day 15	Day 30	Day 60	Day 90	Day 180
Atropine solution with preservative conditioned in LDPE CAT® eyedroppers	0.33	0.31	0.27	0.78	0.78	0.43	0.93
Atropine solution without preservative conditioned LDPE NOVELIA® eyedroppers	0.32	0.31	0.26	0.54	0.44	0.34	0.64

3.2.2. Chemical Stability

Evolution of pH and osmolality throughout the study is presented Table 5. Throughout the study, osmolality did not vary by more than 3.7% (15 mOsm/kg) of the initial osmolality (412 and 398 mOsm/kg respectively for the atropine solution with and without preservatives) after 6 months of storage at 25 °C. Moreover, pH did not vary by more than 1.8% (0.1 pH unity) of the initial pH (6.1 for both solutions).

Table 5. Evolution of pH and osmolality over time ($n = 5$, mean \pm 95% confidence interval).

		Day 0	Day 8	Day 15	Day 30	Day 60	Day 90	Day 180
Atropine solution with preservative conditioned in LDPE CAT® eyedroppers	pH	6.10 \pm 0.01	6.11 \pm 0.01	6.13 \pm 0.02	6.13 \pm 0.01	6.13 \pm 0.02	6.21 \pm 0.04	6.12 \pm 0.01
	Osmolality (mOsm/kg)	412 \pm 16	400 \pm 6	403 \pm 14	393 \pm 14	400 \pm 5	413 \pm 11	418 \pm 23
Atropine solution without preservative conditioned LDPE NOVELIA® eyedroppers	pH	6.10 \pm 0.01	6.11 \pm 0.01	6.13 \pm 0.01	6.14 \pm 0.02	6.13 \pm 0.01	6.21 \pm 0.01	6.09 \pm 0.01
	Osmolality (mOsm/kg)	399 \pm 2	401 \pm 6	409 \pm 6	405 \pm 2	415 \pm 15	408 \pm 10	405 \pm 7

For all studied conditions, mean atropine concentrations did not vary by more than 5.7% of mean initial concentrations (as presented in Figure 4). By extrapolation of the degradation rate using a linear regression, it could be estimated that atropine concentrations would remain higher than 90% of the original concentration for about 300 days.

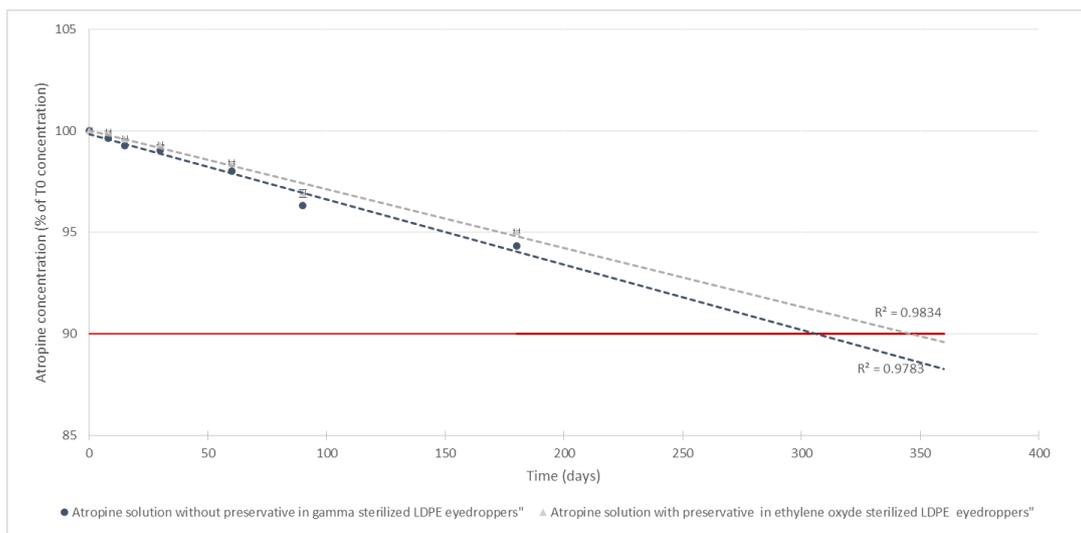


Figure 4. Evolution of atropine concentration over time ($n = 5$, mean \pm 95% confidence interval): the grey curve is the atropine solution with preservatives conditioned in low-density polyethylene (LDPE) CAT[®] eyedroppers. The blue curve is the atropine solution without preservatives conditioned in LDPE NOVELIA[®] eyedroppers. The red line is 90% of the initial concentration. The dotted lines are the calculated linear regression of the evolution of atropine concentrations.

Chromatographs showed no sign of BPs until day 8 for both types of LDPE eyedroppers at 25 °C. After 15 days of storage, one BP appeared, presenting a retention time of 2.10 min (relative retention time of 0.2; Figure 5A) seemingly not detected during forced degradation assays but close to that of tropic acid (Figure 5B). However, when diluting the know impurity tropic acid in a phosphate buffer of the same nature and concentration of the one used for the atropine formulation, its retention time changed to be identical to that of the breakdown product (Figure 5C), thus indicating that it is highly likely that the misidentified breakdown product is in fact tropic acid.

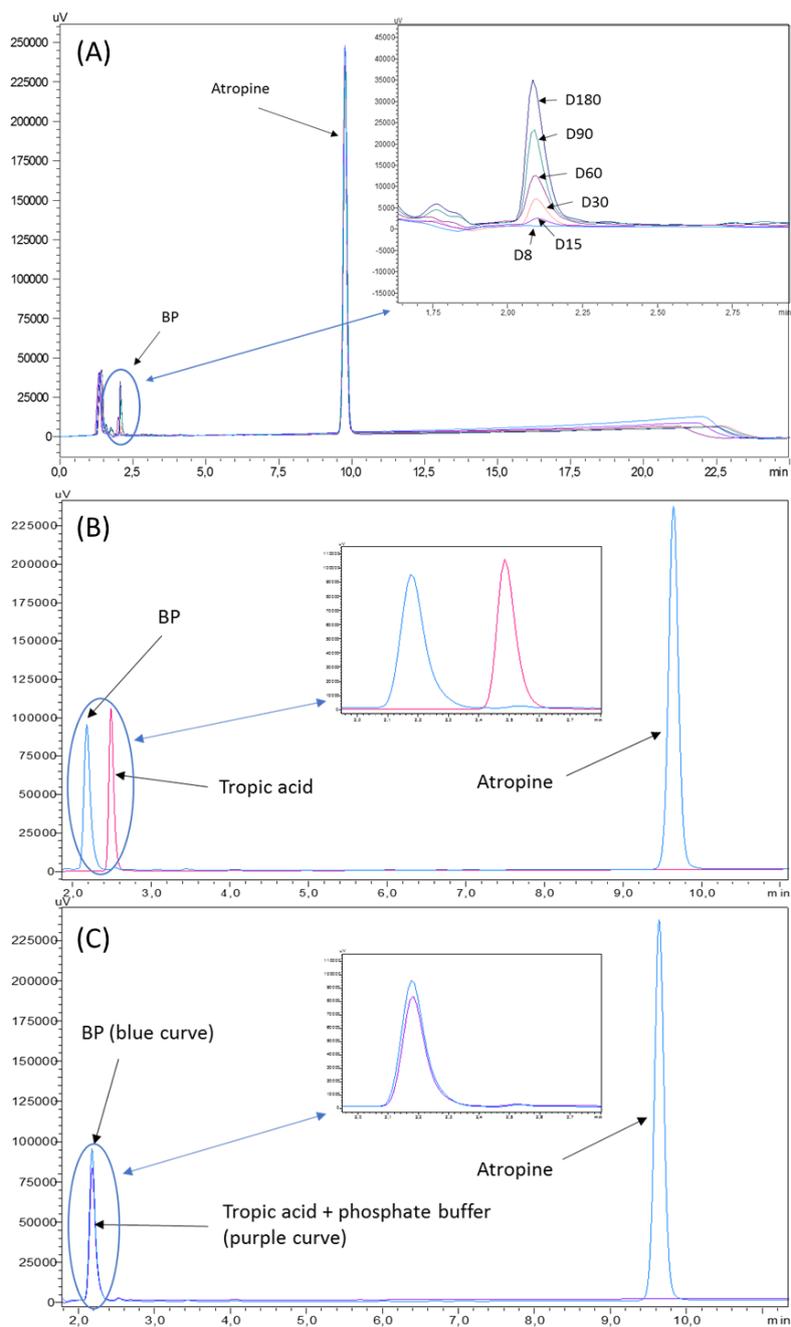


Figure 5. Chromatograms of (A) the increased area under curve of the breakdown product, (B) superposition of chromatograms of tropic acid diluted in water and an atropine solution containing the breakdown product, and (C) superposition of chromatograms of tropic acid diluted in phosphate buffer and an atropine solution containing the breakdown product.

Figure 6 shows the increase of tropic acid concentrations during the 6 months of the study. After 6 months, tropic acid concentrations were 3.5 and 3.4 $\mu\text{g/mL}$, respectively, for both the formulation with and without the preservative.

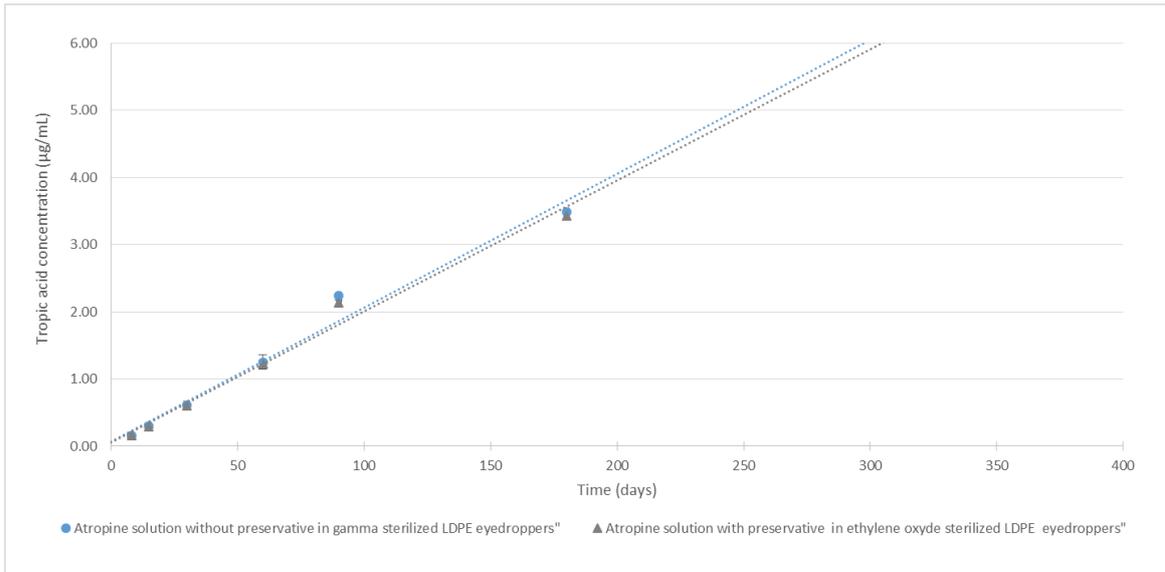


Figure 6. Evolution of breakdown product (tropic acid) concentration during time ($n = 5$, mean \pm 95% confidence interval): The grey curve is the atropine solution with preservative conditioned in LDPE CAT® eyedroppers. The blue curve is the atropine solution without preservative conditioned LDPE NOVELIA® eyedroppers. The dotted lines are the linear regression of the evolution of breakdown product concentrations.

3.2.3. Sterility Assay

None of the five analysed solutions conserved in unopened bottles at day 0, day 60, and day 180 showed any signs of microbial growth.

3.3. Atropine Concentrations in Eye Drops During Simulated Use

During 6 days of drop sampling, no variation exceeding $\pm 5\%$ of initial concentration was found for any of the studied conditioned as presented in Figure 7.

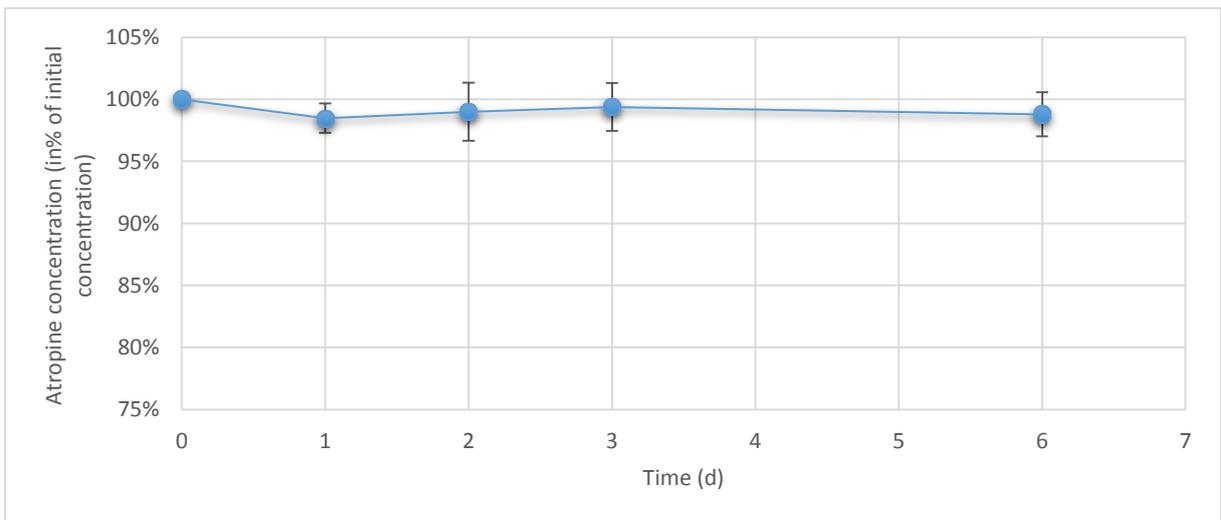


Figure 7. Evolution of atropine concentration in the emitted drops during simulated use ($n = 3$ times 10 pooled drops, mean \pm 95% confidence interval).

4. Discussion

Our study presents new data on the physicochemical stability of 2 formulations (with and without antimicrobial preservatives) of a 0.1 mg/mL atropine solution conditioned in two differently sterilized LDPE eyedroppers (gamma radiations and ethylene oxide) which can be used to prevent myopia progression in children.

The method used for the quantification of atropine was the one described in the European Pharmacopeia, atropine monography, and the use of atropine impurities allowed the identification of 2 breakdown products that appeared during forced degradation to validate the method as being stability-indicating: tropic acid (impurity C) and apoatropine (impurity A). These two compounds have already been widely described as being the main instability by-products occurring during either hydrolysis (tropic acid and tropine) or dehydration (apoatropine) [39]. Our forced degradation results are coherent with previously described data suggesting higher stability in acidic conditions and lower half-life in neutral (pH 7–8) or alkaline (pH > 8) conditions [40]. Using the same chromatographic method, we were also able to quantify tropic acid, which presented a retention time of 2.5 min in the absence of a phosphate buffer. However, in the presence of the phosphate buffer used in the formulations, its retention time was reduced to about 2 min. This could be explained by a local modification of pH induced by the buffer (pH of the formulation = 6.1) leading to tropic acid being deprotonated (the pKa of tropic acid being of 4.3 [41]) and thus being less retained by the stationary C18 column than when injected without the buffer, as the pH will therefore be imposed by the mobile phase (pH 3.9) and tropic acid will be in unionized protonated form. The choice of the quantification wavelength at 210 assured maximum sensitivity with minor influence of the mobile phase, and the absence of dilution of the formulations before chromatographic analysis also meant that we were able to detect minute quantities of breakdown products in the ophthalmic solutions.

For both of the tested formulations, all parameters were in favour of a physicochemical stability of 6 months. No modifications of visual aspect, chromaticity, or luminance were detected. Chromaticity analyses would have helped to detect minute modifications of colour [42], invisible to the naked eye, but as such, the solutions remained colourless throughout the study. Turbidity analyses did not reveal the formation of any additional particles, and the pH and osmolality values also remained within specifications and were compatible with an ophthalmic administration route. Atropine concentrations also remained within specifications after 6 months of storage (maximum loss of 5.3% of initial mean concentration), thus conserving good therapeutic efficiency during the conservation period. However, they did decrease for both formulations following a linear degradation rate, leading to increasing concentrations of tropic acid which reached a maximum of 3.5 µg/mL after 6 months of storage. Comparatively, the concentrations of tropic acid found in commercialised atropine ophthalmic specialities were 6 to 11 times higher (21.4 and 40.2 µg/mL versus 3.5 µg/mL) (see Supplementary data file S1). This information is therefore in favour of a limited clinical impact of the appearance of tropic acid in the formulations during storage, even if studies evaluating the possible toxicity of tropic acid during chronic use could be performed to verify this point. By extrapolation of the evolution of measured atropine concentration over time, assuming it will follow in the worst case a zero-order reaction [43], it could be hypothesised that a 10% decrease would be reached within 300 to 350 days. As the degradation of atropine is linked to the hydrolysis of the ester function in an aqueous media, the equilibrium state will likely not be reached immediately, therefore making this hypothesis plausible, but it would however need to verify if precise data past 6 months is needed. Also, if longer stabilities are one day required, refrigerated conservation conditions could be tested (as lower temperatures will lead a slower breakdown rate by slowing down atropine hydrolysis), or alternatively, the pH of the formulation could be reduced to reach the maximum stability range of atropine (pH comprised between 3 and 4) [44,45]. However, this could decrease ophthalmic tolerance, especially for paediatric patients, which is the target population for which these formulations are designed. In the formulations we tested, the pH was buffered to a more physiological value (around pH 6), thus hopefully limiting

potential unpleasantness for the children during administration and therefore increasing adherence to treatment as well as suppressing any potential modifications of pH that have already been reported during the use of gamma-sterilized LDPE eyedroppers [28].

The sterility assay that we performed in our work followed the European Pharmacopeia sterility monograph [46] and, in our case (for our preparation conditions), did not reveal any microbial contamination in units stored for up to 6 months. Microbiological testing of the final product is an essential test to be able to assign a microbiological shelf-life (along with prerequisites such as controlled cleanroom environment, validated preparation conditions, and integrity testing of the container and closure [47]). Concerning the container and closure system, the gamma-sterilized eyedroppers were provided with a closure system (Novelia® caps) which does not allow unfiltered air to penetrate the eyedropper, is commercially guaranteed to preserve sterility of the content more than a month [48], as well as has been tested for various hospital-prepared ophthalmic solutions either after one month of simulated use or after freezing and thawing [27,29].

During the simulated use study, atropine was quantified in the emitted drops to evaluate any potential loss of API by sorption (adsorption or absorption), as it has been shown that such a phenomena can occur during the first few days of treatment initiation with certain APIs and ophthalmic delivery devices [49]. During the 6-day study, atropine concentrations in the emitted drops remained stable (no variation exceeding of $\pm 5\%$ of initial concentration), therefore excluding any clinically significant loss of atropine. Such information is of high clinical value, as it correlates directly with the drop volume to determine the quantity received by the patient and needs to be known by prescribers. It also indicates that the preservative-free formulation can be used safely with the sterility preserving device that was tested (using Novelia® caps). As antimicrobial preservatives are known to cause potential side effects, especially during long-term treatments [50–52], this information is also of high clinical value.

The stability of atropine in aqueous solutions has been studied over the years, mainly for injectable usage and at concentrations higher than 1 mg/mL, but there is little pertinent data regarding the stability of more diluted forms. Driver et al. followed atropine concentrations of 0.4 mg/mL atropine sulphate solution stored at room temperature for up to 8 days and did not notice any change in concentrations [24], but no other physicochemical parameters were evaluated and the exhaustive composition of the formulation was not detailed. More recently, the physicochemical stability of a 0.1 mg/mL atropine sulphate solution prepared by diluting 10 mg/mL commercial atropine single doses in 0.9% sodium chloride was evaluated for 6 months at room temperature [25]. The authors reported less than 5% loss of atropine and did not mention any breakdown product detection, but the wavelength of their chromatographic method was set up at 250 nm, which is not the wavelength recommended by the European Pharmacopoeia for the analysis of atropine (210 nm) and is less advantageous for the detection of breakdown products in minute quantities. Saito et al. also reported a physicochemical stability of 6 months of 1% commercial atropine solutions diluted in 0.9% saline solution to concentrations of 0.1 mg/mL as well as higher concentrations ranging up to 5 mg/mL [26]. Despite using a tandem mass spectrometry liquid chromatography method initially developed for the quantification of atropine in plasma for clinical and forensic purposes [53], the authors did not mention the presence specifically of tropic acid or of any other breakdown products, possibly because the method they used was not validated as stability-indicating or because breakdown products were not even researched, as the research or quantification of such products was not included in their acceptability criteria.

Stability studies are of vital importance to be able to assign a shelf-life to medications; however, they must be conducted properly to avoid any misinterpretation or incomplete conclusions [54]. Several guidelines exist, such as those prepared by the International Conference on Harmonisation for stability studies [37], by the US Pharmacopoeia [55], or by international consensus by learned societies [38,56,57]. In our case, we validated a European Pharmacopoeia monograph initially designed for the quality control of API atropine as being stability-indicating

and capable of detecting and identifying potential breakdown products. Our results are concordant with previously published data concerning the stability of low concentration atropine solutions with regards to the concentration of atropine; however, we showed that atropine degradation is present and does lead to increased concentrations of tropic acid, a known breakdown product. Very little information is available about the toxicity of tropic acid and even less is available about any potential ocular toxicity. In the human body, atropine metabolism produces small (3%) amounts of tropic acid [58] and atropine is mostly excreted unchanged in the urines. During ophthalmic administrations in rabbits, it has been shown that atropine has good ocular bioavailability via both transcorneal and transconjunctival-scleral routes [59]. Unfortunately and to the best of our knowledge, atropine metabolism in the eye has not been studied despite there being a clear incentive to do so, like for other drugs [60]. There is therefore very little information available about the possibility of the natural formation of tropic acid in the eye after atropine topical application or, as stated previously, about tropic acid's ophthalmic toxicity. In this work, we found that concentrations of tropic acid reached 3.5 µg/mL in the atropine formulations we tested, those concentrations being 6 to 11 times lower than the quantities we also detected in commercial atropine ophthalmic formulations available on the market. As such, it could be considered safe to administer the tested formulations after 6 months of conservation.

5. Conclusions

This study brings new information about the behaviour and stability of low-dose atropine ophthalmic solutions, showing that 0.1 mg/mL atropine solutions buffered at a physiological pH, with or without antimicrobial preservative, are physiochemically stable for 6 months at 25 °C when stored in LDPE bottles, with an identical microbial shelf-life.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1: Supplementary data file S1 (containing the additional data described in the manuscript and all raw data).

Author Contributions: conceptualization: M.W., M.J., and P.C.; methodology: B.B., M.W., Y.B., P.C., and V.S.; investigation: B.B. and M.Y.; verification: B.B., M.Y., Y.B., and P.C.; writing—original draft: B.B. and P.C.; writing—review and editing: all authors

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors would like to thank H el ene Confolent, Marie Mula, and Françoise Picq for their help in performing the sterility assays.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Holden, B.A.; Fricke, T.R.; Wilson, D.A.; Jong, M.; Naidoo, K.S.; Sankaridurg, P.; Wong, T.Y.; Naduvilath, T.J.; Resnikoff, S. Global Prevalence of Myopia and High Myopia and Temporal Trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology* **2016**, *123*, 1036–1042, doi:10.1016/j.ophtha.
2. Williams, K.M.; Verhoeven, V.J.M.; Cumberland, P.; Bertelsen, G.; Wolfram, C.; Buitendijk, G.H.S.; Hofman, A.; van Duijn, C.M.; Vingerling, J.R.; Kuijpers, R.W.A.M.; et al. Prevalence of refractive error in Europe: The European Eye Epidemiology (E3) Consortium. *Eur. J. Epidemiol.* **2015**, *30*, 305–315, doi:10.1007/s10654-015-0010-0.
3. Theophanous, C.; Modjtahedi, B.S.; Batech, M.; Marlin, D.S.; Luong, T.Q.; Fong, D.S. Myopia prevalence and risk factors in children. *Clin. Ophthalmol.* **2018**, *12*, 1581–1587, doi:10.2147/OPTH.S164641.
4. Ding, B.-Y.; Shih, Y.-F.; Lin, L.L.K.; Hsiao, C.K.; Wang, I.-J. Myopia among schoolchildren in East Asia and Singapore. *Surv. Ophthalmol.* **2017**, *62*, 677–697, doi:10.1016/j.survophthal.
5. Xie, Z.; Long, Y.; Wang, J.; Li, Q.; Zhang, Q. Prevalence of myopia and associated risk factors among primary students in Chongqing: Multilevel modeling. *BMC Ophthalmol.* **2020**, *20*, 146, doi:10.1186/s12886-020-01410-3.

6. Dirani, M.; Crowston, J.G.; Wong, T.Y. From reading books to increased smart device screen time. *Br. J. Ophthalmol.* **2019**, *103*, 1–2, doi:10.1136/bjophthalmol-2018-313295.
7. Wen, L.; Cao, Y.; Cheng, Q.; Li, X.; Pan, L.; Li, L.; Zhu, H.; Lan, W.; Yang, Z. Objectively measured near work, outdoor exposure and myopia in children. *Br. J. Ophthalmol.* **2020**, doi:10.1136/bjophthalmol-2019-315258.
8. Nickels, S.; Hopf, S.; Pfeiffer, N.; Schuster, A.K. Myopia is associated with education: Results from NHANES 1999-2008. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0211196, doi:10.1371/journal.pone.
9. Congdon, N.; Burnett, A.; Frick, K. The impact of uncorrected myopia on individuals and society. *Commun. Eye Health* **2019**, *32*, 7–8.
10. Naidoo, K.S.; Fricke, T.R.; Frick, K.D.; Jong, M.; Naduvilath, T.J.; Resnikoff, S.; Sankaridurg, P. Potential lost productivity resulting from the global burden of myopia: Systematic review, meta-analysis, and modeling. *Ophthalmology* **2019**, *126*, 338–346, doi:10.1016/j.ophtha.
11. Spillmann, L. Stopping the rise of myopia in Asia. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2020**, *258*, 943–959, doi:10.1007/s00417-019-04555-0.
12. Modjtahedi, B.S.; Ferris, F.L.; Hunter, D.G.; Fong, D.S. Public health burden and potential interventions for myopia. *Ophthalmology* **2018**, *125*, 628–630, doi:10.1016/j.ophtha.
13. Tran, K.; Ryce, A. *Laser Refractive Surgery for Vision Correction: A Review of Clinical Effectiveness and Cost-effectiveness*; CADTH Rapid Response Reports; Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health: Ottawa, ON, Canada, 2018.
14. Sankaridurg, P.; Conrad, F.; Tran, H.; Zhu, J. Controlling Progression of Myopia: Optical and pharmaceutical strategies. *Asia Pac. J. Ophthalmol. (Phila)* **2018**, *7*, 405–414, doi:10.22608/APO.2018333.
15. Upadhyay, A.; Beuerman, R.W. Biological Mechanisms of Atropine Control of Myopia. *Eye Contact Lens* **2020**, *46*, 129–135, doi:10.1097/ICL.0000000000000677.
16. Chua, W.-H.; Balakrishnan, V.; Chan, Y.-H.; Tong, L.; Ling, Y.; Quah, B.-L.; Tan, D. Atropine for the treatment of childhood myopia. *Ophthalmology* **2006**, *113*, 2285–2291, doi:10.1016/j.ophtha.
17. Chia, A.; Chua, W.-H.; Cheung, Y.-B.; Wong, W.-L.; Lingham, A.; Fong, A.; Tan, D. Atropine for the treatment of childhood myopia: Safety and efficacy of 0.5%, 0.1%, and 0.01% doses (atropine for the treatment of myopia 2). *Ophthalmology* **2012**, *119*, 347–354, doi:10.1016/j.ophtha.
18. Chia, A.; Lu, Q.-S.; Tan, D. Five-Year Clinical Trial on Atropine for the treatment of myopia 2: Myopia control with atropine 0.01% eyedrops. *Ophthalmology* **2016**, *123*, 391–399, doi:10.1016/j.ophtha.
19. Yam, J.C.; Jiang, Y.; Tang, S.M.; Law, A.K.P.; Chan, J.J.; Wong, E.; Ko, S.T.; Young, A.L.; Tham, C.C.; Chen, L.J.; et al. Low-concentration atropine for myopia progression (LAMP) study: A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial of 0.05%, 0.025%, and 0.01% atropine eye drops in myopia control. *Ophthalmology* **2019**, *126*, 113–124, doi:10.1016/j.ophtha.
20. Azuara-Blanco, A.; Logan, N.; Strang, N.; Saunders, K.; Allen, P.M.; Weir, R.; Doherty, P.; Adams, C.; Gardner, E.; Hogg, R.; et al. Low-dose (0.01%) atropine eye-drops to reduce progression of myopia in children: A multicentre placebo-controlled randomised trial in the UK (CHAMP-UK)-study protocol. *Br. J. Ophthalmol.* **2019**, doi:10.1136/bjophthalmol-2019-314819.
21. Sacchi, M.; Serafino, M.; Villani, E.; Tagliabue, E.; Luccarelli, S.; Bonsignore, F.; Nucci, P. Efficacy of atropine 0.01% for the treatment of childhood myopia in European patients. *Acta Ophthalmol.* **2019**, *97*, e1136–e1140, doi:10.1111/aos.14166.
22. Akers, M.J. Formulation and Stability of Solutions. *Int. J. Pharm. Compound.* **2016**, *20*, 137–141.
23. Vigneron, J.; D’Huart, E.; Demoré, B. Stability studies in oncology: A marketing tool for pharmaceutical companies, a scientific mission for hospital pharmacists. *Eur. J. Oncol. Pharm.* **2019**, *2*, e12, doi:10.1097/OP9.0000000000000012.
24. Driver, R.P.; Brula, J.M.; Bezouska, C.A. The stability of atropine sulfate solutions stored in plastic syringes in the operating room. *Anesth. Analg.* **1999**, *89*, 1056, doi:10.1213/00000539-199910000-00044.
25. Farenq, P.O.; Jobard, M.; Cros, C.; Bezia, C.; Brandely-Piat, M.-L.; Batista, R. Physical, Chemical and Microbiological Stability Study of 0.1 mg mL⁻¹ Atropine Eye Drops. In Proceedings of the 22th European GERPAC Conference, Hyères, France, 2–4 October 2019.
26. Saito, J.; Imaizumi, H.; Yamatani, A. Physical, chemical, and microbiological stability study of diluted atropine eye drops. *J. Pharm. Health Care Sci.* **2019**, *5*, 25, doi:10.1186/s40780-019-0154-2.

27. Chennell, P.; Delaborde, L.; Wasiak, M.; Jouannet, M.; Feschet-Chassot, E.; Chiambaretta, F.; Sautou, V. Stability of an ophthalmic micellar formulation of cyclosporine A in unopened multidose eyedroppers and in simulated use conditions. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *100*, 230–237, doi:10.1016/j.ejps.
28. Bouattour, Y.; Chennell, P.; Wasiak, M.; Jouannet, M.; Sautou, V. Stability of an ophthalmic formulation of polyhexamethylene biguanide in gamma-sterilized and ethylene oxide sterilized low density polyethylene multidose eyedroppers. *Peer J.* **2018**, *6*, doi:10.7717/peerj.4549.
29. Roche, M.; Lannoy, D.; Bourdon, F.; Danel, C.; Labalette, P.; Berneron, C.; Simon, N.; Odou, P. Stability of frozen 1% voriconazole eye-drops in both glass and innovative containers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *141*, 105102, doi:10.1016/j.ejps.
30. Ghigliani, D.G.; Martino, P.A.; Bruschi, G.; Vitali, D.; Osnaghi, S.; Corti, M.G.; Beretta, G. Stability and safety traits of novel cyclosporine a and tacrolimus ophthalmic galenic formulations involved in vernal keratoconjunctivitis treatment by a high-resolution mass spectrometry approach. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 378, doi:10.3390/pharmaceutics12040378.
31. Velpandian, T. Preservatives for topical ocular drug formulations. In *Pharmacology of Ocular Therapeutics*; Velpandian, T., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Germany, 2016; pp. 419–430, ISBN 978-3-319-25498-2.
32. Dao, H.; Lakhani, P.; Police, A.; Kallakunta, V.; Ajarapu, S.S.; Wu, K.-W.; Ponkshe, P.; Repka, M.A.; Narasimha Murthy, S. Microbial stability of pharmaceutical and cosmetic products. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2018**, *19*, 60–78, doi:10.1208/s12249-017-0875-1.
33. European Pharmacopeia. *Edition 10.2 Atropine Sulfate Monography*; United States Pharmacopeia: New York, NY, USA, 2020.
34. Hubert, P.; Nguyen-Huu, J.-J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Chiap, P.; Cohen, N.; Compagnon, P.-A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Lallier, M.; et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—part I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *36*, 579–586, doi:10.1016/j.jpba.
35. Hubert, Ph.; Nguyen-Huu, J.-J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Chiap, P.; Cohen, N.; Compagnon, P.-A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Lallier, M.; et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—part II. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 70–81, doi:10.1016/j.jpba.
36. Hubert, Ph.; Nguyen-Huu, J.-J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Cohen, N.; Compagnon, P.-A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—part III. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 82–96, doi:10.1016/j.jpba.
37. International Conference of Harmonization (ICH) Quality Guidelines; ICH. *Guidelines for Stability Q1A to Q1f*. Available online: <http://www.ich.org/products/guidelines/%20quality/article/quality-guidelines.html> (accessed on 18 July 2016).
38. French Society of Clinical Pharmacy (SFPC); Evaluation and Research Group on Protection in Controlled Atmospher (GERPAC). *Methodological Guidelines for Stability Studies of Hospital Pharmaceutical Preparations*; SFPC: Paris, France, 2013.
39. Kirchoff, C.; Bitar, Y.; Ebel, S.; Holzgrabe, U. Analysis of atropine, its degradation products and related substances of natural origin by means of reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1046*, 115–120, doi:10.1016/j.chroma.
40. Schier, J.G.; Ravikumar, P.R.; Nelson, L.S.; Heller, M.B.; Howland, M.A.; Hoffman, R.S. Preparing for Chemical Terrorism: Stability of Injectable Atropine Sulfate. *Acad. Emerg. Med.* **2004**, *11*, 329–334, doi:10.1197/j.aem.
41. Chemicalize-Instant Cheminformatics Solutions. Available online: <https://chemicalize.com/app/calculation/tropic%20acid> (accessed on 7 June 2020).
42. Choudhury, A.K.R. *Principles of Colour and Appearance Measurement: Object Appearance, Colour Perception and Instrumental Measurement*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; ISBN 978-0-85709-924-2.
43. Waterman, K.C.; Adami, R.C. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **2005**, *293*, 101–125, doi:10.1016/j.ijpharm.
44. Connors, K.A.; Amidon, G.L.; Stella, V.J. *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 1986; ISBN 978-0-471-87955-8.

45. American Society of Health-System Pharmacists. *Handbook on Injectable Drugs*, 20th ed.; ASHP: Bethesda, MA, USA, 2018; ISBN 978-1-58528-615-7.
46. European Pharmacopeia. *Monograph 2.6.1 Sterility*, United States Pharmacopeia: New York, NY, USA, 2020.
47. Crauste-Manciet, S.; Krämer, I.; Lagarce, F.; Sautou, V.; Beaney, A.; Smith, J.; Fenton-May, V.; Hecq, J.-D.; Sadeghipour, F.; Brun, P.L. GERPAC Consensus Conference – Guidance on the Assignment of Microbiological Shelf-life for Hospital Pharmacy Aseptic Preparations. *Pharm. Technol. Hosp. Pharm.* **2020**, *5*, doi:10.1515/pthp-2020-0001.
48. Ophthalmic-Preservative-free multidose eyedropper; Nemera. *Drug Deliv. Mag.* 2018, *82*, 16–20.
49. Le Basle, Y.; Chennell, P.; Sautou, V. A Sorption Study between Ophthalmic Drugs and Multi Dose Eyedroppers in Simulated Use Conditions. *Pharm. Technol. Hosp. Pharm.* **2017**, *2*, 181–191, doi:10.1515/pthp-2017-0026.
50. Coroi, M.C.; Bungau, S.; Tit, M. Preservatives from The Eye Drops and the Ocular Surface. *Rom. J. Ophthalmol.* **2015**, *59*, 2–5.
51. Ramli, N.; Supramaniam, G.; Samsudin, A.; Juana, A.; Zahari, M.; Choo, M.M. Ocular surface disease in glaucoma: Effect of polypharmacy and preservatives. *Optom. Vis. Sci.* **2015**, *92*, e222–e226, doi:10.1097/OPX.0000000000000542.
52. Steven, D.W.; Alagband, P.; Lim, K.S. Preservatives in glaucoma medication. *Br. J. Ophthalmol.* **2018**, *102*, 1497–1503, doi:10.1136/bjophthalmol-2017-311544.
53. Koželj, G.; Perharič, L.; Stanovnik, L.; Prosen, H. Simple validated LC–MS/MS method for the determination of atropine and scopolamine in plasma for clinical and forensic toxicological purposes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *96*, 197–206, doi:10.1016/j.jpba.
54. Trissel, L.A. Avoiding common flaws in stability and compatibility studies of injectable drugs. *Am. J. Hosp. Pharm.* **1983**, *40*, 1159–1160.
55. United States Pharmacopeia. *USP <1150> Pharmaceutical Stability*; USP 43-NF38; United States Pharmacopeia: New York, NY, USA, 2018.
56. Association of Southeast Asian Nations. Asean Guidelines on Stability Study of Drug Product. Update Review. In Proceedings of the 9th ACCSQ-PPWg Meeting, Manila, Philippines, 21–24 February 2005.
57. Bardin, C.; Astier, A.; Vulto, A.; Sewell, G.; Vigneron, J.; Trittler, R.; Daouphars, M.; Paul, M.; Trojniak, M.; Pinguet, F. Guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs: A European consensus conference. *Eur. J. Hosp. Pharm.* **2012**, *19*, 278–285, doi:10.1136/ejhpharm-2012-000112.
58. Van der Meer, M.J.; Hundt, H.K.; Müller, F.O. The metabolism of atropine in man. *J. Pharm. Pharmacol.* **1986**, *38*, 781–784, doi:10.1111/j.2042-7158.1986.tb04494.x.
59. Wang, L.Z.; Syn, N.; Li, S.; Barathi, V.A.; Tong, L.; Neo, J.; Beuerman, R.W.; Zhou, L. The penetration and distribution of topical atropine in animal ocular tissues. *Acta Ophthalmol.* **2019**, *97*, e238–e247, doi:10.1111/aos.13889.
60. Argikar, U.A.; Dumouchel, J.L.; Kramlinger, V.M.; Cirello, A.L.; Gunduz, M.; Dunne, C.E.; Sohal, B. Do We Need to Study Metabolism and Distribution in the Eye: Why, When, and Are We There Yet? *J. Pharm. Sci.* **2017**, *106*, 2276–2281, doi:10.1016/j.xphs.2017.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3. Etudes complémentaires

a) Etudes complémentaires relatives à l'article

Les données complémentaires relatives à l'article publié dans « *Pharmaceutics* » sont disponibles en suivant le lien hypertexte :

https://www.mdpi.com/1999-4923/12/8/781#stats_id

b) Etudes complémentaires relatives à la molarité de la réaction de dégradation de l'atropine

En solution aqueuse, la molécule d'atropine est susceptible de se dégrader, et ce, selon différents processus. Comme il est décrit dans l'annexe 6, à l'équilibre stœchiométrique de la réaction, une mole d'atropine produit une mole d'acide tropique ainsi qu'une mole de tropine par hydrolyse de sa liaison ester. Ces deux produits de dégradation (PDD) sont supposés être les deux PDD majoritaires de l'atropine.

Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons comparé les concentrations molaires de la molécule d'atropine initialement et après 272 jours de stabilité d'une part (différence permettant d'obtenir la concentration molaire des supposés PDD), puis, nous avons comparé cette différence de concentration à celle de la molécule d'acide tropique à M9 d'autre part. Cela va nous permettre de vérifier si dans notre cas la voie de dégradation de l'atropine produisant la tropine et l'acide tropique est la voie de dégradation principale ou bien s'il en existe une autre produisant d'autres PDD

non identifiés par notre méthode de chromatographie liquide haute performance (HPLC : « *High performance liquid chromatography* »). Nous verrons ainsi, dans les résultats complémentaires, si notre hypothèse est vérifiée.

B. Résultats complémentaires obtenus après publication

A posteriori de la publication scientifique, nous avons pu poursuivre l'étude de stabilité jusqu'à 9 mois. Nous allons d'abord présenter les résultats extrapolés théoriques de l'étude à 6 mois (M6) puis nous développerons les résultats réellement obtenus à 9 mois (M9). Enfin, nous présenterons les résultats que nous avons obtenus suite à l'étude de la molarité de la dégradation de la molécule d'atropine.

1. Extrapolation des résultats obtenus jusqu'à M6

Comme énoncé dans l'article, à 6 mois de stabilité, la concentration en atropine n'a pas variée de plus de 5.7% par rapport à la concentration initiale dans les collyres et celle de l'acide tropique était de 3,5 et 3,4 $\mu\text{g/mL}$ respectivement dans la solution avec conservateur et sans conservateur.

En extrapolant les résultats obtenus de M6 : la concentration en atropine resterait supérieure à la limite fixée à 90% de la concentration initiale dans les deux solutions, et ce, jusqu'à environ 300 jours de stabilité (Figure 2). Par ailleurs, la

concentration en acide tropique, quant à elle, resterait inférieure à 5 µg/mL pour les deux solutions, et ce, jusqu'à environ 250 jours de stabilité (Figure 3).

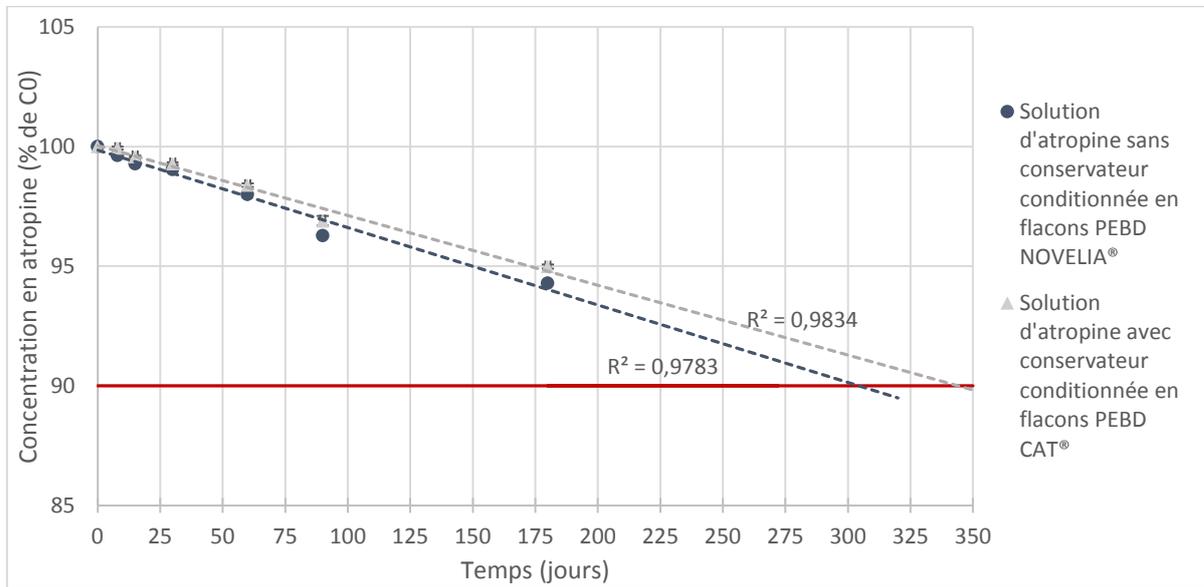


Figure 2. Extrapolation depuis M6 de l'évolution de la concentration en atropine au cours du temps : la courbe grise représente la solution d'atropine avec conservateur conditionnée en flacon PEBD CAT®. La courbe bleue représente la solution d'atropine sans conservateur conditionnée en flacon PEBD NOVELIA®. La ligne rouge représente 90% de la concentration initiale en atropine présente dans la solution. L'extrapolation est faite par le prolongement des courbes grise et bleue en fonction de leur pente respective.

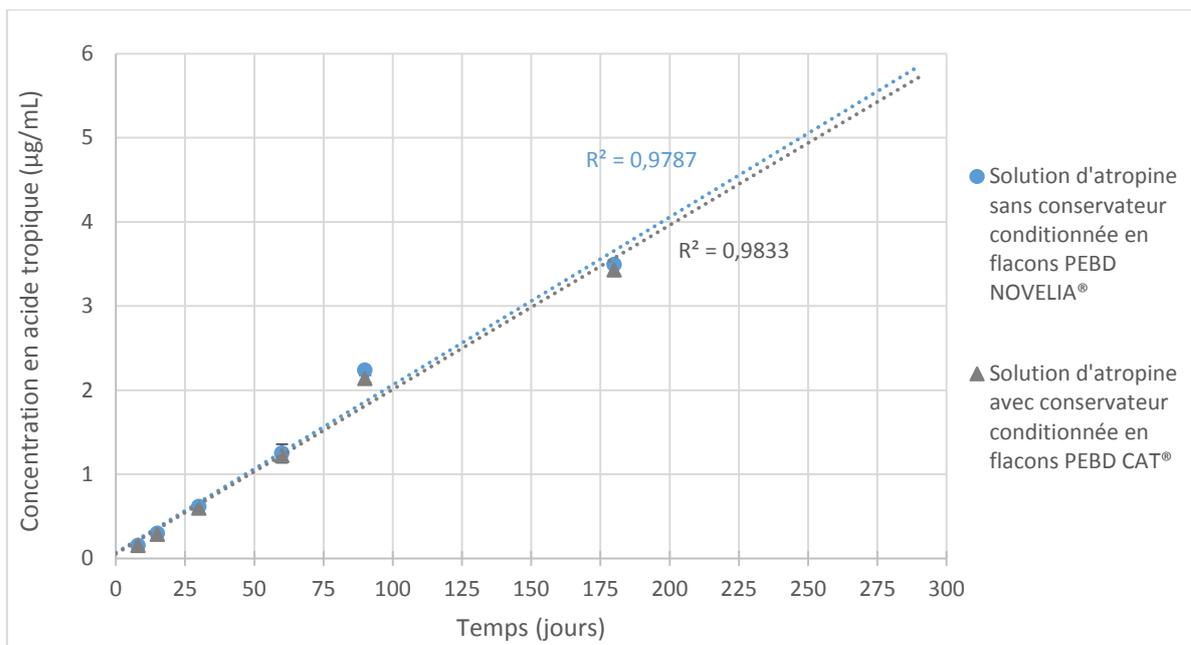


Figure 3. Extrapolation depuis M6 de l'évolution de la concentration du produit de dégradation principal de l'atropine (acide tropique) au cours du temps : la courbe grise représente la solution d'atropine avec conservateur conditionnée en flacon PEBD CAT®. La courbe bleue représente la solution d'atropine sans conservateur conditionnée en flacon PEBD NOVELIA®. L'extrapolation est faite par le prolongement des courbes grise et bleue en fonction de leur pente respective.

2. Résultats complémentaires obtenus jusqu'à M9

Après publication de l'article, l'étude de stabilité s'est poursuivie jusqu'à 9 mois de stabilité. Nous allons désormais présenter ces résultats.

a) Stabilité physique

A 272 jours de stabilité soit 9 mois, tous les échantillons sont restés limpides et incolores. La chromaticité et la luminance n'ont pas varié pour tous les échantillons de collyres analysés. Il n'y a pas eu apparition de quelconque particule en suspension, aucun trouble de la solution n'a été observé, ni aucun dégagement de

gaz. La turbidité initiale était de 0.33 et 0.32 FNU respectivement pour la solution avec et sans conservateur et n'a pas variée de plus de 0.69 FNU pour la solution avec conservateur antimicrobien et de 0.91 FNU pour la solution sans conservateur antimicrobien (Tableau I).

Tableau I. Evolution de la turbidité au cours du temps. n=1 (volume totalisé à partir de 5 flacons). FNU : Formazin Nephelometric Units.

	Turbidité (FNU)							
	Jour 0	Jour 8	Jour 15	Jour 30	Jour 60	Jour 90	Jour 180	Jour 272
Solution d'atropine avec conservateur antimicrobien conditionnée en flacon PEBD CAT®	0,33	0,31	0,27	0,78	0,78	0,43	0,93	1,02
Solution d'atropine sans conservateur antimicrobien conditionnée en flacon PEBD NOVELIA®	0,32	0,31	0,26	0,54	0,44	0,34	0,64	1,23

b) Stabilité chimique

L'évolution du pH et de l'osmolalité jusqu'à 9 mois de stabilité est présentée dans le tableau II. Au cours de l'étude, l'osmolalité n'a pas variée de plus de 5.5% (22.8 mOsm/kg) par rapport à l'osmolalité initiale (412 et 399 mOsm/kg respectivement pour la solution d'atropine avec et sans conservateur antimicrobien) après 9 mois de stockage à 25°C. Par ailleurs, le pH n'a pas varié de plus de 1.8% (0.1 unités pH) par rapport au pH initial (6.1) des deux solutions.

Tableau II. Evolution du pH et de l'osmolalité au cours du temps. n=5 (moyenne \pm intervalle de confiance 95%).

		Jour 0	Jour 8	Jour 15	Jour 30	Jour 60	Jour 90	Jour 180	Jour 272
Solution d'atropine avec conservateur antimicrobien conditionnée en flacon PEBD CAT®	pH	6,10 \pm 0,01	6,11 \pm 0,01	6,13 \pm 0,02	6,13 \pm 0,01	6,13 \pm 0,02	6,21 \pm 0,04	6,12 \pm 0,01	6,03 \pm 0,01
	Osmolalité (mOsm/kg)	412 \pm 16	400 \pm 6	403 \pm 14	393 \pm 14	400 \pm 5	413 \pm 11	418 \pm 23	435 \pm 39,5
Solution d'atropine sans conservateur antimicrobien conditionnée en flacon PEBD NOVELIA®	pH	6,10 \pm 0,01	6,11 \pm 0,01	6,13 \pm 0,01	6,14 \pm 0,02	6,13 \pm 0,01	6,21 \pm 0,01	6,09 \pm 0,01	6,01 \pm 0,01
	Osmolalité (mOsm/kg)	399 \pm 2	401 \pm 6	409 \pm 6	405 \pm 2	415 \pm 15	408 \pm 10	405 \pm 7	409 \pm 9,2

Dans chacune des conditions étudiées, la concentration moyenne en atropine n'a pas variée de plus de 6.9% par rapport à la concentration moyenne initiale (figure 4). Par conséquent, à 9 mois d'étude, cette concentration est restée supérieure à la limite fixée à 90% de la concentration moyenne en atropine initiale.

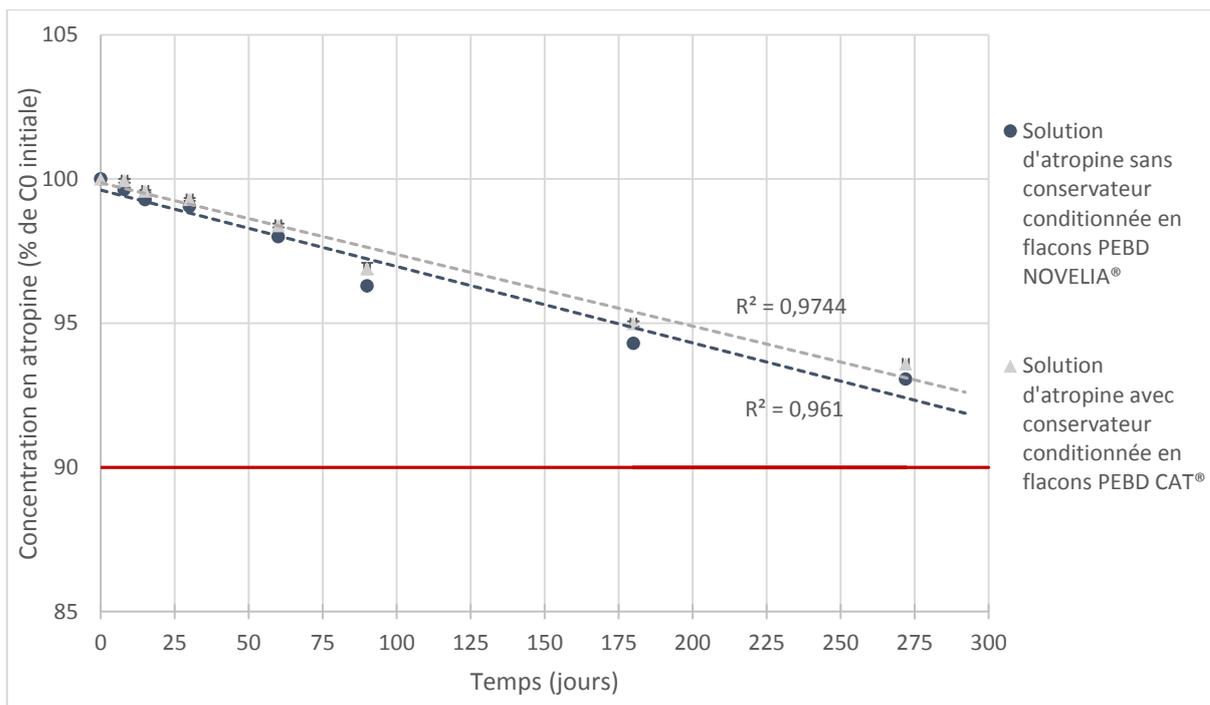


Figure 4. Evolution la concentration en atropine au cours du temps jusqu'à M9 : la courbe grise représente la solution d'atropine avec conservateur conditionnée en flacon PEBD CAT®. La courbe bleue représente la solution d'atropine sans conservateur conditionnée en flacon PEBD NOVELIA®. La ligne rouge représente 90% de la concentration initiale en atropine présente dans la solution. Le prolongement des courbes grise et bleue est réalisé en fonction de leur pente respective.

Les figures 5 et 6 montrent l'évolution de la concentration en acide tropique pendant les 9 mois d'étude d'abord sur un chromatogramme puis sur un graphique.

Après 272 jours, la concentration en acide tropique était 5.08 et 5.07 $\mu\text{g/mL}$, respectivement pour la solution avec et sans conservateur antimicrobien.

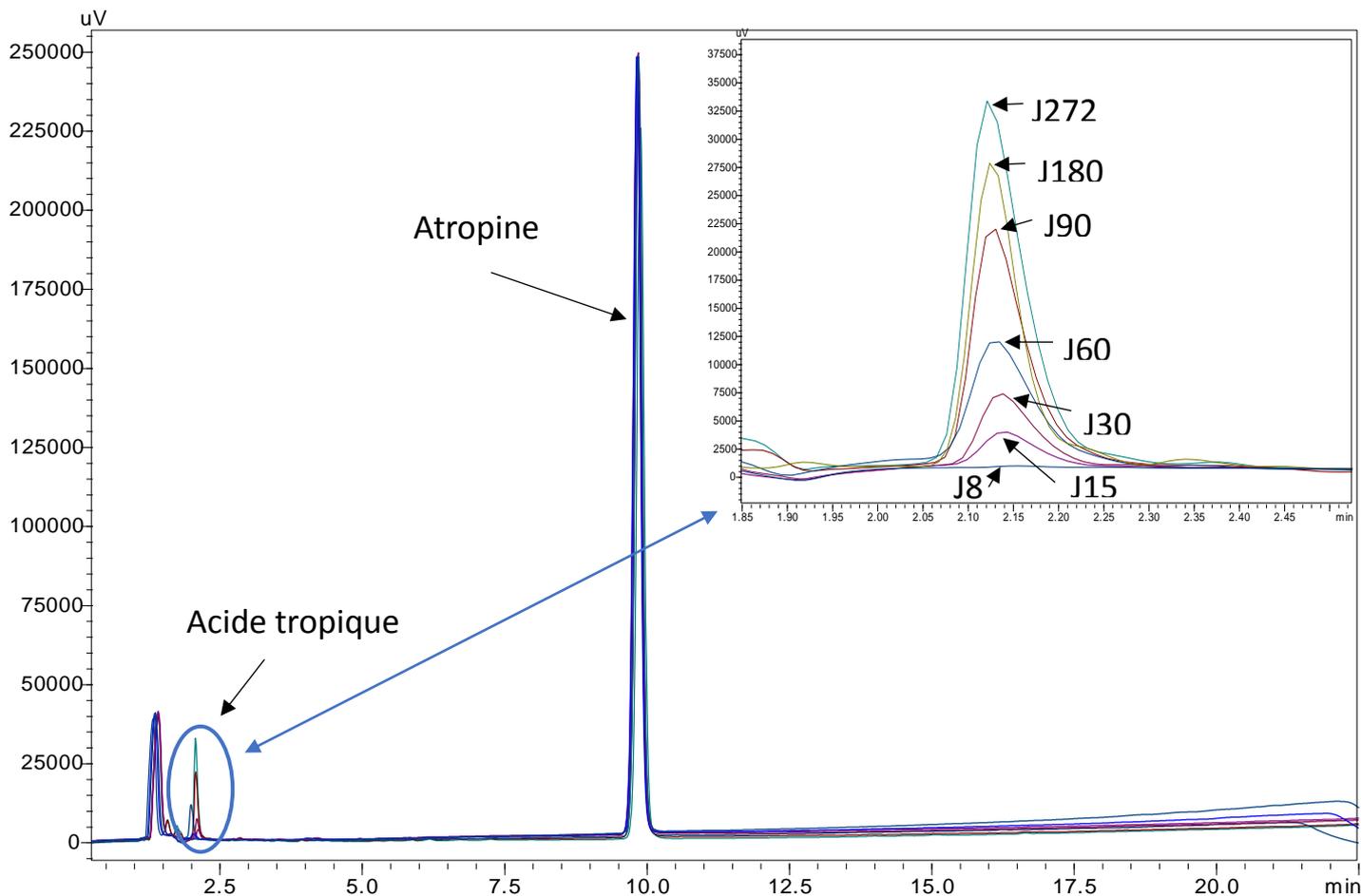


Figure 5. Chromatogramme de l'évolution de la concentration en acide tropique au cours du temps.

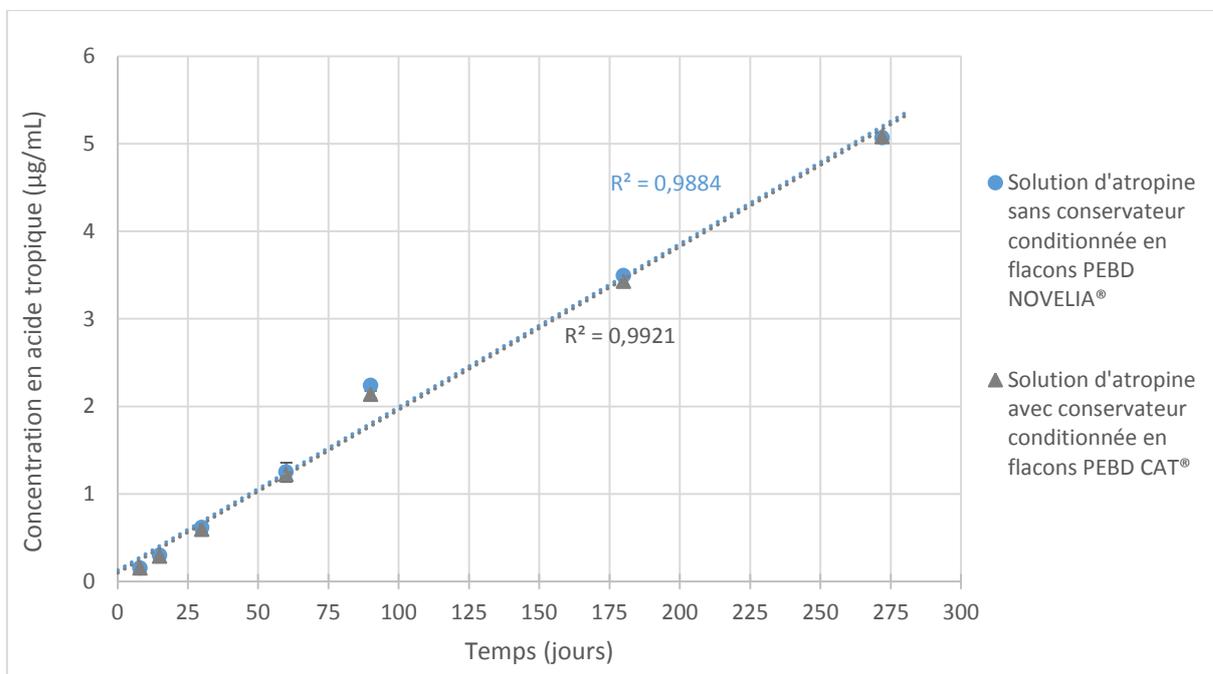


Figure 6. Evolution de la concentration du produit de dégradation principal de l'atropine (acide tropique) au cours du temps jusqu'au M9 : la courbe grise représente la solution d'atropine avec conservateur conditionnée en flacon PEBD CAT®. La courbe bleue représente la solution d'atropine sans conservateur conditionnée en flacon PEBD NOVELIA®. Le prolongement des courbes grise et bleue est réalisé en fonction de leur pente respective.

c) Essais de stérilité

Aucun des 5 flacons de collyres pour les deux solutions, avec et sans conservateur antimicrobien n'a révélé de pousse microbienne à 272 jours ou 9 mois de stabilité.

Finalement, la formulation et l'étude de stabilité ont montré des résultats concluants, notamment en termes physico-chimiques et microbiologiques en ce qui concerne la stabilité à 9 mois suite aux différents temps d'analyses. Abordons désormais le devenir de la molécule d'atropine et sa dégradation en solution.

d) Etude de la molarité de la molécule d'atropine suite à sa dégradation en solution

(1) Evolution de la concentration en atropine

Nous pouvons constater qu'au cours de l'étude de stabilité, la concentration en atropine a diminué de $3,47 \cdot 10^{-7}$ et $3,48 \cdot 10^{-7}$ mol/mL (100%) pour sa concentration initiale, à $3,23 \cdot 10^{-7}$ (93,06%) et $3,25 \cdot 10^{-7}$ mol/mL (93,59%) respectivement pour la formulation sans conservateurs (flacon NOVELIA®) et avec conservateur (flacon CAT®) (Tableau III).

Tableau III. Evolution de la concentration en atropine au cours du temps jusqu'à M9 pour les deux formulations : sans (NOVELIA®) et avec conservateur (CAT®).

	Temps d'analyse	Concentration atropine (µg/mL)	Concentration atropine (% T0)	Masse molaire atropine (µg/mol)	Molarité atropine (mol/mL)
Flacons NOVELIA	J0	100,42	100	289369400	$3,47.10^{-7}$
	J8	100,05	99,64		$3,46.10^{-7}$
	J15	99,69	99,28		$3,45.10^{-7}$
	J30	99,46	99,05		$3,44.10^{-7}$
	J60	98,41	98,00		$3,40.10^{-7}$
	J90	96,69	96,29		$3,34.10^{-7}$
	J180	94,69	94,30		$3,27.10^{-7}$
	J272	93,40	93,06		$3,23.10^{-7}$
	Temps d'analyse	Concentration atropine (µg/mL)	Concentration atropine (% T0)	Masse molaire atropine (µg/mol)	Molarité atropine (mol/mL)
Flacons CAT	J0	100,59	100	289369400	$3,48.10^{-7}$
	J8	100,36	99,94		$3,47.10^{-7}$
	J15	100,00	99,58		$3,46.10^{-7}$
	J30	99,71	99,29		$3,45.10^{-7}$
	J60	98,80	98,39		$3,41.10^{-7}$
	J90	97,30	96,90		$3,36.10^{-7}$
	J180	95,38	94,98		$3,30.10^{-7}$
	J272	94,10	93,59		$3,25.10^{-7}$

Par conséquent, en effectuant la différence entre le J0 et le M9 pour ces deux conditions, la molarité des supposés PDD de la molécule d'atropine est de $2,42.10^{-8}$ et de $2,24.10^{-8}$ mol/mL respectivement pour la formulation sans et avec conservateur.

Il nous reste à comparer ces valeurs à celle de l'acide tropique pour savoir si la voie de dégradation produisant la tropine et l'acide tropique est la voie de dégradation principale de l'atropine.

(2) Comparaison de la concentration des produits de dégradation de l'atropine à celle de l'acide tropique

Au cours du temps, la concentration en acide tropique a augmenté progressivement pour atteindre dans la formulation sans conservateurs $3,05 \cdot 10^{-8}$ mol/mL et pour celle avec conservateur $3,06 \cdot 10^{-8}$ mol/mL (Tableau IV).

Tableau IV. Evolution de la concentration en acide tropique au cours du temps jusqu'à M9 pour les deux formulations : sans (NOVELIA®) et avec conservateur (CAT®).

	Temps d'analyse	Concentration acide tropique ($\mu\text{g/mL}$)	Pourcentage (%) acide tropique en solution	Masse molaire acide tropique ($\mu\text{g/mol}$)	Molarité acide tropique (mol/mL)
Flacons NOVELIA	J0	0	0	166170000	0
	J8	0,1523	0,15		$9,16 \cdot 10^{-10}$
	J15	0,2973	0,30		$1,79 \cdot 10^{-9}$
	J30	0,6157	0,62		$3,71 \cdot 10^{-9}$
	J60	1,2487	1,25		$7,51 \cdot 10^{-9}$
	J90	2,2376	2,26		$1,35 \cdot 10^{-8}$
	J180	3,4933	3,56		$2,10 \cdot 10^{-8}$
	J272	5,0673	5,15		$3,05 \cdot 10^{-8}$
Flacons CAT	J0	0	0	166170000	0
	J8	0,1518	0,15		$9,14 \cdot 10^{-10}$
	J15	0,2857	0,28		$1,72 \cdot 10^{-9}$
	J30	0,5947	0,59		$3,58 \cdot 10^{-9}$
	J60	1,2215	1,22		$7,35 \cdot 10^{-9}$
	J90	2,1364	2,15		$1,29 \cdot 10^{-8}$
	J180	3,4274	3,47		$2,06 \cdot 10^{-8}$
	J272	5,0794	5,12		$3,06 \cdot 10^{-8}$

En effectuant la différence entre la concentration des supposés produits de dégradation de l'atropine et celle de l'acide tropique à M9, les valeurs obtenues sont

$-6,25.10^{-9}$ et $-8,14.10^{-9}$ mol/mL pour les formulations sans et avec conservateur respectivement (Tableau V).

Tableau V. Différence de concentration observée entre PDD supposés de l'atropine et celle de l'acide tropique à M9

Conditionnement	Différence molarité atropine J0 vs M9 : [PDD atropine] (mol/mL)	Molarité acide tropique M9 (mol/mL)	Différence [PDD atropine] vs molarité acide tropique M9 (mol/mL)
NOVELIA	$2,42.10^{-8}$	$3,05.10^{-8}$	$-6,25.10^{-9}$
CAT	$2,24.10^{-8}$	$3,06.10^{-8}$	$-8,14.10^{-9}$

Après avoir présenté les résultats complémentaires, nous allons voir dans la discussion générale ce qu'ils ont pu susciter dans notre réflexion. Nous les commenterons en mettant en lumière ce qu'ils apportent finalement comme plus-value à notre étude, puis nous pourrions ouvrir le sujet vers d'autres perspectives.

DISCUSSION GENERALE

A. Thérapeutiques de la myopie : actuelles et futures

De nos jours, nous disposons de plusieurs solutions pour traiter la myopie. Comme nous l'avons vu précédemment, les moyens permettant la diminution de la progression de la myopie sont nombreux mais chacun présente ses limites propres.

En effet, les moyens de corrections optiques tels que les verres de lunettes et les lentilles de contact sont des dispositifs coûteux qui corrigent « ponctuellement » l'anomalie visuelle et qui ne permettent pas de ralentir durablement sa progression.

Par ailleurs, l'orthokératologie permettant le remodelage cornéen pendant la nuit s'avère être contraignante, ne s'adresse qu'aux patients présentant un degré de myopie faible et présente une réversibilité thérapeutique rapide dès lors que le dispositif n'est plus employé (14).

La chirurgie réfractive au laser quant à elle est une technique efficace pour des myopies stabilisées de l'adulte, mais qui demeure toutefois coûteuse et incertaine malgré ses progrès récents (29).

Les collyres faiblement dosés en atropine sont comme nous l'avons vu des traitements prometteurs et en pleine expansion pour ralentir le développement de la myopie (19–21). Des études évaluant l'impact clinique sur ce traitement au long cours restent toutefois nécessaires.

Enfin, la combinaison de l'orthokératologie associée à l'administration de collyres faiblement dosés à l'atropine s'avèreraient efficace du fait de leur synergie d'action

(10), mais des études sur le long terme doivent être développées pour prouver la réelle efficacité d'une telle association.

En définitive, les collyres à l'atropine s'affirment comme le moyen préventif le plus prometteur d'entre tous, c'est pourquoi la littérature scientifique actuelle se montre particulièrement productive à ce sujet.

Nous allons désormais focaliser notre propos sur les choix galéniques effectués pour la réalisation de la formulation des collyres faiblement dosés en atropine.

B. Choix galéniques pour la formulation des collyres faiblement concentrés en atropine

La réalisation d'un collyre efficace avec une bonne tolérance clinique pour les patients s'avère être toujours un processus délicat du fait de la complexité anatomique de l'œil et de sa physiologie.

1. Choix de la MPUP sous forme de poudre

Le choix d'une MPUP sous forme de poudre pour la réalisation de la formulation du collyre a été fait par rapport à l'absence de spécialités pharmaceutiques adéquates disponibles sur le marché. En effet, ces dernières présentaient dans leur formulation des excipients à effets notoires et notamment de l'acide chlorhydrique, irritant pour l'épithélium cornéen. Ces formulations présentaient un pH souvent trop acide, c'est

pourquoi, il a été décidé de choisir une MPUP de sulfate d'atropine afin de pouvoir gérer au mieux les paramètres de la solution à formuler en s'affranchissant des excipients présents dans les spécialités commerciales. En effet, le réajustement du pH aurait impliqué l'utilisation d'une base : soit sous forme de poudre non stérile, soit sous forme de solution de bicarbonate par exemple, ce qui aurait donc engendré un risque de dilution de la molécule d'atropine.

2. Choix du solvant de dilution

Le choix du chlorure de sodium par rapport à d'autres solvants utilisés fréquemment dans la composition des formes collyres tels que le « *Balanced salt solution* » (BSS qui peut être traduit par « solution saline équilibrée ») ou les larmes artificielles a été décidé en accord avec le service d'ophtalmologie du CHU. Cependant, l'emploi du BSS ou des larmes artificielles avaient été évoqué lors de la phase de réflexion sur la formulation.

En effet, le BSS aurait pu être employé comme véhicule de dilution mais le chlorure de calcium rentrant dans sa composition aurait éventuellement pu engendrer une précipitation intraoculaire. C'est ce que relate *Olson J. et al.* (30) lors du remplacement de lentilles intraoculaires dans l'opération de la cataracte : une cristallisation est observée au niveau de la lentille après intervention chirurgicale. Le chlorure de calcium présent dans le BSS, servant à l'irrigation oculaire durant l'opération, serait responsable de cette cristallisation à la surface de la lentille mais

seulement dans de rares cas. C'est pourquoi son emploi dans notre formulation a été écarté bien que les faits relatés soient exceptionnels.

Concernant l'emploi des larmes artificielles, il a été décidé de ne pas choisir cette option comme solvant de dilution car dans certaines formulations, le chlorure de benzalkonium est retrouvé comme conservateur. Or, cet excipient est connu pour présenter des risques pour la cornée à plus ou moins longs termes (31) : en effet, plusieurs cas de kératopathies probablement induites par le chlorure de benzalkonium ont déjà été rapportés dans la littérature. Bien que toutes les formulations de larmes artificielles ne comportent pas forcément d'excipients à effets notoires, afin de s'affranchir d'un quelconque risque de toxicité, le choix du chlorure de sodium nous a semblé être le plus judicieux.

Effectivement, le chlorure de sodium à 0.9% (NaCl 0.9%), a été choisi également grâce aux données de stabilité de solutions d'atropine à 2 mg/mL (NaCl 0.9% comme solvant), conditionnées dans des seringues en polypropylène, qui étaient de 1 an à température ambiante à la lumière ou de 28 jours à 35°C à la lumière ou de 1 an à 5°C à l'abri de la lumière (32). Ces durées de stabilité étaient d'autant plus rassurantes quant au choix de ce véhicule de dilution pour notre formulation.

3. Choix du pH de la solution

Le pH est un des facteurs clé concernant la pénétration des molécules au niveau de l'épithélium cornéen. En effet, une solution avec un pH relativement acide

permettrait plus facilement la pénétration des molécules protonées, qui seraient donc plus lipophiles qu'hydrophiles car sous forme non ionisées mais aurait pour conséquences plus d'effets indésirables comme des irritations ou des larmoiements importants (33). De plus, la molécule d'atropine est très instable à pH alcalin comme nous avons pu le constater lors des essais de dégradation de l'étude de stabilité, voir même à pH physiologique qui est celui des larmes (7,4). C'est pourquoi, le meilleur choix que nous pouvons faire concernant le pH de la solution formulée sera celui d'un pH compris entre 5 et 6, afin de permettre une absorption de la molécule suffisamment efficace, une bonne stabilité physico-chimique et surtout moins d'effets indésirables engendrés.

De plus, le pH joue également un rôle important dans le temps de résidence de la molécule au niveau de la cornée ainsi qu'au niveau de sa biodisponibilité : un pH physiologique n'engendrera pas de larmoiement superflue, contrairement à un pH acide, ce qui aura pour conséquence d'augmenter l'absorption de la molécule puisque moins rapidement éliminée via les larmes (33). Ce paramètre est donc important dans l'efficacité d'action des collyres employés au niveau de l'œil.

D'autre part, un paramètre important à prendre en compte et qui est décrit dans *Bouattour et al.* (34) est l'acidification des solutions conditionnées dans des flacons en PEBD stérilisés aux rayons gamma (flacons PEBD opaques blancs, référence 10002134 NOVELIA® ; Nemera). Ce phénomène se produit à cause d'un relargage de protons qui s'effectue depuis le conditionnement primaire du collyre causé par le mode de stérilisation : les rayonnements gamma. Ils sensibiliseraient les flacons en PEBD qui relargueraient par la suite, en présence de chlorure de sodium, des

composés acides faisant diminuer le pH de la solution conditionnée. La nécessité de neutraliser cette acidité est donc un paramètre à considérer via notamment l'adjonction d'un tampon dans la formulation du collyre.

4. Choix du tampon de la solution

Comme nous l'avons précédemment énoncé, le relargage de composés acides depuis les flacons en PEBD vers la solution induit une diminution significative du pH au cours du temps. Ces variations pourraient induire des effets indésirables oculaires à pH trop acide ou une instabilité de la molécule d'atropine pour des pH neutres ou alcalins. Afin de maîtriser ce paramètre, nous avons choisi d'employer un tampon phosphate selon le couple : sodium dihydrogénophosphate dihydraté (NaH_2PO_4) à 50 mmol/L / sodium monohydrogénophosphate dodecahydrate cristallisé (NaHPO_4^{2-}) à 31.5 mmol/L ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4^{2-}$), à une concentration définit de telle sorte à ce que l'abaissement du pH constaté dans *Bouattour et al.* (34) (génération de 1.10^{-4} mol/L d'ions H_3O^+ dans 2 mL de solution) soit maîtrisé. Cette concentration a été définit à 7.80 g/L de solution d'atropine réalisée pour le sodium dihydrogénophosphate dihydraté (NaH_2PO_4) et à 4.47 g/L pour le sodium monohydrogénophosphate dodecahydrate cristallisé (NaHPO_4^{2-}). Le pouvoir tampon à ces concentrations permettait de neutraliser l'acidification du milieu relatif au relargage d'ions H_3O^+ . Le choix d'un tampon phosphate a été préféré à

d'autres tels que le citrate de sodium, l'acétate de sodium, ou encore le borate de sodium pour plusieurs raisons pharmacotechniques que nous allons voir.

En effet, le citrate de sodium rentre dans la composition de nombreux collyres en tant que tampon. Il est notamment employé dans un collyre antibiotique à base de céfazoline à 1 et 5% : les résultats satisfaisants concernant la stabilité de ce collyre sur 30 jours montrent que son emploi dans des formulations ophtalmiques peut être fiable (35). Les plages de pH dans lesquels il a été employé pour ce collyre antibiotique sont de 6,11 à 6,27, donc légèrement acides, et qui auraient très bien pu convenir pour notre collyre d'atropine. Toutefois, nous avons pensé que de par sa structure moléculaire avec une chaîne carbonée assez longue et apolaire ($C_6H_5Na_3O_7$), nous aurions pu rencontrer des problèmes de solubilité, minimes, mais plus importants qu'avec un tampon phosphate. De plus, pour les mêmes raisons, des interactions entre phase mobile et phase stationnaire de la colonne d'HPLC greffée en C_{18} auraient pu se produire plus facilement qu'avec un tampon phosphate lors des analyses chimiques de nos collyres au cours de l'étude de stabilité. Il en est de même pour un tampon acétate (CH_3COOH), sa chaîne carbonée, bien que plus courte que celle du citrate de sodium, aurait pu poser problèmes dans la formulation et l'analyse chimique de notre collyre par rapport à un tampon phosphate.

En ce qui concerne l'emploi du borate de sodium, lui aussi fréquemment utilisé dans les formulations de collyre, ses plages de pH alcalines (8,6 – 9,2) étant trop élevées vis-à-vis du pH cible de notre solution (5 - 6), il aurait été nécessaire d'ajouter de trop grandes quantités d'acide conjugué afin de ramener le pH proche

du pH souhaité. Le borate de sodium se serait donc avéré moins facile d'emploi qu'un autre tampon, c'est pourquoi son utilisation dans notre formulation a été écartée.

Ainsi les paramètres concernant le pH de notre formulation seraient maîtrisés avec l'emploi d'un tampon phosphate approprié. Il nous reste à voir les critères que nous avons dû prendre en compte dans le choix du conservateur.

5. Choix du conservateur

De nombreux collyres multidoses comportent dans leur formulation un ou plusieurs conservateurs assurant la stérilité et donc l'innocuité microbiologique et fongique de la solution. Dans la littérature scientifique, le conservateur le plus fréquemment employé est le chlorure de benzalkonium. Ce dernier a notamment été étudié dans plusieurs formulations de collyres à l'atropine. C'est le cas dans *Austermann et al.* (36) où l'influence du chlorure de benzalkonium et notamment son rôle facilitateur dans la pénétration de la molécule d'atropine au niveau de la cornée a été étudié. La concentration d'atropine mesurée par HPLC au niveau de l'humeur aqueuse, 10 minutes après installation de collyres à différentes concentrations en atropine, ne s'est pas révélée significativement différentes entre formulation avec et sans conservateurs. En effet, ce conservateur ne permet pas de faire pénétrer l'atropine plus facilement à travers la cornée. Son emploi dans notre formulation n'aura alors pas plus d'intérêt qu'un autre conservateur à ce niveau.

De plus, ses potentiels effets indésirables rapportés tels que des conjonctivites allergiques ou des réactions d'hypersensibilité ne permettent pas son emploi de manière sûre, ce qui pose la question de son intérêt dans notre formulation en terme de balance bénéfice risque pour le patient. En effet, des conjonctivites allergiques, des dermatites allergiques ainsi que des dermatites de contact sont rapportées suite à l'emploi de collyres à 1%, 0.5% et 0.01% en atropine possédant du chlorure de benzalkonium dans leurs formulations, chez des patients âgés de 5 à 15 ans utilisant quotidiennement l'une des 3 formulations et ce indépendamment de leur âge, de leur genre ou de la durée d'utilisation (37). Les symptômes principaux contractés suite à l'administration de collyres sont principalement des démangeaisons, des sensations de brûlures et picotements, des œdèmes et des rougeurs péri-oculaires. Leur intensité s'avère être proportionnelle à la dose d'atropine employée. En effet, ces symptômes sont plus importants pour des concentrations à 1% en atropine qu'avec celle à 0.01%. Il est important de noter que le fait d'ôter le chlorure de benzalkonium ou le chlorbutanol (conservateur de la famille des alcools) présent dans la formulation des collyres permet la réintroduction du collyre chez certains patients et ce, sans effets indésirables contractés. Aussi, l'utilisation de collyres d'atropine à faible concentration et sans chlorure de benzalkonium ou autres conservateurs à base d'alcool limiterait le développement d'effets indésirables oculaires.

Malgré cela, la réalisation de deux collyres à 0.01% en atropine avec et sans conservateur reste envisagée afin de garder une option de secours dans le cas où la

formulation sans conservateur ne s'avérait pas concluante en terme de sécurité microbiologique.

S'offrent à nous deux possibilités de formulation : une avec conservateur, une autre sans conservateur. La formulation conditionnée dans des flacons en PEBD CAT® dits « classiques » (sans membrane filtrante) contiendra un conservateur permettant un usage multiple. Celle sans conservateur sera conditionnée dans des flacons PEBD NOVELIA® dotés d'un dispositif d'administration capable de préserver la stérilité de la solution (avec membrane filtrante pour la réabsorption d'air après administration, permettant un usage multiple du collyre).

Aussi, afin de garantir la sécurité microbiologique de la solution tout en considérant les effets indésirables relatifs à l'emploi de certains conservateurs, le cétrimide, ammonium quaternaire aux propriétés d'agent conservateur et de désinfectant, stable dans des gammes de pH allant de 3 à 7 (38), a été choisi pour rentrer dans la formulation du collyre avec conservateur. Il serait sûr et tout aussi efficace que le chlorure de benzalkonium. En effet, il est rapporté dans un article (39) comparant la sécurité d'emploi et l'efficacité de deux gels ophtalmiques utilisés contre la sécheresse oculaire dont la formulation ne diffère que par le conservateur employé : chlorure de benzalkonium ou cétrimide ; que le cétrimide n'engendrerait pas plus d'effets indésirables en termes de fréquences que le chlorure de benzalkonium. Ces effets indésirables déjà connus étaient : inconfort oculaire, vision floue, sensation de brûlure et démangeaison. Aucun effet indésirable grave n'a été rapporté. De plus, l'efficacité s'est avérée identique puisqu'il n'existait pas de différence cliniquement significative entre les deux gels dans l'amélioration des symptômes des patients

traités. L'emploi de l'un ou de l'autre des deux conservateurs n'influe donc pas sur le critère d'efficacité. Le cétrimide s'avère donc être équivalent au chlorure de benzalkonium en terme d'efficacité et de sécurité d'emploi.

Après avoir vu les différents choix galéniques de nos deux formulations, nous allons commenter les résultats que nous avons pu obtenir après 9 mois de conservation afin de savoir si nos collyres s'avèrent être stables jusque-là.

C. Résultats complémentaires à M9

Notre étude présente les nouvelles données obtenues suite à 9 mois d'étude de stabilité physico-chimique et microbiologique de deux formulations différentes (avec et sans conservateur) de collyres faiblement dosés en atropine (0.01% ou 0.1 mg/mL). Ces deux formulations sont conditionnées dans deux types de flacons stérilisés différemment (rayonnements gamma et oxyde d'éthylène) et sont destinées à être employées pour la prévention du développement de la myopie en pédiatrie.

Pour les deux formulations analysées, chacun des paramètres étudiés étaient en faveur d'une stabilité physico-chimique et microbiologique sur 9 mois d'étude.

Les échantillons sont restés limpides et incolores. Leur chromaticité et leur luminance n'ont pas variées. Concernant la turbidité, elle n'a également pas variée significativement dans les deux conditions de formulation. Aucune particule en

suspension et aucun trouble de la solution n'a été observé, ni aucun dégagement de gaz. Le pH et l'osmolalité des deux solutions sont également demeurés stables sur les 272 jours d'étude et sont restés dans des valeurs compatibles avec l'administration ophtalmique. La concentration moyenne en atropine n'a pas variée de plus de 6.9% après 9 mois par rapport à la concentration moyenne initiale, ce qui montre que l'efficacité thérapeutique est préservée au cours du temps. Par ailleurs, la concentration en acide tropique quant à elle, a atteint progressivement 5.08 et 5.07 µg/mL, respectivement pour la solution avec et sans conservateur antimicrobien. Ces deux concentrations restent cependant assez faibles si on les compare à celles retrouvées dans des spécialités commerciales à base d'atropine. En effet, elles sont de 21.4 et 40.2 µg/mL dans les spécialités commerciales étudiées (voir les données complémentaires de l'article), soit 4 à 8 fois supérieures à celles retrouvées dans nos collyres faiblement dosés. Ces données sont plutôt rassurantes quant à la tolérance de l'acide tropique au contact de la muqueuse oculaire, qui s'avère acceptable dans notre cas. Toutefois, pour vérifier ce postulat, des études plus poussées concernant les potentiels risques cliniques de l'acide tropique restent à entreprendre.

Concernant la qualité microbiologique des deux formulations, aucune pousse microbienne à 272 jours n'a été observée. L'emploi d'un conservateur antimicrobien dans le cas des flacons en PEBD CAT® et, le dispositif avec membrane filtrante d'air dans le cas des flacons en PEBD NOVELIA®, s'avèrent tout deux efficaces dans la préservation microbiologique des deux solutions.

Nous pouvons donc considérer que l'administration de ces deux formulations de collyres faiblement dosés s'avère être sûre après 9 mois de conservation.

Bien que la concentration en acide tropique dans nos collyres soit très inférieure à celles présentes dans les spécialités commerciales étudiées, l'étude de stabilité nous a amené à nous interroger sur le devenir chimique de la molécule d'atropine. Nous allons désormais nous pencher, au point de vue moléculaire, sur les PDD de l'atropine et notamment l'acide tropique.

D. Dégradation de la molécule d'atropine

Nous allons aborder à présent le comportement moléculaire et chimique de la molécule d'atropine en solution aqueuse au cours du temps, pendant la conservation de nos collyres.

1. Processus de dégradation de l'atropine et produits résultants

La dégradation de l'atropine en solution aqueuse engendre la formation de deux principaux produits de dégradation : l'acide tropique et l'apoatropine (40)

La dégradation de l'atropine s'effectue selon différents modes (Annexe 6) :

- Dans des conditions légèrement acides, l'atropine subit une hydrolyse de sa fonction ester et aboutit à deux produits de dégradation : l'acide tropique et la tropine. Après déshydratation, l'acide tropique produit donne l'acide atropique.
- Dans des conditions basiques, l'atropine peut subir directement une déshydratation et aboutir à l'apoatropine, qui peut : être hydrolysée et donner la tropine et l'acide atropique d'une part, ou, former par dimérisation une molécule de belladonine d'autre part.

Selon *Kirchhoff C. et al.* (40) le produit de dégradation qui devrait être généré en proportion majoritaire est l'apoatropine. En ce qui nous concerne, cette dernière a été identifiée pour la validation de notre méthode de dosage analytique lors des essais de dégradation forcée. Notre méthode permet donc de l'identifier de manière sensible et spécifique. Toutefois, au cours des 9 mois de stabilité, nous n'avons pas détecté la présence d'apoatropine dans nos collyres, mais seulement celle d'acide tropique. L'apoatropine devrait pourtant être facilement détectable par HPLC puisqu'elle possède un groupement benzénique chromophore. Pour expliquer ce phénomène, nous pouvons faire l'hypothèse que l'apoatropine a certainement dû se transformer en partie ou en totalité en tropine et acide atropique qui lui-même a produit de l'acide tropique, ou bien, que l'apoatropine ne s'est tout simplement pas formée (voie de dégradation formant la tropine et l'acide tropique majoritaire dans notre cas).

Il nous reste cependant à connaître ce qu'il en est du second produit de dégradation associé à l'acide tropique qui est la tropine. En effet, cette molécule ne possède pas

de groupement chromophore et n'est pas décrite spécifiquement dans la monographie de la pharmacopée européenne de l'atropine comme produit de dégradation.

Afin de répondre à cette interrogation, nous allons à présent commenter les résultats obtenus sur la molarité de la réaction de dégradation de l'atropine en tropine et en acide tropique. Ainsi, nous pourrions savoir si l'acide tropique est bel et bien l'unique produit de dégradation qu'il y a dans nos collyres et si en plus, il existe également dans notre solution de la tropine, molécule non identifiée avec notre méthode de dosage HPLC.

2. Molarité de la réaction de dégradation de l'atropine

Comme présenté dans les résultats complémentaires : la molarité des supposés PDD de la molécule d'atropine est de $2,42 \cdot 10^{-8}$ et de $2,24 \cdot 10^{-8}$ mol/mL respectivement pour la formulation sans et avec conservateur, et, la concentration en acide tropique dans la formulation sans conservateurs est de $3,05 \cdot 10^{-8}$ mol/mL et pour celle avec conservateur de $3,06 \cdot 10^{-8}$ mol/mL.

La différence entre la concentration des supposés PDD l'atropine et celle de l'acide tropique à M9 est donc de $-6,25 \cdot 10^{-9}$ et $-8,14 \cdot 10^{-9}$ mol/mL pour les formulations sans et avec conservateur respectivement. Ces deux différences sont proches de 0 et négatives, donc en faveur d'une concentration plus grande en acide tropique que celle des supposés PDD de l'atropine. Nous devons évidemment tenir compte du caractère expérimental de nos résultats : marge d'erreur quasi systématique lors de

l'analyse des concentrations par HPLC, différents biais dont ceux de manipulations et de mesures via l'intégration des pics notamment, ce qui expliquerait le fait que ces différences ne soient pas strictement égales à 0.

Grâce à ces résultats, nous pouvons en déduire que la voie de dégradation principale de la molécule d'atropine est celle produisant la tropine et l'acide tropique comme PDD et ce, de façon majoritaire.

Enfin, l'article de *Zvirblis et al.* vient appuyer notre hypothèse et nos résultats expérimentaux en affirmant que la voie majeure de dégradation de l'atropine en milieu aqueux est celle aboutissant à la formation d'acide tropique et de tropine (41).

Nous avons pu voir en amont, dans les études complémentaires à l'article, que les concentrations en acide tropique présentes dans nos collyres demeuraient très faibles au regard de celles présentes dans d'autres spécialités commerciales. Ces résultats étaient plutôt rassurants quant aux potentiels problèmes de tolérance de l'acide tropique. Cependant, il nous reste à déterminer l'impact de la molécule de tropine présente dans nos collyres, puisque produite mole à mole par dégradation de l'atropine. Nous allons désormais nous pencher sur l'étude de cette molécule afin d'en identifier les caractéristiques et son éventuelle toxicité pour la muqueuse oculaire.

3. La tropine : produit de dégradation de l'atropine

De manière structurale, la molécule de tropine ne possède pas de groupement chromophore, son identification s'avère donc plus complexe que celle de l'acide tropique (Figure 7). Elle n'est également pas décrite spécifiquement dans la monographie de la pharmacopée européenne de l'atropine comme PDD.

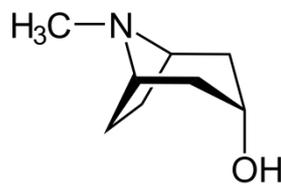


Figure 7. Structure chimique de la molécule de tropine.

Source : Kirchhoff C, Bitar Y, Ebel S, Holzgrabe U. Analysis of atropine, its degradation products and related substances of natural origin by means of reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A. 13 août 2004;1046(1-2):115-20.

Cette molécule est décrite dans un article au sujet de la dégradation de l'atropine et de ses différents PDD. C'est en effet suite à une réaction non enzymatique d'hydrolyse que l'acide tropique et la tropine sont générés. Ces deux PDD sont rapportés comme dépourvus d'activité, c'est-à-dire sans effets anti-muscarinique, et surtout dépourvus de toxicité pour l'organisme humain (42).

En effet, plusieurs cas d'intoxication à base de plantes contenant des alcaloïdes tropaniques ont été rapportés dans la littérature. Ce n'est cependant pas l'effet produit par la tropine ou l'acide tropique, dépourvus d'activité, mais par un excès d'atropine et de scopolamine induisant une paralysie du système nerveux parasympathique et ce, à haute dose (43). Un cas de delirium est décrit dans *Hanna*

et al. suite à une intoxication au *Datura innoxia* (44). Après analyse des composés chimiques par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, il s'avère que ce soient l'atropine et la scopolamine qui sont retrouvées en majorité et non leurs PDD. Ce n'est alors pas la présence de tropine qui induirait une telle toxicité.

Une autre étude sur la stabilité de l'atropine sulfate injectable à faible concentration (400 µg/mL) a permis d'identifier de faibles quantités de tropine en solution mais qui restaient inférieures à 10 µg/mL (45). Ces faibles concentrations de tropine retrouvées n'influençaient pas la stabilité de la solution et n'engendraient pas d'effets indésirables ou autres toxicités. La concentration en tropine à l'équilibre dans nos collyres est censée être égale à celle de l'acide tropique (réaction mole à mole) soit de $3,05 \cdot 10^{-8}$ mol/mL (5,06 µg/mL) dans la formulation sans conservateur et de $3,06 \cdot 10^{-8}$ mol/mL (5,07 µg/mL) dans celle avec conservateur à M9 (Tableau IV). Ces concentrations sont inférieures à celle retrouvées dans *Schier et al.* (45) puisqu'inférieures à 10 µg/mL.

Par conséquent, grâce à ces données bibliographiques, nous pouvons considérer que la concentration en tropine présente dans nos collyres n'induit pas de problèmes de stabilité ni de toxicité après 9 mois de conservation.

Ainsi, après avoir étudié les deux principaux PDD de l'atropine, l'acide tropique et la tropine, nous pouvons dire que leur présence en solution n'engendre ni de problèmes de stabilité ni de toxicités aux concentrations observées après 9 mois de

conservation. Nos collyres faiblement dosés en atropine peuvent donc être employés de manière sûre et efficace après 272 jours de conservation.

Pour aller plus loin et ouvrir notre discussion, nous allons désormais aborder les perspectives futures qui découlent de notre étude.

E. Perspectives futures

La myopie est une pathologie en constante évolution à travers le monde et la stratégie thérapeutique des collyres faiblement dosés en atropine, notamment le dosage à 0.01%, s'avère être une des plus concluantes dans le ralentissement de son développement sans engendrer d'effets indésirables majeurs. C'est notamment ce que confirme une méta-analyse récente (46). Un logigramme de prise en charge contre la progression de la myopie est proposé dans *Wu et al.* (4). Il comprend notamment comme stratégie thérapeutique l'emploi de collyres à l'atropine faiblement dosés, une fois par jour le soir, pendant 2 ans initialement, ainsi que le renforcement des moyens préventifs contre la myopie telle que l'augmentation du temps passé en plein air (Annexe 7). Cette option reste toutefois une approche hypothétiquement efficace contre le ralentissement du développement de la myopie. Les résultats cliniques obtenus à posteriori permettront de savoir si oui ou non cette stratégie se révèle concluante.

Enfin, en ce qui nous concerne, depuis la fin de l'étude de stabilité à M9, en 2020, les collyres faiblement dosés à l'atropine ont pu être produits par lot sous le statut de préparation hospitalière : la formulation sans conservateur ayant été privilégiée. Ainsi, les premiers jeunes patients ont pu débuter leur traitement. Jusqu'alors, au niveau du bassin Clermontois, 50 patients environ sont suivis cliniquement et traités de manière continue à raison d'une goutte par œil quotidiennement, le soir. Ces chiffres sont en nette progression puisqu'en effet, le nombre de patients traités a doublé au cours des deux premières années suite à la production hospitalière. Le nombre d'établissement de santé voulant s'approvisionner en collyres faiblement dosés en atropine est également croissant et la production au sein de la PUI a dû s'adapter en conséquence pour répondre à ce besoin thérapeutique grandissant. Ces résultats sont encourageants, ils permettront à posteriori d'avoir un retour clinique concernant l'efficacité et la tolérance des collyres sur un échantillon de patients représentatif, ce qui permettra d'en dégager les premières conclusions et ainsi d'identifier de futures perspectives autant sur le plan pharmacotechnique que thérapeutique.

CONCLUSION GENERALE

En définitive, cette étude nous a permis de réaliser une formulation de collyres faiblement dosés en atropine à 0.1 mg/mL, avec et sans conservateurs, dans deux types de flacons en polyéthylène de basse densité. L'étude de stabilité réalisée sur 6 mois puis poursuivie jusqu'à 9 mois a démontré que ces deux collyres demeuraient stables à une température de 25°C, autant sur le plan physico-chimique que microbiologique. L'augmentation progressive d'acide tropique en solution demeure acceptable au vu des concentrations plus importantes de ce produit de dégradation de l'atropine présentes dans des spécialités commerciales à base d'atropine à plus fortes concentrations, employées dans d'autres indications.

L'utilisation des collyres faiblement dosés en atropine au quotidien dans le ralentissement du développement de la myopie en pédiatrie semble pouvoir s'effectuer de manière efficace et sûre au vu des données que nous avons pu obtenir.

La production de ces collyres, en privilégiant la formulation sans conservateur, a pu être réalisée au sein de la PUI du CHU de Clermont-Ferrand en tant que préparation hospitalière. Les premiers patients ont débuté leur traitement depuis 2020 avec une efficacité et une tolérance clinique immédiate satisfaisante. Une évaluation sur le long terme reste cependant nécessaire pour juger de ces premiers résultats cliniques.

THÈSE SOUTENUE PAR : Baptiste BERTON

TITRE :

DEVELOPPEMENT ET ETUDE DE STABILITE DE SOLUTIONS OPHTALMIQUES
D'ATROPINE A 100 µg/mL (0.01%) POUR LA PREVENTION DE L'EVOLUTION DE LA
MYOPIE EN PEDIATRIE

CONCLUSION :

En définitive, cette étude nous a permis de réaliser une formulation de collyres faiblement dosés en atropine à 0.1 mg/mL, avec et sans conservateurs, dans deux types de flacons en polyéthylène de basse densité. L'étude de stabilité réalisée sur 6 mois puis poursuivie jusqu'à 9 mois a démontré que ces deux collyres demeuraient stables à une température de 25°C, autant sur le plan physico-chimique que microbiologique. L'augmentation progressive d'acide tropique en solution demeure acceptable au vu des concentrations plus importantes de ce produit de dégradation de l'atropine présentes dans des spécialités commerciales à base d'atropine à plus fortes concentrations, employées dans d'autres indications.

L'utilisation des collyres faiblement dosés en atropine au quotidien dans le ralentissement du développement de la myopie en pédiatrie semble pouvoir s'effectuer de manière efficace et sûre au vu des données que nous avons pu obtenir.

La production de ces collyres, en privilégiant la formulation sans conservateur, a pu être réalisée au sein de la PUI du CHU de Clermont-Ferrand en tant que préparation hospitalière. Les premiers patients ont débuté leur traitement depuis 2020 avec une efficacité et une tolérance clinique immédiate satisfaisante. Une évaluation sur le long terme reste cependant nécessaire pour juger de ces premiers résultats cliniques.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le : 23/02/2022

LE DOYEN :
Pr. Michel SEVE



LE TUTEUR UNIVERSITAIRE :
Dr. Julien LEENHARDT



LE PRESIDENT DU JURY :
Pr. Benoit ALLENET



LE DIRECTEUR DE THESE :
Dr. Philip CHENNELL



BIBLIOGRAPHIE

1. Fan DSP, Lam DSC, Chan CKM, Fan AH, Cheung EYY, Rao SK. Topical atropine in retarding myopic progression and axial length growth in children with moderate to severe myopia: a pilot study. *Jpn J Ophthalmol.* févr 2007;51(1):27- 33.
2. Dirani M, Crowston JG, Wong TY. From reading books to increased smart device screen time. *Br J Ophthalmol.* janv 2019;103(1):1- 2.
3. Holden BA, Fricke TR, Wilson DA, Jong M, Naidoo KS, Sankaridurg P, et al. Global Prevalence of Myopia and High Myopia and Temporal Trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology.* mai 2016;123(5):1036- 42.
4. Wu P-C, Chuang M-N, Choi J, Chen H, Wu G, Ohno-Matsui K, et al. Update in myopia and treatment strategy of atropine use in myopia control. *Eye.* janv 2019;33(1):3- 13.
5. Xiong S, Sankaridurg P, Naduvilath T, Zang J, Zou H, Zhu J, et al. Time spent in outdoor activities in relation to myopia prevention and control: a meta-analysis and systematic review. *Acta Ophthalmol (Copenh).* sept 2017;95(6):551- 66.
6. Leo SW, Scientific Bureau of World Society of Paediatric Ophthalmology and Strabismus (WSPOS). Current approaches to myopia control. *Curr Opin Ophthalmol.* mai 2017;28(3):267- 75.
7. Nickels S, Hopf S, Pfeiffer N, Schuster AK. Myopia is associated with education: Results from NHANES 1999-2008. *PloS One.* 2019;14(1):e0211196.
8. Grossniklaus HE, Green WR. Pathologic findings in pathologic myopia. *Retina Phila Pa.* 1992;12(2):127- 33.
9. Société Française d'Ophtalmologie. Réfraction et anomalies de la refraction [Internet] ; 2010. Disponible sur : https://www.sfo.asso.fr/files/files//21_REFRACTION_2010%5B1%5D.pdf
10. Sánchez-González J-M, De-Hita-Cantalejo C, Baustita-Llamas M-J, Sánchez-González MC, Capote-Puente R. The Combined Effect of Low-dose Atropine with Orthokeratology in Pediatric Myopia Control: Review of the Current Treatment Status for Myopia. *J Clin Med.* 24 juill 2020;9(8):E2371.
11. Walline JJ, Greiner KL, McVey ME, Jones-Jordan LA. Multifocal contact lens myopia control. *Optom Vis Sci Off Publ Am Acad Optom.* nov 2013;90(11):1207- 14.

12. Bao J, Yang A, Huang Y, Li X, Pan Y, Ding C, et al. One-year myopia control efficacy of spectacle lenses with aspherical lenslets. *Br J Ophthalmol*. 2 avr 2021;bjophthalmol-2020-318367.
13. Bao J, Huang Y, LI X, Yang A, Lim EW, Spiegel D, et al. Myopia control with spectacle lenses with aspherical lenslets: a 2-year randomized clinical trial. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 21 juin 2021;62(8):2888.
14. Syndicat Nationale d'Ophtalmologie Française (SNOF). Orthokératologie et CRT [Internet]; 22 juill 2021. Disponible sur : <https://www.snof.org/encyclopedie/orthok%C3%A9ratologie-et-crt>
15. Cho P, Tan Q. Myopia and orthokeratology for myopia control. *Clin Exp Optom*. juill 2019;102(4):364- 77.
16. Li X, Friedman IB, Medow NB, Zhang C. Update on Orthokeratology in Managing Progressive Myopia in Children: Efficacy, Mechanisms, and Concerns. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1 mai 2017;54(3):142- 8.
17. Yam JC, Jiang Y, Tang SM, Law AKP, Chan JJ, Wong E, et al. Low-Concentration Atropine for Myopia Progression (LAMP) Study: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial of 0.05%, 0.025%, and 0.01% Atropine Eye Drops in Myopia Control. *Ophthalmology*. janv 2019;126(1):113- 24.
18. Cooper J, Eisenberg N, Schulman E, Wang FM. Maximum atropine dose without clinical signs or symptoms. *Optom Vis Sci Off Publ Am Acad Optom*. déc 2013;90(12):1467- 72.
19. Chia A, Chua W-H, Cheung Y-B, Wong W-L, Lingham A, Fong A, et al. Atropine for the treatment of childhood myopia: safety and efficacy of 0.5%, 0.1%, and 0.01% doses (Atropine for the Treatment of Myopia 2). *Ophthalmology*. févr 2012;119(2):347- 54.
20. Chia A, Lu Q-S, Tan D. Five-Year Clinical Trial on Atropine for the Treatment of Myopia 2: Myopia Control with Atropine 0.01% Eyedrops. *Ophthalmology*. févr 2016;123(2):391- 9.
21. Azuara-Blanco A, Logan N, Strang N, Saunders K, Allen PM, Weir R, et al. Low-dose (0.01%) atropine eye-drops to reduce progression of myopia in children: a multicentre placebo-controlled randomised trial in the UK (CHAMP-UK)-study protocol. *Br J Ophthalmol*. juill 2020;104(7):950- 5.
22. Wan L, Wei C-C, Chen CS, Chang C-Y, Lin C-J, Chen JJ-Y, et al. The Synergistic Effects of Orthokeratology and Atropine in Slowing the Progression of Myopia. *J Clin Med*. 7 sept 2018;7(9):E259.
23. Code de la santé publique - Article L5126-1. Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. 15 juill 2021. Disponible sur:

https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000033621036/2017-07-01

24. Code de la santé publique - Article L4211-1. Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. 15 juill 2021. Disponible sur:

https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000028747979/

25. Code de la santé publique - Article R5126-9. Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. 22 juill 2021. Disponible sur:

https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000038598073/

26. Code de la santé publique - Article R5126-33. Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. 22 juill 2021. Disponible sur:

https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000038597763/

27. Code de la santé publique - Article L5121-1. Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. 22 juill 2021. Disponible sur:

https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000037950971

28. Bonnes pratiques de préparation - ANSM [Internet] ; 8 juill 2021. Disponible sur : <https://ansm.sante.fr/documents/referance/bonnes-pratiques-de-preparation>

29. Tran K, Ryce A. Laser Refractive Surgery for Vision Correction : A Review of Clinical Effectiveness and Cost-effectiveness [Internet]. Ottawa (ON) : Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2018 [cité 11 nov 2021]. (CADTH Rapid Response Reports). Disponible sur :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532537/>

30. Olson RJ, Caldwell KD, Crandall AS, Jensen MK, Huang SC. Intraoperative crystallization on the intraocular lens surface. *Am J Ophthalmol.* août 1998;126(2):177- 84.

31. Zhang Y, Cao H, Lin T, Gong L. Effects of artificial tears on rabbit ocular surface healing after exposure to benzalkonium chloride. *Drug Chem Toxicol.* oct 2016;39(4):455- 60.

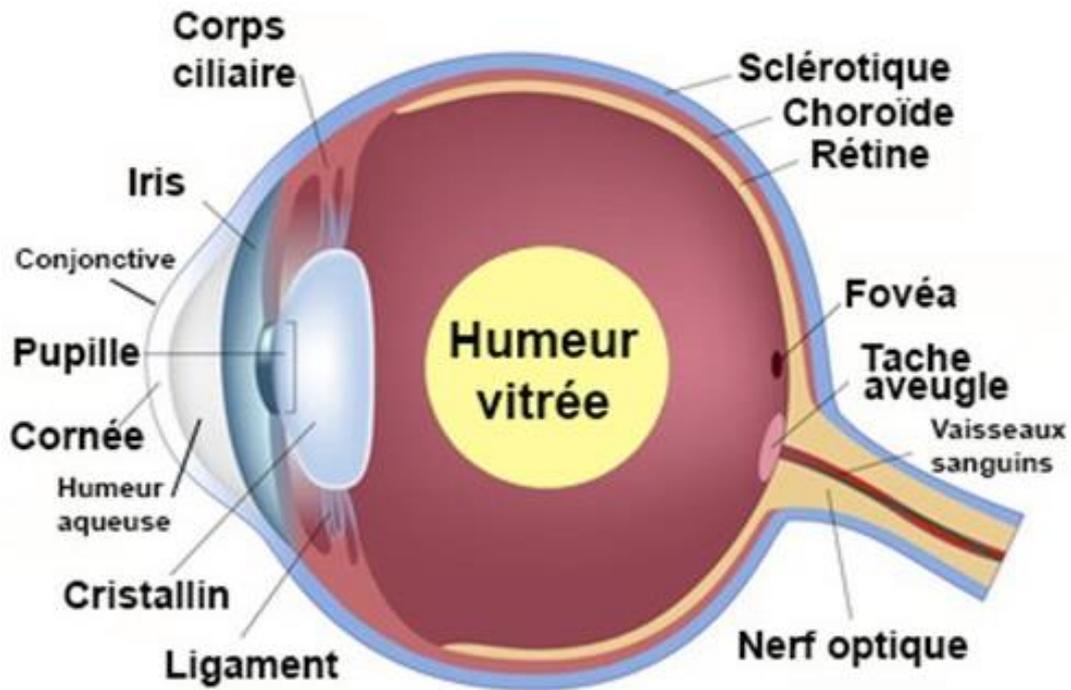
32. Stabilis.org. Monographie Atropine sulfate [Internet]. 2021. Disponible sur : <https://www.stabilis.org/Monographie.pdf.php?Molecule=Atropine%20sulfate>

33. Awwad S, Mohamed Ahmed AHA, Sharma G, Heng JS, Khaw PT, Brocchini S, et al. Principles of pharmacology in the eye. *Br J Pharmacol.* déc 2017;174(23):4205- 23.

34. Bouattour Y, Chennell P, Wasiak M, Jouannet M, Sautou V. Stability of an ophthalmic formulation of polyhexamethylene biguanide in gamma-sterilized and ethylene oxide sterilized low density polyethylene multidose eyedroppers. *PeerJ.* 2018;6:e4549.

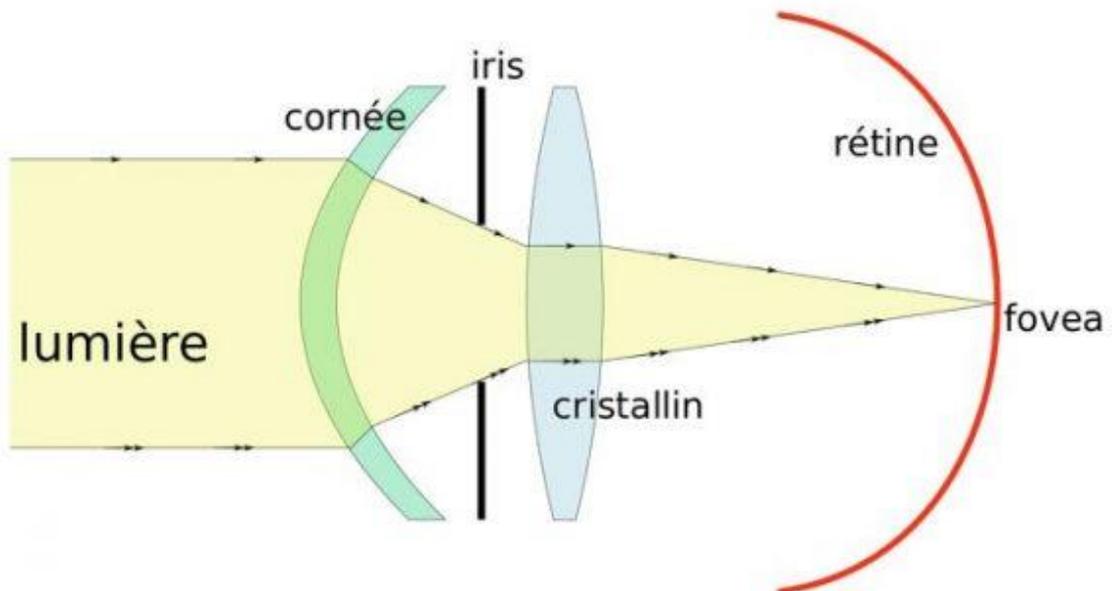
35. Kodym A, Bilski P, Domańska A, Hełminiak Ł, Jabłońska M, Jachymska A. Physical and chemical properties and stability of sodium cefazolin in buffered eye drops determined with HPLC method. *Acta Pol Pharm.* févr 2012;69(1):95- 105.
36. Austermann H, Schaeffel F, Mathis U, Hund V, Mußhoff F, Ziemssen F, et al. Corneal Penetration of Low-Dose Atropine Eye Drops. *J Clin Med.* 4 févr 2021;10(4):588.
37. Kothari M, Jain R, Khadse N, Rathod V, Mutha S. Allergic reactions to atropine eye drops for retardation of progressive myopia in children. *Indian J Ophthalmol.* oct 2018;66(10):1446- 50.
38. Sadeghipour DF. Cours 2ème année de master en pharmacie. Préparation de médicaments en petites quantités - Gels, crèmes, pommades. *Univ Genève.* 2015;7.
39. Bron AJ, Daubas P, Siou-Mermet R, Trinquand C. Comparison of the efficacy and safety of two eye gels in the treatment of dry eyes: Lacrinorm and Viscotears. *Eye Lond Engl.* 1998;12 (Pt 5):839- 47.
40. Kirchhoff C, Bitar Y, Ebel S, Holzgrabe U. Analysis of atropine, its degradation products and related substances of natural origin by means of reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 13 août 2004;1046(1- 2):115- 20.
41. Zvirblis P, Socholitsky I, Kondritzer AA. The kinetics of the hydrolysis of atropine. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc.* juill 1956;45(7):450- 4.
42. Wiśniewski W, Piasecka H. [Study of stability of atropine sulfate in injection solutions, using the conductometric micro-method]. *Acta Pol Pharm.* 1969;26(4):305- 12.
43. Nowak A, Łata S. [Datura intoxication--report of three cases]. *Przegl Lek.* 2010;67(5):438- 9.
44. Hanna JP, Schmidley JW, Braselton WE. *Datura delirium.* *Clin Neuropharmacol.* avr 1992;15(2):109- 13.
45. Schier JG, Ravikumar PR, Nelson LS, Heller MB, Howland MA, Hoffman RS. Preparing for chemical terrorism: stability of injectable atropine sulfate. *Acad Emerg Med Off J Soc Acad Emerg Med.* avr 2004;11(4):329- 34.
46. Gong Q, Janowski M, Luo M, Wei H, Chen B, Yang G, et al. Efficacy and Adverse Effects of Atropine in Childhood Myopia. *JAMA Ophthalmol.* juin 2017;135(6):624- 30.

ANNEXES



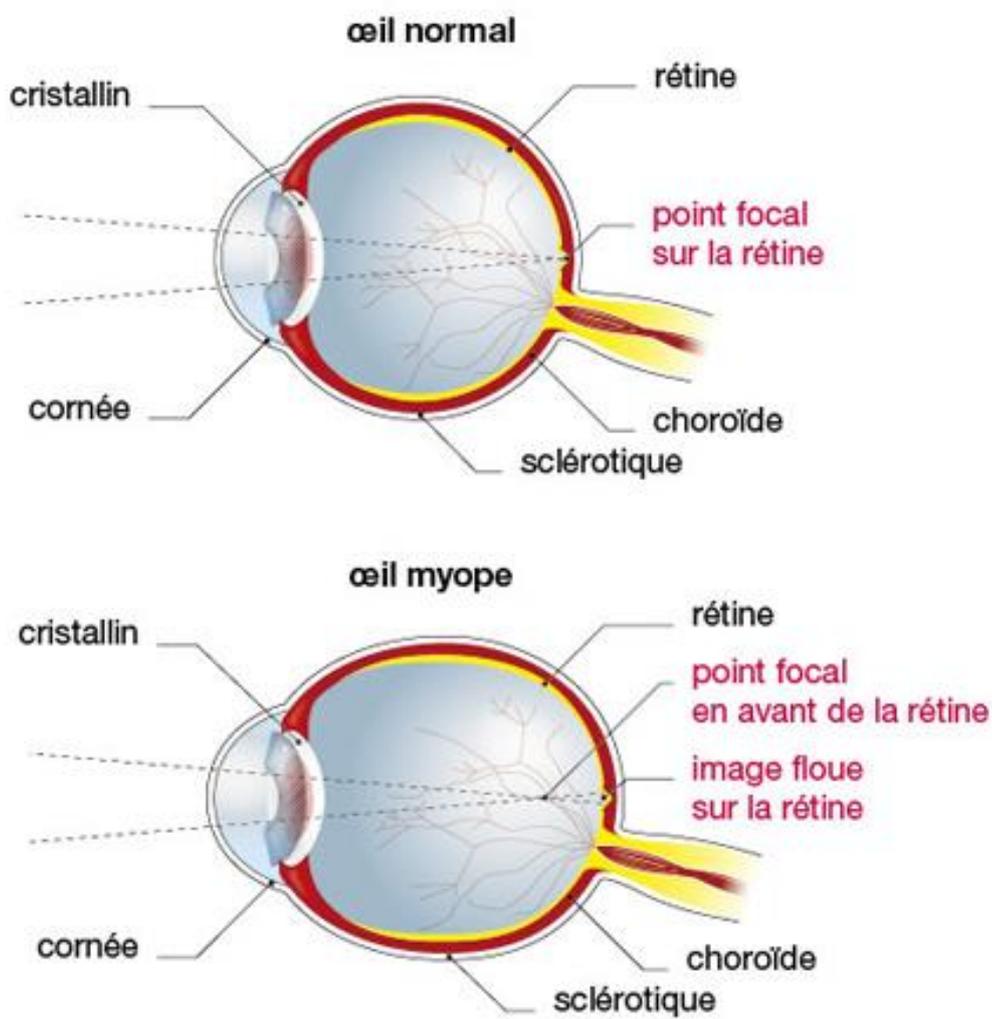
Annexe 1. Illustration anatomique de l'œil humain.

Source : <http://docteurancel.com/troubles-de-la-vision/anatomie-de-loeil>, consultée le 05/07/2021.



Annexe 2. Schéma illustrant la réfraction de la lumière dans l'œil emmétrope.

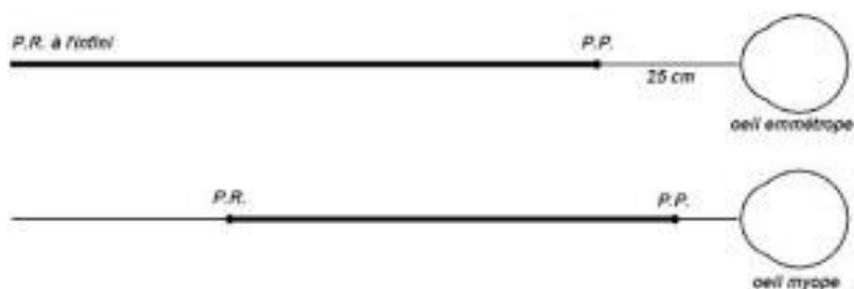
Source : <http://docteurancel.com/troubles-de-la-vision/anatomie-de-loeil>, consultée le 05/07/2021.



© Ligue Braille

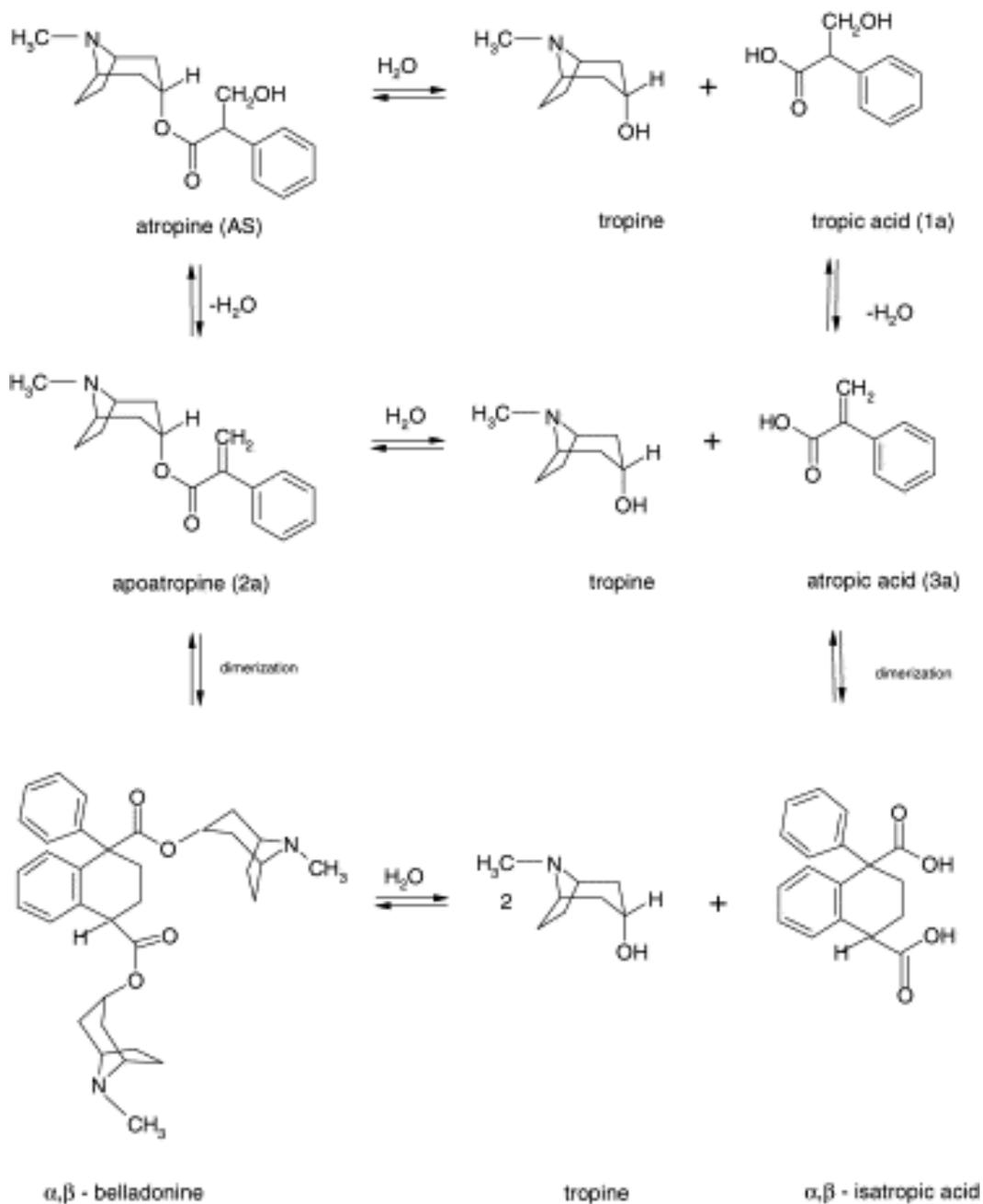
Annexe 4. Illustration anatomique d'œil myope versus un œil emmétrope.

Source : www.braille.be/fr/documentation/pathologies-visuelles/myopie-forte, consultée le 05/07/2021.

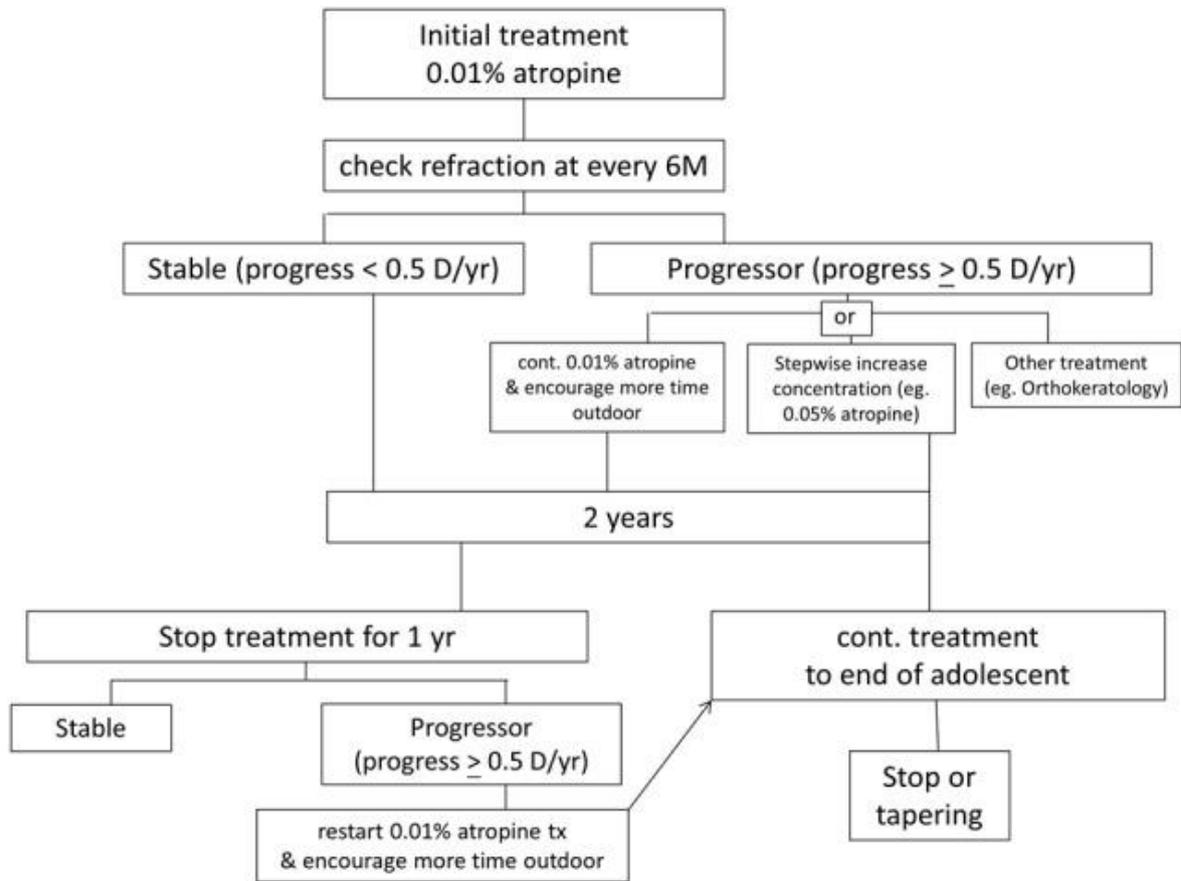


Annexe 5. Schéma représentant la vision d'un œil myope versus celle d'un œil emmétrope (position du *ponctum remotum*, PR et du *ponctum proximum*, PP).

Source : www.maxicours.com/se/cours/accommodation-du-cristallin, consultée le 05/07/2021..



Annexe 6. Différents modes de dégradation de la molécule d'atropine en solution aqueuse.
 Source : Kirchhoff C, Bitar Y, Ebel S, Holzgrabe U. Analysis of atropine, its degradation products and related substances of natural origin by means of reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 13 août 2004;1046(1-2):115-20.



Annexe 7. Logigramme proposant une stratégie de prise en charge contre le développement de la myopie
 Source : Wu P-C, Chuang M-N, Choi J, Chen H, Wu G, Ohno-Matsui K, et al. Update in myopia and treatment strategy of atropine use in myopia control. *Eye (Lond)*. janv 2019;33(1):3-13.

SERMENT DE GALIEN

*Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes*



Serment de Galien



« En présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

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.

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 ».

RESUME

M. Baptiste BERTON

DEVELOPPEMENT ET ETUDE DE STABILITE DE SOLUTIONS OPHTALMIQUES D'ATROPINE A 100 µg/mL (0.01%) POUR LA PREVENTION DE L'EVOLUTION DE LA MYOPIE EN PEDIATRIE

RÉSUMÉ :

La myopie est une pathologie ophtalmique touchant plus d'un cinquième de la population mondiale et particulièrement les jeunes enfants. Un traitement local à base de collyre faiblement concentré en atropine a prouvé son efficacité dans le ralentissement du développement de la myopie. Cependant, il n'existe pas actuellement de spécialités commerciales disponibles sur le marché et les données de stabilité publiées concernant les préparations hospitalières à base d'atropine sont peu nombreuses. L'objectif de cette thèse est de présenter la démarche scientifique et réglementaire qui a permis d'aboutir à la formulation finale de collyres à base d'atropine et de présenter l'étude de stabilité réalisée. Cette étude a permis d'évaluer la stabilité de deux formulations d'atropine dosées à 0.1 mg/mL (avec et sans conservateur antimicrobien) pendant 6 puis 9 mois dans deux flacons multidoses différents en polyéthylène de basse densité (PEBD). Les analyses effectuées étaient les suivantes : inspection visuelle, turbidité, mesure de chromaticité, mesure du pH et de l'osmolarité, évaluation de la concentration en atropine via une méthode de chromatographie liquide haute performance indicatrice de stabilité, recherche des produits de dégradation, et essais de stérilité. Lors de l'étude dite « en conditions d'utilisation » ou « in-use », le dosage de l'atropine a également été effectué sur un pool de plusieurs gouttes émises depuis plusieurs flacons de collyre afin de connaître l'évolution de cette concentration au cours du temps dans des conditions réelles d'utilisation. Tous les paramètres évalués se sont avérés stables d'abord pendant 6, puis à posteriori, pendant 9 mois, avec une concentration en atropine de 94.7% (à 6 mois) et 93.4% (à 9 mois) de la concentration initiale. La concentration en acide tropique, principal produit de dégradation de l'atropine a augmentée progressivement au cours du temps mais est restée en dessous des seuils limites acceptables. La concentration en atropine est restée stable durant l'étude « en conditions d'utilisation ». Les deux formulations d'atropine à 0.1 mg/mL (avec et sans conservateur antimicrobien) conditionnées dans des flacons PEBD ont prouvé leur stabilité physico-chimique et microbiologique pendant 6 puis 9 mois à 25°C.

MOTS CLÉS : atropine, solution ophtalmique, myopie, préparation hospitalière, étude de stabilité

SPÉCIALITÉ : Pharmacie hospitalière – Pratique et Recherche

ABSTRACT

M. Baptiste BERTON

DEVELOPMENT AND STABILITY OF 100 µg/mL (0.01%) OPHTHALMIC ATROPINE SOLUTION FOR CHILD MYOPIA CONTROL

ABSTRACT :

Myopia is an ophthalmic condition affecting more than 1/5th of the world population, especially children. Low-dose atropine eyedrops have been shown to limit myopia evolution during treatment. However, there are currently no commercial industrial forms available and there is little data published concerning the stability of medications prepared by compounding pharmacies. The objective of this thesis was to present the scientific and regulatory approach to obtain atropine eyedrops formulation and the stability study realized on this formulation. The study was to evaluate the stability of two 0.1 mg/mL atropine formulations (with and without antimicrobial preservatives) for 6 then 9 months in two different low-density polyethylene (LDPE) multidose eyedroppers. Analyses used were the following: visual inspection, turbidity, chromaticity measurements, osmolality and pH measurements, atropine quantification by a stability-indicating liquid chromatography method, breakdown product research, and sterility assay. In an in-use study, atropine quantification was also performed on the drops emitted from the multidose eyedroppers. All tested parameters remained stable during the 6 then 9 months period, with atropine concentrations above 94.7% (6 month) and 93.4% (9 months) of initial concentration. A breakdown product (tropic acid) did increase slowly over time but remained well below usually admitted concentrations. Atropine concentrations remained stable during the in-use study. Both formulations of 0.1 mg/mL of atropine (with and without antimicrobial preservative) were initially proved to be physicochemically stable for 6 months and then for 9 months at 25°C when stored in LDPE bottles, with an identical microbial shelf-life.

KEYWORDS : atropine, ophthalmic solution, myopia, compound pharmacy, stability

SPECIALISATION : Pharmacie hospitalière – Pratique et Recherche