



HAL
open science

Électrophorèse capillaire : développement d'une méthode de dosage de l'atropine en collyre

François Barbier

► **To cite this version:**

François Barbier. Électrophorèse capillaire : développement d'une méthode de dosage de l'atropine en collyre. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. dumas-03937118

HAL Id: dumas-03937118

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03937118v1>

Submitted on 13 Jan 2023

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.



UFR DE PHARMACIE
Université Clermont Auvergne

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE
UFR DE PHARMACIE

Année : 2022

N°

THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
le 24 octobre 2022
par
François BARBIER

Electrophorèse capillaire : développement d'une méthode de dosage de l'atropine en collyre

Directeur de thèse : **M. Freddy MOUNSEF**

Jury

Président : **Mme Valérie SAUTOU**

Professeur,
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Membres : **M. Freddy MOUNSEF**

Praticien Hospitalier,
CHU de Saint-Etienne

Mme Roseline MAZET

Praticien Hospitalier,
CHU de Grenoble-Alpes

M. Philip CHENNELL

Maitre de conférences,
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Mme Élodie JACQUEROUX

Assistant Spécialiste,
CHU de Saint-Etienne



UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE
UFR DE PHARMACIE

Année : 2022

N°

THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
le 24 octobre 2022

par
François BARBIER

Electrophorèse capillaire : développement d'une méthode de dosage de l'atropine en collyre

Directeur de thèse : **M. Freddy MOUNSEF**

Jury

Président : **Mme Valérie SAUTOU**

Professeur,
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Membres : **M. Freddy MOUNSEF**

Praticien Hospitalier,
CHU de Saint-Etienne

Mme Roseline MAZET

Praticien Hospitalier,
CHU de Grenoble-Alpes

M. Philip CHENNELL

Maitre de conférences,
UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand

Mme Élodie JACQUEROUX

Assistant Spécialiste,
CHU de Saint-Etienne

Remerciements

Aux membres du jury :

A Madame le Professeur Valérie SAUTOU,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Je vous suis très reconnaissant de l'accueil que j'ai reçu au CHU de Clermont-Ferrand, et de la qualité de la formation qui y est dispensée. Je vous remercie également pour votre accompagnement, vos conseils et votre bienveillance au cours de mon cursus d'internat en tant que coordonnatrice de DES.

A Monsieur le Docteur Freddy MOUNSEF,

Je te remercie de m'avoir proposé ce sujet de thèse et d'avoir accepté de m'encadrer en tant que directeur. Tes remarques précises et ton aide ont été précieuses dans l'élaboration de cette méthode. Le semestre que j'ai passé dans ton secteur de pharmacotechnie m'a beaucoup apporté, que ce soit d'un point de vue théorique mais aussi pratique.

A Madame le Docteur Roseline MAZET,

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de lire et de juger mon travail en tant que membre extérieur. Je vous suis reconnaissant d'apporter votre expertise et votre expérience en tant que responsable de la pharmacotechnie au CHU de Grenoble pour le jugement de cette thèse.

A Monsieur le Docteur Philip CHENNELL,

Cher Philip, je garde en mémoire tous les précieux conseils que tu as pu me donner lors de mes deux premiers semestres au CHU de Clermont, que ce soit en tant que coordinateur des gardes ou en tant que responsable du LCD. Je te suis reconnaissant, *a posteriori*, pour ces lectures d'articles qui m'ont finalement été bien utiles pour la rédaction de cette thèse. Merci d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et de juger mon travail.

A Madame le Docteur Élodie JACQUEROUX,

Je pense qu'un simple merci ne serait pas suffisant pour t'exprimer toute ma reconnaissance pour ton accompagnement tout au long de ce travail de thèse. Merci pour ta rigueur, pour ton expérience de thésarde, mais aussi pour ta bonne humeur et ta disponibilité. Ta présence dans ce jury est pour moi une évidence, et je te remercie d'avoir accepté d'en faire partie.

A ma famille,

A mes parents, j'espère que ce travail vous rendra fiers. Il est l'aboutissement d'un parcours que vous avez rendu possible grâce à votre amour, votre soutien, et votre aide précieuse sur laquelle je sais pouvoir toujours compter. Merci.

A mes beaux-parents, merci pour vos encouragements dès le concours de première année, et pour m'avoir accueilli dans votre famille avec tant de gentillesse et de sincérité. Je suis heureux que vous fassiez partie de ma famille.

A Simon, j'ai sûrement découvert l'hôpital à travers tes récits, résignés parfois, révoltés souvent, mais toujours passionnés et engagés. Ta bienveillance et ton fabuleux contact m'ont toujours rendu admiratif, tout comme ton courage professionnel et personnel. Je suis chanceux que tu sois mon frère.

A Jérémy, malgré notre écart d'âge, nous allons finir nos études en même temps. Je te suis reconnaissant de ne pas avoir fait de moi le seul étudiant à table lors des repas de famille. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.

A Antoine, je me souviendrai toujours de ta fierté de grand frère quand j'ai obtenu mon bac, quand j'ai réussi la PACES, ou encore quand j'ai eu le concours de l'internat. Ce regard m'a permis, autant que faire se peut, de prendre confiance en moi, et je t'en remercie.

A Ninette, quel bonheur de t'avoir eu comme grand-mère. Merci pour tout.

A Camille, sans toi rien n'aurait été possible. Ton soutien sans faille, pour ces trois concours, mais aussi pour tout le reste, ton amour, tes encouragements, ta patience, m'ont aidé tout au long de ces bientôt dix années passées ensemble. Te rendre fière est et sera toujours un moteur pour avancer, et aller toujours plus loin. Je te souhaite, et je nous souhaite de toujours pouvoir compter sur notre bonne étoile, d'être heureux et de réaliser nos rêves. Je t'aime.

A mes amis, cette bande extraordinaire qui s'est formée il y a tant d'années maintenant. J'espère que cela continuera encore pendant de nombreuses autres.

Aux équipes des différents hôpitaux qui m'ont si bien accueilli et tellement appris, que ce soit à Clermont, Riom, Issoire, ou Saint-Etienne.

Table des matières

Remerciements	4
Liste des figures	9
Liste des tableaux	10
Liste des abréviations	11
Contexte	12
Introduction	14
1. La myopie.....	14
1.1. Physiopathologie de la myopie	14
1.2. Epidémiologie de la myopie	15
2. Traitements de la myopie	17
2.1. Moyens thérapeutiques physiques	17
2.2. Moyens thérapeutiques pharmacologiques	19
2.3. Comparaison d'efficacité des traitements	22
3. L'atropine en collyre, une préparation pharmaceutique.....	24
3.1. Contexte réglementaire	24
3.2. Contexte local	26
4. Électrophorèse	27
4.1. Électrophorèse capillaire.....	27
4.2. Paramètres influençant la séparation électrophorétique.....	28
4.3. Détecteur à barrette de diode	31
4.4. Electrophérogramme	33
4.5. Avantages et inconvénients de l'électrophorèse	35
5. Méthode de quantification.....	36
5.1. Critères de validation	36
5.2. Étalonnage.....	37
5.3. Spécificité de la quantification de l'atropine par électrophorèse.....	38
Partie 2 : l'article original.....	40
Partie 3 : Discussion générale	55

1. Développement de la méthode de dosage	55
1.1. Optimisation des paramètres de l'électrophorèse capillaire	55
1.2. Choix du tampon d'électrophorèse	55
1.3. Choix des autres paramètres	56
1.4. Sélectivité de la méthode	56
1.5. Préparation de l'échantillon	57
1. Intérêt et limites de l'étude.....	58
2. Perspectives.....	59
Conclusion.....	60
Bibliographie.....	61
Serment de Galien	65
Résumé	66
Mots-clés	66

Liste des figures

Figure 1. Illustration de la vision d'un myope avec et sans correction	14
Figure 2. Schéma de la physiopathologie de la myopie	15
Figure 3. Schéma de fonctionnement des verres à microlentilles asphériques, technologie HALT de Essilor™	18
Figure 4. Graphique montrant l'évolution moyenne de la sphéricité de l'œil	20
Figure 5. Résumé des résultats des études ATOM 1 & 2	21
Figure 6. Comparaison de l'efficacité de différentes interventions dans le contrôle de la myopie	23
Figure 7. Evolution du nombre de patients traités au CHU de Saint-Etienne.....	26
Figure 8. Schéma de fonctionnement d'une électrophorèse capillaire.....	28
Figure 9. La mobilité électrophorétique en fonction du pH et de la concentration en électrolyte	30
Figure 10. Mobilité de deux acides faibles en fonction du pH du tampon.....	30
Figure 11. Schéma comparant le fonctionnement d'un détecteur photodiode simple et un DAD	32
Figure 12. Graphique 3D obtenu après un balayage du spectre UV-Visible par un DAD	33
Figure 13. Schéma d'un électrophérogramme pouvant être obtenu par électrophorèse capillaire en mode cationique.....	34
Figure 14. Représentation du comportement de molécules chargées dans un capillaire d'électrophorèse	34
Figure 15. Représentation de la molécule d'atropine.....	38
Figure 16. Représentation de la molécule de scopolamine	39

Liste des tableaux

Tableau I. Efficacité relative des différents traitements utilisé dans le contrôle de la progression de la myopie comparé au groupe placebo/sans intervention.....	22
Tableau II. Comparaison des contrôles exigés par les bonnes pratiques de préparation entre les préparations magistrales et hospitalières.....	25
Tableau III. Comparaison de l'électrophorèse capillaire et de la chromatographie liquide haute performance.....	35

Liste des abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

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

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BPP : Bonnes Pratiques de Préparation

BSS™ : Balanced Salt Solution™

CE/EC : Électrophorèse capillaire

CZE : Électrophorèse capillaire de zone

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

DAD : Diode Array Detector, détecteur à barrette de diodes.

EOF : Flux Electroosmotique

HPLC/CLHP : Chromatographie Liquide haute performance

ICH : International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

LASIK: “*Laser Assisted in Situ Keratomileusis*”

MPUP : Matière Première à Usage Pharmaceutique

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PPH : Préparateur en Pharmacie Hospitalière

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

UV : Ultra-violet

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

Contexte

Aujourd'hui dans le monde, il y a 2,6 Milliards de myopes, et ce chiffre pourrait atteindre 4,8 Milliards à l'horizon 2050. La myopie constitue donc un problème majeur de santé publique, en tant que pathologie oculaire la plus répandue. Malgré de nombreux progrès depuis la moitié du XXe siècle, les traitements actuels, qu'ils soient physiques ou pharmacologiques ne donnent pas entière satisfaction, en cela que la myopie est un phénomène aujourd'hui irréversible. En effet, ils ne permettent pas de supprimer la myopie une fois que celle-ci s'est déclarée, ils ne permettent que de la corriger de façon plus ou moins invasive, ou de ralentir sa progression.

Parmi les traitements disponibles, une molécule se détache : l'atropine, qui présente une efficacité et un profil d'effets indésirables très favorable. En effet, nous verrons que de nombreuses études ont montré que l'atropine en faible dosage, instillée chez de jeunes patients, ralentissait considérablement la progression de la myopie. L'atropine est une molécule connue de longue date, utilisée pour ses propriétés anticholinergiques en tant qu'antagoniste des récepteurs muscariniques. Elle était par exemple déjà utilisée comme antidote pour soigner les intoxications aux organophosphorés, qu'ils soient sous forme de gaz neurotoxiques tels que le gaz sarin, ou le VX, ou sous forme plus conventionnel dans certains pesticides comme le glyphosate.

Au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Saint-Etienne, une concertation entre la pharmacie à usage intérieur (PUI) et le service d'ophtalmologie a permis la mise en place d'un circuit de consultation et de production et dispensation d'atropine en collyre dosés à 0,1mg/ml. Le nombre de patients suivis dans le bassin de population du CHU est en constante augmentation, ayant été multiplié par quatre entre 2017 et 2022.

Les collyres d'atropine en faible dosage n'existant pas sous forme de spécialité pharmaceutique industrielle, il est nécessaire de les fabriquer sous le statut de préparation pharmaceutique. Le circuit repose donc sur la fabrication des collyres au sein de la PUI, sous la responsabilité du pharmacien, selon des normes et des référentiels, sur les locaux, le personnel, les équipements, ou les matières premières qui seront présentés.

Afin de garantir une sécurité optimale pour le patient, les préparations pharmaceutiques sont contrôlées avant d'être libérées puis dispensées. Parmi les contrôles réalisés, nous nous concentrerons sur le contrôle de teneur. En effet, le nombre croissant de patients myopes pris en charge dans notre établissement a nécessité une montée en puissance de la production de

collyre, impliquant de sécuriser encore d'avantage le processus. C'est dans ce cadre qu'a eu lieu le développement et la validation analytique d'une méthode de dosage de l'atropine contenue dans nos collyres. Actuellement au CHU de Saint-Etienne ce dosage est effectué au Laboratoire de Toxicologie par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la spectrométrie de masse. Étant équipés d'une électrophorèse capillaire nous avons souhaité effectuer ces dosages au sein de la PUI pour être plus autonomes. Le caractère innovant de cette méthode de dosage réside dans l'utilisation d'une méthode différente de la méthode de référence par chromatographie liquide haute performance, puisqu'elle repose sur une technique de séparation par électrophorèse capillaire, couplée à une détection UV-visible par un détecteur à barrettes de diodes.

L'objectif de cette thèse est de présenter le développement et la validation d'une méthode de dosage de l'atropine en collyre à 0,01% par électrophorèse capillaire.

Nous évoquerons le contexte de la fabrication de cette préparation pharmaceutique, qu'il soit réglementaire ou local. Nous verrons aussi les principes physiques et techniques sur lesquels se repose la méthode de dosage développée. Nous discuterons ensuite des difficultés rencontrées lors de la mise en place de cette méthode de quantification, de ses avantages et de ses limites. Enfin nous présenterons des perspectives de développements futurs offertes par ce travail.

Introduction

1. La myopie

1.1. Physiopathologie de la myopie

La Société française d'ophtalmologie définit la myopie comme « l'amétropie sphérique dans laquelle, en vision de loin, le foyer image est situé en avant de la rétine. Il s'ensuit une baisse d'acuité visuelle de loin, mais une préservation de la vision de près. ».

D'un point de vue physiologique, les rayons de lumière se propagent de façon parallèle avant d'arriver à l'œil et d'être déviés par le complexe cornée-cristallin. Les rayons ainsi déviés doivent arriver en un point sur la rétine, qui transfère les informations reçues au cerveau sous la forme d'un signal électrique via le nerf optique. C'est ce qui se produit pour un œil sain.

Pour un œil myope, la courbure du complexe cornée-cristallin est trop marquée, et les rayons de lumière se croisent en amont de la rétine. Les faisceaux de lumière n'arrivent donc plus en un point, ce qui se traduit par une vision de loin floue (Figure 1).

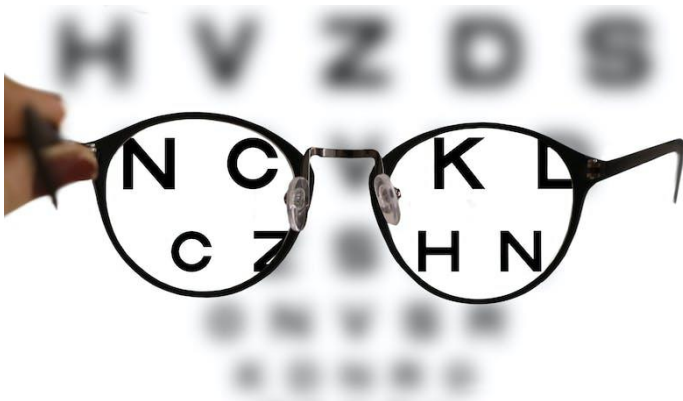


Figure 1. Illustration de la vision d'un myope avec et sans correction. (1)

Le point le plus éloigné offrant une vision nette, le punctum remotum, est alors rapproché de l'œil par rapport à un œil emmétrope (Figure 2).

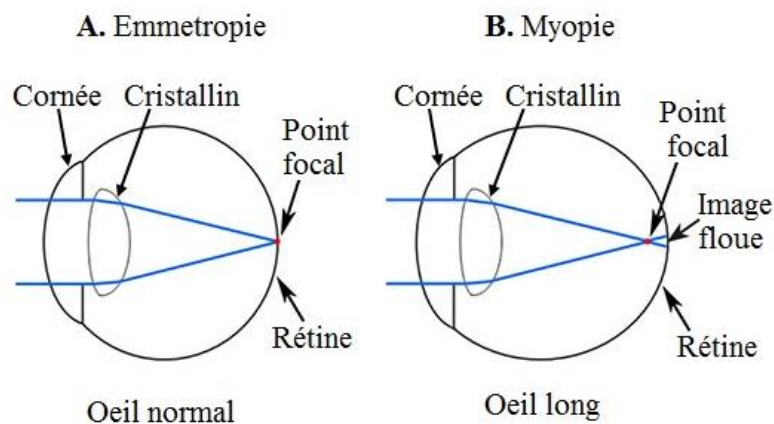


Figure 2. Schéma de la physiopathologie de la myopie. D'après Tkatchenko TV et al, 2019 (2)

La myopie est diagnostiquée après un simple examen clinique. Les ophtalmologistes se sont longtemps appuyés sur le tableau de Snellen, qui évalue l'acuité visuelle du patient exprimée en dixième, obtenue en faisant lire au patient des lettres de plus en plus petites. Ce type de tableau est retrouvé en arrière-plan sur la figure 1. Aujourd'hui le diagnostic se déroule grâce à un réfracteur automatique qui mesure automatiquement la réfraction (exprimée en dioptries).

La myopie peut relever de différents stades en fonction de l'atteinte de l'œil du patient. Il n'existe pas de classification officielle des degrés de myopie mais on retrouve souvent la notion de myopie faible quand la réfraction est comprise entre -1 et -3 dioptries, myopie moyenne entre -3 et -6 dioptries, et myopie forte lorsque la réfraction est supérieure à -6 dioptries.

1.2. Épidémiologie de la myopie

Parmi les troubles réfractifs, la myopie est le plus fréquent dans le monde et en Europe avec plus de 30% d'européens myopes en 2015 (3). Plus largement, dans son rapport de 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait à 2,6 Milliards le nombre de personnes myopes dans le monde (4). La myopie constitue donc une vraie préoccupation de santé publique pour plusieurs raisons.

En premier lieu, la qualité de vie des personnes atteintes de myopie est affectée. En effet des études menées chez des adolescents ont montré que les scores de qualité de vie étaient

systématiquement diminués dans les groupes atteints de myopie (5). Dans ces études, la myopie affectait non seulement le niveau scolaire mais aussi le fonctionnement psychosocial, le niveau d'anxiété, et l'estime de soi (5,6). Chez l'adulte, on trouve également cet aspect de diminution de la qualité de vie, avec un handicap ou une incapacité à réaliser des activités de la vie courante (7). Enfin, bien que la littérature nous montre que chez les adultes la qualité de vie retrouve un niveau équivalent aux groupes contrôles quand la myopie est corrigée, chez les enfants et adolescents la pression sociale et la stigmatisation des porteurs de lunettes diminue fortement cet aspect positif, pour renforcer un peu plus le rejet et le dénigrement de soi (8,9).

L'impact individuel est donc important, mais il est accompagné également d'un coût élevé pour la société. Il y a naturellement le coût des soins ophtalmologiques et des corrections optiques. Il y a également un coût en termes de perte de productivité, du fait des impacts individuels évoqués précédemment. Une myopie non corrigée est potentiellement suffisamment handicapante pour impacter le travail, ou l'empêcher totalement. Ainsi, une étude menée en 2015 a montré une perte potentielle de 244 Milliards de dollars due à la myopie (10). Une estimation similaire a été retrouvée dans une autre étude publiée dans le bulletin de l'OMS, qui estimait en 2009 à 268 Milliards de dollars par an les pertes de productivité liées aux troubles réfractifs.

Au-delà des impacts individuels et collectifs, c'est également la progression de la myopie dans la population mondiale qui en fait un problème majeur de santé publique. L'étude sur laquelle se fonde l'OMS pour son estimation de la prévalence de la myopie en 2020 rapporte aussi, qu'en 2050, le nombre de myope augmenterait à 4,76 Milliards, tandis qu'il y en avait seulement 1,95 Milliards en 2010 (11). Les études menées sur les enfants et adolescents vont également dans le sens d'une augmentation de la prévalence de la myopie (12).

De nombreux facteurs de risque de développement de la myopie ont été identifiés. Le plus récent est l'utilisation quotidienne des écrans. En effet, les activités qui stimulent uniquement la vision de près ont été corrélées avec un risque accru de développer une myopie (13). Cependant, il faut bien reconnaître que la myopie précède largement l'invention des smartphones, et d'autres facteurs entrent donc en jeu, comme l'âge, les prédispositions génétiques, l'activité physique ou le niveau d'éducation (14–16). En effet plus l'âge est élevé, plus la prévalence de la myopie est élevée. La prévalence de la myopie chez les enfants sans parent myope était de 7%, tandis qu'elle était de 43,6% chez les enfants ayant deux parents myopes, mettant en évidence un facteur de risque génétique (17). La myopie était d'autant plus importante que le niveau d'éducation était élevé, ou que le niveau d'activité physique était faible.

2. Traitements de la myopie

2.1. Moyens thérapeutiques physiques

2.1.1. Préventifs

Devant les conséquences d'une myopie non corrigée, que ce soit à titre individuel ou collectif, la prise en charge de cette affection oculaire apparaît comme primordiale. Il est alors possible d'agir de deux manières, de façon préventive et curative.

Il existe plusieurs types de préventions, primaire, secondaire et tertiaire. La prévention primaire consiste en la mise en place de moyens thérapeutiques afin d'éviter l'apparition d'une pathologie. La prévention secondaire repose sur les moyens mis en place afin de limiter l'évolution d'une pathologie. Enfin la prévention tertiaire consiste en la mise en place de moyens pour réduire les complications et le risque de rechute.

En ce qui concerne la prévention primaire de la myopie on retrouve dans la littérature que l'augmentation du temps passé à l'extérieur serait un facteur protecteur de l'apparition et de la progression de la myopie (14). Malheureusement, la force de ce facteur n'est pas encore complètement établie, de même que le nombre d'heures nécessaires passées à l'extérieur pour bénéficier de cette protection.

Devant le peu de solutions disponibles, il paraît nécessaire de se tourner vers des moyens thérapeutiques physiques relevant plutôt de la prévention secondaire. L'un des moyens les plus courant est le port de lunettes ou de lentilles correctrices. Les verres correcteurs exercent une déviation de la lumière en amont de l'œil, permettant aux rayons lumineux de se rejoindre à nouveau en un seul point sur la rétine. Le port de lunettes est également associé à un ralentissement de la progression de la myopie (18). Bien que cette réduction soit statistiquement significative, elle ne se traduit pas par une réelle amélioration clinique. Le port de lentilles de contact n'a pas non plus montré d'efficacité dans le ralentissement de la progression de la myopie.

Le port de lentilles multifocales montre des résultats encourageants dans le ralentissement de la progression de la myopie chez l'enfant, avec une réduction de l'ordre de 50% en comparaison au port de lentilles correctrices simples (19).

Des lunettes avec des verres innovants sont également disponibles et prometteuses, il s'agit de verres composés de microlentilles asphériques (Figure 3). Le centre du verre permet

la déviation de la lumière et la correction de la myopie, tandis que la périphérie, composée de ces microlentilles asphériques, ralentiraient la progression de la myopie. Les études menées tendent à confirmer les résultats encourageants obtenus avec cette technique (20,21). En revanche, leur disponibilité et leur coût sont encore des freins à leur généralisation.

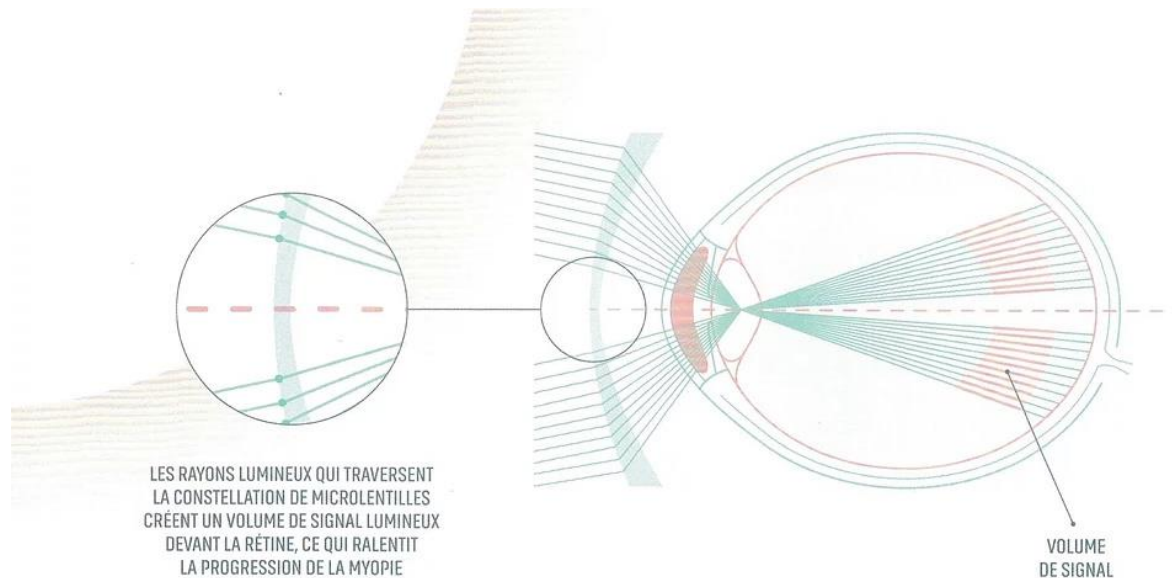


Figure 3. Schéma de fonctionnement des verres à microlentilles asphériques, technologie HALT de Essilor™. (22)

L'orthokératologie consiste à porter pendant la nuit des lentilles qui modifient la surface de l'œil. Les résultats obtenus dans plusieurs études montrent une amélioration d'environ 40% dans le groupe des enfants portant ces lentilles d'orthokératologie en comparaison d'enfants portant de simples lentilles (23,24). Cependant cette technique n'est efficace que sur des patients présentant une myopie faible, et ne persiste pas à l'arrêt du port nocturne de ces lentilles. De plus, ces deux dernières techniques comportent les mêmes limites que le port de lentilles classiques : un risque infectieux, une utilisation contraignante et un effet réversible.

2.1.2. Curatifs

Parmi les traitements physiques de la myopie, il reste en traitement curatif la chirurgie réfractive. Cette chirurgie est disponible uniquement pour les adultes présentant une myopie faible à modérée, et stabilisée. La chirurgie réfractive repose sur plusieurs techniques, comme la technique « LASIK » qui permet la découpe fine et précise de l'épithélium cornéen, puis la technique « Excimer » qui permet le remodelage de la surface cornéenne. Ces techniques sont purement curatives, et n'ont pas pour objectif le ralentissement de la progression de la myopie. Elles sont de plus exclusivement réservées à l'adulte, et ne peuvent être envisagées en population pédiatrique chez laquelle la myopie évolue.

2.2. Moyens thérapeutiques pharmacologiques

En complément des traitements physiques, les traitements pharmacologiques, dit « freinateurs » visent à ralentir la progression de la myopie. Il s'agit donc uniquement de traitements préventifs.

L'ensemble des molécules utilisées possèdent un mécanisme commun en tant qu'antagonistes des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine. Ce mécanisme n'est néanmoins pas totalement élucidé à l'heure actuelle.

Le tropicamide est une molécule anticholinergique en bloquant les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine. Son efficacité sur la progression de la myopie chez l'enfant a été testée dans plusieurs études, sous la forme d'un collyre à une concentration de 0,4%. Cependant les résultats obtenus sont très variables, allant de l'absence d'effet face à un placebo, à un effet intéressant face à d'autres molécules, ce qui nécessite donc d'autres études cliniques (25,26).

La pirenzépine, un antimuscarinique spécifique, est également souvent retrouvé dans le ralentissement de la progression de la myopie. Le schéma suivi dans les études cliniques utilisait des gels ophtalmiques de pirenzépine à 0,5%, 1% et 2%. Les résultats obtenus sont encourageants, mais limités du fait de son absence sur le marché français (27). De plus malgré sa spécificité, des effets indésirables propres aux antagonistes muscariniques sont retrouvés tels que des troubles de l'accommodation et une sécheresse oculaire.

L'atropine est un antagoniste muscarinique non spécifique, utilisé depuis le 19^e siècle dans le traitement de la myopie. Il existe deux théories pour expliquer son effet freinateur sur la progression de la myopie (28) :

(1) l'atropine fonctionne à une dose relativement faible par le biais d'une cascade neurochimique, qui commence au niveau des récepteurs $M_{1/4}$ dans la rétine (peut-être dans les cellules amacrines)

(2) l'atropine a un effet direct sur les fibroblastes scléreaux en inhibant la synthèse des glycosaminoglycanes par un mécanisme non muscarinique.

L'efficacité et la sécurité de l'atropine ont été évaluées dans trois grandes études cliniques : ATOM 1&2 et LAMP.

L'étude ATOM 1 (Atropine for the Treatment of Childhood Myopia) avait pour objectifs d'évaluer l'efficacité et la sécurité de l'utilisation de collyre d'atropine à 1% dans le traitement de la myopie chez l'enfant à raison d'une goutte instillée dans l'œil le soir, pendant deux ans. Elle s'est déroulée auprès de 400 enfants répartis en deux groupes, l'un recevant le traitement par atropine et le deuxième recevant un placebo. Dans chaque groupe, placebo ou atropine, un seul œil était traité. La progression de la myopie était significativement ralentie pour l'œil traité par atropine comparé à l'autre œil non traité, ou aux yeux traités ou non du groupe placebo. (29)(Figure 4)

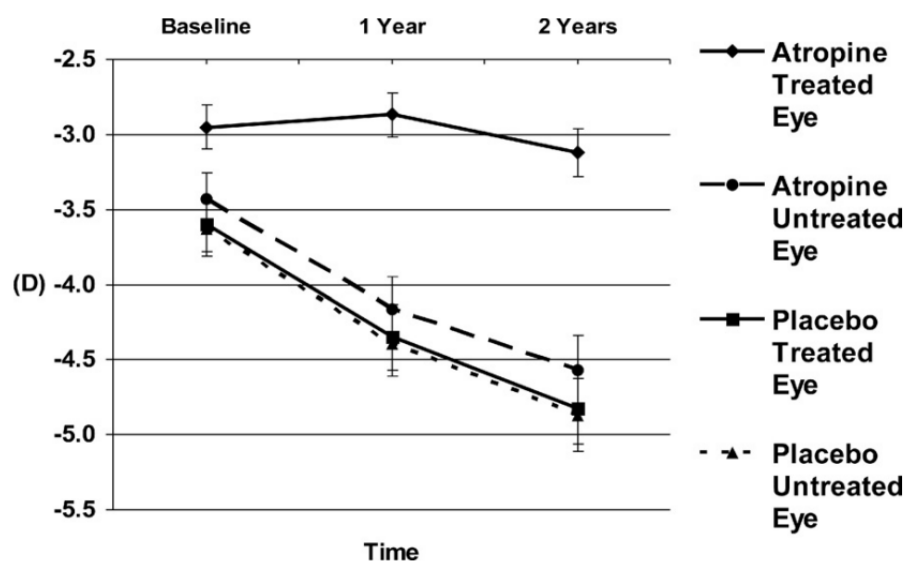


Figure 4. Graphique montrant l'évolution moyenne de la sphéricité de l'œil. D=dioptrie. D'après Chua WH et al. 2006. (29)

L'étude ATOM 2 s'est concentrée sur détermination de la dose minimale efficace pour ralentir la myopie chez l'enfant. ATOM 2, faisant suite à ATOM 1, a démontré que l'utilisation d'un collyre à 0,01%, 0,1% et 0,5% d'atropine à raison d'une goutte par jour le soir chez des enfants de 6 à 12 ans diminue de 77% la progression de la myopie. Ces résultats ont permis de

conclure à l'efficacité et à la sécurité de l'utilisation de l'atropine dans le ralentissement de l'évolution de la myopie chez l'enfant (30). Cette étude révèle également que les effets indésirables étaient plus fréquents avec des dosages plus importants (kératites, conjonctivites, troubles de l'accommodation, et diminution de l'acuité visuelle de près notamment). La dose optimale au regard des résultats a été fixée à 0,01%, permettant le meilleur effet dans le temps, grâce notamment à la réduction de l'effet rebond, et réduisant significativement la fréquence des effets indésirables (Figure 5).

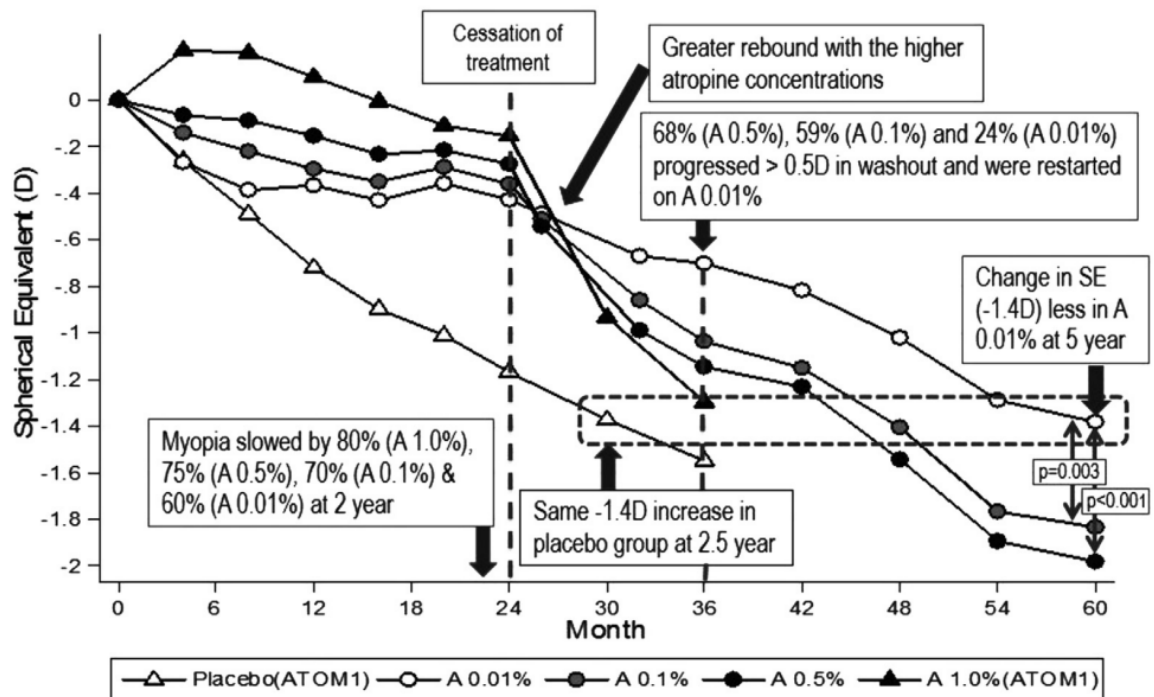


Figure 5. Résumé des résultats des études ATOM 1 & 2. D'après Chia A et al. 2012. (31)

L'effet rebond, qui consiste à la reprise accélérée de la myopie à l'arrêt du traitement, était également considérablement réduit avec de faibles doses d'atropine. L'existence de cet effet rebond rend l'efficacité globale de l'atropine 0.01% supérieure à l'efficacité obtenue avec de plus forts dosages. En effet, un an après l'arrêt du traitement, 68% du groupe ayant reçu l'atropine 0,5% avait vu sa myopie augmenter de plus de 0,5 dioptrie. Ce chiffre n'était que de 59% pour le groupe 0,1% et de seulement 24% pour le groupe traité par l'atropine 0,01% (Figure 5).

L'étude LAMP (Low-dose Atropine in Myopia Progression), a évalué l'efficacité de trois dosages de collyres d'atropine (0,01 ; 0,25 et 0,5%) dans la progression de la myopie chez l'enfant comparé à un placebo. Les résultats révèlent une efficacité significative pour les trois

dosages, et une relation effet-dose, avec une efficacité plus importante pour les dosages plus élevés (32). Ces résultats viennent donc corroborer ceux obtenus dans les études ATOM.

2.3. Comparaison d'efficacité des traitements

Plusieurs études ont comparé l'efficacité d'un ou plusieurs traitements sur le développement de la myopie chez l'enfant. Parmi ces études, deux méta-analyses démontrent une efficacité supérieure de l'atropine en collyre comparativement aux autres traitements.

En 2016, Huang *et al.* a effectué une méta-analyse se basant sur 30 études, et comprenant 5422 yeux. Cette étude internationale comparait 16 traitement dans la prise en charge de la myopie chez l'enfant. Parmi les traitements comparés figuraient l'atropine à faible, moyenne et forte dose, la pirenzépine, l'orthokératologie, les lunettes classiques, ou encore l'activité en extérieur. Cette méta-analyse a conclu sans équivoque à une efficacité supérieure de l'atropine en collyres (18). (Tableau 1)

Tableau I. Efficacité relative des différents traitements utilisé dans le contrôle de la progression de la myopie comparé au groupe placebo/sans intervention. D'après Huang et al. 2016. (18)

	Ineffective R: ≤ 0 D/yr AL: ≥ 0 mm/yr	Weak R: 0 to 0.25 D/yr AL: 0 to -0.09 mm/yr	Moderate R: 0.25 to 0.50 D/yr AL: -0.09 to -0.18 mm/yr	Strong R: ≥ 0.50 D/yr AL: ≤ -0.18 mm/yr
Atr H				R: <u>0.68 (0.52–0.84)</u> AL: <u>-0.21 (-0.28 to -0.16)</u>
Atr M				R: <u>0.53 (0.28–0.77)</u> AL: <u>-0.21 (-0.32 to -0.12)</u>
Atr L			AL: <u>-0.15 (-0.25 to -0.05)</u> R: <u>0.29 (0.05–0.52)</u>	R: <u>0.53 (0.21–0.85)</u>
Pir		AL: <u>-0.09 (-0.17 to -0.01)</u> R: 0.21 (-0.07 to 0.48)	AL: <u>-0.11 (-0.20 to -0.03)</u> AL: <u>-0.15 (-0.22 to -0.08)</u>	
PDMCLs			R: 0.25 (-0.03 to 0.54)	
OK			R: 0.33 (-0.02 to 0.67)	
PBSLs		AL: -0.08 (-0.16 to 0.00)		
Cyc				
PASLs		R: <u>0.14 (0.02–0.26)</u> AL: <u>-0.04 (-0.09 to -0.01)</u>		
BSLs		R: 0.09 (-0.07 to 0.25) AL: -0.06 (-0.12 to 0.00)		
PDMSLs		R: 0.12 (-0.24 to 0.47) AL: -0.05 (-0.15 to 0.05)		
MOA		R: 0.14 (-0.17 to 0.46)		
RGPClS	AL: 0.02 (-0.05 to 0.10)	R: 0.04 (-0.21 to 0.29)		
Tim	R: -0.02 (-0.31 to 0.27)			
SCLs	R: -0.09 (-0.29 to 0.10) AL: 0.01 (-0.06 to 0.07)			
USVSLs	R: -0.11 (-0.35 to 0.13) AL: 0.03 (-0.06 to 0.11)			

AL = axial length change; Atr = atropine; Atr H = high-dose atropine (1% or 0.5%); Atr L = low-dose atropine (0.01%); Atr M = moderate-dose atropine (0.1%); BSLs = bifocal spectacle lenses; Cyc = cyclopentolate; D = diopter; MOA = more outdoor activities (14–15 hrs/wk); OK = orthokeratology; PASLs = progressive addition spectacle lenses; PBO = placebo; PBSLs = prismatic bifocal spectacle lenses; PDMCLs = peripheral defocus modifying contact lenses; PDMSLs = peripheral defocus modifying spectacle lenses; Pir = pirenzepine; R = refraction change; RGPClS = rigid gas-permeable contact lenses; SCLs = soft contact lenses; SVSLs = single vision spectacle lenses; Tim = timolol; USVSLs = undercorrected single vision spectacle lenses. The underlined data indicate that there are statistically significant effects ($P < 0.05$). A 0.18-mm axial length change is estimated to produce a 0.50 D change in refraction.

En 2018, Tan *et al.* a comparé différentes études portant sur l'efficacité de plusieurs traitements, comme les lunettes multifocales, bifocales, l'orthokératologie, la pirenzépine, ou l'atropine à haute, moyenne ou faible dose (28). L'atropine a montré une supériorité d'action dans chacun de ses dosages. (Figure 6)

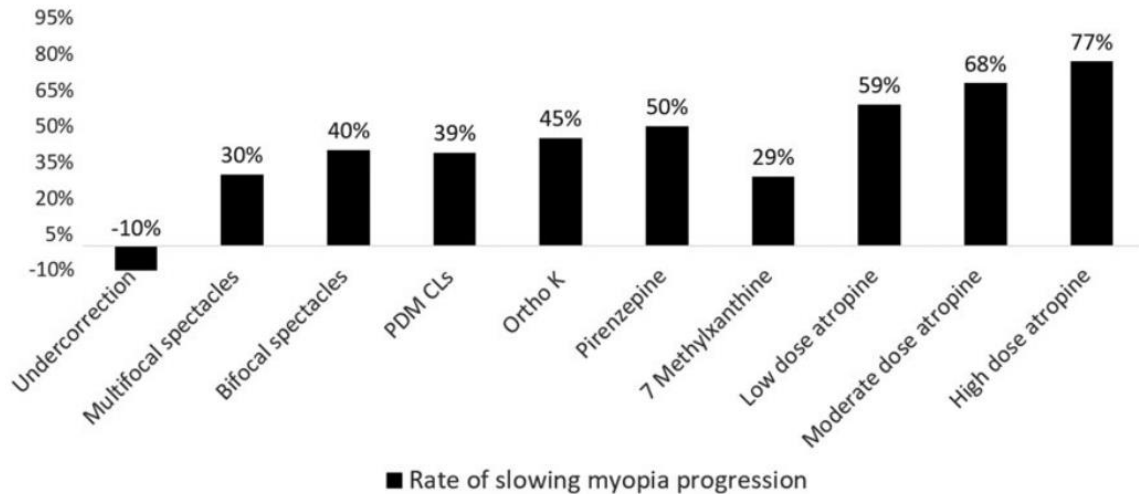


Figure 6. Comparaison de l'efficacité de différentes interventions dans le contrôle de la myopie. D'après de Tan *et al.* 2018. (28)

L'atropine apparait donc comme le traitement le plus sûr et le plus efficace dans le ralentissement de l'évolution de la myopie chez l'enfant.

3. L'atropine en collyre, une préparation pharmaceutique

3.1. Contexte réglementaire

Les collyres faiblement dosés en atropine, et particulièrement celui à 0,01%, semblent être l'une des meilleures stratégies pour ralentir l'installation de la myopie chez l'enfant. Des spécialités commencent à être disponibles sur le marché asiatique, notamment en Malaisie (Myopine™). Cependant, en France, il n'existe pas de spécialité industrielle d'atropine en collyre disponible sur le marché avec ce dosage.

En l'absence de spécialité industrielle disponible et d'alternatives thérapeutiques, les pharmacies sont autorisées par l'article L-5121-1 du code de la santé publique, à réaliser une préparation. Il existe deux types de préparations : les préparations magistrales, et les préparations hospitalières. Toutes deux doivent être conformes aux Bonnes Pratiques de Préparation (BPP), dont la version actuelle date de 2022, émises par l'ANSM.

Les préparations magistrales sont préparées de façon extemporanée pour un patient donné.

Quant aux préparations hospitalières, elles sont préparées par les pharmacies à usage intérieur et sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients. Elles font l'objet d'une déclaration auprès de l'ANSM. Cette production est donc une production par lot, avec une limite actuelle fixée à 300 unités galéniques par lot. Au-delà, la fabrication est considérée comme se rapprochant d'une production industrielle et doit être soumise aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

En fonction du type de préparation choisi, les bonnes pratiques de préparations imposent différent niveaux de contrôles. (Tableau 2)

Tableau II. Comparaison des contrôles exigés par les bonnes pratiques de préparation entre les préparations magistrales et hospitalières. D'après les Bonnes pratiques de préparation 2022. (33)

Contrôles d'une préparation liquide stérile	Préparation magistrale	Préparation hospitalière
Contrôle à réception <ul style="list-style-type: none"> • MPUP (Matière première à usage pharmaceutique) • Article de conditionnement 	✓ ✓	✓ ✓
Contrôles en cours de préparation <ul style="list-style-type: none"> • Doubles contrôles volumes • Enregistrement des étapes de fabrication 	✓ ✓	✓ ✓
Contrôles des préparations terminées <ul style="list-style-type: none"> • Étiquetage • Adéquation avec la prescription • Aspect • Teneur • Stabilité • Stérilité 	✓ ✓ ✓	✓ ✓ ✓ ✓ ✓ ✓
Contrôle libératoire <ul style="list-style-type: none"> • Dossier de lot • Conditions de préparation • Résultats des contrôles • Respect du référentiel qualité 	✓ ✓ ✓ ✓	✓ ✓ ✓ ✓
Contrôle des locaux et équipements <ul style="list-style-type: none"> • Qualification • Microbiologie 	✓ ✓	✓ ✓
Evaluation du personnel	✓	✓
Echantillothèque		✓

3.2. Contexte local

Au Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne (CHUSE), 19 patients étaient traités par des collyres d'atropine 0,01% en 2017. En 2021, ce nombre passe à 78, ce qui représente une augmentation de plus de 300%. De fait, le nombre de flacons produits a également augmenté, passant de 569 en 2018 à 1513 en 2021. (Figure 7)

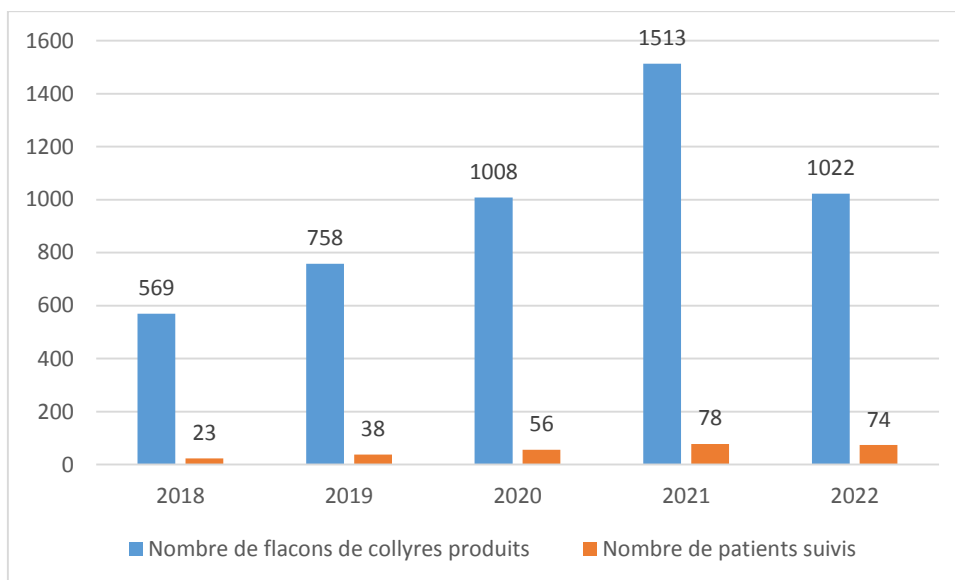


Figure 7. Evolution du nombre de patients traités par des collyre d'atropine 0,01% suivis au CHU de Saint-Etienne, et du nombre de flacons de collyres produits par la PUI entre 2018 et 2022.

La production était jusqu'à présent réalisée sous le statut de préparation magistrale, mais compte tenu de l'augmentation constante du nombre de patients, et dans une volonté de sécurisation supplémentaire de la production, l'idée d'un passage à une production sous le statut de préparation hospitalière s'est progressivement imposée. De plus, la production sous forme de préparation hospitalière permet une planification de production, une meilleure organisation du travail, et à terme, une meilleure efficacité.

La formulation du collyre produit au CHUSE, repose sur deux matières premières : des ampoules d'atropine à 0.1% (1mg/ml), actuellement fournies par le laboratoire Aguetant (Lyon, France), et du BSS™ (Balanced Salt Solution) du laboratoire Alcon (Puurs-sint-Amands, Belgique).

Cette préparation est effectuée par des préparateurs en pharmacie hospitalière (PPH), préalablement formés et habilités. La fabrication a lieu dans une zone à atmosphère contrôlée (ZAC) de classe C, sous une hotte à flux laminaire classée A. L'équipement utilisé est qualifié

chaque année par un organisme extérieur. Les contrôles microbiologiques d'air, d'eau et des surfaces sont réalisés de façon trimestrielle.

4. Électrophorèse

L'électrophorèse est une technique séparative qui permet des analyses qualitatives et quantitatives. Elle repose sur la migration différentielle de particules chargées, en fonction de leur taille, de leur charge et de leur forme, sous l'influence d'un champ électrique. Le nom électrophorèse vient d'ailleurs d'« *electro-* » préfixe d'origine grecque pour désigner l'électricité, et « *-phorèse* » du grec *phoresis* qui signifie « porter », littéralement « porter par l'électricité ».

C'est l'une des principales techniques séparatives utilisée en chimie et en biologie avec la chromatographie.

4.1. Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire repose sur les principes de l'électrophorèse évoqués précédemment. Elle utilise comme support de migration un capillaire généralement en silice fondue équipé d'une fenêtre de lecture. Les extrémités du capillaire trempent dans les solutions de tampon, de même que les électrodes reliées à une source de courant. Lorsqu'un courant électrique est appliqué aux extrémités d'un capillaire rempli de tampon, cela crée un flux de tampon appelé flux d'électro-osmose. Ce flux dépend de la mobilité électroosmotique, qui dépend elle-même des caractéristiques du tampon et des charges de la paroi interne du capillaire. La vitesse de migration d'un composé dans un capillaire est donc la somme de la vitesse électrophorétique et de la vitesse électroosmotique. Ces mobilités peuvent être complémentaires ou agir en sens contraire. L'électrophorèse capillaire, grâce à ces nombreux paramètres permet d'obtenir une excellente efficacité avec un nombre de plateaux théoriques allant jusqu'à 500 000 par mètre linéaire. (34)

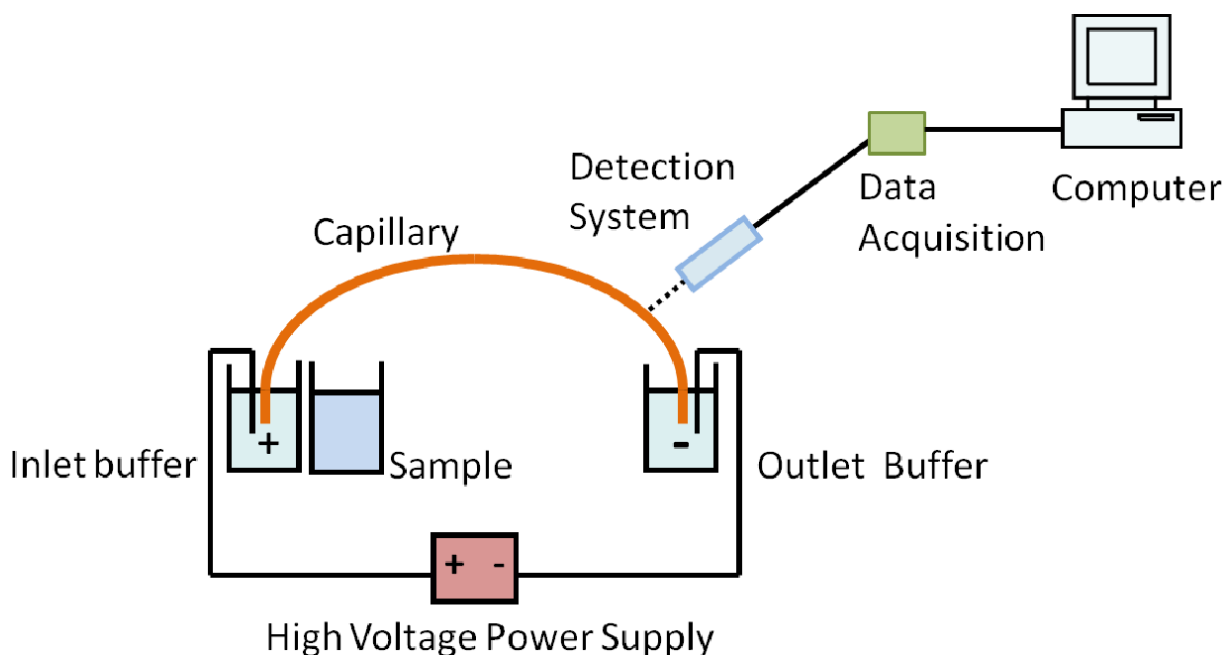


Figure 8. Schéma de fonctionnement d'une électrophorèse capillaire. D'après Kizilkaya, Funda. 2012. (35)

4.2. Paramètres influençant la séparation électrophorétique

Différents paramètres peuvent modifier la séparation des molécules, avec, en premier lieu, les paramètres liés à la molécule elle-même :

- La charge de la molécule : plus une molécule est chargée, plus elle migrera rapidement. Cette charge est liée au pKa de la molécule qui est sa capacité à se charger positivement ou négativement, en captant ou en cédant un proton.
- La taille : les molécules de faibles poids moléculaire migrent plus rapidement que les molécules plus imposantes
- La forme : des molécules à charge et taille identiques migrent différemment en fonction de leur composition structurelle linéaire, bi- ou tridimensionnelle.

Le champ électrique influence également la séparation en électrophorèse : la mobilité électrique est la vitesse de déplacement des particules en suspension : les particules sont chargées et sont influencées par un champ électrique qui exerce une force électrostatique. Ainsi, une particule de charge électrique Q , placée dans un champ électrique E , est soumise à une force F qui l'entraîne vers l'électrode de signe opposé :

$$F = Q.E$$

Des forces de frottement, liées à la viscosité du milieu (qui dépend de la température) ralentissent la migration de la particule. Ces forces sont d'autant plus importantes que la particule est grosse et que la vitesse de migration est grande :

$$\mathbf{f} = 6\pi \cdot \eta \cdot \mathbf{r} \cdot \mathbf{v}$$

Avec \mathbf{f} la force de frottement, η le coefficient de viscosité, \mathbf{r} le rayon de la particule, et \mathbf{v} la vitesse de migration.

Lorsque ces deux forces s'équilibrent, la particule se déplace alors à vitesse constante :

$$\mathbf{Q} \cdot \mathbf{E} = 6\pi \cdot \eta \cdot \mathbf{r} \cdot \mathbf{v} \text{ soit } \mathbf{v} = \mathbf{Q} \cdot \mathbf{E} / 6\pi \cdot \eta \cdot \mathbf{r}$$

Pour chaque particule on définit sa mobilité électrophorétique μ :

$$\mu = \frac{v}{E} \text{ soit } \mu = Q / 6\pi \cdot \eta \cdot r$$

Elle dépend des paramètres suivants :

- Voltage : la vitesse de migration est proportionnelle au voltage.
- Ampérage : la vitesse de migration est proportionnelle à l'intensité du courant.
- Résistance : la vitesse de migration des molécules est inversement proportionnelle à la résistance qui est dépendante de la longueur du support et de la concentration des ions du tampon.

Parmi les facteurs ayant une influence sur la séparation des molécules par électrophorèse, on retrouve également les paramètres liés au tampon

- La nature et la concentration du tampon : elles déterminent la force ionique, le courant électrique est transporté par les ions du tampon et de l'échantillon. Plus un tampon est concentré, plus le flux d'électroosmose est diminué, ainsi que la vitesse des solutés. (Figure 9)
- Le pH du tampon : détermine le degré d'ionisation des molécules contenues dans l'échantillon. En fonction du pH les molécules seront plus ou moins chargées en fonction de leur pKa (Figure 9 et 10), influençant leur mobilité. Plus le pH est acide, plus les molécules sont chargées positivement. (36)

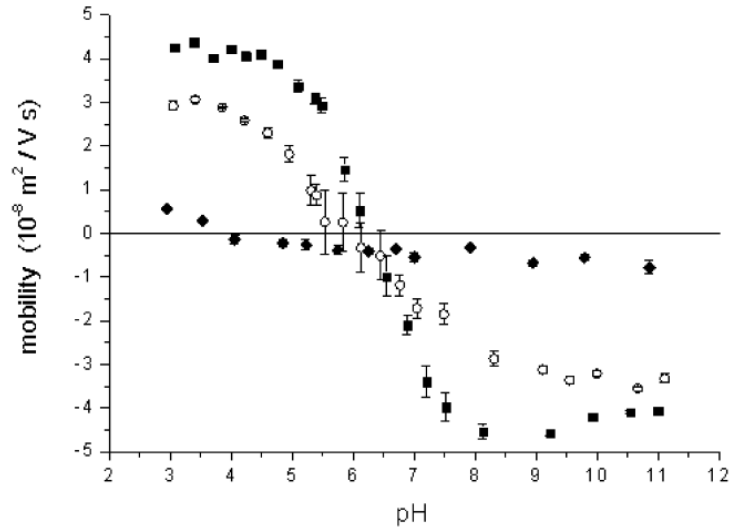


Figure 9. La mobilité électrophorétique en fonction du pH et de la concentration en électrolyte. ■ NaCl 2mM, ○ NaCl 20mM, ◆ NaNO₃ 500mM

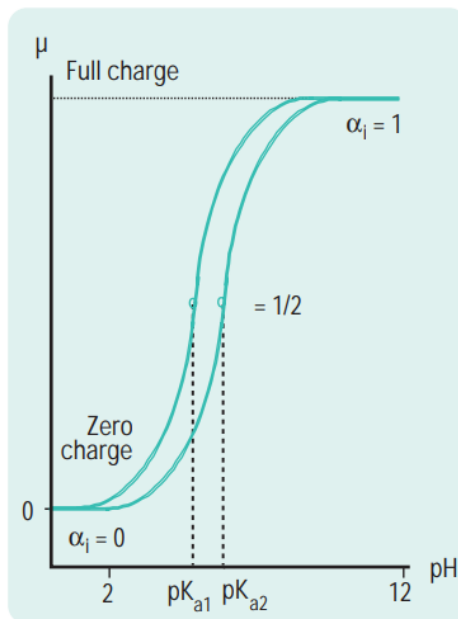


Figure 10. Mobilité de deux acides faibles en fonction du pH du tampon. (37)

- L'ajout de solvants organiques : ils permettent d'accroître la solubilité des solutés, ou agir sur le degré d'ionisation des composants de l'échantillon à analyser. (38). Les solvants les plus utilisés en électrophorèse sont le méthanol, l'alcool isopropylique, ou encore l'acétonitrile.

Le support, qui est en théorie inerte, mais qui, en pratique influence la séparation des molécules, par des phénomènes d'adsorptions, ou d'électro-osmose.

La pharmacopée européenne précise, en outre, les paramètres liés à l'instrument disponibles pour optimiser une méthode séparative en électrophorèse capillaire de zone (CZE) (39):

- La tension : plus la tension est élevée, plus le temps de migration est réduit. Cependant, l'application d'une tension trop élevée conduit à un effet-Joule, qui correspond à l'apparition de gradient de température et d'un gradient de viscosité, ce qui diminue la résolution. En pratique, il est recommandé d'appliquer la plus haute tension disponible qui ne provoque pas ce phénomène.
- La polarité des électrodes : deux modes de polarité sont possibles. Elle peut être normale (de l'anode à la cathode, du plus vers le moins) ou en mode inversé (de la cathode vers l'anode). Ce dernier mode a pour conséquence d'inverser le flux électroosmotique, et donc l'ordre de sortie des molécules sur l'électrophérogramme.
- La température : elle agit principalement sur la viscosité et la conductivité électrique du tampon. Une température élevée diminue la viscosité et augmente la conductivité. Cependant un travail mené à une température trop élevée pourrait dénaturer l'analyte, et perturber sa migration. (40)
- Le capillaire : la longueur et le diamètre du capillaire jouent sur la résolution et sur le temps d'analyse. Plus le capillaire est long, plus la résolution est importante, mais plus la durée de l'analyse sera élevée. La position et le type de fenêtre de lecture influence également l'efficacité et la sensibilité de l'analyse. (41)

4.3. Détecteur à barrette de diode

Ce détecteur repose sur le principe des spectrophotomètres UV/Visible, donc sur la détection de l'absorbance lors du passage d'un produit. Cette variation d'intensité lumineuse permet, via la loi de Beer-Lambert, de déterminer la concentration dans l'échantillon du soluté détecté grâce à la formule suivante :

$$A = \epsilon_{\lambda}.l. C$$

Avec A l'absorbance, ϵ_{λ} le coefficient d'extinction molaire à une longueur d'onde donnée, l la longueur du trajet optique et C la concentration du soluté d'intérêt.

La spectrophotométrie est basée sur la propriété de la matière d'absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-visible. Elle permet de réaliser des dosages du fait d'une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un spectrophotomètre qui détermine l'absorption d'une solution pour une longueur d'onde donnée ou pour une plage de longueurs d'ondes judicieusement choisie.

L'absorbance d'une molécule dépend donc de la longueur d'onde appliquée par la lampe UV/Visible. Il est donc primordial de rechercher la longueur d'onde permettant une absorption maximale, ou du moins optimale pour rechercher et quantifier un produit. Sur un spectrophotomètre classique, il faudrait tester chaque longueur d'onde, c'est ce que l'on appelle un balayage. L'avantage du détecteur DAD est de pouvoir faire ce balayage automatiquement grâce à l'émission dans la totalité du spectre UV/Visible (Figure 11 et 12).

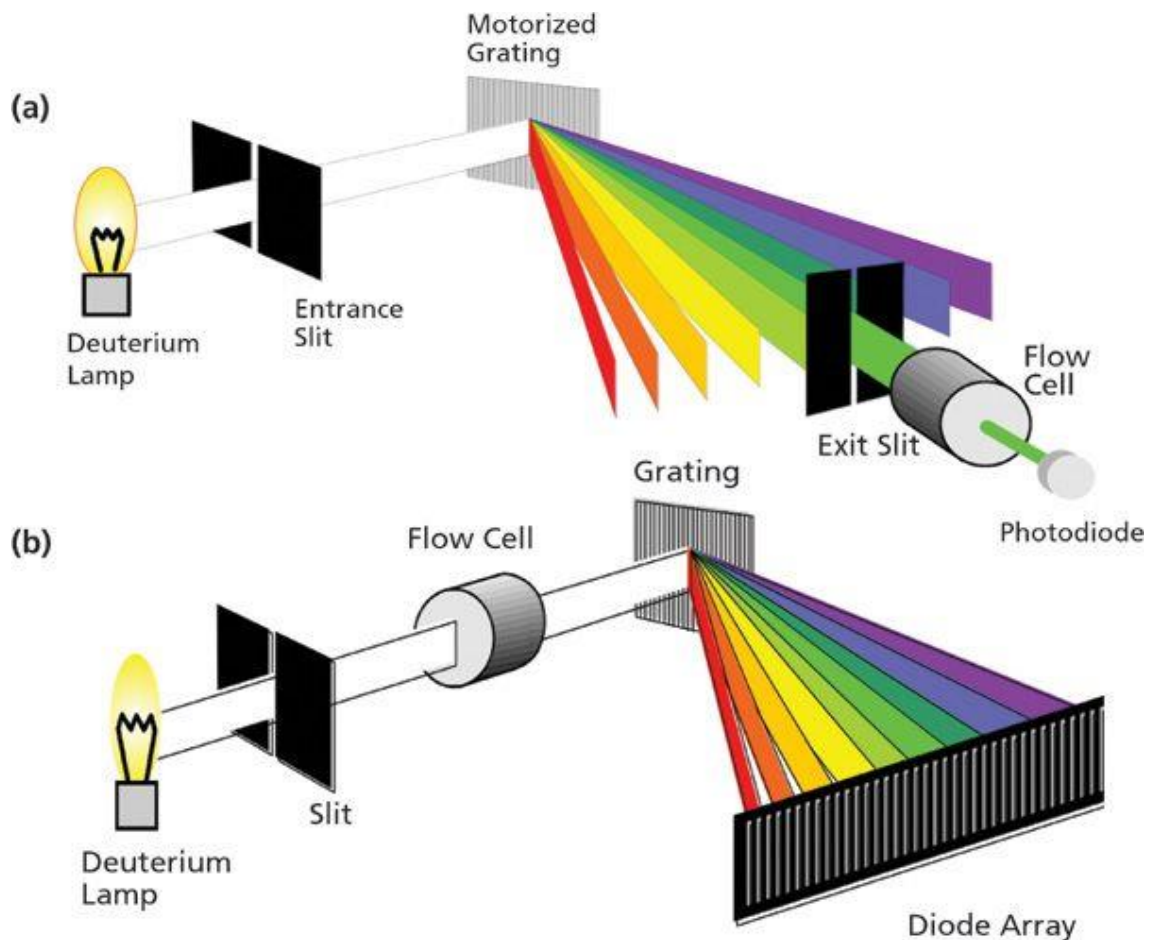


Figure 11. Schéma comparant le fonctionnement d'un détecteur photodiode simple et un DAD. Le DAD absorbe dans tout le spectre UV-Visible. D'après Wysocki J. et al. 2019. (42)

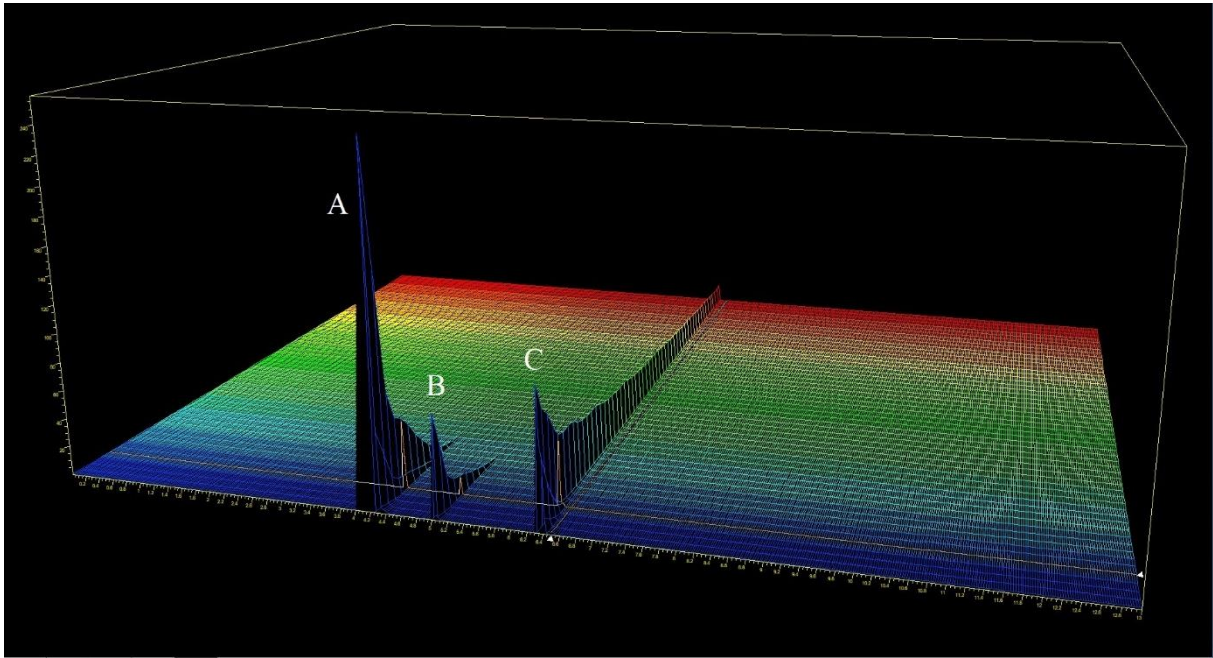


Figure 12. Graphique 3D obtenu après un balayage du spectre UV-Visible par un DAD. A : Atropine ; B : Scopolamine ; C : EOF

4.4. Electrophérogramme

L'électrophérogramme est le tracé obtenu par une méthode d'électrophorèse, à l'instar du chromatogramme en chromatographie. Sur un électrophérogramme on retrouve le signal reçu et traité informatiquement par le détecteur, dans le cas de notre électrophorèse capillaire au CHU de Saint-Etienne, par le détecteur DAD. Le signal reçu par le détecteur est le plus souvent constitué d'un signal de base, horizontal et plat. Pour chaque molécule d'intérêt, un pic sera présent, dont la hauteur et l'aire sous la courbe dépendront de la concentration. Enfin, on retrouve également une perturbation du signal de base qui est lié à l'EOF (ElectroOsmotic Flow), c'est le signal du passage du flux électroosmotique. D'un point de vue physique, dans un fonctionnement de l'électrophorèse en mode cationique, de l'anode vers la cathode, les espèces chargées positivement seront détectées avant l'EOF, les neutres sortiront en même temps que l'EOF, et les molécules chargées négativement seront détectées après l'EOF. (Figure 13)

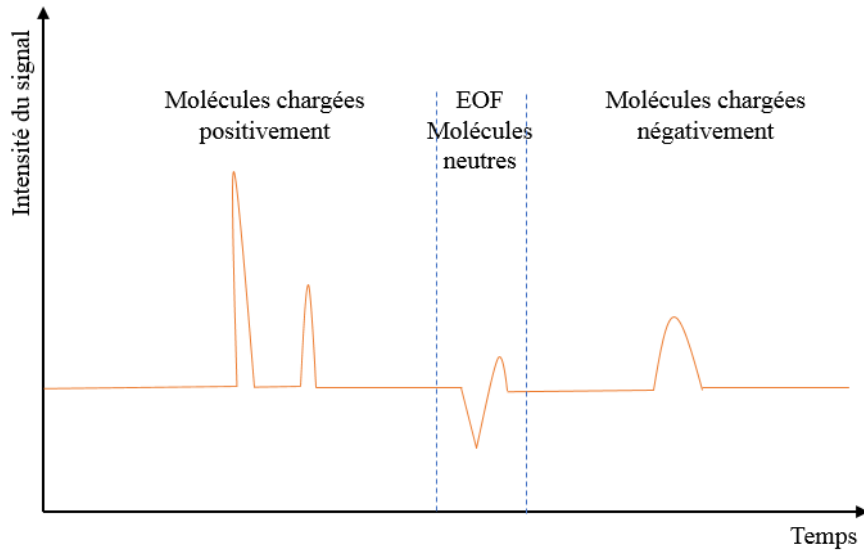


Figure 13. Schéma d'un électrophérogramme pouvant être obtenu par électrophorèse capillaire en mode cationique.

Les molécules chargées positivement sont soumises aux flux électrophorétiques et électroosmotique, qui vont dans le même sens, ce qui accélère leur migration par rapport à la seule vitesse du solvant. Pour les molécules négatives c'est l'inverse, elles sont ralenties par rapport au flux de solvant du fait d'un flux électroosmotique allant en sens contraire du flux électrophorétique. Les molécules neutres ou non chargées, ne subissent que le flux électroosmotique et sont donc détectées au niveau de l'EOF (Figure 14).

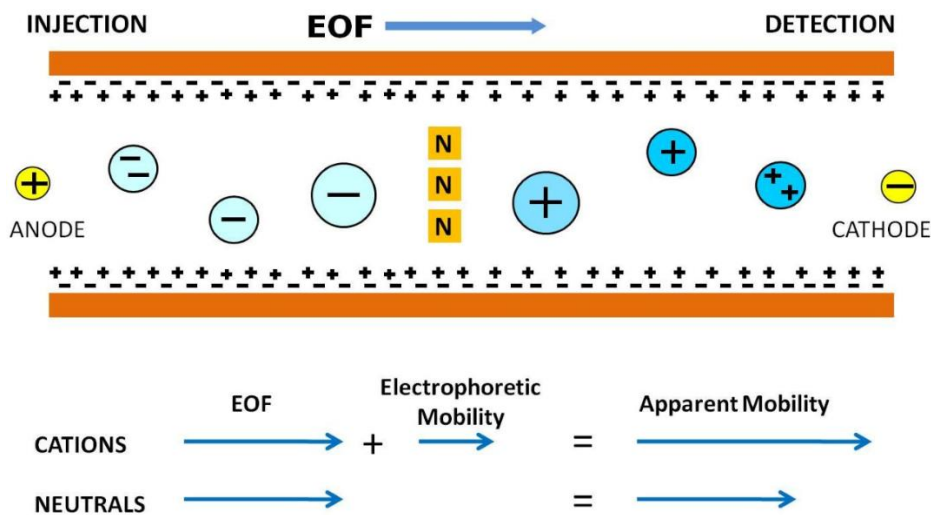


Figure 14. Représentation du comportement de molécules chargées dans un capillaire d'électrophorèse. D'après Kizilkaya, Funda. 2012. (35)

4.5. Avantages et inconvénients de l'électrophorèse

Parmi les méthodes séparatives, la chromatographie liquide haute performance et l'électrophorèse capillaire sont les plus répandues. L'HPLC étant la technique quantitative de référence dans les monographies de la pharmacopée européenne, nous allons nous en servir comme référence afin d'explicitier les avantages et les inconvénients de l'électrophorèse capillaire. (Tableau 3)

Tableau III. Comparaison de l'électrophorèse capillaire et de la chromatographie liquide haute performance.

Paramètre	CE	HPLC
Référentiels	Peu représentée	Méthode de référence
Rapidité (exemple atropine)	≈6 min	≈10 min
Efficacité	N > 50 000 plateaux	Limité par la longueur de la colonne
Coût	Faible	Moyen
Précision	Bonne	Très bonne
Polyvalence	Limitée (molécules neutres)	Importante
Volume de tampon utilisé	<5ml	>10ml
Volume d'échantillon nécessaire	<1µL	10-20µL
Encombrement	Faible	Moyen

La rapidité de la CE s'explique par la méthode en elle-même, la vitesse en chromatographie liquide impacte immédiatement la résolution sur le chromatogramme, en augmentant le débit, on diminue la résolution. C'est partiellement vrai en électrophorèse pour la mobilité électroosmotique, mais pas pour la mobilité électrophorétique.

L'efficacité est montrée par le nombre de plateaux théoriques, qui est très élevé en électrophorèse, mais qui est dépendant de la longueur de la colonne en HPLC, et donc limité par l'encombrement de la machine.

Pour le coût, cela se retrouve essentiellement en coût de fonctionnement, une chromatographie liquide étant très consommatrice de solvant.

En revanche, un avantage majeur de la chromatographie est également qu'elle constitue la technique de référence de la pharmacopée Européenne. Il y a, de ce fait, de nombreux référentiels pour le développement de méthode en chromatographie, ce qui est plus rare en électrophorèse.

Dans le cas du collyre d'atropine à 0,01% fabriqué par le CHU de Saint-Etienne, la méthode à mettre en place est une méthode de quantification à utiliser en routine sur un produit unique et chargé, dans une matrice simple. Les inconvénients soulevés ne sont donc pas un obstacle à l'utilisation de l'électrophorèse capillaire. La vitesse et le faible coût d'utilisation compensent la perte de précision de la méthode.

5. Méthode de quantification

5.1. Critères de validation

Pour effectuer les contrôles de teneur sur nos collyres d'atropine à 0,01%, nous avons développé une méthode de quantification par électrophorèse capillaire. Ces méthodes de quantification doivent être validées, pour prouver leur fiabilité. Pour ce faire, plusieurs paramètres sont étudiés dont nous allons voir les définitions. Ces définitions sont tirées du référentiel de la conférence internationale d'harmonisation (ICH guidelines Q2(R1)) (43).

La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes.

La justesse correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention.

La précision d'une méthode correspond au degré d'accord (degré de dispersion) entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions prescrites. La précision peut s'évaluer à trois niveaux : répétabilité, précision intermédiaire et reproductibilité.

- **Répétabilité**: La répétabilité est une expression de la précision de l'analyse lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisation, après un court intervalle de temps. La répétabilité est également appelée « précision intra-jour ».

- Précision intermédiaire : correspond aux variations survenant dans un même laboratoire : analyses effectuées à des jours différents, par des personnes différentes, au moyen d'appareils différents, etc.
- Reproductibilité : correspond à la concordance entre laboratoires (travaux de collaboration visant généralement l'uniformisation de la méthodologie).

La limite de détection est la concentration la plus faible à laquelle la substance peut être détectée de façon fiable. En général, un rapport signal/bruit de 3 pour 1 est considéré comme acceptable pour l'estimation de la limite de détection.

Limite de quantification est la concentration la plus faible à laquelle la substance peut être quantifiée de façon fiable. En général, le rapport signal/bruit est de 10 pour 1, ou le rapport signal/limite de détection est de 3 pour 1.

La calibration est le passage d'échantillon de concentrations connues afin d'établir la relation de proportionnalité entre le signal obtenu et la concentration en composé d'intérêt. Il est recommandé d'inclure 5 points de calibration et un zéro.

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon. La mesure de la régression linéaire est effectuée grâce au coefficient de détermination, r^2 , qui doit tendre le plus possible vers 1.

5.2. Étalonnage

L'étalonnage interne consiste à intégrer dans l'échantillon un composé de concentration connue. Le but de ce composé est de subir toutes les étapes de l'analyse de la même façon que le composé d'intérêt. Cela permet de rajouter de la précision à la méthode. En effet, si la température, la pression atmosphérique, ou le matériau du contenant par exemple, varient par rapport aux conditions de réalisation de l'étalonnage, l'étalon interne permettra de visualiser ces changements. Il permet aussi d'objectiver un effet matrice.

L'étalon interne idéal doit être proche du composé d'intérêt d'un point de vue physico-chimique, afin d'avoir le comportement le plus similaire possible. Il ne doit normalement pas être contenu dans l'échantillon à analyser. Il doit aussi être distinctement identifié pour ne pas interférer avec le composé d'intérêt. Enfin l'aire de son pic doit être proche de celle du composé d'intérêt pour des concentrations identiques, c'est ce qu'on appelle le coefficient de proportionnalité, ou coefficient de réponse. (43)

5.3. Spécificité de la quantification de l'atropine par électrophorèse

L'atropine est un alcaloïde tropanique retrouvé dans de nombreuses plantes comme la belladone. En tant que principe actif c'est un puissant antagoniste des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine. C'est une molécule chirale avec deux énantiomères, R et S, présentée sous forme racémique (mélange équimolaire de chaque énantiomère).

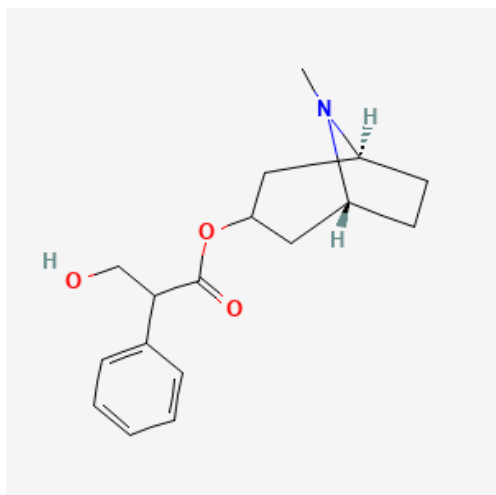


Figure 15. Représentation de la molécule d'atropine. (44)

L'atropine possède deux groupements donneurs de protons, ce qui implique qu'elle a donc deux pKa. Le premier, pKa₁, est de 4,35, et le deuxième pKa₂ est de 9,43.

La pharmacopée Européenne lui attribue huit impuretés, de A à H dont les plus connues sont l'acide tropique (impureté C), et la scopolamine (impureté F). Les impuretés sont des molécules que l'on peut retrouver à la suite du processus d'extraction et de purification de la molécule. Il ne faut pas les confondre avec les produits de dégradations de l'atropine, qui eux sont le fruit de l'instabilité chimique de la molécule d'atropine qui conduit à sa modification.

Dans ce travail, nous avons recherché trois impuretés. Tout d'abord, l'impureté B a été sélectionnée, du fait de sa mobilité électrophorétique proche de l'atropine, afin de s'assurer d'une résolution suffisante entre les deux pics. Nous avons également recherché l'acide tropique, car il s'agit d'une des impuretés les mieux décrites dans la littérature, et qui est aussi un produit de dégradation de l'atropine. (46)

Enfin, du fait de sa disponibilité immédiate et de sa proximité moléculaire avec l'atropine, nous avons travaillé sur la scopolamine. Cette dernière a finalement servi d'étalon interne dans notre méthode de quantification.

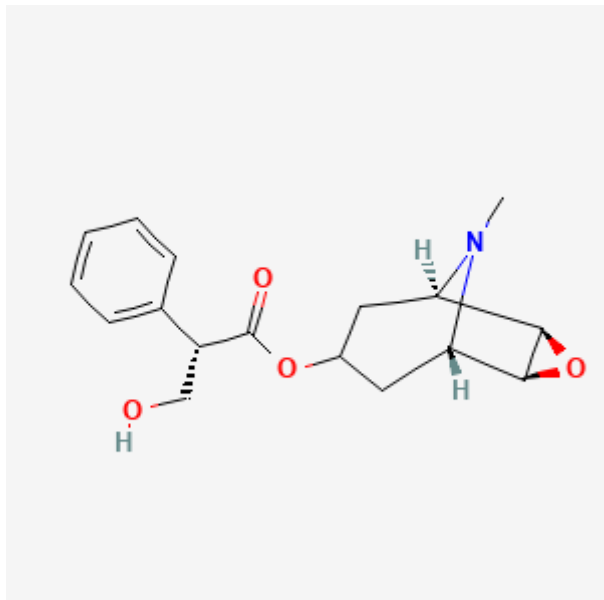


Figure 16. Représentation de la molécule de scopolamine. (45)

A pH neutre, l'atropine est chargée positivement, et son pic de détection se situe en amont de l'EOF en électrophorèse capillaire en mode cationique.

Partie 2 : l'article original

Title: Quantification of 0.01% atropine compounded eye drops by capillary zone electrophoresis, is it conceivable?

Abstract: Children's myopia is a whole world public health problem. One of the most effective pharmacological treatment is low-dose atropine eye drops. But there is no low-dose formulation of atropine eye drops currently on the market. So, this treatment has to be compounded and controlled in hospital pharmacies. Quantification of drugs is usually done with High Performance Liquid Chromatography methods but Capillary Electrophoresis could be an alternative to HPLC. The aim of this work was to validate a quantification method of atropine by capillary electrophoresis coupled with a diode-array detector in 0.01% atropine eye drops. We chose Hyoscine as internal standard, and our method was developed following the ICH guidelines Q2 (R1). We obtained a linear validated quantification method with a mean correlation of 0.9998 (n=6). The method was precise and accurate with validated intraday and between day. This work could offer an alternative to HPLC in atropine concentration quantification in compounded eye drops. Our method was validated for routine but still need optimization to be used as an alternative to HPLC in atropine eye drops stability indicating studies. HPLC is still the European pharmacopeia reference. This work suggests that CE could be an interesting tool for the quantification of active substances in hospital pharmacies.

Keywords: Atropine, quantification method, eye drops, myopia, capillary electrophoresis

1. Introduction

Myopia is an ophthalmic affection that disturbs the patient's distant vision. According to Holden *et al.*, in the world in 2020, there were 2.6 billion of myopic people (1). That's why WHO's world report on vision concluded that myopia is a major public health preoccupation (2). It is a whole world problem with ethnical and sexual influences, for example, at the age of 15, 16.7% of white people were myopic against 69% of east Asians. Moreover, 40% of migrant South Asians were myopic while it was only 9% in indigenous South Asians (3). Myopia commonly starts in childhood, with identified risk factors like age, parental myopia, shorter time outdoors, and longer time indoors with close-vision activities (4). Untreated myopia can have many consequences, like reduce quality of life, or productivity. Myopia could be associated with a productivity loss from US\$49 billion to US\$697 billion (5). Myopia can be treated by different methods, physical or pharmacological. Physical treatments may include glasses, lenses, or refractive surgery. In pharmacological treatment, mydriatic agent like atropine in eye drops are used for many years in limiting children's myopia progression. Atropine is an alkaloid tropane that influences pupil accommodation. In literature we found that atropine seems to be one of the most effective treatments in the myopia progression (6). Many clinical trials have investigated atropine eye drops effects on childhood myopia progression, particularly in Asia. ATOM 1 explored efficacy and safety of atropine in eye-drops, then ATOM 2 focused on the lowest effective concentration of atropine in eye drops for limiting the myopia progression (7,8). On Asian patients, ATOM studies concluded that atropine in eye-drops was the safest and the most effective at 0.01%. A recent meta-analysis and the LAMP study showed that optimal concentration in the myopia progression was 0.1 mg/ml too, and confirm that higher concentrations were effective but showed bouncing effect (9–11).

Today, there is industrial atropine eye drops in France, but in those, atropine is too concentrated. Hence, hospital pharmacies are allowed to compound low-dose atropine eye drops. The French good manufacturing practices require a content control for the hospital preparations (12). At

the Saint-Etienne university hospital, more and more patients are treated with 0.01% atropine eye-drops for limiting the myopia progression. Between 2017 and 2022, the number of patients increased by 300%, that's why it was interesting switch to serial production. In our hospital, quantification of atropine concentration in eye drops was performed at toxicology laboratory, using a high-performance liquid chromatography method coupled with mass spectrometry (HPLC-MS). However, it could be more effective to measure it in pharmacy, that is also recommended by the French good manufacturing practices.

The aim of this work was to develop and validate a quantification method of atropine by capillary electrophoresis in our 0.01% atropine eye drops.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

Atropine sulfate 0.25 mg/ml was purchased by Agueffant (Lyon, France). Hyoscine hydrobromide 0.25 mg/ml was obtained from Renaudin (Itxassou, France). Sodium phosphate (0.05 mol/l) buffer solution, pH 7.0, and water for HPCE were obtained from Agilent (Santa Clara, USA). Isopropyl alcohol was purchased by Laurypath (Chaponost, France). BSS™ sterile irrigating solution was provided by Alcon (Puurs-sint-Amans, Belgium). Atropine impurities (impurity B, tropic acid, and tropine) were obtained from council of Europe EDQM (Strasbourg, France)

2.2. Calibration standards and quality control samples

Calibration curve standards and quality control (QC) samples were prepared in BSS™ and Water for HPCE, with hyoscine hydrobromide as internal standard (IS) at a concentration of 50 µg/ml. Calibrator concentrations were 0, 40, 45, 50, 55, and 60 µg/mL and QC levels

were 42.5, 50 and 57.5 µg/mL. Calibration curves and QC samples were prepared from separate working solutions.

2.1 Sample preparation

Calibration standards and QC samples were prepared with 135ml of BSS™, 60µl of hyoscine 0.25mg/ml, increasing volumes of atropine 0.25mg/ml from 48µl to 72µl, and water to 300µL. Sample preparation consisted in 150µl of atropine 0.01% eye drops, 60µl of ISTD and 90µl of water.

2.3. Capillary electrophoresis (CE)

Electrophoretic analysis was performed using an Agilent 7100 capillary electrophoresis system coupled with a diode-array detector from Agilent (Santa Clara, USA). Electrophoresis was on cationic mode (anode at the inlet, cathode at the outlet). Instruments control, data acquisition and data handling was performed by a CE Chemstation (Agilent). Separation was performed at 25°C using an Extended Light Path Bare Fused-Silica capillary (56cm effective length, 50µm ID). Detection was set at 206nm. Applied voltage was 30kV. Buffer solution was a mix of 80/20 V/V sodium phosphate buffer and isopropyl alcohol respectively. Time of injection was 5s, applied pressure was 50mbar. Before each sequence of analyses, capillary was conditioned by an air flush of 5min and a buffer flush of 10min. Our method included a pre-treatment step of 2min buffer flush. There was no post-treatment of the capillary. Replenishment was performed every five analyses to prevent buffer electrolysis.

2.4. Method validation

The method was validated in line with the French Good Manufacturing Practices (12), and ICH guidelines Q2 (R1) (13).

2.4.1. Linearity, accuracy and precision

Calibrators and QC samples were used to appraise linearity, accuracy and precision. Linearity was evaluated with six standard curves. Linear regression analysis was carried out on the standard curve generated by plotting peak areas ratio of atropine and ISTD versus concentration of atropine. Despite no minimal acceptable correlation factor value has been fixed by the ICH guidelines, a value of 0,99 is commonly admitted.

Intraday and between-day precisions were assessed by analysis of low, mid and high QC samples six times during the same day and on six different days, respectively. The accuracy was assessed by comparing the measured concentrations against the theoretical concentration $((1 - (\text{theoretical concentration} - \text{mean concentrations})/\text{theoretical concentration}) \times 100)$ for the 3 level QC samples. A relative standard deviation of 5% was fixed as acceptance requirement.

2.4.2. LLOD and LLOQ determination

Lower limit of detection (LLOD) was determined by the lowest atropine concentration detected. LLOD was estimated as three times the signal-to-noise ratio. The LLOD was determined by injecting atropine solutions of decreasing concentrations. Lower limit of quantification (LLOQ) was defined as the lowest concentration that can be clearly quantify. The LLOQ was estimated as three times the LLOD (13). For LLOQ, precision should be better than 20% and accuracy in the range of 80–120%.

2.4.3. Specificity and carry over

Specificity was evaluated by determining atropine concentration with and without presence of three different impurities: impurity B, tropine and tropic acid. Resolution (R_s) was calculated through the equation $R_s=2[(t_2-t_1)/(w_1+w_2)]$, where t_1 and t_2 are the migration times and w_1 and w_2 are the base peak widths of solutes 1 and 2, respectively.

Carry over was investigated by performing three blank runs after the injection of the highest concentration standard.

3. Results

3.1. Method development

During the analyses, electrical power of 1.0W and intensity of 34 μ A were obtained. Time for each analysis was around 10min. Atropine was detected around 6.8min and hyoscine around 7.5min (Figure 1). On each run, R_s between atropine and hyoscine peaks was higher than 2.5.

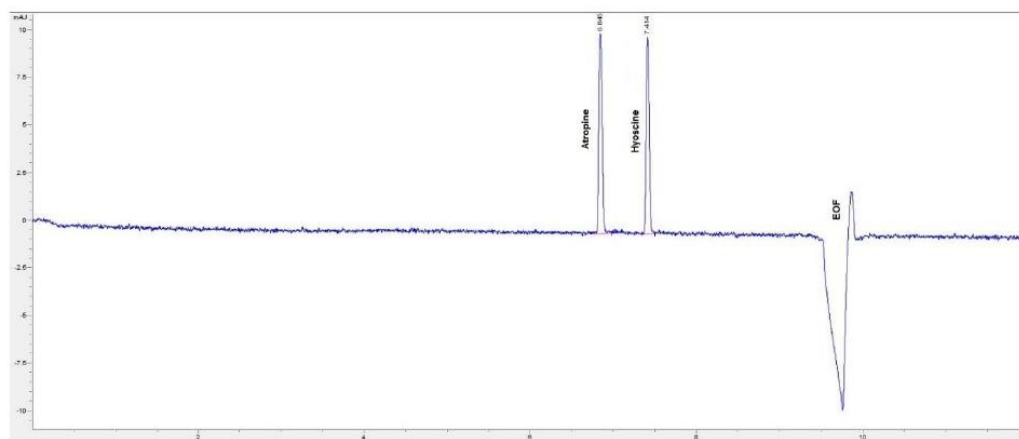


Figure 1. Typical electropherogram of atropine at 50 μ g/ml and hyoscine at 50 μ g/ml.

3.2. Linearity

The linearity of the method was evaluated on six calibration runs for concentrations from 40 µg/ml to 60 µg/ml. The results are summarized in Table I.

Table I. Calibration standards means for quantification of Atropine in eye drops (n=6)

	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5
Concentration (µg/ml)	40	45	50	55	60
Mean ± SD (µg/ml)	40.6 ± 0.83	45.3 ± 0.69	49.7 ± 0.92	54.3 ± 0.83	59.9 ± 1.20
Precision (%)	2,0	1,5	1,8	1,5	2,0
Accuracy (%)	1,57	0,75	-0,70	-1,34	-0,19

An example of calibration curve is shown on Figure 2. All correlation coefficients were between 0.99936 and 0.99999.

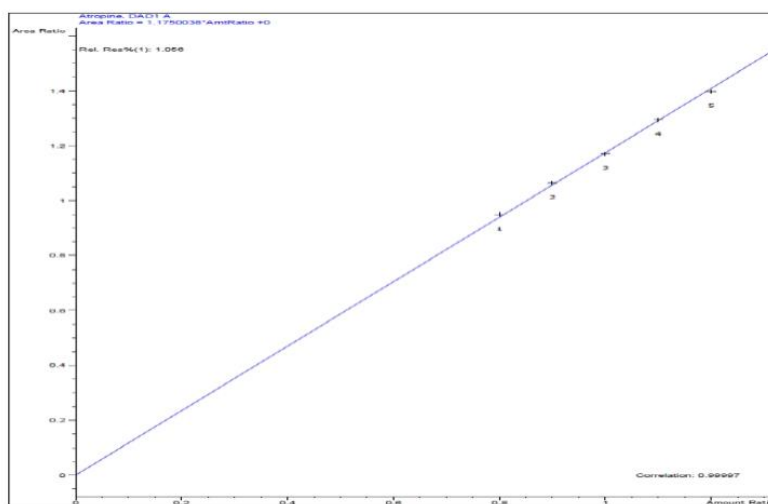


Figure 2. Example of a calibration curve of atropine

3.3. Precision, accuracy

Intraday was determined by replicate injection (n=6) for each QC concentration on the same day. Between-day was obtained by injection of each QC concentration on six different days. Results are shown on table II.

Table II. Method validation, precision and accuracy (n=6).

	Between-day			Intraday		
	Low QC	Mid-QC	High QC	Low QC	Mid-QC	High QC
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	42.5	50	57.5	42.5	50	57.5
Mean \pm SD ($\mu\text{g/ml}$)	42.1 \pm 1.3	49.8 \pm 0.9	57.5 \pm 0.6	42.0 \pm 0.5	49.9 \pm 0.4	57.6 \pm 0.3
Precision (%)	3.1	1.8	1.1	1.3	0.8	0.5
Accuracy (%)	-1.05	-0.49	0.05	-1.26	-0.22	0.15

3.4. Carry-over and specificity

After the injection of the highest concentration standard, three blank runs were performed to evaluate the carry-over. No peak was detected in the three blank runs.

Atropine quantification was also performed in presence of impurities to assess specificity. Quantification was not influenced by the presence of impurity B, tropine, or tropic acid (impurity C) (Figure 3). There is no peak for tropine because it has no chromophore group and so, tropine cannot be detected in direct mode by a DAD detector.

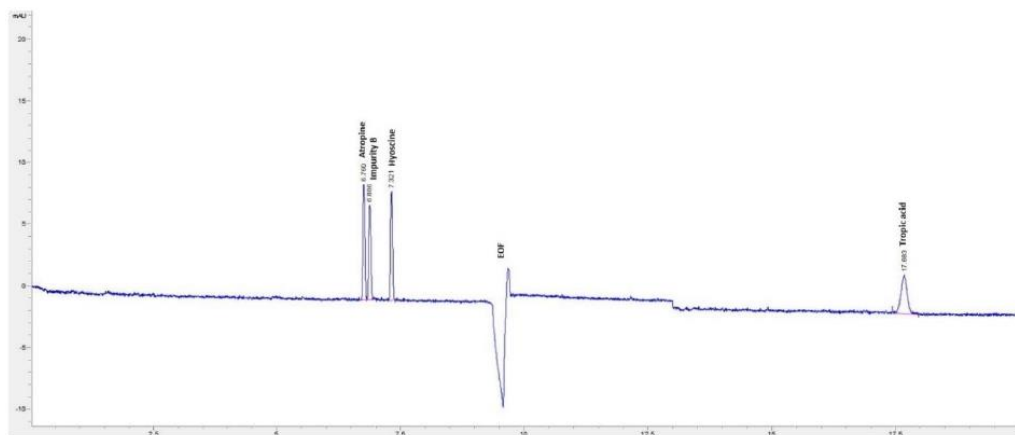


Figure 3. Typical electropherogram of atropine, hyoscine, impurity B and tropic acid. A boost of pressure was applied at 13min to detect tropic acid earlier.

3.5. LLOD and LLOQ determination

The LLOD was determined at 3.75 μ g/ml. The LLOQ was fixed at 10 μ g/ml. We obtained a mean \pm SD of 11.272 \pm 0.42 μ g/ml. Precision for LLOQ was better than 4.1% and accuracy was in the range of 87–113%.

4. Discussion and conclusions

Children's myopia is a major public health preoccupation. Of all the treatments currently available, one of the safest and effective is low concentration atropine eye-drops. These atropine eye drops are compounded in hospital pharmacies due to a lack of industrial formulations. The objective of our work was to develop a validated method for the quantification of atropine in our compounded 0.01% atropine eye-drops.

No HPLC was available in our hospital pharmacy, so CE was selected because of the compact size of the instrumentation, low cost using and efficiency. The French Academy of pharmaceutical sciences described that CE is faster than HPLC (14). We obtained a fast CE method for determining atropine concentration in eye drops with a time of analysis of 10 min,

and atropine peak detection around 7 min. It is indeed faster than the HPLC method of Berton *et al.* with an atropine detection at 9.7 min (15). Our method is slower than the method of Cherkaoui *et al.*, which obtained atropine peaks at 4 min (16). This difference in retention time can be explained by the different composition of the buffer, in particular the addition of isopropyl alcohol in our buffer.

According to the French Academy pharmaceutical sciences, CE is also cheaper than chromatography, with lower using costs due to low volumes of samples and buffer used. Volume of capillary is shorter than volume of chromatography columns. For a sequence of 5 samples analyses, our method only used 150µl of each atropine 0.01% sample, and 3.5ml of buffer. It is lower than the method described in the European pharmacopeia, with a buffer flow rate of 1ml/min in HPLC. Consequently, during a 10 min analysis the volume of buffer used in our method is three times lower.

In literature we found many studies comparing CE and HPLC, like in cosmetics, biology, or pharmaceuticals. Several studies conducted on various medicines and disinfectants such as natamycin, ketoconazole or benzyldimethyldodecylammonium bromide, support our results concerning an advantage for CE in speed and costs (17–19).

One of the limitations of CE seems to be a higher detection limit, and a lack of precision compared to HPLC. According to studies that have compared HPLC and CE, HPLC would have a higher precision, and a superior sensibility (17,18). We considered that CE precision was enough for our routine using.

Like for all analytical methods, it is very important to find the good working buffer. There were only few references in literature about atropine quantification by CE. We found in Cherkaoui *et al.* many results of their trials of many buffers. They concluded to best results with a pH around 7 (16). They used a tris buffer, titrated at pH 7 by adding sodium phosphate. We also based on the pKa of atropine and its impurities to determine the pH of our buffer, and we

found that pH 7 was central and allowed a good working ionization. That's why we chose a phosphate buffer at pH 7. We tested different solvents like methanol and isopropyl alcohol. Acetonitrile was not tested because of a physicochemical incompatibility with phosphate components. The addition of isopropyl alcohol in the phosphate buffer allowed to increase buffer viscosity and resolution, especially between atropine and impurity B. We obtained the best results at 20% V/V, after trying other concentration like 15% and 25% (data not shown).

One limitation of our method is variation in retention times, which appears to be due to the capillary conditioning and conservation. Indeed, after some time without analyses or when using a new capillary, we observed a diminution of the retention time until it stabilized. Because our atropine eye drops are a simple matrix, and we are expected only atropine and scopolamine peaks, this was not an obstacle to the validation of our quantification method, which appeared to stay reliable. The retention times changed but the peaks remained constant in their height. However, we have been working on a longer capillary conditioning time for future work.

ICH guidelines Q2 (R1) recommended to evaluate the linearity across the range of analytical procedure (13). Our atropine eyedrops had a theoretical concentration of 0.1 mg/ml but analyzed samples were half-diluted, that's why the concentration range was 0.04 mg/ml to 0.06 mg/ml, corresponding to an interval of [80%; 120%] needed for the acceptance of a pharmaceutical compounding according to European Pharmacopeia (20).

One challenge in our work was to quantify a sodium chloride high concentrated eye drops by capillary electrophoresis. Garcia *et al.* showed that high concentrations in sodium chloride decreased the peaks heights in capillary electrophoresis, made wider peaks, with longer retention times (21). Our 0.01% atropine compounded eye-drops are compounded with BSS™, that contains 6.4 mg/ml of sodium chloride. At first, pure atropine samples were analyzed, but low and wide peaks, with a bad resolution were obtained (data not shown). That's why we finally chose to work on half diluted samples, after also testing one-third dilution. Half dilution

had the best results in resolution and signal strength (data not shown). More, our method had an electrical power of 1.0W, that was the high limit before causing a Joule effect because of the high sodium concentration in buffer and samples.

This work provided a reliable quantification method of atropine eyedrops. Relative standard deviations were less than 3.1% for both intra- and between-day precision, and accuracy was within 98.7% and 100.2%. It is similar with the results obtained by Berton *et al.* with a HPLC method, with results for accuracies and precision within 3% of the expected value (15). The above values were within the acceptable range, so we considered the method was accurate and precise.

We evaluated specificity in presence of three CRS impurities: tropine, tropic acid and impurity B. According to Kirchhoff *et al.*, degradation products of atropine are mainly tropic acid, and apoatropine. Both degradation pathways produce tropine (22). The presence of these impurities didn't seem to affect the quantification of our atropine eye drops. Apoatropine (impurity A) was not tested because it was not available on the time of experimentations.

To validate our method in routine, samples from 10 compounding 0.01% atropine eyedrops were analyzed with our CE method and with the HPLC-MS method developed by our toxicology laboratory. No significantly difference in determined concentrations of the 10 atropine samples was observed between these two methods (data not shown). Advantages of in situ method were the speed of execution, specificity of the instruments, and a specific validated method. The French good manufacturing practices recommend that the control of hospital compounding should be carried out in the hospital pharmacy unit under the responsibility of the pharmacist (12). Moreover, toxicology laboratory is specialized in quantification of drugs in blood. Searched blood concentrations and method settings are very different. For example, concentration of atropine in blood in the case of an organophosphate poisoning treatment is a thousand times less than in our atropine eye drops, about 12 ng/μl (23).

To conclude, this work provided a reliable capillary electrophoresis validated method for the quantification of atropine in 0.01% atropine eyedrops. It is used in routine to determine the atropine concentration in our compounded eye drops. Although this method is currently used routinely, a work is now warranted to explore the degradation products and perform a global stability indicating study for our atropine eyedrops. Our work suggests that quantification by capillary electrophoresis could be an alternative when HPLC is not available or possible. Indeed, many active substances used in the composition of medicines can be quantified by capillary electrophoresis because of their characteristics suitable for this approach (electrophoretic mobility capacity).

1. 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*. 2016 May;123(5):1036–42.
2. World Health Organization. World report on vision. 2019;180.
3. Rudnicka AR, Kapetanakis VV, Wathern AK, Logan NS, Gilmartin B, Whincup PH, et al. Global variations and time trends in the prevalence of childhood myopia, a systematic review and quantitative meta-analysis: implications for aetiology and early prevention. *Br J Ophthalmol*. 2016 Jul;100(7):882–90.
4. 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 Dec;20(1):146.
5. Naidoo KS, Fricke TR, Frick KD, Jong M, Naduvilath TJ, Resnikoff S, et al. Potential Lost Productivity Resulting from the Global Burden of Myopia. *Ophthalmology*. 2019 Mar;126(3):338–46.
6. Huang J, Wen D, Wang Q, McAlinden C, Flitcroft I, Chen H, et al. Efficacy Comparison of 16 Interventions for Myopia Control in Children: A Network Meta-analysis. *Ophthalmology*. 2016 Apr;123(4):697–708.
7. Chua WH, Balakrishnan V, Chan YH, Tong L, Ling Y, Quah BL, et al. Atropine for the treatment of childhood myopia. *Ophthalmology*. 2006 Dec;113(12):2285–91.
8. Chia A, Chua WH, Cheung YB, Wong WL, 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*. 2012 Feb;119(2):347–54.
9. 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*. 2019 Jan;126(1):113–24.
10. Chen C, Yao J. Efficacy and Adverse Effects of Atropine for Myopia Control in Children: A Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *J Ophthalmol*. 2021;2021:4274572.
11. Chia A, Chua WH, Wen L, Fong A, Goon YY, Tan D. Atropine for the treatment of childhood myopia: changes after stopping atropine 0.01%, 0.1% and 0.5%. *Am J Ophthalmol*. 2014 Feb;157(2):451-457.e1.
12. Bonnes pratiques de préparation - ANSM [Internet]. [cited 2022 Aug 11]. Available from: <https://ansm.sante.fr/documents/referance/bonnes-pratiques-de-preparation>
13. EMA. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cited 2022 Aug 11]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures>
14. Électrophorèse — acadpharm [Internet]. [cited 2022 Aug 11]. Available from: <https://dictionnaire.acadpharm.org/w/%C3%89lectrophor%C3%A8se>

15. Berton B, Chennell P, Yessaad M, Bouattour Y, Jouannet M, Wasiak M, et al. Stability of Ophthalmic Atropine Solutions for Child Myopia Control. *Pharmaceutics*. 2020 Aug 17;12(8):781.
16. Cherkaoui S, Mateus L, Christen P, Veuthey JL. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of atropine, homatropine and scopolamine in ophthalmic solutions. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997 Aug 29;696(2):283–90.
17. Li X, Gao F, Liu H, Gao Y. Development of a capillary zone electrophoresis method to determine natamycin in food and a comparison with a liquid chromatography method. *J Sci Food Agric*. 2020 Jan 30;100(2):811–6.
18. Velikinac I, Cudina O, Janković I, Agbaba D, Vladimirov S. Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations. *Farmaco*. 2004 May;59(5):419–24.
19. Ding X, Mou S, Zhao S. Analysis of benzyldimethyldodecylammonium bromide in chemical disinfectants by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 2004 Jun 11;1039(1–2):209–13.
20. Technical guide for the elaboration of monographs. 8th edition, 2022. :75.
21. Garcia LL, Shihabi ZK. Sample matrix effects in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1993 Oct;652(2):465–9.
22. 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. *Journal of Chromatography A*. 2004 Aug;1046(1–2):115–20.
23. Thiermann H, Steinritz D, Worek F, Radtke M, Eyer P, Eyer F, et al. Atropine maintenance dosage in patients with severe organophosphate pesticide poisoning. *Toxicology Letters*. 2011 Sep;206(1):77–83.

Partie 3 : Discussion générale

1. Développement de la méthode de dosage

1.1. Optimisation des paramètres de l'électrophorèse capillaire

Le choix de l'électrophorèse capillaire comme méthode analytique de nos collyres d'atropine a été motivé d'une part par la disponibilité immédiate de l'appareil, que nous possédions dans notre unité, mais également par la compacité, la rapidité, et le coût limité de cette méthode pour un usage de routine. Ce choix s'est accompagné de contraintes auxquelles nous avons cherché des solutions.

Le principal obstacle était l'absence de référentiel pour nous guider dans ce développement de méthode, car la pharmacopée européenne repose essentiellement sur la chromatographie liquide haute performance. Afin de mettre en place notre méthode de quantification par électrophorèse capillaire, la pharmacopée européenne nous a fourni les exigences nécessaires que nous avons adaptées en nous appuyant sur la littérature scientifique. Cette recherche bibliographique nous a confirmé que l'électrophorèse capillaire est très peu utilisée dans le domaine de la production pharmaceutique. Nous avons principalement retrouvé des articles à propos de la séparation de substances actives dans des extraits de plantes ou de médicament, mais plus rarement concernant la quantification de ces substances actives. Nous avons donc dû nous baser sur un petit nombre d'article, et expérimenter différentes solutions afin de déterminer les paramètres les plus favorables en terme de séparation, de temps de migration, ou de résolution.

1.2. Choix du tampon d'électrophorèse

Nous avons en première intention utilisé un tampon phosphate à pH 7 dosé à 50 mmol/l qui semblait donner des résultats satisfaisants pour l'atropine (36). Nous obtenions des pics très larges, impliquant une faible résolution, et une très mauvaise précision. Nous avons donc choisi de rajouter un solvant dans notre tampon dans le but d'améliorer la résolution, en essayant le méthanol et l'alcool isopropylique. L'acétonitrile est à éviter avec un tampon phosphate du fait d'une incompatibilité physico-chimique provoquant une précipitation. Le méthanol n'a pas permis d'améliorer la résolution entre l'impureté B et l'atropine, contrairement à l'alcool

isopropylique qui a montré les meilleurs résultats, en affinant les pics, et en améliorant la résolution. Une des limites de l'ajout de solvant au tampon réside dans l'allongement du temps de l'analyse. Nous avons essayé différentes proportions pour trouver le bon compromis entre résolution et temps d'analyse, notamment 15% v/v (volume/volume), 20% v/v ou 25% v/v. Le tampon contenant 20% d'alcool isopropylique a fourni une résolution suffisante pour un temps d'analyse acceptable pour une utilisation en routine.

1.3. Choix des autres paramètres

En électrophorèse capillaire il est recommandé de toujours travailler avec le plus haut voltage disponible ne provoquant pas d'effet Joule. Cet effet est observé lors de l'application d'une tension trop forte, provoquant une production de chaleur et créant un différentiel de viscosité et donc de mobilité à l'intérieur du capillaire. Dans notre méthode nous avons travaillé à la tension maximale offerte par notre appareil soit 30kV, et aucun effet Joule n'a été observé. Cela est cohérent avec les paramètres décrits par Cherkaoui *et al.* (36). La puissance de 1.0W atteinte dans notre méthode, était la puissance limite du fait de la présence d'une forte concentration de sodium dans notre tampon et notre échantillon.

Nous avons également testé différentes températures (20°C, 25°C, et 30°C) afin de jouer sur la viscosité du solvant. De très bons résultats étaient obtenus avec une température de 25°C, similaires à ceux retrouvés dans la littérature (41). Du fait de sa disponibilité au sein de notre unité et de son caractère polyvalent, nous avons opté pour un capillaire de silice fondue de 56 cm de longueur effective avec un diamètre interne de 50µm.

Nous avons également choisi d'appliquer un prétraitement à ce capillaire de façon systématique avant chaque série d'analyses, afin de s'assurer de la reproductibilité de nos résultats. Le prétraitement consistait à vider le capillaire du tampon précédemment utilisé grâce à un flush (un nettoyage) d'air de 5 minutes, puis à le rincer et le remplir de tampon frais. Pour ce faire, nous appliquons un flush de 10 minutes de tampon phosphate et alcool isopropylique (80/20 v/v).

1.4. Sélectivité de la méthode

Nous avons testé notre méthode de quantification en présence et en absence de différents composés, afin de tester la sélectivité. Le choix des composés testés s'est porté sur l'acide

tropique, l'impureté B, la tropine et la scopolamine. Concernant l'acide tropique, c'est un produit de dégradation majeur de l'atropine, puisqu'il est présent dans les deux voies principales de dégradation (46).

Dans notre méthode, avec un pH de travail de 7, l'acide tropique sous forme ionisée est détecté après l'EOF, et est donc bien séparé de l'atropine. Nous avons testé la scopolamine du fait de son utilisation dans la méthode en tant qu'étalon interne. Nous avons choisi d'évaluer la sélectivité avec l'impureté B car son pic sur l'électrophérogramme était le plus proche de celui de l'atropine dans les conditions de notre méthode. Bien que la pharmacopée européenne suggère une résolution supérieure à 2,5 pour l'HPLC, il n'y a pas de référentiel exigible pour l'électrophorèse capillaire, nous avons donc estimé que la séparation des deux pics était bonne avec une résolution de 2.

Enfin, l'un des intérêts majeurs de notre méthode est de pouvoir détecter la tropine. En effet, l'électrophorèse permet la détection directe des particules, mais aussi la détection indirecte, permettant de visualiser les composés sans groupe chromophore.

Les résultats des dosages de nos collyres avec et sans ces quatre composés n'était pas significativement différents, notre méthode était donc sélective.

1.5. Préparation de l'échantillon

En électrophorèse capillaire, la concentration en ion de l'échantillon à doser influe de façon importante sur la résolution et les pics obtenus sur l'électrophérogramme. L'une des principales difficultés à laquelle nous avons été confrontés est que notre collyre comporte comme solvant du BSS™, qui par définition est très riche en ion. Les premiers essais effectués étaient donc peu concluants avec des pics très larges de forme patatoïde.

Les ions et le sodium en particulier ont été largement décrits dans la littérature comme interférant clairement avec la qualité de la séparation électrophorétique (47,48).

Nous avons donc opté pour travailler avec l'injection de l'échantillon dilué. Nous avons testé la dilution au demi, et au tiers. Les résultats obtenus après ces deux dilutions étaient bien supérieurs à la limite de quantification. Cependant, la dilution au demi permettait une meilleure séparation, et de pics bien différenciés du bruit de fond, ce qui était moins concluant avec la dilution au tiers.

Après avoir constaté des premiers résultats peu concluants en terme de linéarité, nous avons travaillé sur la formulation des points de calibration, pour se rapprocher au maximum de la composition de l'échantillon de collyre d'atropine à doser. Nous avons donc ajouté du BSS™

en proportion équivalente à celle de l'échantillon pour chaque contrôle qualité, et chaque point de calibration, zéro compris. Ceci a nettement amélioré les résultats de notre méthode, en réduisant l'effet matrice du BSS™.

L'un des points faibles de la CE étant le manque de précision, nous avons souhaité que notre méthode repose sur un étalonnage interne pour compenser cette faiblesse. L'étalon interne est un composé proche du composé d'intérêt, et qui subit toutes les étapes de la méthode. Une étude brésilienne a montré que l'incertitude lors du dosage de l'ammonium dans des cartouches pour cigarettes électronique passait de 18,6% en étalonnage externe à 13,9% avec l'utilisation d'un étalon interne. (49)

Nous avons choisi la scopolamine pour sa proximité physicochimique avec l'atropine. Le paramètre calculé était donc le rapport des aires sous la courbes de l'atropine et de la scopolamine, permettant de mettre en évidence et de corriger des erreurs de dilution, de manipulation, et de dosage.

Grâce à tous ces ajustements, nous avons obtenu une méthode fiable, rapide et efficace.

1. Intérêt et limites de l'étude

Notre étude est, à notre connaissance, la première à mettre au point et à valider une méthode de quantification de l'atropine en collyre par électrophorèse capillaire dans un usage de routine.

La particularité de notre étude n'était pas le développement d'une méthode de dosage, mais l'électrophorèse capillaire en tant qu'outil de cette méthode. Les résultats obtenus étaient amplement conformes à nos attentes. En effet nous avons obtenu une méthode rapide, avec un résultat en 10 minutes. Le pic d'atropine sortait même en moins de 7 minutes, ce qui est plus rapide que la méthode de référence par HPLC (50).

Nous avons également obtenu une méthode fiable, alliant exactitude et précision. En effet nos résultats de précision intra et inter jour remplissaient les critères fixés par les ICH (43). Cette précision n'était pas affectée par les différences de temps de rétention pour les pics entre le début et la fin du développement de méthode. En effet, une des limites de notre méthode est cette variabilité dans les temps de rétention. Cette variabilité a été grandement améliorée par l'ajout du flush d'air en prétraitement. Elle peut s'expliquer par un conditionnement insuffisant de notre capillaire, ou de longues périodes sans passage de tampon. Le flush d'air permettrait alors de vider correctement le capillaire avant de le remplir de tampon frais, ce qui est d'autant plus important qu'il contient un solvant volatil avec l'alcool isopropylique. En fin de

développement, et lors de l'utilisation en routine, nous avons remarqué une stabilisation des temps de rétention à 6,8 minutes. Nous étudierons à nouveau la variabilité des temps de rétention lors d'études ultérieures, notamment pour une prochaine étude de stabilité sur nos collyres et notre conditionnement. Néanmoins les résultats de l'étude étaient suffisamment robustes pour valider notre méthode de dosage et l'utiliser en routine.

Cette étude répondait à un besoin du service d'internaliser le contrôle de teneur de nos collyre d'atropine, néanmoins notre méthode n'est pas applicable, en l'état, à une étude de stabilité de nos collyres. Notre travail n'a, en effet, pas exploré la détection et la quantification des produits de dégradation de l'atropine. Ceci devra être mis en œuvre pour le passage de la fabrication de nos collyres sous le statut de préparation hospitalière.

L'intérêt majeur de cette étude est d'offrir une perspective d'alternative à l'HPLC dans la quantification de substances actives dans des formulations pharmaceutiques., pour des établissements dans lesquels l'HPLC ne serait pas disponible, ou trop coûteuse à l'utilisation, ou sur le dosage de produits avec un très faible échantillon disponible.

2. Perspectives

Cette étude est la première que nous avons mis en place avec notre électrophorèse capillaire. Elle devrait servir de support pour plusieurs travaux futurs :

Le développement et la conduite d'une étude de stabilité « stability-indicating » pour nos collyres d'atropine, s'appuyant sur cette méthode de dosage. En effet cette méthode a été développée dans une optique plus large d'étudier notre collyre d'atropine et son comportement dans le temps afin d'optimiser au mieux sa production.

Le développement d'autres méthodes de quantification pour des molécules différentes de l'atropine. En effet dans le secteur de pharmacotechnie, nous fabriquons également des collyres d'antibiotiques renforcés (Piperacilline, Amikacine, Vancomycine notamment) mais également d'autres formes pharmaceutiques, comme par exemple des gélules servant à la réalisation de tests allergologiques. Il est donc nécessaire de développer des méthodes de dosages pour ces produits afin de pouvoir les produire en séries sous le statut de préparation hospitalière.

THÈSE SOUTENUE PAR : François Barbier

TITRE : Electrophorèse capillaire : développement d'une méthode de dosage de l'atropine en collyre

Conclusion

Pour conclure, ce travail nous a permis de développer et valider une méthode de quantification fiable et rapide de l'atropine par électrophorèse capillaire dans les collyres à 0,01% fabriqués à la PUI du CHU de Saint-Etienne.

Bien que peu utilisée en pharmacie hospitalière, l'électrophorèse capillaire semble être un outil analytique performant, adapté aux contrôles des préparations réalisées au sein de la PUI. Cette méthode est à présent utilisée en routine à chaque campagne de fabrication. L'internalisation du contrôle de la production du secteur permet de limiter les flux logistiques, et de mieux maîtriser le circuit, de la prescription à la libération de la préparation pharmaceutique. Nous pourrions nous appuyer sur ce travail pour étendre l'utilisation de cet outil au développement et au contrôle d'autres préparations pharmaceutiques. Cette nouvelle possibilité de contrôle de notre production nous permet de répondre à des besoins existants et futurs des prescripteurs.

Enfin, nous envisageons d'augmenter de façon significative notre production, pour répondre à une demande croissante des prescripteurs du bassin stéphanois et du GHT Loire concernant les collyres d'atropine en tant que traitement efficace et sûr de la limitation de la progression de la myopie chez l'enfant. La mise en place de cette technique constituait une étape essentielle afin de déclarer l'atropine sous le statut de préparation hospitalière. Une étude de stabilité sera nécessaire pour finaliser la transition de nos collyres d'atropine à 0,01% vers ce statut.

Bibliographie

1. Myopia correction glasses on the eye chart letters background [Internet]. Adobe Stock. [cited 2022 Oct 4]. Available from: <https://stock.adobe.com/fr/contributor/203624044/ulianna19970>
2. Tkatchenko TV, Tkatchenko AV. Pharmacogenomic Approach to Antimyopia Drug Development: Pathways Lead the Way. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2019 Nov;40(11):833–52.
3. Williams KM, Verhoeven VJM, Cumberland P, Bertelsen G, Wolfram C, Buitendijk GHS, et al. Prevalence of refractive error in Europe: the European Eye Epidemiology (E3) Consortium. *Eur J Epidemiol*. 2015 Apr;30(4):305–15.
4. World Health Organization. World report on vision. 2019;180.
5. Wong HB, Machin D, Tan SB, Wong TY, Saw SM. Visual Impairment and Its Impact on Health-related Quality of Life in Adolescents. *American Journal of Ophthalmology*. 2009 Mar;147(3):505-511.e1.
6. Łazarczyk JB, Urban B, Konarzewska B, Szulc A, Bakunowicz-Łazarczyk A, Żmudzka E, et al. The differences in level of trait anxiety among girls and boys aged 13–17 years with myopia and emmetropia. *BMC Ophthalmol*. 2016 Dec;16(1):201.
7. Takashima T. The Quality of Life in Patients with Pathologic Myopia. *Japanese Journal of Ophthalmology*. 2001 Feb;45(1):84–92.
8. Narayanan A, Kumar S, Ramani KK. Spectacle Compliance among Adolescents: A Qualitative Study from Southern India. *Optom Vis Sci*. 2017 May;94(5):582–7.
9. Rustagi N, Uppal Y, Taneja D. Screening for visual impairment: Outcome among schoolchildren in a rural area of Delhi. *Indian J Ophthalmol*. 2012;60(3):203.
10. Naidoo KS, Fricke TR, Frick KD, Jong M, Naduvilath TJ, Resnikoff S, et al. Potential Lost Productivity Resulting from the Global Burden of Myopia. *Ophthalmology*. 2019 Mar;126(3):338–46.
11. 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*. 2016 May;123(5):1036–42.
12. Grzybowski A, Kanclerz P, Tsubota K, Lanca C, Saw SM. A review on the epidemiology of myopia in school children worldwide. *BMC Ophthalmol* [Internet]. 2020 Dec [cited 2022 Oct 10];20(1). Available from: <https://bmcophthalmol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12886-019-1220-0>
13. Dirani M, Crowston JG, Wong TY. From reading books to increased smart device screen time. *Br J Ophthalmol*. 2019 Jan;103(1):1–2.

14. 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*. 2017 Sep;95(6):551–66.
15. Nickels S, Hopf S, Pfeiffer N, Schuster AK. Myopia is associated with education: Results from NHANES 1999-2008. Tsai DC, editor. *PLoS ONE*. 2019 Jan 29;14(1):e0211196.
16. Katz J, Tielsch JM, Sommer A. Prevalence and risk factors for refractive errors in an adult inner city population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997 Feb;38(2):334–40.
17. Ip JM, Huynh SC, Robaei D, Rose KA, Morgan IG, Smith W, et al. Ethnic Differences in the Impact of Parental Myopia: Findings from a Population-Based Study of 12-Year-Old Australian Children. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Jun 1;48(6):2520–8.
18. Huang J, Wen D, Wang Q, McAlinden C, Flitcroft I, Chen H, et al. Efficacy Comparison of 16 Interventions for Myopia Control in Children: A Network Meta-analysis. *Ophthalmology*. 2016 Apr;123(4):697–708.
19. Correction of Myopia Evaluation Trial 2 Study Group for the Pediatric Eye Disease Investigator Group. Progressive-Addition Lenses versus Single-Vision Lenses for Slowing Progression of Myopia in Children with High Accommodative Lag and Near Esophoria. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011 Apr 25;52(5):2749–57.
20. 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*. 2021 Apr 2;1171–6.
21. Bao J, Huang Y, Li X, Yang A, Zhou F, Wu J, et al. Spectacle Lenses With Aspherical Lenslets for Myopia Control vs Single-Vision Spectacle Lenses: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol*. 2022 May 1;140(5):472.
22. Crouzet AS. Le verre Stellest d'Essilor ralentit de 67 % l'évolution de la myopie [Internet]. *L'OL MAG*. 2021 [cited 2022 Oct 4]. Available from: <https://www.opticien-presse.fr/2021/07/15/le-verre-stellest-dessilor-ralentit-de-67-levolution-de-la-myopie/>
23. Sun Y, Xu F, Zhang T, Liu M, Wang D, Chen Y, et al. Orthokeratology to Control Myopia Progression: A Meta-Analysis. Al-Ghoul KJ, editor. *PLoS ONE*. 2015 Apr 9;10(4):e0124535.
24. Santodomingo-Rubido J, Villa-Collar C, Gilmartin B, Gutiérrez-Ortega R, Sugimoto K. Long-term Efficacy of Orthokeratology Contact Lens Wear in Controlling the Progression of Childhood Myopia. *Current Eye Research*. 2017 May 4;42(5):713–20.
25. Abraham SV. Control of myopia with tropicamide. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1966 Nov;3(4):10–22.
26. Shih YF, Chen CH, Chou AC, Ho TC, Lin LLK, Hung PT. Effects of Different Concentrations of Atropine on Controlling Myopia in Myopic Children. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 1999 Feb;15(1):85–90.
27. Saw SM, Gazzard G, Au Eong KG, Tan DTH. Myopia: attempts to arrest progression. *British Journal of Ophthalmology*. 2002 Nov 1;86(11):1306–11.

28. Tan D, Tay SA, Loh KL, Chia A. Topical Atropine in the Control of Myopia: Asia-Pacific Journal of Ophthalmology. 2016;5(6):424–8.
29. Chua WH, Balakrishnan V, Chan YH, Tong L, Ling Y, Quah BL, et al. Atropine for the treatment of childhood myopia. *Ophthalmology*. 2006 Dec;113(12):2285–91.
30. Chia A, Chua WH, Cheung YB, Wong WL, 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*. 2012 Feb;119(2):347–54.
31. Chia A, Chua WH, Wen L, Fong A, Goon YY, Tan D. Atropine for the treatment of childhood myopia: changes after stopping atropine 0.01%, 0.1% and 0.5%. *Am J Ophthalmol*. 2014 Feb;157(2):451–7.
32. 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*. 2019 Jan;126(1):113–24.
33. Bonnes pratiques de préparation - ANSM [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 10]. Available from: <https://ansm.sante.fr/documents/reference/bonnes-pratiques-de-preparation>
34. Électrophorèse — acadpharm [Internet]. [cited 2022 Aug 11]. Available from: <https://dictionnaire.acadpharm.org/w/%C3%89lectrophor%C3%A8se>
35. Kizilkaya F. Investigation of electroosmotic flow dynamics and reproducibility in capillary electrophoresis [Internet] [Doctor of Philosophy]. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College; 2012 [cited 2022 Oct 10]. Available from: https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_dissertations/1721
36. Cherkaoui S, Mateus L, Christen P, Veuthey JL. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of atropine, homatropine and scopolamine in ophthalmic solutions. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997 Aug 29;696(2):283–90.
37. Lauer HH, Rosing GP. High Performance Capillary Electrophoresis. In: Agilent. 2009.
38. Jouyban A, Kenndler E. Capillary Electrophoresis with Organic Solvents in Pharmaceutical Analysis: A Systematic Guide through the Background. *CAC*. 2014 Mar 31;10(2):248–66.
39. EDQM. 11e Édition de la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) [Internet]. Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé. 2022 [cited 2022 Oct 10]. Available from: <https://www.edqm.eu/en/>
40. Rogacs A, Santiago JG. Temperature Effects on Electrophoresis. *Anal Chem*. 2013 May 21;85(10):5103–13.
41. Wehr T. Capillary Zone Electrophoresis. In: Encyclopedia of Physical Science and Technology [Internet]. Elsevier; 2003 [cited 2022 Oct 10]. p. 355–68. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012227410500079X>

42. Dong M, Wysocki J. Ultraviolet detectors: perspectives, principles, and practices. *Lc Gc North America*. 2019 Oct 1;37:750.
43. EMA. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cited 2022 Aug 11]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures>
44. PubChem. Atropine [Internet]. [cited 2022 Oct 10]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/174174>
45. PubChem. Scopolamine [Internet]. [cited 2022 Oct 10]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3000322>
46. 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. *Journal of Chromatography A*. 2004 Aug;1046(1–2):115–20.
47. Garcia LL, Shihabi ZK. Sample matrix effects in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1993 Oct;652(2):465–9.
48. Valle-Delgado JJ, Molina-Bolivar JA, Galisteo-Gonzalez F, Galvez-Ruiz MJ. Study of the colloidal stability of an amphoteric latex. *Colloid & Polymer Science*. 2003 Aug 1;281(8):708–15.
49. Oliveira EC de, Muller EI, Abad F, Dallarosa J, Adriano C. Internal standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis. *Quím Nova*. 2010;33(4):984–7.
50. Berton B, Chennell P, Yessaad M, Bouattour Y, Jouannet M, Wasiaik M, et al. Stability of Ophthalmic Atropine Solutions for Child Myopia Control. *Pharmaceutics*. 2020 Aug 17;12(8):781–98.

Serment de Galien

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



Résumé

La myopie est un problème majeur de santé publique dans le monde. L'instillation de collyres faiblement dosés en atropine constitue l'un des traitements les plus efficaces et sûrs. Cependant, en l'absence de spécialité pharmaceutique industrielle disponible sur le marché français, la fabrication de ces collyres est réalisée dans les unités de pharmacotechnie des pharmacies à usage intérieur. Afin de réaliser le contrôle de teneur directement dans les locaux de la pharmacie, nous avons développé une méthode de dosage de l'atropine en collyre par électrophorèse capillaire. Cette méthode tend à répondre aux exigences des Bonnes Pratiques de Préparation, mais aussi des lignes directrices de l'ICH. Nous avons développé une méthode de dosage par électrophorèse capillaire, fiable et rapide, qui permet de contrôler en routine nos collyres d'atropine à 0,01%, en raison de l'absence de référentiels pour cette technique. Ce travail a montré que l'électrophorèse capillaire est utilisable dans le dosage de composés pharmaceutiques, et pourrait constituer une alternative à l'HPLC. Le développement de cette méthode de dosage était une étape indispensable pour passer à une production en série, mais une étude de stabilité sera nécessaire pour finaliser cette transition, puis envisager de l'appliquer à d'autres molécules.

Mots-clés

- Électrophorèse capillaire
- Atropine
- Collyre
- Méthode de dosage
- Myopie