

GERPAC – Octobre 2010

TOXICITE DES FORMULATIONS OPHTALMIQUES



Pr Patrice RAT

Laboratoire de Toxicologie

C-TAC/ Chimie et Toxicologie Analytique et Cellulaire

Faculté de Pharmacie (Université Paris Descartes)

Patrice.rat@parisdescartes.fr

COMMENT ÉVALUER LE POTENTIEL CYTOTOXIQUE DE FORMULATIONS OPHTALMIQUES ?

Quelques exemples
extraits

→ D'Observations au Centre Hospitalier
National d'Ophtalmologie des 15/20 – Paris.

→ Cas de Pharmaco/Matériovigilances évalués
avec l'AFSSaPS DLC

COMMENT ÉVALUER LE POTENTIEL CYTOTOXIQUE DE FORMULATIONS OPHTALMIQUES ?

- 1)- Evaluer la formulations
(principe actif, excipients ..)
- 2)- prendre en compte la spécificité et la
sensibilité des cellules oculaires cibles
- 3)- Influence des solvants utilisés
- 4)- Influence des flacons utilisés/ formulations

1)- EVALUER LA FORMULATION

→ Matières premières/ Labo Pharmaceutiques

→ Spécialités Commercialisées
ex. forme injectable



ADAPTATION
vers une formulation
ophtalmique
→ RISQUES DE TOXICITÉ

A)- CAS PHARMACOVIGILANCE COLLYRES ANTIGLAUCOMATEUX

→ Collyres Antiglaucomateux (1^{er} génération)
Timolol

On observe après plusieurs semaines de TT

- Irritations / conjonctivites
- sensation de brûlure/ picotements

→ INTOLERANCE au traitement

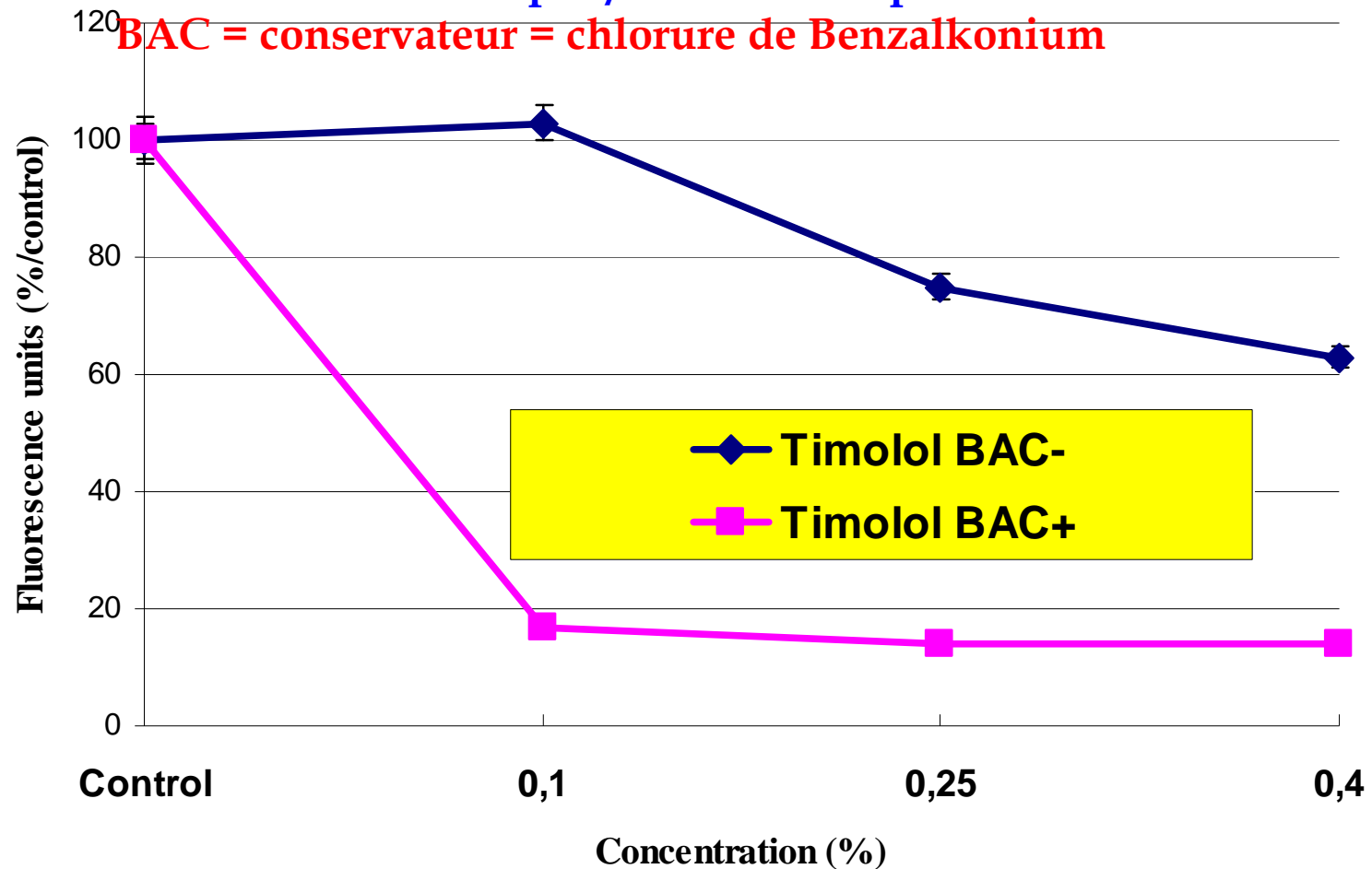
→ NON OBSERVANCE avec risque de cécité par
augmentation de la Pression intraOculaire PIO

Viabilité Cellulaire (NR test) Sur cellules conjonctivales humaines

Collyre antiglaucomeux au TIMOLOL

- Incubation de 15 minutes avec les collyres
- PUIS 24h de repos / vérifier si le phénomène est réversible

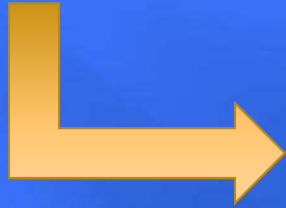
BAC = conservateur = chlorure de Benzalkonium



1)- EVALUER LA FORMULATION

→ **SPÉCIALITÉS COMMERCIALISÉS** (ex f. injectable)

- BAC : 0,1-0,01% → **peu ou pas de Toxicité**



UNE FORMULATION OPHTALMIQUE

→ **RISQUES DE TOXICITÉ**

- BAC 0,1-0,01% → **Nécrose +++**

- BAC 0,01- 0,0001% → **Nécrose +**

→ **APOPTOSE RETARDÉE**

- diminution de la croissance cellulaire
- condensation nucléaire
- diminution de l'activité mitochondriale
- fragmentation de l'ADN
- surproduction Radicale

pour des Conc. 50-100 fois inférieures/ f. injectable

QU'EN EST-IL EN CLINIQUE ?

→ PHÉNOMÈNES RETARDÉS :

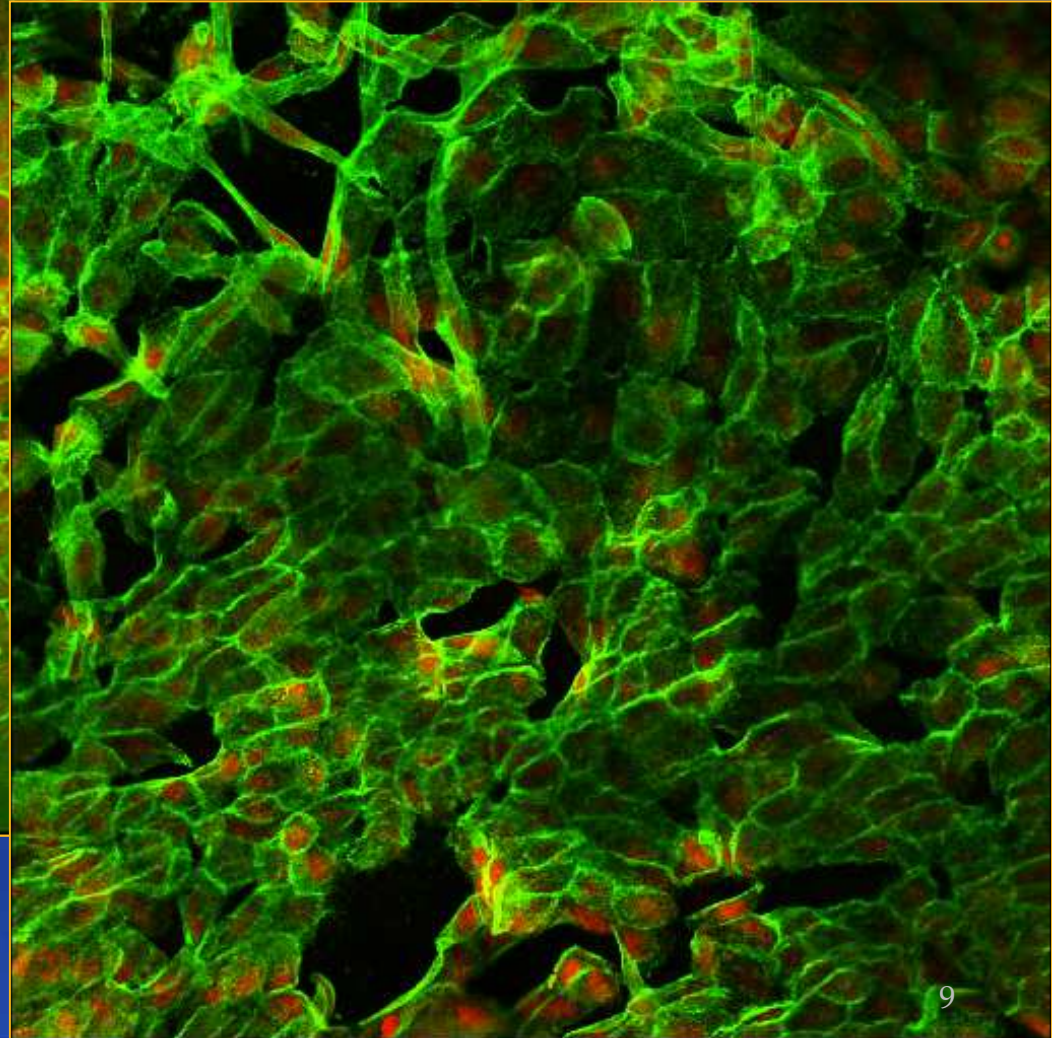
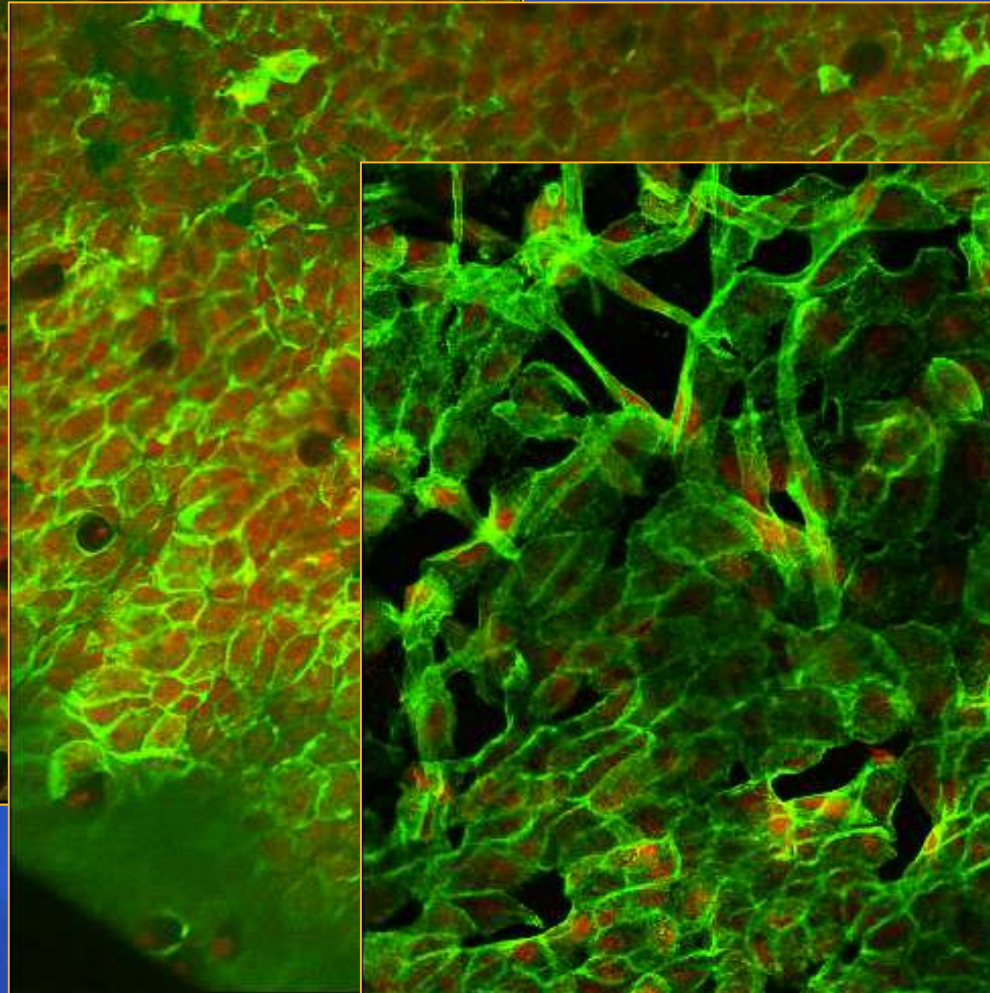
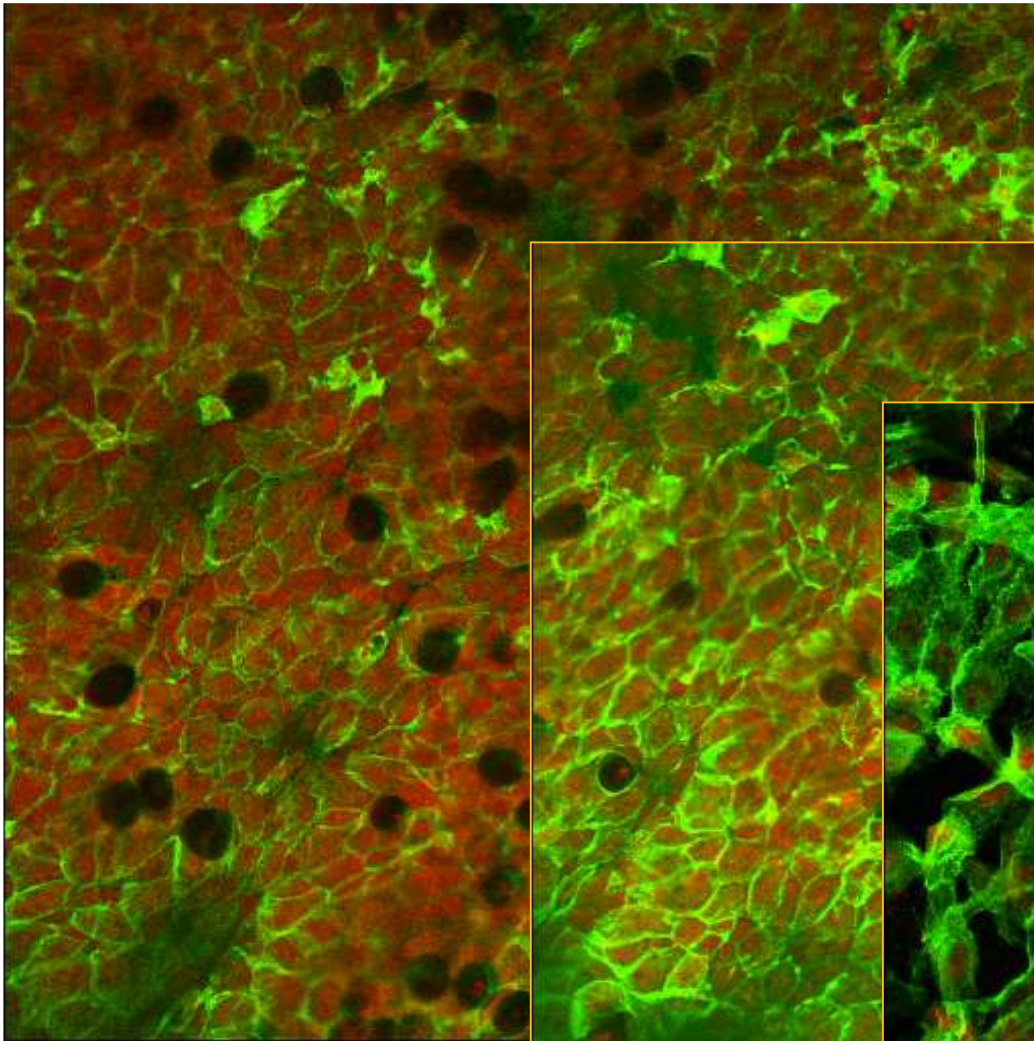
-IRRITATIONS/ SÉCHERESSE OCULAIRE /
DOULEURS...

apparaissent après plusieurs semaines/ mois de traitement

→ COLLYRE ANTIGLAUCOMATEUX AVEC CONSERVATEURS

→ MÉCANISME DE TOXICITÉ RETARDÉ ?

Pour mieux comprendre
Observations sur
EMPREINTES CONJONCTIVALES HUMAINES



1)- EVALUER LA FORMULATIONS

→ Une forme injectable sans effet toxique

N'est pas une référence pour produire une formulation oculaire bien toléré.

→ **IMPORTANCE des Excipients et conservateurs (Chlorure de Benzalkonium)**

→ Une formulation inerte sur des tissus vasculaires peut apparaître toxique sur les cellules de la surface oculaire

→ **il faut prendre en compte la spécificité des cellules oculaires.**

COMMENT ÉVALUER LE POTENTIEL CYTOTOXIQUE DE FORMULATIONS OPHTALMIQUES ?

- 1)- Evaluer la formulations
(principe actif, excipients ..)
- 2)- prendre en compte la spécificité et la sensibilité des cellules oculaires cibles
- 3)- Influence des solvants utilisés
- 4)- Influence des flacons utilisés/ formulations

Surface Oculaire

Très sensible aux agents toxiques

CELLULES CONJONCTIVALES

- **Privilège immunitaire** déclenchement de mécanismes immuno-inflammatoires sans coopération cellulaire (Ex marqueur HLA_{dr})
- **Richesse en récepteurs de mort** et inflammation
- **Grande sensibilité** aux stress pour de très faibles concentrations

Surface Oculaire

Très sensible aux agents toxiques

ETUDE CYTOTOXICITÉ- MOLECULE X

→ PEAU FIBROBLASTES

KERATINOCYTES 24 H contact min

→ Foie -Hépatocytes 4-24h

→ Œil - Cell. Conjonctivales 15 min/

cellules oculaires : **détection précoce et grande sensibilité** aux stress pour de très faibles concentrations

Pharmacovigilance : Collyre Fluoroquinolones

→ PERFORATIONS CORNÉENNES

→ CYTOLYSES BRUTALES

→ QUELQUES JOURS APRES LE DÉBUT DU
TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE

→ RÔLE DES FLUOROQUINOLONES ?

→ MECANISMES DE TOXICITE ?

Rôle du BAC / Colyres fluoroquinolones ==> *apoptose* sur cellules de cornée / conjonctive

Dutot et al.

IOVS, July 2006, Vol. 47, No. 7

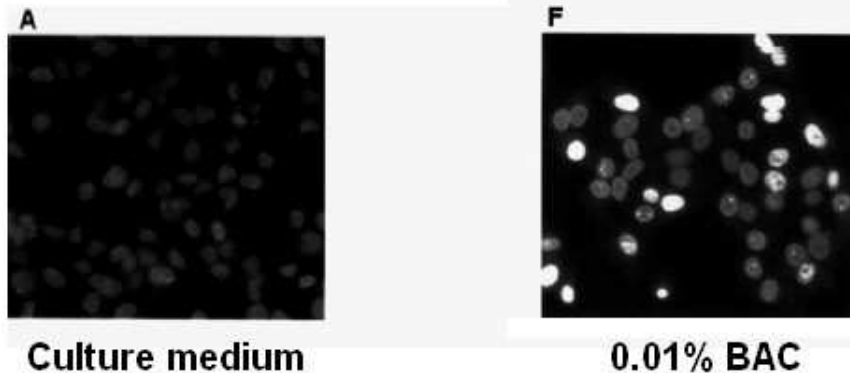
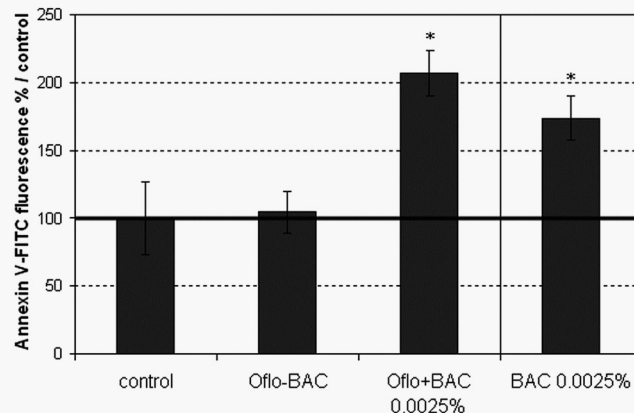


FIGURE 7. Evaluation of chromatin condensation with Hoechst 33342 test after 15 minutes of incubation with unpreserved (B), preserved ofloxacin (C) and different concentrations of BAC: (D) 0.0025%, (E) 0.005%, and (F) 0.01%. (A) Control culture. Preserved ofloxacin and different concentrations of BAC showed a characteristic concentration-dependent apoptotic chromatin condensation. Magnification, $\times 200$.

Condensation de la chromatine

(test ADN/ Hoechst 33342)

BAC = Chlorure de Benzalkonium

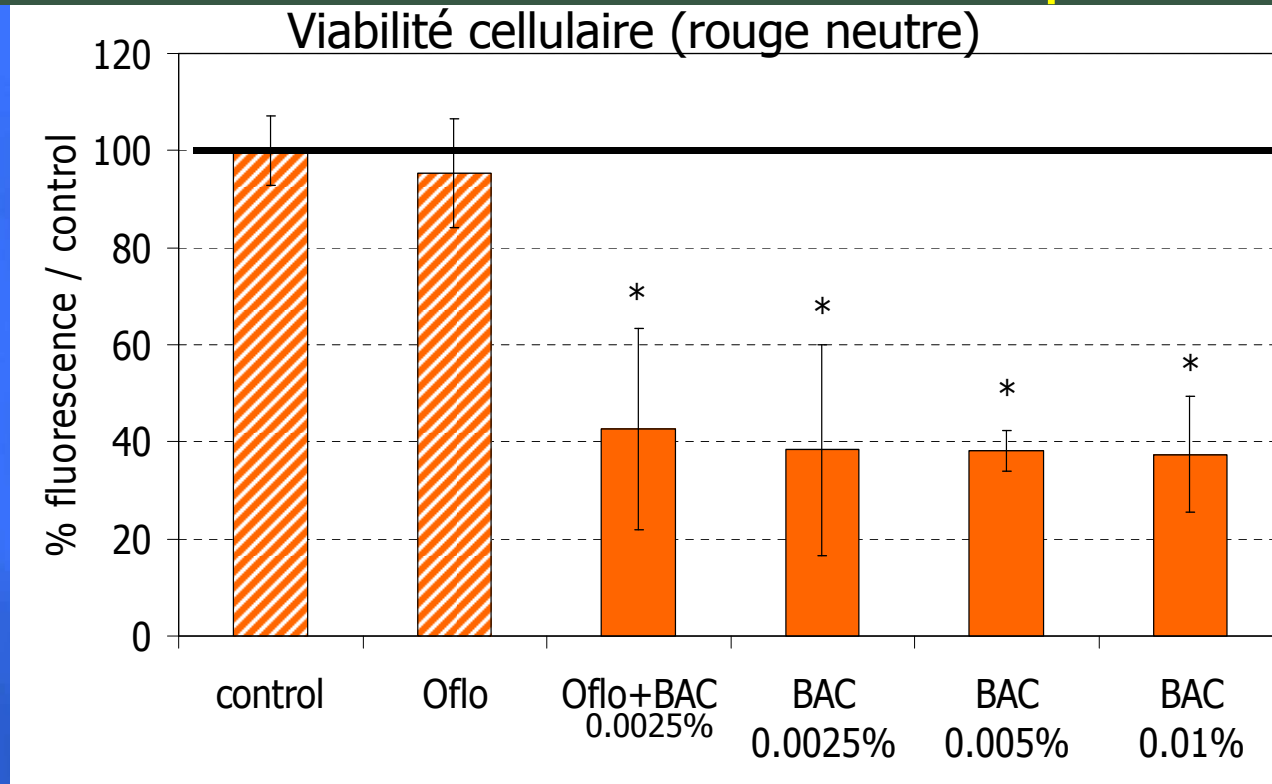


==> Rôle des
Conservateurs /apoptose
Translocation des
Phosphatidylserine (test
Annexin V)

=> Publié dans IOVS Jul. 2006

Collyre à l'ofloxacine et cellules cornéennes

15 minutes de contact + 24h récupération



Oflo : ofloxacine (fluoroquinolone)

BAC : chlorure de benzalkonium (conservateur)



- Perte de Viabilité Cellulaire

- Stress oxydant : production d'ERO/ d'anion superoxyde
➔ Mécanisme / Dégénérescence Cellulaire Brutale ?

PATHOLOGIES INFLAMMATOIRES et DEGENERATIVES

ARTICULATIONS

SYSTEME NERVEUX

POLYARTHRITE
RHUMATOIDE

NEURODEGENERESCENCE

Dell'Antonio *et al.*, 2000

**Récepteur de mort
Cytolytique P2X7**

Le Feuvre *et al.*, 2002
Paravatheni *et al.*, 2003

⇒ Prob :P2X7 inconnu dans l'œil

⇒ Notre Hypoth: Rôle P2X7 dans cytolyses Oculaires?

BAC : Chl. Benzalkonium

Rôle du conservateur BAC dans l'activation de P2X7

(test yopro-1)

→ conc X 2 -
Activation 900->5500

→ Récepteur de seuil

→ Imp Collyres sans
conservateur

Figure 5a

conjonctive

+5500 %

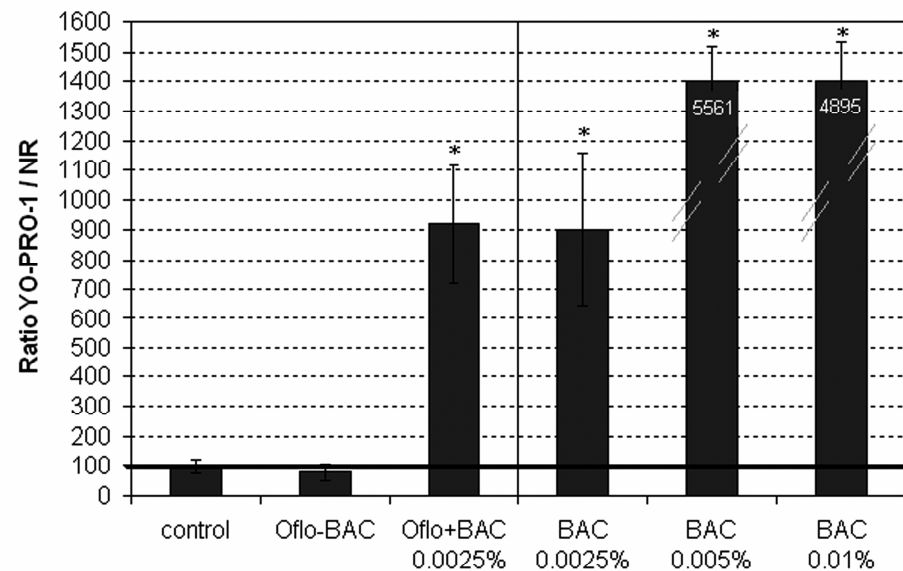
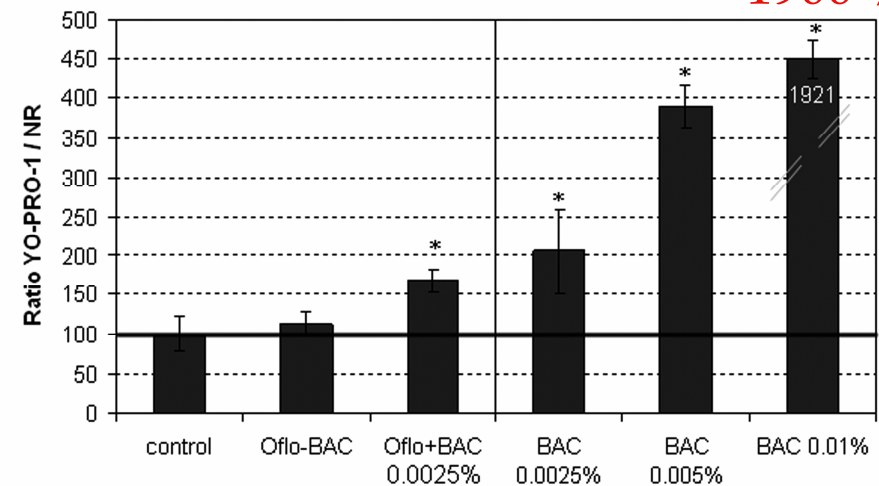


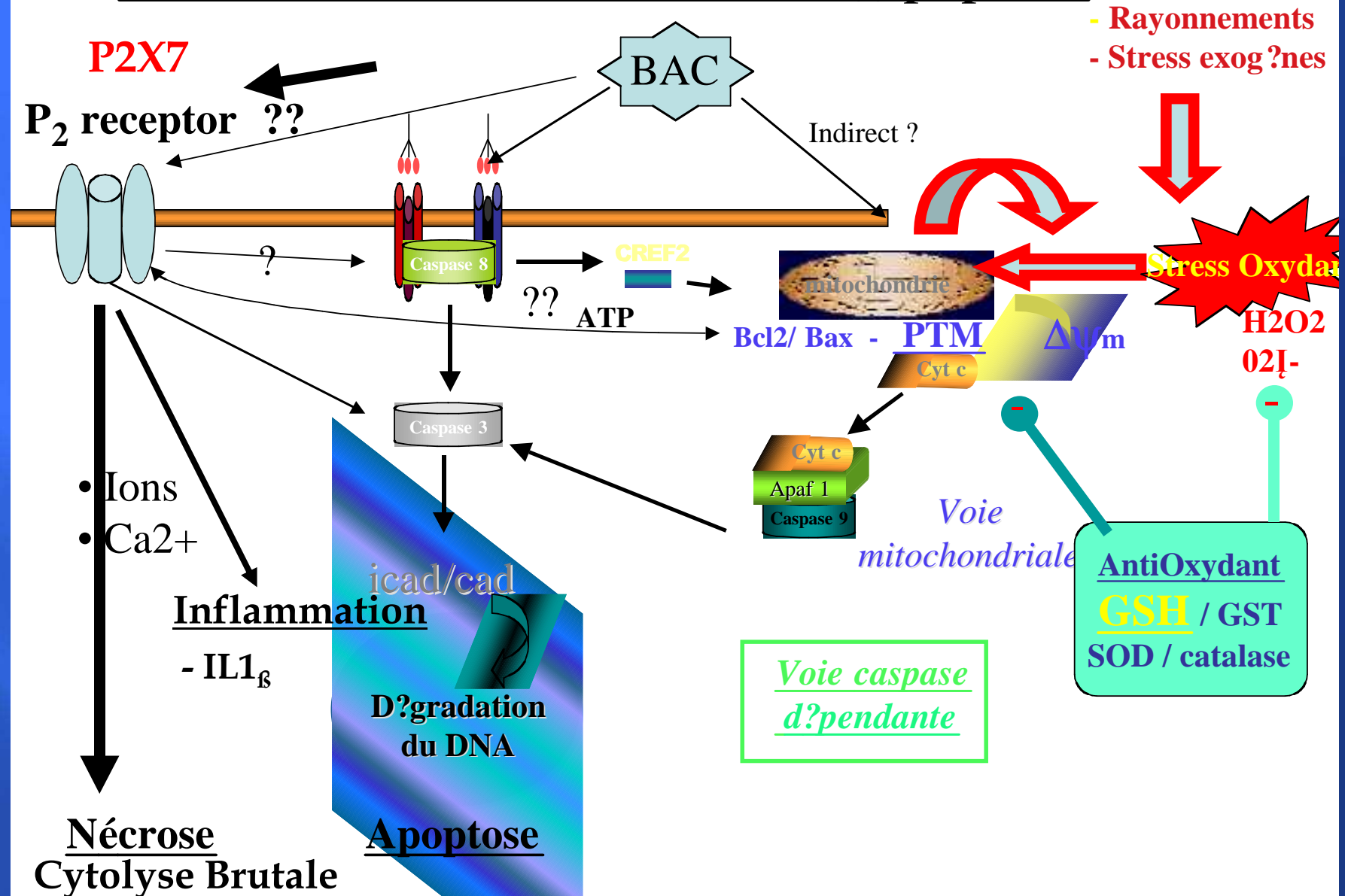
Figure 5b

Cornée

+1900 %



Surface oculaire : les voies de l'apoptose



ROLE Du Récepteur de Mort P2X7 dans différents mécanismes de TOXICITE

==> Médicaments

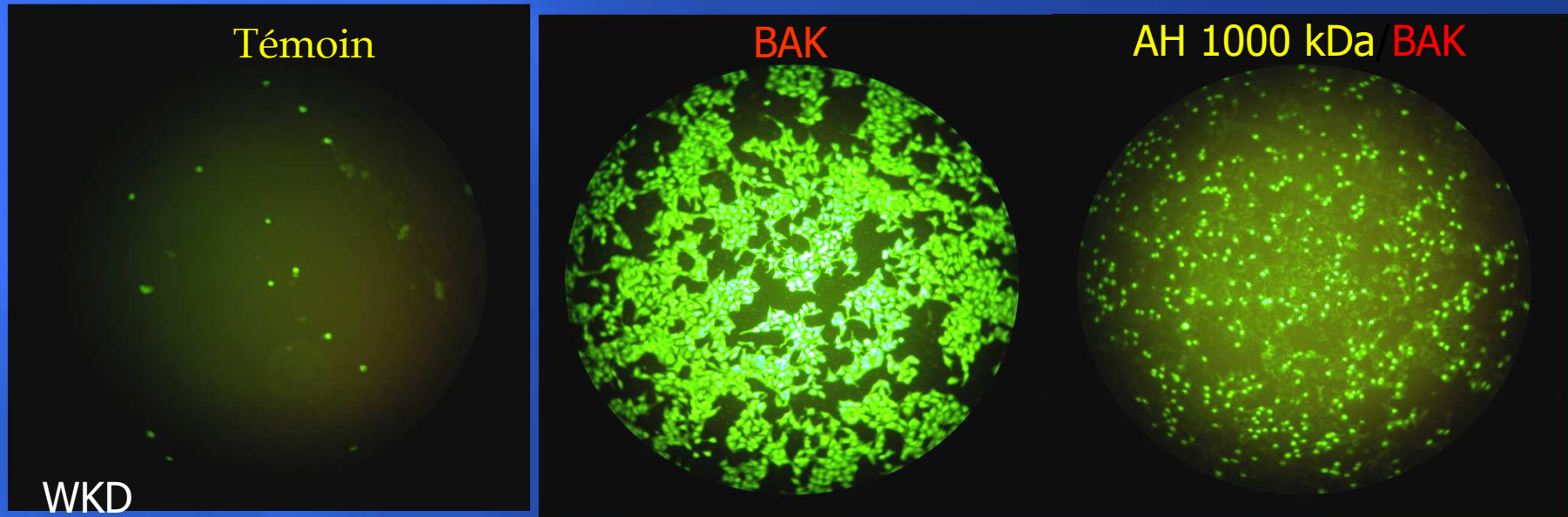
- Fluoroquinolones collyres (BAC)
- Antiglaucomateux collyres
- Chloroquine (toxicité rétinienne)

==> Dispositifs médicaux (avec AFSSaPS)

- Tolérance des Implants
- produits multifonctions lentilles de contact
 - => Intolérance Lentilles de contact

Activation et modulation des récepteurs de mort et de dégénérescence P2X7

Microscopie en fluorescence



Test au YO-PRO-1

AH1000 : Formulation Hyaluronans modifiés de Haut poids moléculaire :

→ Effet anti P2X7

→ Effet cytoprotecteur /- limitation de certains mécanismes de toxicité

COMMENT ÉVALUER LE POTENTIEL CYTOTOXIQUE DE FORMULATIONS OPHTALMIQUES ?

- 1)- Evaluer la formulations
(principe actif, excipients ..)
- 2)- prendre en compte la spécificité et la sensibilité des cellules oculaires cibles
- 3)- Influence des solvants utilisés
- 4)- Influence des flacons utilisés/ formulations

MATÉRIOVIGILANCE :

=> FORMULATIONS INTRAOCULAIRES

→ On observe des mécanismes d'inflammation intraoculaire / CRISTALLIN, suite à l'utilisation

- d'implants **intraoculaires** en seringues autoinjectables ou de
- **formulations intraoculaires en seringues préremplies**

→ Enquête :

- **analyse des formulations (principe actif/ Excipients) OK**
- **Analyse des matériaux des seringues utilisées OK**
- **Analyse des SOLVANTS et liquides de transport utilisés ...**

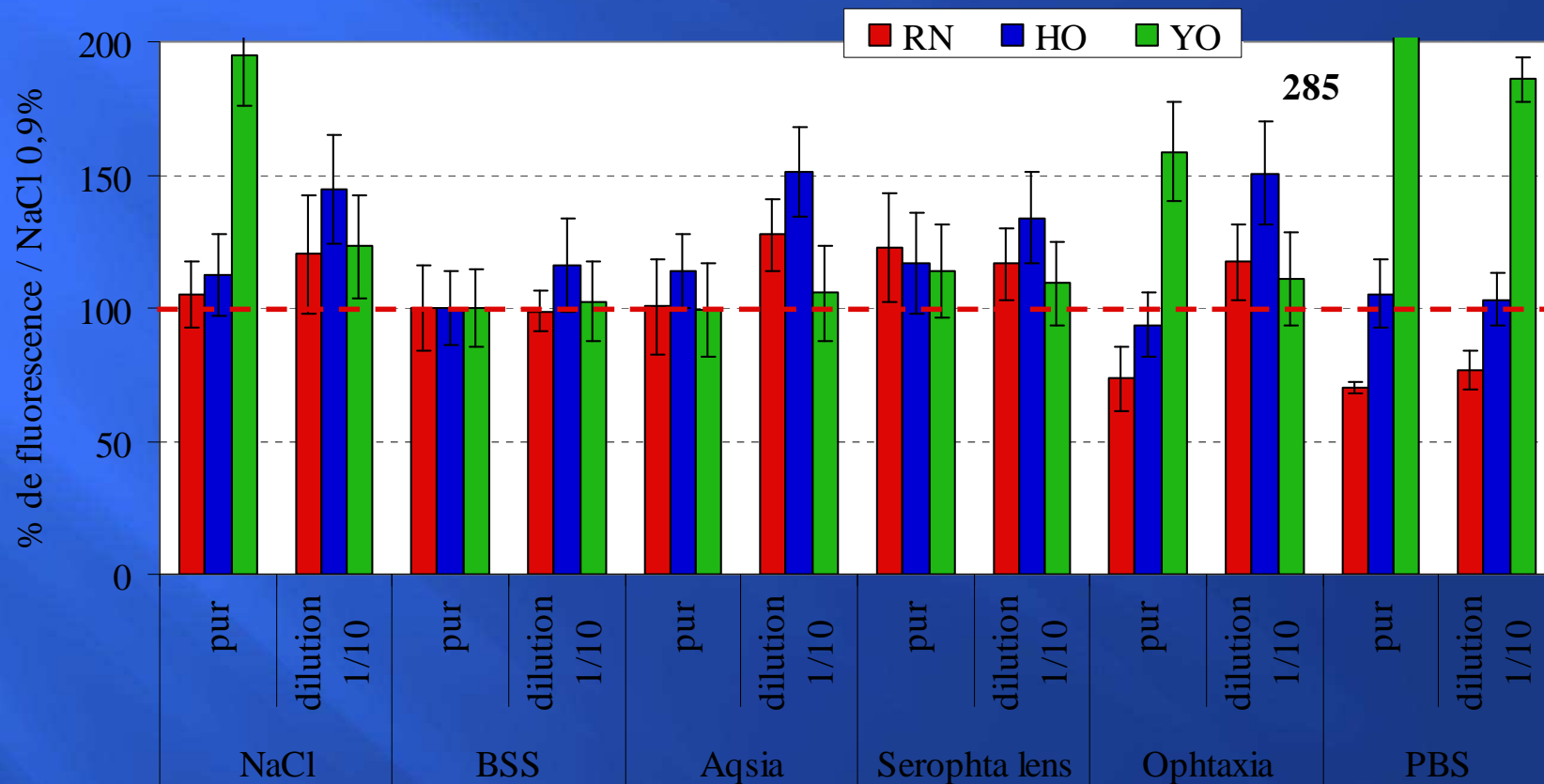
Problème : test sur des cellules du cristallin mais

notre témoin négatif donne une réponse surprenante

EFFETS DE SOLUTIONS SALINES SUR LES CELLULES HUMAINES DU CRISTALLIN (INCUBATION 3H)

EN ROUGE – Viabilité Cellulaire / **EN BLEU** condensation chromatine ADN

●●●**EN VERT** – Activation recepteurs mort P2X7 ●●●



Activation P2X7 avec **NaCl à 0,9%** - **Ophtaxia** - **PBS**
baisse viabilité **Ophtaxia** et **PBS**

EFFETS DE SOLUTIONS SALINES SUR LES CELLULES HUMAINES DU CRISTALLIN

Le NaCl 0,9 % n'est pas cytotoxique en général mais il réagit sur les cellules du cristallin avec activation des récepteurs de mort P2X7

→ Le remplacement du NaCl par du BSS dans les formulations en cause à suffi à supprimer les problèmes observés *

→ Les récepteurs P2X7 , les cellules trabéculaires, et les cellules du cristallin sont sensibles à une **Homeostasie ionique** riche en cations divalents

→ Des solvants Riches en cations (Mg^{2+} / Ca^{2+} / Zn^{2+}) seront **privilegiés** (tampon BSS) comparativement au solvant NaCl 0,9%

1990-95/ chirurgie de la cataracte

 **Inflammations post Op** suite au rinçage par NaCl 0,9%.
Ces problèmes sont à l'origine de la création des solutions
Tampon BSS pour rinçage intraoculaire (Chir. cristallin)

COMMENT ÉVALUER LE POTENTIEL CYTOTOXIQUE DE FORMULATIONS OPHTALMIQUES ?

- 1)- Evaluer la formulations
(principe actif, excipients ..)
- 2)- prendre en compte la spécificité et la sensibilité des cellules oculaires cibles
- 3)- Influence des solvants utilisés
- 4)- Influence des flacons utilisés/ formulations

MATÉRIOVIGILANCE :

=> IMPLANT INTRAOCULAIRE

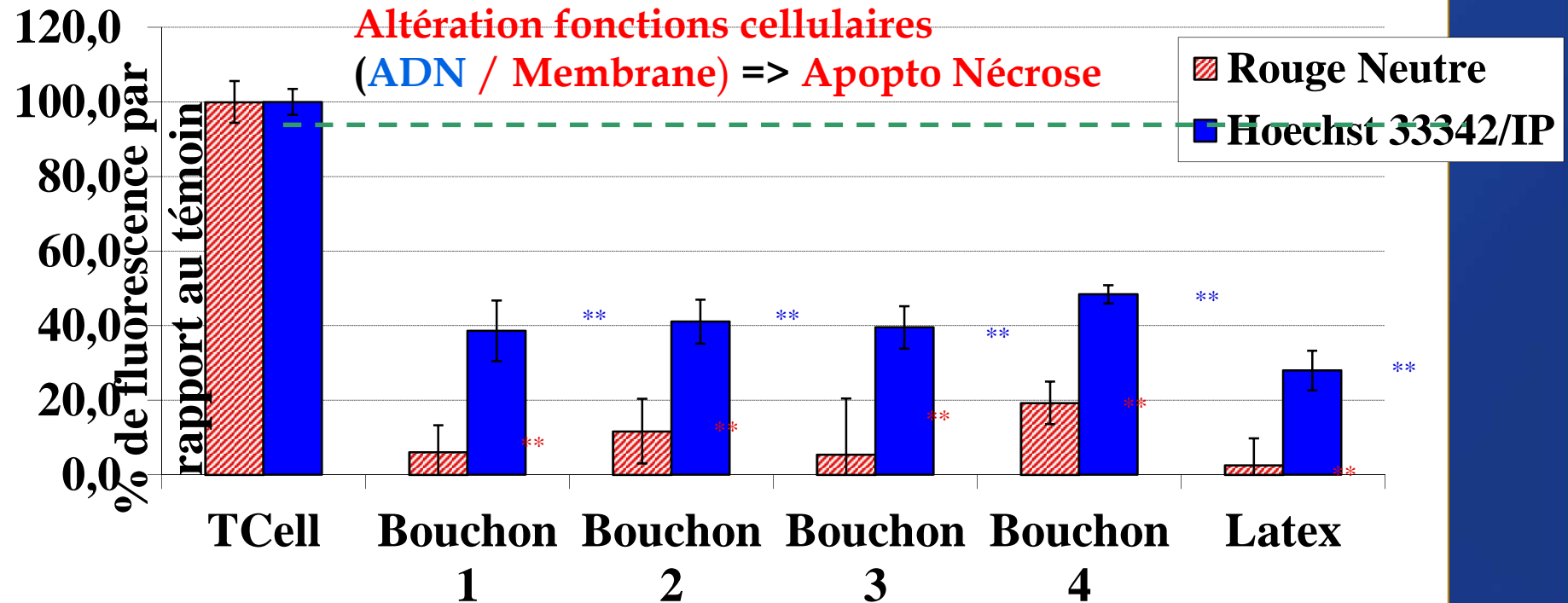
-Implants Cristallin (chirurgie cataracte)

Implants mis dans des petits flacons injectables

- INFLAMMATION / Rétraction du sac capsulaire
syndromes TASS (Toxic Anterior Segment Syndrome),
- Nécessite nouvelle opération
avec nettoyage sac capsulaire et explantation
- Enquête :
 - analyse de l'implant OK
 - analyse du liquide de transport OK
 - Analyse du flacon utilisé (Fl. Injectable) ...

MATÉRIOVIGILANCE :

=> RÔLE DU BOUCHON / FL. INJECTABLE



→ **Flacon injectable** agréé pour Voie injectable

Pas de flacon, spécifique pour formulations intraoculaires

→ **Elution du bouchon** (48h)– Libération du particules qui réagissent sur cellules humaines du cristallin (SRA) en 30 min

→ **Même problème avec 4 marques d'implants** mais le même bouchon en ChroroButyl Elastomère (agréé /injectable)

CONCLUSION

→ Pour une Formulation Oculaire :

ATTENTION CONSERVATEURS (Chl. Benzalkonium)

→ SURFACE OCULAIRE :

SPECIFICITE et GRANDE SENSIBILITE pour
Différents agents toxiques à de très faibles concentration

→ RICHESSE/ RECEPTEURS de MORT et de
DEGENERESCENCE

→ APOPTOSE RETARDEE

plusieurs semaines/ mois après le début du traitement

→ CYTOLYSE BRUTALE

→ ATTENTION AU SOLVANTS et AU FLACONNAGE
(Bouchon) POUR LES FORMES INTRAOCULAIRES

TESTER LA CYTOTOXICITÉ D'UNE FORMULATION OCULAIRE FINALE

→ MISE EN PLACE DE NOUVELLES NORMES AVEC L'AFSSAPS DLC

→ DÉRIVÉS DE LA NORME ISO 10993-5 POUR L'ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ OCULAIRE (NÉCROSE/ APOPTOSE/ AUTOPHAGIE)

→ FORMULATIONS AQUEUSES

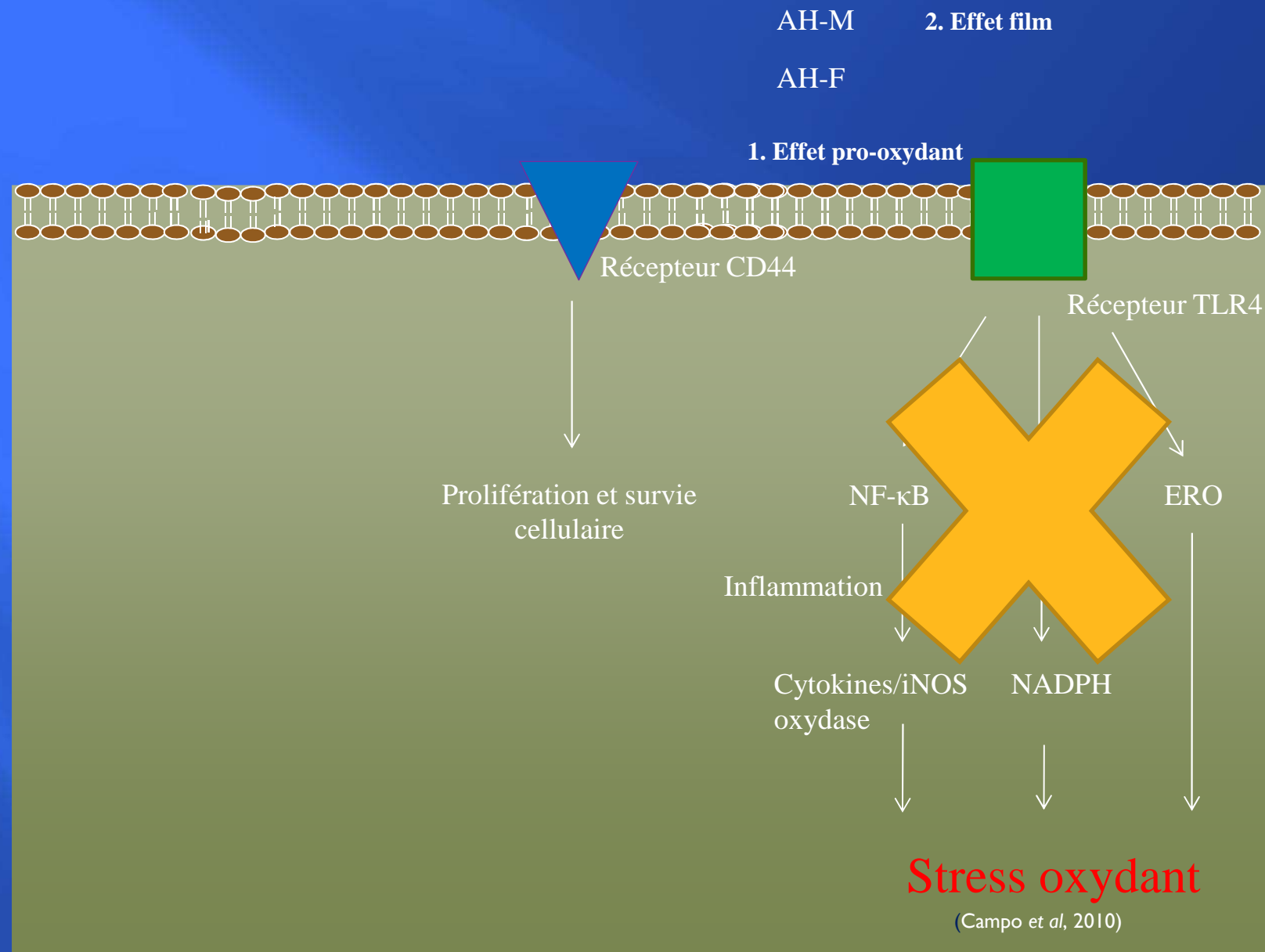
→ FORMULATIONS HUILEUSES

PLUS D'INFOS

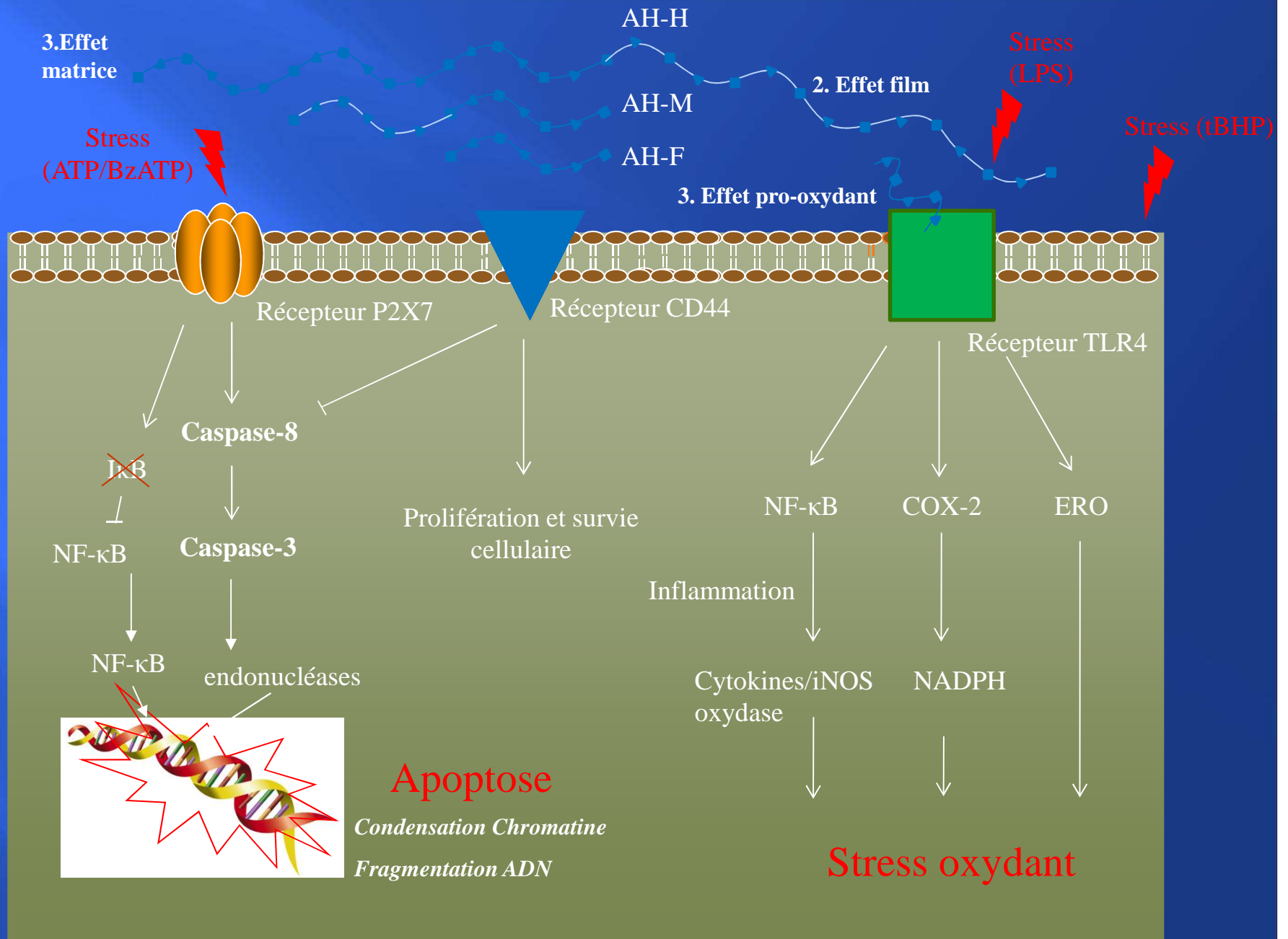
Laboratoire C-TAC (Faculté Pharmacie –P aris5
Chimie et Toxicologie Analytique et cellulaire
patrice.rat@parisdescartes.fr

MERCI
DE VOTRE ATTENTION

DISCUSSION



Effets de l'AH sur des récepteurs colocalisés au récepteur CD44



Effets de l'AH sur des récepteurs colocalisés au récepteur CD44

OXIDATIVE STRESS AND HYALURONAN

