

UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTES DE MEDECINE

ANNEE 2013

2013 TOU3 1536

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

MEDECINE SPECIALISEE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement
par

Myriam CASSAGNE

Interne des Hôpitaux

le 18 septembre 2013

CROSSLINKING TRANS-EPITHELIAL DU COLLAGENE
CORNEEN: EVALUATION PRE-CLINIQUE DE
L'IONTOPHORESE

Directeurs de thèse : Dr Vincent SOLER
Pr Pierre FOURNIE

JURY

Monsieur le Professeur François MALECAZE

Président

Monsieur le Professeur Jean-Louis ARNE

Assesseur

Monsieur le Professeur Pierre FOURNIE

Assesseur

Madame le Docteur Camille LAURENT

Assesseur

Monsieur le Docteur Vincent SOLER

Suppléant



**TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2012**

Professeurs honoraires

Doyen Honoraire	M. LAZORTES G.	Professeur Honoraire	M. PONTONNIER
Doyen Honoraire	M. PUEL P.	Professeur Honoraire	M. CARTON
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL	Professeur Honoraire	Mme PUEL J.
Doyen Honoraire	M. LAZORTES Y.	Professeur Honoraire associé	M. GOUZI
Professeur Honoraire	M. CHAP H.	Professeur Honoraire	M. DUTAU
Professeur Honoraire	M. COMMANAY	Professeur Honoraire	M. PONTONNIER
Professeur Honoraire	M. CLAUDX	Professeur Honoraire	M. PASCAL
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE	Professeur Honoraire	M. MURAT
Professeur Honoraire	Mme ENJALBERT	Professeur Honoraire	M. SALVADOR M.
Professeur Honoraire	M. GAYRAL	Professeur Honoraire	M. SOLEILHAVOUP
Professeur Honoraire	M. PASQUIE	Professeur Honoraire	M. BONEU
Professeur Honoraire	M. RIBAUT	Professeur Honoraire	M. BAYARD
Professeur Honoraire	M. SARRASIN	Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE
Professeur Honoraire	M. GAY	Professeur Honoraire	M. FABIÉ
Professeur Honoraire	M. ARLET J.	Professeur Honoraire	M. BARTHE
Professeur Honoraire	M. RIBET	Professeur Honoraire	M. CABARROT
Professeur Honoraire	M. MONROZIES	Professeur Honoraire	M. GHISOLFI
Professeur Honoraire	M. MIGUERES	Professeur Honoraire	M. DUFFAUT
Professeur Honoraire	M. DALOUS	Professeur Honoraire	M. ESCAT
Professeur Honoraire	M. DUPRE	Professeur Honoraire	M. ESCANDE
Professeur Honoraire	M. FABRE J.	Professeur Honoraire	M. SARRAMON
Professeur Honoraire	M. FEDOU	Professeur Honoraire	M. CARATERO
Professeur Honoraire	M. LARENG	Professeur Honoraire	M. CONTÉ
Professeur Honoraire	M. DUCOS	Professeur Honoraire	M. ALBAREDE
Professeur Honoraire	M. GALINIER	Professeur Honoraire	M. PRIS
Professeur Honoraire	M. LACOMME	Professeur Honoraire	M. CATHALA
Professeur Honoraire	M. BASTIDE	Professeur Honoraire	M. BAZEX
Professeur Honoraire	M. COTONAT	Professeur Honoraire	M. ADER
Professeur Honoraire	M. DAVID	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE
Professeur Honoraire	Mme DIDIER	Professeur Honoraire	M. CARLES
Professeur Honoraire	M. GAUBERT	Professeur Honoraire	M. LOUVET
Professeur Honoraire	M. GUILHEM	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ
Professeur Honoraire	Mme LARENG M.B.	Professeur Honoraire	M. VAYSSE
Professeur Honoraire	M. BES	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. GUITARD
Professeur Honoraire	M. GARRIGUES	Professeur Honoraire	M. LAZORTES F.
Professeur Honoraire	M. REGNIER	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. CERENE
Professeur Honoraire	M. REGIS	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL
Professeur Honoraire	M. ARBUS	Professeur Honoraire	M. HOFF
Professeur Honoraire	M. LARROUY	Professeur Honoraire	M. REME
Professeur Honoraire	M. PUJOL	Professeur Honoraire	M. FAUVEL
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI	Professeur Honoraire	M. BOCCALON
Professeur Honoraire	M. RUMEAU	Professeur Honoraire	M. FREXINOS
Professeur Honoraire	M. PAGES	Professeur Honoraire	M. CARRIERE
Professeur Honoraire	M. BESOMBES	Professeur Honoraire	M. MANSAT M.
Professeur Honoraire	M. GUIRAUD	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. SUC	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC
Professeur Honoraire	M. COSTAGLIOLA	Professeur Honoraire	M. DELSOL
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE	Professeur Honoraire	Mme ARLET

Professeurs émérites

Professeur GHISOLFI	Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL
Professeur LARROUY	Professeur COSTAGLIOLA
Professeur ALBAREDE	Professeur L. LARENG
Professeur CONTÉ	Professeur JL. ADER
Professeur MURAT	Professeur Y. LAZORTES
Professeur MANELFE	Professeur H. DABERNAT
Professeur LOUVET	Professeur F. JOFFRE
Professeur SOLEILHAVOUP	Professeur B. BONEU
Professeur SARRAMON	Professeur J. CORBERAND
Professeur CARATERO	Professeur JM. FAUVEL

P.U. - P.H.
Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ADOUE D.	Médecine Interne, Gériatrie
M. AMAR J.	Thérapeutique
M. ARNE J.L. (C.E)	Ophthalmologie
M. ATTAL M. (C.E)	Hématologie
M. AVET-LOISEAU H.	Hématologie
M. BLANCHER A.	Immunologie (option Biologique)
M. BONNEVILLE P.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.
M. BOSSAVY J.P.	Chirurgie Vasculaire
M. BROUSSET P. (C.E)	Anatomie Pathologique
M. BUGAT R. (C.E)	Cancérologie
M. CARRIE D.	Cardiologie
M. CHAP H. (C.E)	Biochimie
M. CHAUVEAU D.	Néphrologie
M. CHOLLET F. (C.E)	Neurologie
M. CLANET M. (C.E)	Neurologie
M. DAHAN M. (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DALY-SCHVEITZER N.	Cancérologie
M. DEGUINE O.	O. R. L.
M. DUCOMMUN B.	Cancérologie
M. FERRIERES J.	Epidémiologie, Santé Publique
M. FRAYSSE B. (C.E)	O.R.L.
M. IZOPET J.	Bactériologie-Virologie
M. LIBLAU R.	Immunologie
M. LANG T.	Biostatistique Informatique Médicale
M. LANGIN D.	Biochimie
M. LAUQUE D.	Médecine Interne
M. MAGNAVAL J.F.	Parasitologie
M. MALAUAUD B.	Urologie
M. MARCHOU B.	Maladies Infectieuses
M. MONROZIES X.	Gynécologie Obstétrique
M. MONTASTRUC J.L. (C.E)	Pharmacologie
M. MOSCOVICI J.	Anatomie et Chirurgie Pédiatrique
Mme MOYAL E.	Cancérologie
Mme NOURHASHEMI F.	Gériatrie
M. OLIVES J.P.	Pédiatrie
M. OSWALD E.	Bactériologie-Virologie
M. PARINAUD J.	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.
M. PERRET B. (C.E)	Biochimie
M. POURRAT J.	Néphrologie
M. PRADERE B.	Chirurgie Générale
M. QUERLEU D. (C.E)	Cancérologie
M. RAILHAC J.J. (C.E)	Radiologie
M. RASCOL O.	Pharmacologie
M. RISCHMANN P. (C.E)	Urologie
M. RIVIERE D.	Physiologie
M. SALES DE GAUZY J.	Chirurgie Infantile
M. SALLES J.P.	Pédiatrie
M. SERRE G. (C.E)	Biologie Cellulaire
M. TELMON N.	Médecine Légale
M. TREMOULET M.	Neurochirurgie
M. VINEL J.P. (C.E)	Hépatogastro-entérologie

P.U. - P.H.
2ème classe

Mme BEYNE-RAUZY O.	Médecine Interne
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie
M. BRASSAT D.	Neurologie
M. BUREAU Ch	Hépatogastro-entéro
M. CALVAS P.	Génétique
M. CARRERE N.	Chirurgie Générale
Mme CASPER Ch.	Pédiatrie
M. CHAIX Y.	Pédiatrie
M. COGNARD C.	Neuroradiologie
M. FOURCADE O.	Anesthésiologie
M. FOURNIE B.	Rhumatologie
M. FOURNIÉ P.	Ophthalmologie
M. GEERAERTS T.	Anesthésiologie - réanimation
Mme GENESTAL M.	Réanimation Médicale
Mme LAMANT L.	Anatomie Pathologique
M. LAROCHE M.	Rhumatologie
M. LAUWERS F.	Anatomie
M. LEOBON B.	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. MANSAT P.	Chirurgie Orthopédique
M. MAZIERES J.	Pneumologie
M. MOLINIER L.	Epidémiologie, Santé Publique
M. PARANT O.	Gynécologie Obstétrique
M. PARIENTE J.	Neurologie
M. PATHAK A.	Pharmacologie
M. PAUL C.	Dermatologie
M. PAYOUX P.	Biophysique
M. PAYRASTRE B.	Hématologie
M. PERON J.M.	Hépatogastro-entérologie
M. PORTIER G.	Chirurgie Digestive
M. RECHER Ch.	Hématologie
M. RONCALLI J.	Cardiologie
M. SANS N.	Radiologie
M. SELVES J.	Anatomie Pathologique
M. SOL J-Ch.	Neurochirurgie
Mme WEBER-VIVAT M.	Biologie cellulaire

P.U.

M. OUSTRIC S.	Médecine Générale
---------------	-------------------

P.U. - P.H.
Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ABBAL M.	Immunologie
M. ALRIC L.	Médecine Interne
M. ARLET Ph. (C.E)	Médecine Interne
M. ARNAL J.F.	Physiologie
Mme BERRY I.	Biophysique
M. BOUTAULT F. (C.E)	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
M. BUSCAIL L.	Hépatogastro-Entérologie
M. CANTAGREL A.	Rhumatologie
M. CARON Ph.	Endocrinologie
M. CHAMONTIN B. (C.E)	Thérapeutique
M. CHAVOIN J.P. (C.E)	Chirurgie Plastique et Reconstructive
M. CHIRON Ph.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mlle DELISLE M.B. (C.E)	Anatomie Pathologie
M. DIDIER A.	Pneumologie
M. DURAND D. (C.E)	Néphrologie
M. ESCOURROU J. (C.E)	Hépatogastro-Entérologie
M. FOURTANIER G. (C.E)	Chirurgie Digestive
M. GALINIER M.	Cardiologie
M. GERAUD G.	Neurologie
M. GLOCK Y.	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GRAND A. (C.E)	Epidémiol. Eco. de la Santé et Prévention
Mme HANAIRE H.	Endocrinologie
M. LAGARRIGUE J. (C.E)	Neurochirurgie
M. LARRUE V.	Neurologie
M. LAURENT G. (C.E)	Hématologie
M. LEVADE T.	Biochimie
M. MALECAZE F. (C.E)	Ophthalmologie
Mme MARTY N.	Bactériologie Virologie Hygiène
M. MASSIP P.	Maladies Infectieuses
M. MAZIERES B.	Rhumatologie
M. PESSEY J.J. (C.E)	O. R. L.
M. PLANTE P.	Urologie
M. PUGET J. (C.E.)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. RAYNAUD J-Ph.	Psychiatrie Infantile
M. REME J.M.	Gynécologie-Obstétrique
M. RITZ P.	Nutrition
M. ROCHE H. (C.E)	Cancérologie
M. ROSTAING L.	Néphrologie
M. ROUGE D. (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU H.	Radiologie
M. SALVAYRE R. (C.E)	Biochimie
M. SCHMITT L. (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD J.M.	Pharmacologie
M. SERRANO E.	O. R. L.
M. SOULIE M.	Urologie
M. SUC B.	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER M.T.	Pédiatrie
M. VELLAS B. (C.E)	Gériatrie

P.U. - P.H.
2ème classe

M. ACCADBLE F.	Chirurgie Infantile
M. ACAR Ph.	Pédiatrie
Mme ANDRIEU S.	Epidémiologie
M. BERRY A.	Parasitologie
M. BONNEVILLE F.	Radiologie
M. BROUCHET L.	Chir. Thoracique et cardio-vasculaire
M. BUJAN L.	Uro-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE A.	Médecine Vasculaire
M. CHAYNES P.	Anatomie
M. CHAUFOUR X.	Chirurgie Vasculaire
M. CONSTANTIN A.	Rhumatologie
M. COURBON	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI M.	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN C.	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DE BOISSESON X.	Médecine Physique et Réadaptation
M. DECRAMER S.	Pédiatrie
M. DELABESSE E.	Hématologie
M. DELORD JP.	Cancérologie
M. ELBAZ M.	Cardiologie
M. GALINIER Ph.	Chirurgie Infantile
M. GARRIDO-STŌWHAS I.	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET A.	Anatomie Pathologique
M. GOURDY P.	Endocrinologie
M. GROLLEAU RAOUX J.L.	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD R.	Cancérologie
M. KAMAR N.	Néphrologie
M. LAFOSSSE JM.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. LEGUEVAQUE P.	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. MARQUE Ph.	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MAZEREUEW J.	Dermatologie
M. MINVILLE V.	Anesthésiologie Réanimation
M. MUSCARI F.	Chirurgie Digestive
M. OTAL Ph.	Radiologie
M. ROLLAND Y.	Gériatrie
M. ROUX F.E.	Neurochirurgie
M. SAILLER L.	Médecine Interne
M. SOULAT J.M.	Médecine du Travail
M. TACK I.	Physiologie
M. VAYSSIERE Ch.	Gynécologie Obstétrique
M. VERGEZ S.	O.R.L.
Mme URO-COSTE E.	Anatomie Pathologique

Professeur Associé de Médecine Générale
Dr VIDAL M.

Professeur Associé en Soins Palliatifs
Dr MARMET Th.

Professeur Associé de Médecine du Travail
Dr NIEZBORALA M.

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN
37, allées Jules Guesde – 31062 Toulouse Cedex

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE- RANGUEIL
133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE cedex

M.C.U. - P.H.

M. APOIL P. A	Immunologie
Mme ARNAUD C.	Epidémiologie
M. BIETH E.	Génétique
Mme BONGARD V.	Epidémiologie
Mme COURBON C.	Pharmacologie
Mme CASPAR BAUGUIL S.	Nutrition
Mme CASSAING S.	Parasitologie
Mme CONCINA D.	Anesthésie-Réanimation
M. CONGY N.	Immunologie
M. CORRE J.	Hématologie
M. COULAIS Y.	Biophysique
Mme DAMASE C.	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY I.	Physiologie
Mme DELMAS C.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme DE-MAS V.	Hématologie
M. DUBOIS D.	Bactériologie-Virologie
Mme DUGUET A.M.	Médecine Légale
Mme DULY-BOUHANICK B.	Thérapeutique
M. DUPUI Ph.	Physiologie
Mme FAUVEL J.	Biochimie
Mme FILLAUX J.	Parasitologie
M. GANTET P.	Biophysique
Mme GENNERO I.	Biochimie
M. HAMDI S.	Biochimie
Mme HITZEL A.	Biophysique
M. JALBERT F.	Stomato et Maxillo Faciale
M. KIRZIN S.	Chirurgie Générale
Mme LAPEYRE-MESTRE M.	Pharmacologie
M. LAURENT C.	Anatomie Pathologique
Mme LE TINNIER A.	Médecine du Travail
M. LOPEZ R.	Anatomie
M. MONTOYA R.	Physiologie
Mme MOREAU M.	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
M. PILLARD F.	Physiologie
Mme PRERE M.F.	Bactériologie Virologie
Mme PUISSANT B.	Immunologie
Mme RAGAB J.	Biochimie
Mme RAYMOND S.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY F.	Biochimie
Mme SAUNE K.	Bactériologie Virologie
M. SOLER V.	Ophthalmologie
Mme SOMMET A.	Pharmacologie
M. TAFANI J.A.	Biophysique
Mlle TREMOLLIÈRES F.	Biologie du développement
M. TRICOIRE J.L.	Anatomie et Chirurgie Orthopédique
M. VINCENT C.	Biologie Cellulaire

M.C.U. - P.H.

Mme ABRAVANEL F.	Bactério. Virologie Hygiène
Mme ARCHAMBAUD M.	Bactério. Virologie Hygiène
M. BES J.C.	Histologie - Embryologie
M. CMBUS J.P.	Hématologie
Mme CANTERO A.	Biochimie
Mme CARFAGNA L.	Pédiatrie
Mme CASSOL E.	Biophysique
Mme CAUSSE E.	Biochimie
M. CHASSAING N	Génétique
Mme CLAVE D.	Bactériologie Virologie
M. CLAVEL C.	Biologie Cellulaire
Mme COLLIN L.	Cytologie
M. DEDOUIT F.	Médecine Légale
M. DE GRAEVE J.S.	Biochimie
M. DELOBEL P.	Maladies Infectieuses
M. DELPLA P.A.	Médecine Légale
M. EDOUARD T	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Y.	Médecine du travail
Mme ESCOURROU G.	Anatomie Pathologique
Mme GALINIER A.	Nutrition
Mme GARDETTE V.	Epidémiologie
Mme GRARE M.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER C.	Anatomie Pathologique
M. HUYGHE E.	Urologie
Mme INGUENEAU C.	Biochimie
M. LAHARRAGUE P.	Hématologie
M. LAPRIE Anne	Cancérologie
M. LEANDRI R.	Biologie du dével. et de la reproduction
M. MARCHEIX B.	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mme MAUPAS F.	Biochimie
M. MIEUSSET R.	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme PERIQUET B.	Nutrition
Mme PRADDAUDE F.	Physiologie
M. PRADERE J.	Biophysique
M. RAMI J.	Physiologie
M. RIMAILHO J.	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES M.	Anatomie - Chirurgie orthopédique
M. TKACZUK J.	Immunologie
M. VALLET P.	Physiologie
Mme VEZZOSI D.	Endocrinologie
M. VICTOR G.	Biophysique
M.C.U.	
M. BISMUTH S.	Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr MESTHÉ P.
Dr STILLMUNKES A.
Dr BRILLAC Th.
Dr ABITTEBOUL Y.

Dr ESCOURROU B.
Dr BISMUTH M.
Dr BOYER P.

Décembre 2013

A notre maître et président de jury,

Monsieur le Professeur François MALECAZE

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier en Ophtalmologie

Chef de service hospitalier

Vous nous faites l'honneur de présider à notre jury de thèse.

Votre dynamisme, votre enthousiasme et votre persévérance pour mener à bien tous les projets forcent le respect et sont source d'inspiration.

La transmission de votre savoir et de votre expérience en particulier dans le domaine de la chirurgie réfractive dans lequel vous bénéficiez d'une reconnaissance scientifique nationale et internationale, est une chance qui n'a pas de prix.

A notre maître et membre de jury,

Monsieur le Professeur Jean-Louis ARNE

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier en Ophtalmologie

Nous vous remercions d'avoir accepté de siéger à notre jury de thèse.

Nous avons eu le privilège de commencer l'internat en bénéficiant de votre enseignement, de la transmission de votre analyse clinique et de votre expérience chirurgicale.

Votre vaste expertise en ophtalmologie inspire la plus profonde admiration.

A notre maître et directeur de thèse,

Monsieur le Professeur Pierre FOURNIE

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier en Ophtalmologie

Votre dextérité chirurgicale mais aussi l'amplitude de vos connaissances théoriques forcent l'admiration et constituent un objectif ambitieux à atteindre.

Nous vous remercions pour les conseils toujours bien appropriés lors de ce travail, tant sur le versant expérimental que pour l'écriture de l'article scientifique puis de cette thèse.

A notre maître et membre de jury,

Madame le Docteur Camille LAURENT

Maître de Conférence des Universités

Praticien Hospitalier en Anatomo-pathologie

Ce travail nous a permis de vous rencontrer et de découvrir vos compétences mais aussi vos qualités humaines, notamment de dynamisme. Nous vous remercions pour la clarté de vos explications dans votre domaine qui nous ont permis de comprendre et d'adapter en retour les expérimentations animales. Nous vous remercions pour votre implication dans cette étude.

Nous vous souhaitons de poursuivre brillamment votre carrière et cela sera pour nous un grand plaisir de collaborer avec vous sur de nouveaux projets.

A notre maître et directeur de thèse,

Monsieur le Docteur Vincent Soler
Maître de Conférence des Universités
Praticien Hospitalier en Ophtalmologie

Nous avons débuté l'ophtalmologie alors que vous commenciez le clinicat. C'est avec une grande disponibilité que vous nous avez formée et transmis de solides bases pour exercer notre spécialité.

Votre simplicité et votre humour rendent le travail agréable à vos côtés.

L'éclectisme de vos connaissances, votre soif d'apprendre mais aussi vos qualités humaines ne peuvent que vous permettre de continuer brillamment votre carrière.

Nous vous remercions pour vos conseils dans l'écriture de ce travail.

A nos maîtres d'internat,

Les Professeurs CARLES, Alain DIDIER et Julien MAZIERES, service de Pneumologie

Votre accompagnement dans nos débuts, au sortir de l'externat, en tant que « faisant fonction d'interne » et votre transmission du sens clinique et de la prise en charge globale du patient sont des valeurs que nous nous efforcerons de garder.

Les Professeurs Jean-Pierre VINEL et Jean-Marie PERON, service d'hépatogastro-entérologie de Purpan,

Vous nous avez transmis la rigueur clinique et l'intérêt pour l'analyse critique d'articles scientifiques qui resteront les bases de notre future bonne pratique.

Le Professeur Jean LAGARRIGUE et Franck ROUX, service de Neurochirurgie de Purpan,

Vous nous avez bien intégrée dans votre service et transmis les bases chirurgicales de cette belle et difficile spécialité, tout en sachant qu'elle ne serait pas la notre. Nous vous sommes reconnaissant de cette ouverture à une « culture générale » de la chirurgie.

Le Professeur Isabelle COCHEREAU, service d'ophtalmologie de la Fondation Rothschild à Paris,

Nous vous remercions de l'accueil dans votre équipe et de nous avoir permis de découvrir une structure et un fonctionnement hospitalier différent. Vous avez su nous apprendre à rester pragmatique dans toutes situations cliniques ou chirurgicales. Ce stage a été un enrichissement.

Aux médecins et aînés qui m'ont formée,

Le Docteur Marie MITTAINÉ, service de Pneumologie,

Merci pour ta bonne humeur, ton encadrement et ta confiance pendant mon stage de « faisant fonction d'interne ».

Le Docteur Sergio BOETTO, service de Neurochirurgie de Purpan,

Tes compétences chirurgicales indéniables sont complétées par tes grandes qualités humaines (disponibilité, écoute, patience et humour). Merci pour ton accueil.

Le Docteur Julien DOUAT,

Un grand merci pour ce coup de fil, en août 2008, sans lequel je n'écrirai pas cette thèse aujourd'hui. Merci pour ta formation, ton dynamisme et ton « esprit festif » à l'internat de Tarbes.

Le Docteur Solange MOALIC,

Un grand merci pour ta disponibilité, tes conseils, ta confiance et ta volonté de transmettre ton savoir.

Le Docteur Jean-Claude QUINTYN,

Merci pour les cours du lundi soir et pour ta patience au bloc opératoire lors de mon début d'internat, qui ont contribué à un apprentissage plus rapide de l'ophtalmologie.

Le Docteur Corinne PONCHEL,

Merci pour ta confiance pour ma première cataracte en solo et sans chef en salle.

Le Docteur Véronique PAGOT-MATHIS,

Merci de m'avoir fait découvrir la chirurgie de la rétine.

Avec tout mon respect et ma gratitude pour le Pr André Mathis qui m'a permis de réaliser mon rêve de rentrer dans le cursus d'ophtalmologie.

Le Docteur Laurence MAHIEU,

Ta rigueur et ton empathie dans la prise en charge des patients sont pour moi une source d'inspiration.

Le Docteur Eric GABISON, service d'Ophtalmologie de la Fondation Rothschild,

Tes connaissances infinies, ta minutie chirurgicale et tes capacités de travail forcent l'admiration. Mais tes qualités ne s'arrêtent pas là : tu es également un modèle d'humanisme et de compassion avec les patients. Un grand merci pour tout ce que tu m'as appris.

Le Docteur Serge DOAN, service d'Ophtalmologie de la Fondation Rothschild,

Merci pour la transmission de ton savoir et de ta rigueur dans l'analyse clinique de la surface oculaire. L'ambiance musicale jazzy de tes blocs et de tes consultations restera un excellent souvenir.

Le Docteur Minh-Hanh DUONG, service d'Ophtalmologie de la Fondation Rothschild,

Tu m'as fait toucher du doigt toute l'humilité qu'il fallait avoir dans la prise en charge chirurgicale du glaucome, et ce même en ayant de grandes compétences techniques.

Le Docteur Cédric LAMIREL, service d'ophtalmologie de la Fondation Rothschild,

Je te remercie pour la transmission de ton analyse sémiologique en neuro-ophtalmologie. Tes consultations et ton savoir ont été une grande source d'apprentissage dans ce domaine.

Le Docteur Céline GUILLAUD,

Merci pour ton accompagnement ce début de dernier semestre d'internat pour un passage en douceur vers le clinicat. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour ta nouvelle fonction...et ce sera un plaisir de travailler à nouveau avec toi à ton retour.

A ceux qui ont contribués directement à ce travail de thèse,

Madame le Docteur Anne GALINIER, service de Biochimie de Rangueil

Merci de m'avoir fait découvrir la technique d'HPLC et pour votre collaboration dans ce travail.

Madame Magda RODRIGUEZ, technicienne au laboratoire INSERM

Merci pour votre compétence et votre travail qui nous ont permis d'obtenir ces belles images de microscopie biphotonique.

Monsieur Pierre ROY, ingénieur

Merci pour nos échanges toujours très enrichissants mais aussi pour ta disponibilité et ta réactivité.

L'équipe de l'animalerie de Claude-Bernard, Marie-Andrée et Jérôme,

Merci pour votre précieuse aide lors des manipulations avec les lapins.

Monsieur Eric CHAPOTOT,

Je vous remercie pour votre aide sur l'analyse statistique.

Le Docteur Jonathan LETSCH, ancien interne d'ophtalmologie de Strasbourg,

Cette expédition sur neige restera mémorable. Merci d'avoir surmonté ton appréhension et apporté ta contribution à ce travail sur les animaux.

Merci pour ton humour au cours de ton semestre parmi nous.

A mes co-internes d'Ophtalmologie,

Pierre-Julien, Samira, Muhsen, Alexandre, Paul, Andréas, Thibaut, Fred, David, Caroline, Nawfal, Julie, Léopoldine, Sylvain, Benjamin, Marie, Sirine, Rima, Cyrielle, Anaïs, Jeanne, Aurélie, Alex, Julien, Valérie, Thomas,...

Merci pour ces bons moments passés et la bonne entente malgré le travail. Sachez la préserver au fil des promos...

A l'équipe des internes de Tarbes,

Louis, Lotié, David, Damien, Amélie, Pierre, Benoît, Océane, Tatiana, Emilie, Mehdi,...

Vous avez grandement contribué à rendre ce semestre à Tarbes agréable malgré les locaux, la nourriture et la distance avec Toulouse. Les soirées inoubliables ont créé des liens que j'espère nous saurons entretenir en continuant les week-end ch'tarbais...

A toute l'équipe des services d'Ophtalmologie de Purpan,

Infirmières, surveillantes, orthoptistes, secrétaires, aides-soignants,

Merci pour votre accueil, votre aide quotidienne et votre esprit d'équipe.

A toute l'équipe du laboratoire de recherche INSERM,

Stéphane, Béatrice, Angélique et Michelle.

Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche au quotidien (mais aussi les Toltèques !) pendant mon année de Master 2.

A mes amis,

Nancie et Rodrigo,

Merci de rester aussi proche malgré cette grande distance qui nous sépare. Tu comptes beaucoup pour moi. Je te souhaite beaucoup de joie avec ton mari et le petit bout qui va arriver...

Stéphanie et Jacques,

Je te remercie pour ton amitié fidèle et ton soutien dans les moments de joies mais aussi ceux plus difficiles. Je vous souhaite plein de bonheur qui sera encore plus grand dans quelques semaines...

Stéphanie et Gaël,

J'ai connu d'abord tes compétences chirurgicales et ton dynamisme, puis s'est installée une amitié sincère. Votre rapprochement géographique sera je suis sûre l'occasion de partager davantage de moments ensemble.

Tamara et Romain,

Je suis ravie que notre amitié puisse continuer et je vous souhaite, après les événements de la vie qui ne vous ont pas épargnés, tout le bonheur que vous méritez pour l'avenir.

Manu et Léa,

Merci pour votre disponibilité et votre soutien dans les moments importants de notre vie malgré les kilomètres qui nous séparent.

Maéva et Olivier,

Je te souhaite une longue et belle carrière dans ta spécialité que j'aurais pu choisir, mais aussi une grande et belle famille, ce qui est déjà bien commencé.

David et Vanessa,

Merci pour nos échanges « philosophiques » et nos soirées dansantes. J'espère que nous saurons continuer à partager d'excellentes soirées malgré nos horizons différents.

A mes amis d'externat,

Laure, merci pour tes conseils de filles et ta bonne humeur; **Laurent et Christophe**, plein de bonheur pour la suite mais j'attends mon tour en bateau...; **Alexandre et Myriam**, je suis heureuse de pouvoir commencer mon clinicat à tes côtés ; **Romain et Sophie**, vous êtes toujours prêts pour partager des moments entre amis (avec des monaco !); **Nicolas et Marie-Julie**, notre porte vous est ouverte pour des soirées avec ou sans blue lagoon...; **Florence**, je te souhaite plein de bonheur à Miami, à Paris, ou ailleurs...

A tous, merci pour toutes les soirées étudiantes que nous avons partagées du « bizutage », aux soirées-quizz en passant par les week-end sétois.

A ma famille,

A Benoît, mon mari

Ton amour, ton soutien et ta patience sont un réconfort au quotidien. Notre complicité est le témoin de cet amour réciproque qui nous unit.

A mes parents,

Je vous remercie pour votre précieux soutien tout au long de mes études. Merci de m'avoir fait confiance et d'être présents dans toutes les étapes importantes de ma vie.

A Audrey, ma sœur

Merci pour tous ces bons souvenirs d'enfance, ta malice et ton espièglerie. Je te souhaite plein de bonheur.

A toute ma famille,

Céline, tes valeurs morales (honnêteté, sincérité, droiture) sans oublier ton épicurisme sont de grandes qualités qui te permettront de construire le bonheur que tu mérites. **Sylvie et Pascal**, merci d'être là pour les étapes importantes, malgré la distance ; **Elise**, ma filleule, la petite princesse ; **A tous**, merci pour votre aide et tous les bons moments passés en famille.

A Joëlle et Fernand, François et Nadine,

Merci de m'avoir accueillie, merci pour votre soutien si important il y a quelques semaines...J'espère que nous continuerons à partager de nombreux moments heureux.

A Anne-Cécile, Florent, Fanny et Sylvain

Que la vie nous donne le temps de partager un maximum de moments ensemble.

Table des Matières

I/ Introduction	p 22
------------------------------	------

II/ Le Kératocône

A. Définition et historique	p 23
B. Epidémiologie.....	p 24
C. Etiologies	p 25
1. L'atopie.....	p 25
2. La trisomie 21	p 26
3. Les altérations du tissu conjonctif	p 26
4. Le frottement oculaire.....	p 26
5. Les autres associations	p 27
D. Physiopathologie.....	p 27
E. Histopathologie.....	p 28
F. Clinique	p 29
G. Traitements	p 32

III/ Le crosslinking du collagène cornéen

A. Principe biochimique	p 35
B. La procédure conventionnelle.....	p 36
C. Indications thérapeutiques	p 37
D. Echecs et complications	p 39
E. Avancées.....	p 39
1. Le crosslinking trans-épithélial	p 40
2. Optimisation de l'irradiation UVA	p 40

IV/ L'iontophorèse

A. Introduction	p 43
B. Historique.....	p 43
1. Généralités	p 43
2. L'iontophorèse en ophtalmologie.....	p 44

C. Principe de l'iontophorèse.....	p 47
D. L'iontophorèse transcornéenne de riboflavine	p 50

V/ Etude expérimentale

A. Introduction	p 52
B. Matériels et méthodes	p 52
1. Animaux.....	p 52
2. Procédure conventionnelle de crosslinking	p 53
3. Procédure de crosslinking par iontophorèse	p 53
4. Groupes de traitements	p 55
5. Microscopie biphotonique	p 57
a. Principe	p 57
b. Application expérimentale	p 57
6. Histochimie et immunohistochimie	p 59
7. HPLC	p 59
a. Principe	p 59
b. Application expérimentale	p 60
8. Analyse statistique	p 60
C. Résultats	p 61
1. Etude de la diffusion de la riboflavine	p 61
a. Analyse histologique	p 61
b. Résultats biochimiques	p 65
2. Etude des modifications de la structure cornéenne	p 66
D. Discussion	p 70
E. Perspectives	p 73

VI /Conclusion	p 76
-----------------------------	------

Bibliographie	p 77
----------------------------	------

Annexes	p 85
----------------------	------

Résumé	p 90
---------------------	------

Titre, résumé et mots clés en anglais	p 91
----------------------------------------------------	------

Table des Abréviations

a-CASP3 : Anticorps anti-caspase 3 active

ARVO: Association for research in vision and ophthalmology

CH : Corneal hysteresis

CLEK: Collaborative longitudinal evaluation of keratoconus

CPTP : Centre de physiopathologie de Toulouse

CRF : Corneal resistance factor

CXL: Crosslinking du collagène cornéen

C-CXL : Crosslinking du collagène cornéen conventionnel

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

HPLC: High performance liquid chromatography

H&E : Coloration histologique à l'hématoxyline et éosine

IL1: Interleukine 1

iNOS: Inducible nitric oxide synthase

I-CXL : Crosslinking du collagène cornéen par iontophorèse

MFI : Measurement of fluorescence intensity

ORA : Ocular response analyzer

OCT : Optic coherence tomography

ORL : Oto-rhino-laryngologie

SHG : Second harmonic generation ou génération de seconde harmonique

SOD : Superoxyde dismutase

SRAX: Skewed radial axes

UVA : Ultra-Violet A

Table des Illustrations

Figure 1 : Illustration du Traité de Demours.....	p 23
Figure 2 : Risque de progression du kératocône	p 25
Figure 3 : Coupe histologique d'une cornée humaine atteinte de kératocône	p 28
Figure 4 : Différents « patterns » topographiques décrits par Rabinowitz.....	p 30
Tableau 1 : Classification de Krumeich.....	p 31
Figure 5 : Anneaux intra-cornéens	p 33
Figure 6 : Schématisation du phénomène de crosslinking	p 35
Figure 7 : Formule chimique de la riboflavine ou vitamine B2	p 36
Figure 8 : Procédure conventionnelle de crosslinking selon le protocole de Dresde....	p 37
Figure 9 : Courbe rigidité cornéenne/puissance d'irradiation des UVA	p 41
Figure 10 : Photo de Selinger réalisant une iontophorèse en 1947	p 45
Figure 11 : Iontophorèse transcornéenne par Yoo	p 46
Figure 12 : Différents dispositifs d'iontophorèse transsclérale	p 47
Figure 13 : Schématisation du principe général de l'iontophorèse	p 48
Figure 14 : Schématisation du principe d'iontophorèse chez l'homme	p 51
Figure 15 : Représentation schématique du dispositif de l'électrode principale.....	p 53
Photo 1 : Vue générale de l'installation pendant l'iontophorèse.....	p 54
Photo 2 : Dispositif d'iontophorèse positionné sur l'œil du lapin	p 55
Tableau 2 : Animaux et figures pour la diffusion de riboflavine	p 56
Tableau 3 : Animaux et figures pour l'analyse des modifications structurales.	p 57
Figure 16 : Diffusion de riboflavine en microscopie biphotonique.....	p 62
Figure 17 : Analyse de l'épithélium cornéen.....	p 63
Figure 18 : Analyse du collagène en génération de seconde harmonique par microscopie biphotonique	p 64
Tableau 4 : Dosage de riboflavine par HPLC dans l'humeur aqueuse et la cornée	p 65
Figure 19 : Emission de fluorescence 14 jours après CXL.....	p 67
Figure 20 : Quantification de l'intensité de fluorescence (MFI)	p 68
Figure 21 : Analyse des modifications structurales cornéennes à 14 jours après CXL	p 69
Photo 3 : Iontophorèse en cours de réalisation chez un patient	p 73
Photos 4 : Matériel et installation pour l'iontophorèse de riboflavine 0,1% dans l'étude de Bikbova et al.	p 74

I/ Introduction

Le Kératocône est une maladie ectasiente évolutive bilatérale de la cornée. Elle débute généralement à l'adolescence, progresse pendant les premières décennies et se stabilise pendant la troisième ou quatrième décade.¹ L'évolution peut conduire jusqu'au stade terminal qui est caractérisé par l'apparition d'opacités cornéennes invalidantes. Le seul traitement alors envisageable reste la greffe de cornée. La vitesse de progression est variable d'un patient à l'autre, de plusieurs mois à plusieurs années, mais peut être très rapide sur quelques mois.

La stabilisation de cette maladie avant qu'elle n'atteigne les stades avancés est donc un enjeu thérapeutique important.

Le seul traitement ayant actuellement montré une efficacité pour rigidifier le stroma cornéen et ainsi ralentir la progression du kératocône est le crosslinking du collagène cornéen (CXL), développé par Théo Seiler.^{2,3}

Cependant, le CXL présente des effets indésirables essentiellement liés à la désépithélialisation réalisée au cours de ce traitement. Une nouvelle technique préservant l'épithélium et conservant la même efficacité sur la stabilisation représente donc l'avenir pour les patients porteurs d'un kératocône évolutif.

Dans ce cadre, nous avons voulu évaluer une nouvelle stratégie, l'iontophorèse, qui pourrait permettre de réaliser un CXL sans désépithélialisation.

Nous rapportons les résultats d'une étude expérimentale animale, dont l'objectif était d'évaluer l'efficacité sur la pénétration intrastromale de riboflavine lors de l'imbibition de la cornée par iontophorèse, et de la comparer à celle obtenue après imbibition conventionnelle de riboflavine (respectant le protocole de Dresde). Les critères d'évaluation étaient le taux de riboflavine en intra-cornéen et dans l'humeur aqueuse, mesuré par HPLC (High Performance Liquid Chromatography), ainsi que la présence de riboflavine intra-cornéenne évaluée par microscopie biphotonique. Nous avons également apprécié par microscopie biphotonique les modifications de la structure du stroma cornéen après UVA-thérapie faisant suite à une imbibition conventionnelle ou par iontophorèse de riboflavine.

II/ Le kératocône

A. Définition et historique

Le kératocône est une dystrophie cornéenne bilatérale, évolutive, se manifestant par une protrusion non inflammatoire de la cornée qui débute généralement pendant l'adolescence. Cette déformation s'accompagne d'un amincissement progressif de la cornée. L'évolution se fait vers une baisse d'acuité visuelle liée à l'importance de l'astigmatisme irrégulier et de la fréquente survenue d'opacités cornéennes.

Les premières descriptions de cette pathologie et les premières propositions de prise en charge pour en ralentir l'évolution datent du XVIII^{ème} siècle. Dans son " Traité des maladies des yeux", Antoine Pierre Demours, oculiste du roi, nomme cette déformation cornéenne "protubérance" et décrit à l'époque un traitement par incision cornéenne puis bandage oculaire compressif (**Figure 1**).



Figure 1 : Illustration du Traité de Demours : Bandage compressif d'un kératocône.

En 1859, le chirurgien britannique Bowman utilise un ophtalmoscope (inventé par le physicien allemand Von Helmholtz) pour diagnostiquer le kératocône, et décrit comment incliner le miroir de l'instrument de manière à mieux distinguer la forme conique de la cornée.⁴ En 1869, le suisse Horner rédige une thèse sur le traitement du kératocône dans laquelle la maladie a déjà acquis sa dénomination actuelle.

Le traitement, approuvé par l'allemand Von Gräfe au XIX^{ème} siècle, est une tentative pour reformer physiquement la cornée par cautérisation chimique grâce à une solution de nitrate d'argent et l'application d'un agent amenant à la contraction de la pupille, par l'application d'une pression.

En 1888, le traitement du kératocône devient l'une des premières applications pratiques des verres de contact récemment mis au point par le physicien français Kalt, qui fabrique une coquille de verre améliorant la vision en comprimant la cornée en une forme plus régulière.⁵

Depuis, le traitement du kératocône a été l'objet de nombreux travaux dont ont découlés les traitements actuels.

B. Epidémiologie

L'incidence est estimée à environ 1/2000 et la prévalence à 54/100 000⁶ dans les populations caucasiennes européennes. Ces chiffres sont très variables d'un pays à l'autre et selon les critères diagnostiques utilisés par les auteurs. Mais ils sont probablement sous-estimés en raison des formes de kératocône fruste, non comptabilisées. Ces formes « infra-cliniques » sont dépistées le plus souvent parmi les patients candidats à la chirurgie réfractive, lors du bilan systématique préopératoire comportant une topographie cornéenne. Parmi cette population, la fréquence de la maladie est de l'ordre de 0,9% et peut atteindre jusqu'à 8% dans une population de patients myopes.

Le kératocône touche les deux sexes de manière équivalente.

Cette maladie touche toutes les races. L'incidence est plus élevée chez les asiatiques par rapport aux caucasiens (7,5 :1).⁶ Une incidence plus élevée a été rapportée dans une population rurale en Inde et en Arabie Saoudite. L'influence de la consanguinité et des formes familiales a été évoquée pour expliquer cette incidence plus importante.

Classiquement, le kératocône apparaît à la puberté et évolue jusqu'à la troisième ou quatrième décennie. Plus rarement, on observe des formes cliniques plus tardives ou plus précoces (forme congénitale). Sur une série multicentrique de 1579 patients, l'étude CLEK (pour Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus) rapporte un âge moyen de découverte de $27,3 \pm 9,5$ ans, avec près de 90 % des patients diagnostiqués entre 10 et 39 ans.⁷ Cependant l'âge de début de la maladie est probablement surestimé étant donné son caractère initialement asymptomatique. De plus, l'âge de découverte dépend au moins en partie de la rapidité d'évolution de la maladie, très variable d'un patient à l'autre. En effet, le kératocône est évolutif dans environ 22% des cas et la vitesse de progression est maximale pendant la première

décade, ralentie pendant la deuxième et rare après 30 ans.^{8,9}

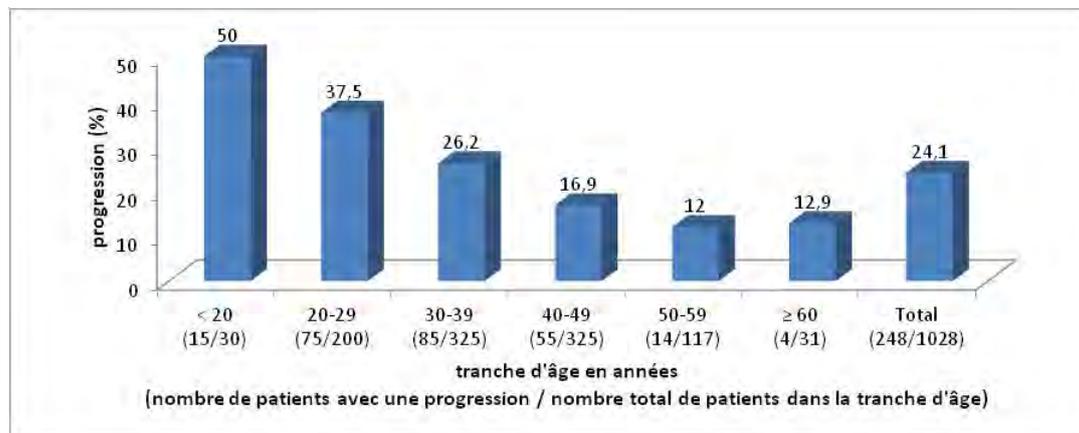


Figure 2: Risque de progression du kératocône, définie par une augmentation d'au moins 3 dioptries de la kératométrie sur différentes tranches d'âge, d'après McMahon et al.⁹

Le kératocône est le plus souvent bilatéral (seulement 0,5% à 4% de formes unilatérales)¹⁰ mais le degré d'atteinte est souvent asymétrique.¹¹ La surveillance doit donc être bilatérale car la vitesse de progression peut être aussi asymétrique.

C. Etiologies

L'étiologie exacte du kératocône reste encore inconnue. Son association avec d'autres pathologies fait évoquer une origine multifactorielle : génétique, environnementale, métabolique. Les cas de kératocônes familiaux (6 à 23,5% des cas) attestent d'un rôle génétique dans l'apparition de cette maladie qui aurait un mode de transmission autosomique dominant à pénétrance et expressivité variables. Une transmission sur le mode autosomique récessif a été proposée dans les populations à forte consanguinité.

Les principaux facteurs associés sont : l'atopie, l'hérédité, les anomalies chromosomiques, les altérations du tissu conjonctif et les contraintes mécaniques.

1. L'atopie

L'association atopie et kératocône est connue depuis plus de cinquante ans. Environ 56,7% des patients présentent des antécédents d'atopie.¹² De plus, les patients atopiques possèdent des caractéristiques topographiques et pachymétriques différentes

de celles de patients non atopiques¹³. L'une des hypothèses pour expliquer cette association est le frottement oculaire.¹⁴

2. La trisomie 21

La prévalence du kératocône dans la trisomie 21 est 10 à 300 fois plus élevée que dans la population générale. Cette constatation a fait évoquer une implication du chromosome 21 dans la pathogénie du kératocône. De nombreuses études génétiques ont été réalisées sans qu'une mutation ait pu être mise en évidence à ce jour.

3. Les altérations du tissu conjonctif

Plusieurs pathologies associées à une altération du tissu conjonctif ont été évoquées comme étant associées plus fréquemment au kératocône. Il s'agit de la maladie d'Ehlers Danlos, de la maladie de Marfan, de l'ostéogénèse imparfaite (ou maladie de Lobstein) ou du prolapsus de la valve mitrale. Cependant, la prévalence du kératocône dans ces pathologies reste faible et l'association kératocône/maladies du tissu conjonctif contredite par certains auteurs.

4. Le frottement oculaire

Le frottement oculaire serait impliqué dans la pathogénie d'un certain nombre de kératocônes. Sa prévalence chez les patients atteints de cette maladie serait proche de 70%. Il est souvent associé aux antécédents d'atopie ou de retard mental. L'incidence des cas de kératocônes aigus est plus élevée chez les patients porteurs de trisomie 21 en raison de traumatismes oculaires plus fréquents.

Des cas de kératocônes asymétriques voire unilatéraux en raison d'un excès de frottements oculaires d'un œil par rapport à l'autre ont été décrits. McMonnies retrouve un lien significatif entre la main dominante et l'œil le plus évolué.¹⁵

Le "floppy eyelid syndrom", est une hyperlaxité palpébrale responsable d'une éversion nocturne des paupières. Cliniquement, on observe une conjonctivite papillaire chronique associée le plus souvent à une kératite ponctuée superficielle. Certains auteurs ont également décrit une association plus fréquente du kératocône chez ces patients par rapport à la population générale.^{16, 17}

5. Les autres associations

Il a mis en évidence un effet protecteur du diabète de type 2 sur l'apparition du kératocône et sur son évolution. Une des hypothèses serait l'apparition de modifications des propriétés biomécaniques de la cornée, en raison de la glycosylation anormale des fibres de collagène du stroma cornéen dans le diabète, réalisant un CXL métabolique.

D'autres pathologies ont été associées au kératocône : l'amaurose congénitale de Leber, le syndrome de Turner ou encore d'autres dystrophies cornéennes. Les plus fréquentes sont la dystrophie de Fuchs, la dystrophie de Cogan et la dystrophie postérieure polymorphe. Plus rarement, la dystrophie maculaire et la dystrophie granulaire ont été rapportées.

Néanmoins, ces associations n'ont pas permis d'identifier clairement la physiopathogénie de cette maladie. Il reste difficile de savoir si ces maladies favorisent l'apparition du kératocône en tant que cofacteur ou si elles sont directement impliquées dans sa genèse.

D. Physiopathologie

En terme de physiopathogénie, certains auteurs comme Rabinowitz évoquent un déséquilibre entre synthèse et destruction de collagène dans le stroma des cornées kératocôniques. On sait qu'un facteur déclenchant environnemental pro-inflammatoire (frottement palpébral, conjonctivite chronique, port de lentille, atopie...) stimule la synthèse d'interleukine 1 (IL1) par les cellules épithéliales. Or dans le kératocône, les kératocytes du stroma présentent un nombre plus élevé de récepteurs IL1 par rapport aux sujets non atteints.¹⁸ Leur sensibilité accrue à cette cytokine entraînerait leur apoptose et donc une diminution de la masse stromale.¹⁹

Pour expliquer cet amincissement du stroma, certains ont aussi évoqué un déséquilibre de la balance entre les protéases et leurs inhibiteurs, en faveur d'une destruction du collagène. En effet, des études retrouvent une diminution de certains inhibiteurs de protéases²⁰ en parallèle d'une augmentation de protéases (métallo-protéinases, protéases lysosomiales, cathepsine K, trypsine-2).²¹

D'autres auteurs ont évoqué l'implication de la voie de signalisation de l'oxyde nitrique devant l'observation d'une augmentation de « l'inducible nitric oxide synthase » (iNOS) et d'une baisse de la « superoxide dismutase » (SOD) extracellulaire, puissant antioxydant tissulaire. Cependant aucune mutation de la SOD1 n'a pu être mis en

évidence chez des patients porteurs d'un kératocône.⁶ Ceci suggère une implication des radicaux libres dans la pathogénie du kératocône mais leur rôle exact reste inconnu.

Cependant, aucun mécanisme physiopathologique n'a pu être clairement identifié dans le kératocône.

E. Histopathologie

L'atteinte cornéenne du kératocône concerne essentiellement le stroma qui est aminci avec une diminution de la densité en kératocytes et une hypertrophie des nerfs.

De façon plus détaillée, les modifications cornéennes constatées au cours du kératocône sont, de la surface vers la profondeur :

- au niveau de l'épithélium : une diminution des cellules épithéliales basales, réduisant le nombre de couches cellulaires à deux ou trois au lieu de six à sept dans une cornée normale. Ces modifications prédominent au niveau du sommet du cône.

- au niveau de la membrane basale : Celle-ci peut être très irrégulière et présenter des solutions de continuité qui sont comblées par du tissu conjonctif ou des cellules épithéliales. Elle prend alors un aspect fibrillaire caractéristique, dit « en ligne brisée » (**Figure 3**).

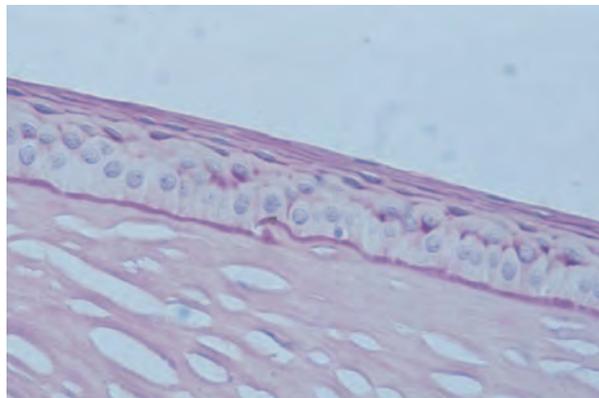


Figure 3 : Coupe histologique d'une cornée humaine atteinte de kératocône : Elle est centrée sur la jonction épithélium/ membrane de Bowman et stroma antérieur. Elle montre une zone de rupture de la membrane basale et de la membrane de Bowman.

On peut retrouver des dépôts osmophiles homogènes, au niveau de la lamina densa, semblant s'infiltrer dans la membrane de Bowman. D'autre part, des modifications de sa composition sont décrites avec notamment la présence inhabituelle de la chaîne alpha 1-2 du collagène IV ou au contraire l'absence de protéines habituellement présentes comme la chaîne alpha 5-6 du collagène IV.

- au niveau du stroma : les principaux types de collagènes présents dans la cornée d'un kératocône sont identiques ceux des cornées normales (collagènes I, III, IV, V, VI). Cependant, la proportion de certains types est modifiée (surreprésentation du collagène XIII, comme dans une cornée cicatricielle) et la quantité de fibres de collagène est diminuée.

Dans le stroma moyen et profond, l'arrangement structural des fibres de collagène se modifie : il apparaît une perte du parallélisme des lamelles de collagène avec une modification plus marquée de l'orientation fibrillaire au sommet du cône. Ce changement de distribution et d'orientation du collagène évoque un glissement des fibres de collagène les unes par rapport aux autres à partir de l'apex du cône.

D'autre part, le diamètre moyen et l'espace inter-fibrillaire des fibres de collagène sont réduits et la densité de ces fibres et des protéoglycans est augmentée par rapport à une cornée saine. L'augmentation progressive et symétrique de la masse de collagène du centre vers la périphérie de la cornée est également modifiée.

- au niveau de la membrane de Descemet : on observe des déformations, des ondulations et parfois des encoches en cas d'hydrops.

- au niveau de la couche endothéliale : la forme des cellules endothéliales est conservée mais les espaces entre les noyaux peuvent être irréguliers et il peut apparaître un polymégathisme cellulaire secondaire à l'étirement des cellules dans le sens de la protrusion de la cornée. Au total, la densité cellulaire est abaissée.

F. Clinique

A l'heure actuelle, dans la plupart des cas, le diagnostic est porté au stade frustré ou débutant : en effet, il est suspecté sur l'observation de la kératométrie et confirmé après l'analyse de la topographie cornéenne.

Parfois, le patient se présente avec des plaintes fonctionnelles telles qu'une baisse d'acuité visuelle, une diplopie monoculaire ou une photophobie.

Les signes physiques à rechercher sont :

- la protrusion excentrique de la cornée,
- un amincissement cornéen maximal au sommet du cône,
- une visibilité anormale des nerfs cornéens,
- un anneau de Fleisher (situé à la base du cône et correspondant à l'accumulation de ferritine intra-épithéliale),

- des opacités fibrillaires sous-épithéliales concentriques à la partie interne de l'anneau de Fleisher,
- des stries de Vogt (lignes de contraintes stromales pré-descémétiques),
- des opacités superficielles réticulées (correspondant aux ruptures de la membrane de Bowman comblées par un tissu cicatriciel)
- et des opacités profondes.

A un stade évolué de la maladie, elle peut se compliquer (dans 3% des cas) d'un amincissement majeur avec une rupture de la membrane de Descemet au sommet du cône entraînant une imbibition de la cornée par l'humeur aqueuse : c'est le kératocône aigu ou hydrops. A distance de cet épisode aigu, va persister une cicatrice invalidante.

Les examens complémentaires cruciaux dans le diagnostic puis le suivi du kératocône sont la topographie cornéenne et la pachymétrie cornéenne centrale.

Il existe deux types d'examen topographique : le premier est la topographie spéculaire qui est basée sur l'analyse du reflet du disque de Placido sur la cornée. Rabinowitz a classé les différentes formes topographiques ainsi obtenues et a défini les « patterns » à risques (**Figure 4**).

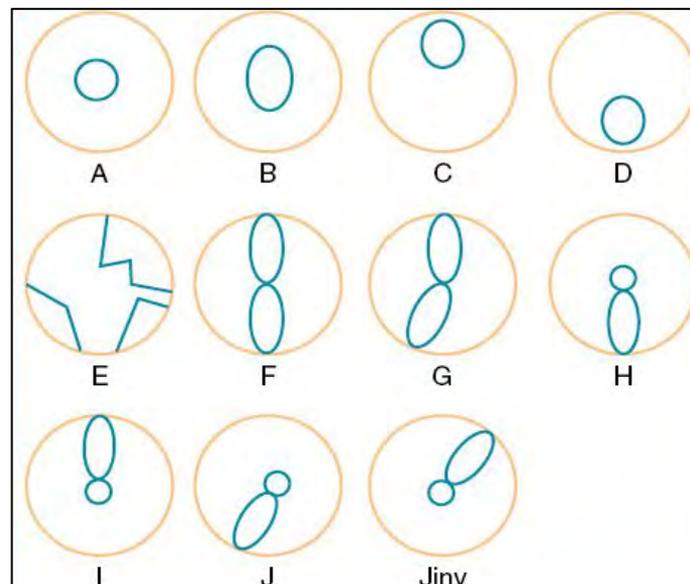


Figure 4: Différents « patterns » topographiques décrits par Rabinowitz. Les formes à risque sont le D (bombement inférieur), le G (angulation excessive entre les deux hémiméridiens les plus bombés), le H (astigmatisme asymétrique) et le J (combinaison des patterns G et H).²²

Un autre signe topographique intéressant est la perte de l'énantiomorphisme (symétrie en miroir des deux cornées, sans être superposables).

Des indices quantitatifs ont été créés afin d'améliorer la détection des kératocônes, en particulier des formes frustrées tels que l'indice I-S (inferior-Superior), le SRAX (Skewed Radial Axes) ou l'indice KISA.

Le deuxième type d'examen topographique est la topographie d'élévation (Orbscan® ou Pentacam®) qui permet une analyse de l'élévation de la face postérieure de la cornée, intéressante dans le diagnostic précoce du kératocône car le bombement de la face postérieure de la cornée précède celui de la face antérieure.

La pachymétrie cornéenne centrale est également un des signes à analyser car dans un kératocône, la cornée est amincie et souvent inférieure à 500 µm.

Le diagnostic repose donc sur un faisceau d'arguments cliniques et paracliniques. Plusieurs classifications tentant de les rassembler ont été proposées. La plus utilisée est la classification de Krumeich²³ qui prend en compte la kératométrie topographique maximale des 3mm centraux, la pachymétrie, la puissance réfractive manifeste de la sphère et du cylindre, et enfin la présence éventuelle d'opacités cornéennes (**Tableau1**).

Stade	Caractéristiques
1	Myopie et/ou astigmatisme < 5 D Kératométrie maximale ≤ 48 D Stries de Vogt, pas de cicatrice Epaisseur cornéenne ≥ 500 µm
2	Myopie et/ou astigmatisme > 5 D < 8 D Kératométrie maximale ≤ 53 D Absence de cicatrice centrale Epaisseur cornéenne ≥ 400 µm
3	Myopie et/ou astigmatisme > 8 D < 10 D Kératométrie maximale > 53 D Absence de cicatrice centrale Epaisseur cornéenne 200 à 400 µm
4	Réfraction non mesurable Kératométrie maximale > 55 D Cicatrice centrale, perforation Epaisseur cornéenne < 200 µm

Tableau 1: Classification de Krumeich : sachant qu'un seul critère suffit pour appartenir à un stade.²³

D'autres examens paracliniques permettent d'étudier les cornées atteintes d'un kératocône : l'ORA (Ocular Response Analyzer) permet une évaluation de l'hystérèse cornéenne (CH) et du facteur de résistance cornéenne (CRF). Ces paramètres sont diminués dans le kératocône. Cependant, cet outil d'analyse de la visco-élasticité cornéenne est encore en cours d'évaluation.

L'analyse du front d'onde par aberrométrie met en évidence dans le kératocône une augmentation des aberrations de haut degré de type coma et trefoil. La présence de ces aberrations explique souvent les symptômes décrits par le patient : halos, éblouissements, diplopie, diminution de la sensibilité aux contrastes.

Enfin, les améliorations successives de l'Optic Coherence Tomography (OCT) autorisent désormais une analyse de plus en plus fine des différentes couches de la cornée permettant de proposer une nouvelle classification pour le kératocône.²⁴

G. Traitements

La prise en charge des patients porteurs d'un kératocône repose sur deux objectifs :

- la stabilisation de la maladie
- la meilleure réhabilitation visuelle possible

Pour améliorer la qualité visuelle, plusieurs options sont possibles et proposées successivement en cas d'échec ou de résultat insatisfaisant de la technique précédente.

La première est l'équipement en lunettes qui n'est souvent suffisant que dans les formes frustes ou précoces.

Rapidement est proposée l'adaptation en lentilles qui demeure la méthode de réhabilitation visuelle la plus utilisée et suffisante dans la majorité des cas. Elle se fait essentiellement à l'aide de lentilles rigides perméables aux gaz mais est possible en lentilles souples, en piggy-back ou encore en verres scléaux.

En cas d'échec, des techniques chirurgicales peuvent être proposées :

- la pose d'anneaux intra-cornéens est une technique qui permet d'aplanir le sommet du cône et donc de diminuer l'astigmatisme irrégulier et les aberrations de haut degré. Elle est proposée quand la transparence cornéenne est toujours conservée et si l'épaisseur cornéenne centrale est supérieure à 400 μm . L'amélioration de la qualité visuelle repose donc sur un remodelage mécanique de la cornée (**Figure 5**, à gauche) qui peut être complété par une adaptation en lentille rigide, facilitée après cet

aplanissement. Les résultats retrouvent en moyenne un gain d'acuité visuelle dans 80% des cas avec une diminution de l'équivalent sphérique de trois dioptries et de la kératométrie de quatre dioptries.^{25, 26}

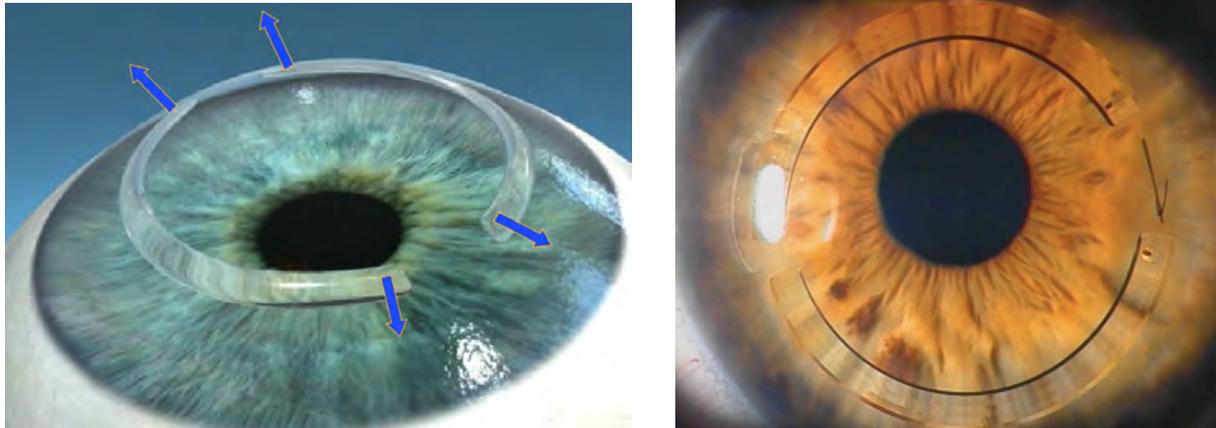


Figure 5: Anneaux intra-cornéens. **A gauche:** mécanisme d'action des anneaux intra-cornéens permettant l'aplanissement du kératocône. **A droite:** photo après la pose d'anneaux intra-cornéens.

- l'introduction intraoculaire d'implants phaques et/ou toriques peut permettre de corriger une myopie importante et un astigmatisme, essentiellement si ce dernier est régulier dans les 3 à 5 mm centraux. Le kératocône doit bien entendu être stabilisé pour proposer cette intervention chirurgicale. Sa principale indication est la dégénérescence marginale pellucide qui est une forme (ou pour certains un diagnostic différentiel) de kératocône avec une déformation essentiellement périphérique.

- la greffe de cornée peut être proposée en cas d'amélioration insuffisante de la qualité de vision par les anneaux intra-cornéens ou en cas d'opacités cornéennes invalidantes, c'est-à-dire, quand tous les autres moyens ont été épuisés. Le but est l'amélioration, d'une part, fonctionnelle de la qualité de vision mais aussi anatomique pour restaurer une courbure et une épaisseur cornéennes normales. Environ 10 à 20% des patients porteurs de kératocône auront recours à la greffe de cornée dans leur vie¹ et le kératocône représente 10 à 30% des indications de greffe.

La greffe de cornée transfixiante a longtemps été la référence dans le cadre du kératocône, mais les indications se sont progressivement réduites au profit de la greffe lamellaire antérieure profonde. En effet, tout en conservant les mêmes résultats réfractifs, cette dernière permet une diminution du risque de rejet endothélial^{27, 28} (évalué à 15 à 30% à 5 ans après kératoplastie transfixiante^{29, 30}). Ceci permet un

allongement de la durée de vie du greffon.³¹ Cependant, même lamellaire, la greffe de cornée reste un traitement contraignant (suivi très régulier et prolongé, instillation quotidienne de collyres) et avec un risque non négligeable de complications (rejet, transmission de maladies infectieuses, cataracte et glaucome cortisonique).

Le deuxième objectif dans la prise en charge du kératocône est la stabilisation de la maladie. Le seul traitement actuellement efficace pour stopper la progression d'un kératocône est le CXL. Cet aspect est primordial puisque le CXL permettrait de diminuer le recours à la greffe de cornée.³² Le dépistage des formes évolutives de kératocône est donc essentiel pour proposer un traitement précoce par CXL, avant que le kératocône n'atteigne un stade trop évolué. De plus, cette technique de stabilisation peut être combinée aux techniques de réhabilitation visuelle telles que la pose d'anneaux intra-cornéens.

III/ Le crosslinking du collagène cornéen

Stratégie développée initialement par l'équipe de Théo Seiler² à Zurich à partir de 1999, les premiers traitements par CXL réalisés en France datent de 2006. Cette procédure s'est rapidement répandue puisqu'en France en 2010, environ 1000 CXL ont été réalisés.

En effet, le CXL représente actuellement le seul traitement efficace pour ralentir, voire stopper la progression du kératocône en rigidifiant la cornée. Plusieurs études ont montré sa relative innocuité³³ et surtout son efficacité^{3, 34-39} : la stabilisation de la maladie est obtenue dans environ 90% des cas et il est classique d'observer une diminution moyenne de la kératométrie maximale de deux dioptries et parfois un gain d'une à deux lignes d'acuité visuelle.

A. Principe biochimique

L'objectif du CXL est de créer des ponts entre les différentes fibres de collagène de la matrice extracellulaire stromale afin de rigidifier la cornée antérieure (**Figure 6**).⁴⁰

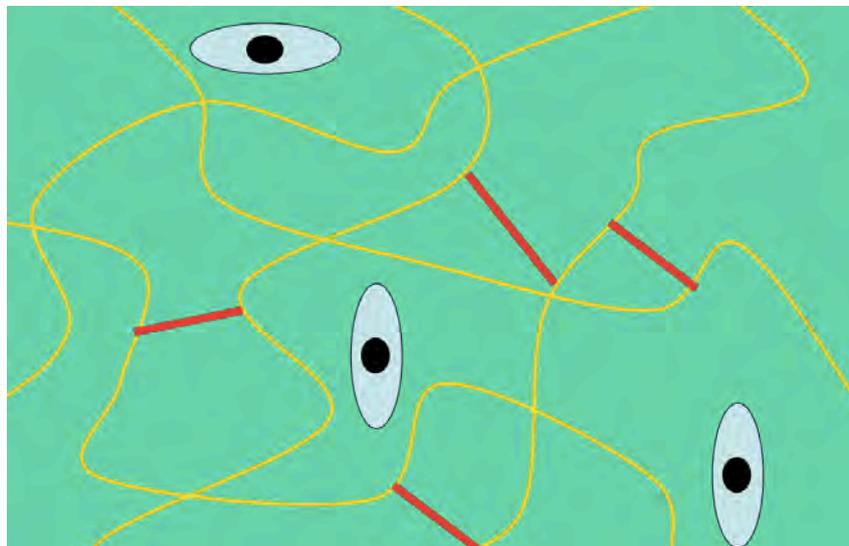


Figure 6: Schématisation du phénomène de crosslinking : formation de pont (traits rouges) entre les fibres de collagène (lignes jaunes) de la matrice extra-cellulaire produite par les kératocytes (ovales gris et noirs).

Sur le plan biochimique, ces ponts correspondent à une réaction de glycation : les chaînes hydrocarbonées du collagène forment des ponts azotés entre elles.^{41, 42} Les

protéoglycans de la matrice extra-cellulaire vont également former des ponts, entre eux mais aussi avec les fibres de collagène.⁴³

Cette réaction est naturellement constatée dans l'organisme mais de façon très lente. Le but est donc de l'accélérer par la technique du CXL: les ultraviolets A (UVA) agissent comme catalyseur et la riboflavine (**Figure 7**) comme photosensibilisant de cette réaction.⁴⁴ Par ailleurs, la riboflavine en saturant le segment antérieur bloque la transmission du rayonnement aux structures intraoculaires plus postérieures.

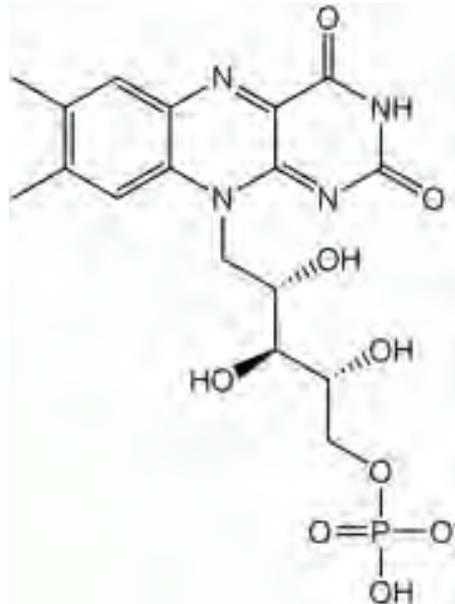


Figure 7: Formule chimique de la riboflavine ou vitamine B2 : C₁₇ H₂₀ N₄ Na O₉ P, de poids moléculaire 478.33Da. Elle se caractérise notamment par plusieurs pics d'absorption dont 370nm et 449nm et un pic d'émission maximal à 530 nm.

Cependant, la riboflavine ne peut pas pénétrer spontanément dans le stroma cornéen en raison de la barrière créée par les jonctions serrées présentes entre les cellules épithéliales cornéennes. La technique actuellement utilisée nécessite donc une désépithélialisation préalable à l'imbibition de riboflavine.

B. La procédure conventionnelle

La procédure conventionnelle, selon le protocole de Dresde,³⁶ nécessite l'usage d'un bloc opératoire pour une durée d'environ 75 minutes. La première étape, après anesthésie topique et désinfection cutanéomuqueuse, consiste à désépithélialiser mécaniquement la cornée sur environ 8 à 9 mm de diamètre, de façon centrée sur la pupille. La deuxième étape est l'imbibition du stroma par la riboflavine en instillant une

goutte de riboflavine chaque minute pendant 30 minutes. Enfin, la dernière étape consiste en l'irradiation centrée sur la zone désépithérialisée à l'aide d'une lampe à UVA (365nm) à une fluence de 3 mW/cm² pendant 30 minutes (**Figure 8**). Une antibiothérapie topique préventive est instillée en fin d'intervention et une lentille thérapeutique est placée pour 48 heures.



Figure 8: Procédure conventionnelle de crosslinking selon le protocole de Dresde. **A gauche:** après désépithérialisation, 1^{ère} étape d'instillation de riboflavine pendant 30 minutes. **A droite :** 2^{ème} étape d'irradiation par des UVA à une fluence de 3 mW/cm², pendant 30 minutes.

C. Indications thérapeutiques

Les indications du CXL se sont peu à peu étendues mais impliquent toujours la notion d'évolutivité de la maladie. Cette évolutivité peut être fonctionnelle et/ou physique, alors objectivée par le suivi de la topographie, de la pachymétrie ou de l'aberrométrie cornéennes.

Ces patients qui progressent peuvent bénéficier des mêmes techniques de réhabilitation visuelle que ceux qui ne progressent pas : c'est-à-dire, correction par lunettes et/ou lentilles en première intention et en cas de résultats insatisfaisants, la pose d'anneaux intra-cornéens ou d'implants intraoculaires. Il n'existe pas de consensus ni sur la chronologie des actes (CXL avant pose des anneaux ou vice versa,..) ni sur les délais à respecter entre deux actes, mais il semble que le CXL devrait se pratiquer en premier lieu suivi d'un autre traitement si nécessaire.

La place du CXL dans la prise en charge du kératocône évolutif est donc primordiale car il représente le seul traitement stabilisateur et il n'empêche aucun des autres traitements à visée réfractive.

Cependant se pose le problème de la définition d'un kératocône évolutif. L'équipe de Spoerl à Dresde avait proposé en 2008 les critères suivants:³⁶

- une augmentation de la kératométrie ≥ 1 dioptrie sur un an,
- ou la nécessité de réadapter la lentille de contact sur une période de deux ans,
- ou une baisse d'acuité visuelle rapportée par le patient.

Une équipe italienne avait appliqué une définition plus floue pour son étude : « progression définie cliniquement et paracliniquement sur une période de six mois ».³⁷

Une équipe australienne a réalisé une étude comparative en utilisant comme critères de progression sur un intervalle d'un an: ³⁸

- une diminution de la correction sphérique $\geq 0,5$ dioptrie,
- ou une diminution du cylindre ≥ 1 dioptrie,
- ou une augmentation de la kératométrie maximale ≥ 1 dioptrie.

Enfin, l'étude d'accréditation FDA (US FDA phase III trial), en cours, a défini ses critères de progression en reprenant ceux de l'étude australienne mais de façon moins restrictive puisqu'ils s'entendent sur 24 mois.

Dans une étude bicentrique française menée au sein du Centre de Référence National du Kératocône (CRNK), les critères de progression étaient:³⁹

- une augmentation de la kératométrie ≥ 1 dioptrie en six mois ou ≥ 2 dioptries sur un an,
- une perte de deux lignes d'acuité visuelle corrigée sur un an.

Actuellement, l'indication qui semble communément admise de CXL est basée sur la présence de l'ensemble de ces critères :

- une augmentation de plus d'une dioptrie de la kératométrie maximale sur un intervalle d'un an (ou moins), constatée en comparant deux examens topographiques successifs (réalisés sur le même appareil)
- transparence de la cornée centrale conservée
- une pachymétrie centrale $> 400 \mu\text{m}$.

Il faut noter des indications plus anecdotiques de CXL dans le traitement de kératites infectieuses sévères.⁴⁵ En effet, le CXL augmente la résistance du stroma à la digestion enzymatique⁴⁶ et entraîne probablement une destruction des germes de la même façon que les kératocytes du stroma antérieur.

D. Echecs et complications

Le taux d'échecs, défini par une augmentation de plus d'une dioptrie de la kératométrie maximale sur un an, est en moyenne de 8 à 10%.³⁵ Aucun facteur de risque d'échec n'a pu clairement être identifié. Certains ont présenté une kératométrie supérieure à 58 dioptries comme facteur de risque d'échec^{37, 47} mais ceci est sujet à controverse.³⁵

Le taux d'effets indésirables est d'environ 3% (1 à 10% selon les études).^{35, 48} Les principaux sont :

- les douleurs pendant les 48 premières heures post-opératoires. Elles sont liées à la désépithélialisation.

- la baisse temporaire d'acuité visuelle

- le pseudo-haze : cicatrice cornéenne antérieure transitoire, responsable d'une baisse d'acuité visuelle réversible dans les trois premiers mois⁴⁹

- les infiltrats aseptiques périphériques (par réaction immunitaire aux antigènes staphylococciques)

- les kératites infectieuses : Les principaux germes identifiés sont *Pseudomonas aeruginosa*,⁵⁰ *Escherichia coli*,⁵¹ *Staphylococcus epidermidis*,⁵² voire des infections pluri-microbiennes.⁵³

- la réactivation herpétique^{54, 55}

- la décompensation endothéliale sur cornée très fine (<400µm) : les cellules endothéliales peuvent être lésées à partir d'une irradiation à 0,35mW/cm² (la dose administrée en respectant le protocole conventionnel est de 0,18mW/cm²).^{56, 57}

- les opacités stromales (près de 30% des cas)^{48, 58} ou haze permanent⁴⁷

- ou encore la nécrose cornéenne.

Ces complications peuvent être sévères et leur prise en charge peut conduire jusqu'à la greffe de cornée. Or la majorité de ces complications sont liées à la désépithélialisation. Une technique de CXL préservant l'épithélium permettrait d'éviter la majorité des complications et effets indésirables.

E. Avancées

La majeure partie des études réalisées actuellement pour améliorer la procédure visent soit à s'affranchir de la désépithélialisation responsable des effets indésirables, de

la lourdeur et du coût de ce traitement, c'est le crosslinking trans-épithélial ; soit à raccourcir le temps ou modifier le profil d'irradiation par les UVA.

Les autres pistes sont la proposition de solutions hypo-osmolaires pour pouvoir réaliser des CXL sur des cornées kératocôniques évolutives avec une pachymétrie inférieure à 400 µm.⁵⁹ Enfin, certains explorent de nouvelles techniques de rigidification de la cornée, par exemple en utilisant le rose Bengale suivi d'une irradiation par lumière verte, chez le lapin.⁶⁰

1. Le crosslinking trans-épithélial

Le CXL trans-épithélial (ne nécessitant pas d'abrasion mécanique de l'épithélium) fait l'objet ces toutes dernières années de recherches par plusieurs équipes. Les premières tentatives pour faire pénétrer la riboflavine à travers l'épithélium ont consisté à modifier la formulation de la riboflavine, notamment son osmolarité.⁶¹ Plusieurs molécules « facilitatrices » (enhancers) associées à la riboflavine ont également été proposées : le polyéthylène glycol, la lysine, le chlorure de benzalkonium,⁶² le peptide NC 1059.⁶³

Jusqu'à présent, la seule molécule sur le marché permettant de réaliser un CXL trans-épithélial est le Ricrolin TE® (Sooft, Montegiorgio, FM, Italie) qui combine deux « enhancers » qui jouent le rôle de « solvant » chimique : l'amino-alcool-TRIS (ou trométanol) et l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA). Il va permettre de relâcher la barrière épithéliale cornéenne et autoriser la diffusion de la riboflavine trans-épithéliale. Le principe actif, la riboflavine, est donc le même. Les résultats des études cliniques sont contradictoires : certains rapportent une efficacité⁶⁴⁻⁶⁷ et d'autres non.⁶⁸⁻⁷¹ Mais toutes s'accordent sur une pénétration moindre de la riboflavine trans-épithéliale. A l'heure actuelle, aucune étude clinique randomisée et prospective n'a fait la preuve de l'efficacité du CXL utilisant le Ricrolin TE®, sur la stabilisation de la maladie.

2. Optimisation de l'irradiation UVA

L'une des pistes d'amélioration de la procédure de CXL est donc le raccourcissement du temps d'irradiation par les UVA. En effet, le durcissement cornéen induit est proportionnel à la quantité totale d'énergie délivrée au niveau de la cornée et non pas à sa puissance. Ainsi, on peut induire un durcissement équivalent au CXL

conventionnel (30 minutes d'irradiation) en réduisant le temps d'irradiation tout en augmentant la puissance d'irradiation de façon à délivrer une quantité d'énergie équivalente sur la cornée (selon la loi de réciprocité de Bunsen-Roscoe). Une puissance élevée délivrée sur un temps plus court provoque, en théorie, la même rigidification de la cornée que le traitement conventionnel. Cependant, il existe un seuil au-delà duquel, l'augmentation de la puissance d'irradiation n'est plus associée à l'augmentation de la rigidité cornéenne (**Figure 9**).⁷² Cette valeur seuil est de 47mW/cm². L'énergie totale à délivrer étant de 90mW/cm², cela correspond à un temps d'irradiation d'environ deux minutes. Une hypothèse explicative à cette valeur seuil du raccourcissement de la durée d'irradiation est qu'elle corresponde au délai minimal pour que le renouvellement en oxygène dans le stroma ait le temps de se produire afin de permettre la réaction chimique de glycation, consommatrice d'oxygène et productrice de radicaux libres oxygénés.

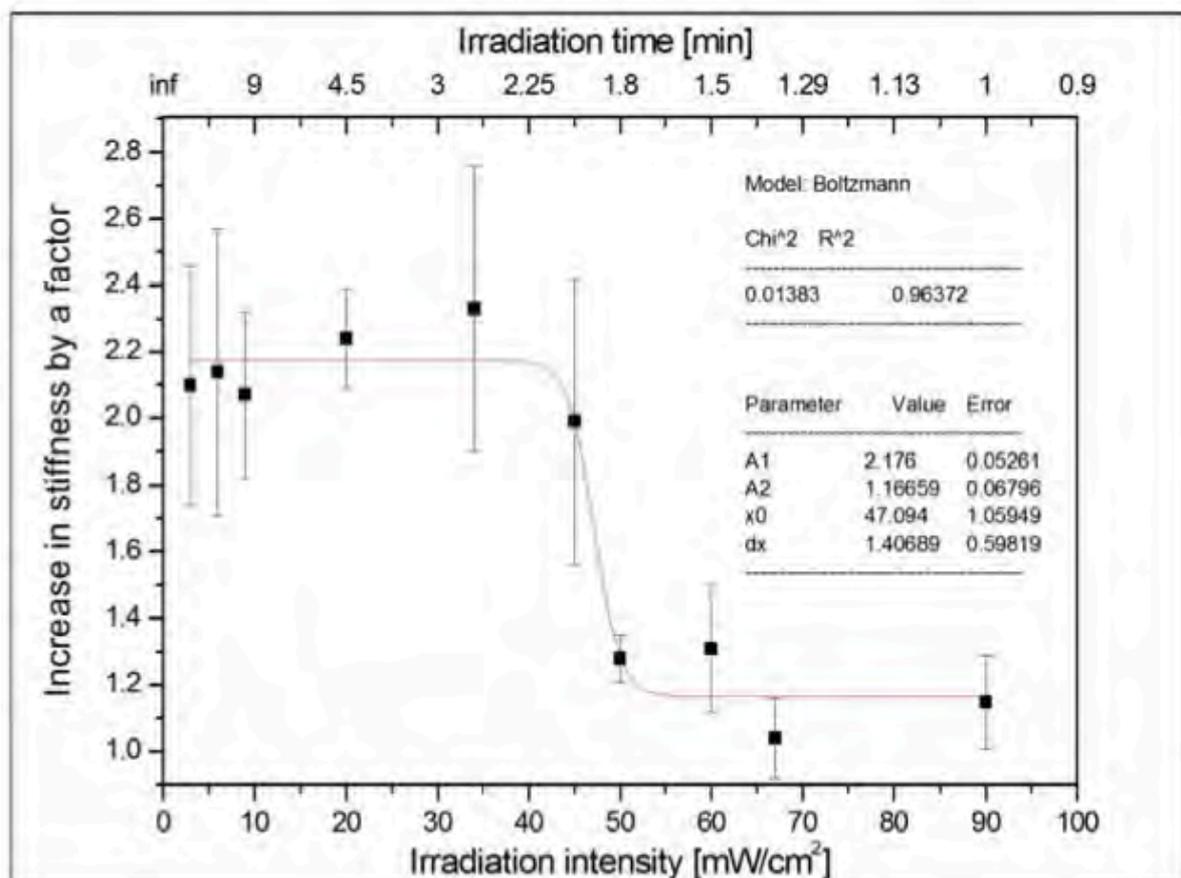


Figure 9: Courbe rigidité cornéenne/puissance d'irradiation des UVA : relation entre le facteur d'augmentation de la rigidité par rapport à une cornée non traitée et la puissance d'irradiation (en mW/cm²), selon Wernli et al.⁷²

Plusieurs sociétés concurrentes travaillent actuellement sur ce concept : une première va proposer un nouveau dispositif permettant un CXL en 3 minutes ; une autre modifie les propriétés de la lampe UV qu'elle commercialise déjà afin qu'elle délivre 10mW/cm² d'UVA en 9 minutes au lieu des 3mW/cm² pendant 30 minutes.

Les études expérimentales retrouvent une rigidification cornéenne équivalente entre ces différentes fluences permettant de délivrer la même énergie totale.^{73, 74}

Les premières études cliniques rapportent une efficacité des procédures d'irradiation « accélérées »^{71, 74, 75} mais aucune étude prospective randomisée n'a encore prouvé la non-infériorité des traitements UVA accélérés par rapport à la procédure conventionnelle. De plus, les échantillons de ces premières études sont faibles et certains ont rapportés des modifications, réversibles en quelques mois, des cellules endothéliales après des CXL utilisant une irradiation accélérée.⁷⁶

La modulation du profil d'irradiation par les UVA est également une piste des avancées pour le CXL. En effet, le profil d'irradiation pourrait à terme être adapté aux données préopératoires (topographie, image OCT,...) de la cornée à traiter ou aux mesures de fluorescence réalisées en peropératoire pour adapter la puissance délivrée.⁷⁷

L'association de ces deux grands principes d'avancées dans le domaine du traitement par CXL permettrait donc de transformer les suites opératoires, de réduire les effets indésirables, de réduire la durée de la procédure, d'améliorer le confort du patient et probablement d'étendre les critères d'inclusions.

IV/ L'iontophorèse

A. Introduction

L'iontophorèse, du grec « iontos », « les ions » et « phoresis », « se déplacer au travers de », est une procédure non invasive durant laquelle un faible courant électrique est appliqué pour faciliter la pénétration d'une substance ionisée (électriquement chargée) à travers un tissu. L'iontophorèse a été initialement développée pour la dermatologie puis a trouvé un champ d'application en ophtalmologie chez l'homme dès le début du XXème siècle.⁷⁸⁻⁸⁰

B. Historique

1. Généralités

Les premières descriptions de l'utilisation de l'électricité pour faire migrer des substances datent du milieu du XVIIIème siècle:⁸¹ l'italien Pivati a été le premier en 1747 à montrer qu'il pouvait faire diffuser une odeur (baume du Pérou) dans une pièce en lui appliquant un courant électrique.⁸² Ces travaux ont ensuite été repris par le français Fabré Palaprat qui a travaillé sur le passage de molécules chimiques à travers le corps en leur appliquant un courant électrique.

A partir de 1858, Richardson réalise les premières anesthésies dentaires utilisant l'iontophorèse.⁸³

En 1870, l'allemand Munk parvient à provoquer, chez des lapins, des contractures musculaires confirmant le transfert intracorporel de la strychnine appliquée par voie cutanée.⁸⁴

En 1888, Boccaleri et Massieri effectuent eux aussi des expérimentations sur des lapins : en leur administrant de la strychnine par iontophorèse, ils parviennent à les euthanasier.

En 1900, le français Leduc reprend ces expérimentations et confirme que l'iontophorèse puisse être un moyen d'administrer des molécules grâce à son expérience sur des lapins connectés en série et euthanasiés suite à une application transcutanée de strychnine par iontophorèse sur le premier lapin.⁸⁵ On parlait alors encore de

cataphorèse en pensant que les molécules chimiques étaient transportées par le flux du courant.

C'est finalement Frankenhauser qui invente le terme d'iontophorèse en 1907 en se basant sur plusieurs travaux montrant que chaque molécule chimique avait sa propre charge ionique.⁸⁶

Depuis l'iontophorèse a connu de nombreuses applications, notamment en dermatologie pour le traitement de l'hyperhidrose ou pour l'administration transcutanée de lidocaine, de dexaméthasone ou de fentanyl. Mais l'iontophorèse intéresse également d'autres domaines: en ORL, dans le traitement des otites moyennes chroniques ou des rhinites vasomotrices; en rhumatologie pour le traitement des ostéoarthrites, en stomatologie pour désensibiliser des dents, ou encore en urologie pour le traitement de la maladie de Lapeyronie.⁸⁰ Elle a été très récemment évaluée pour la pénétration de nicotine et lidocaine à travers la muqueuse orale.⁸⁷

2. L'iontophorèse en ophtalmologie

En 1908, l'allemand Wirtz réalise pour la première fois une iontophorèse transcornéenne de sel de zinc afin de traiter des ulcères de cornée.⁸⁸

En 1921, Birkauser publie le cas de 10 patients atteints de leucome cornéen avec une amélioration clinique après l'administration d'ions iodure et chlorure par iontophorèse transcornéenne.⁸⁹

En 1924, Fietta publie le traitement de synéchies irido-cristalliniennes en administrant de l'atropine par iontophorèse transcornéenne.⁹⁰

En 1926, Le Cam réalise sa thèse intitulée « De la valeur de l'ionisation en thérapeutique oculaire » à Paris.

En 1927, Morisot rapporte des applications de lithium par iontophorèse pour le traitement de sclérites, de magnésium et calcium pour le traitement du glaucome, de chlorure d'ammonium pour le traitement de la cataracte ou encore d'acide phosphorique pour le traitement de l'atrophie optique.⁹¹

En 1936, Erlanger effectue la première publication dans une revue anglo-saxonne sur l'iontophorèse, concernant ses travaux chez l'animal.⁹²

En 1939, Karbowski publie une revue de la littérature sur les travaux effectués jusque là essentiellement par des européens.⁹³

En 1943, Fleming rapporte quelques centaines de cas traités pendant les 10 années précédentes, pour des inflammations intraoculaires, des infections à pneumocoque et à gonocoque, des sclérites et épisclérites ou encore des névrites rétro-bulbaires.⁷⁹

La même année, Von Sallmann démontre la supériorité de l'administration d'atropine par iontophorèse transcornéenne par rapport aux injections sous-conjonctivales.⁹⁴

En 1947, Selinger décrit la technique d'iontophorèse transcornéenne à l'aide d'une lentille ou d'une cupule oculaire (**Figure 10**), notamment selon la charge de la molécule à administrer.⁷⁸

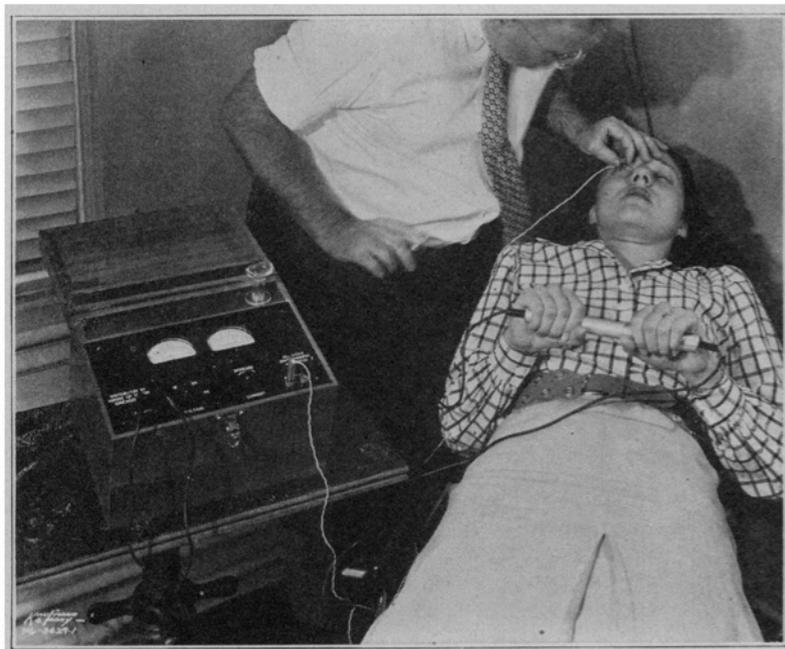


Figure 10: Photo de Selinger réalisant une iontophorèse en 1947: l'électrode principale étant sous forme d'une lentille (notez le deuxième type de dispositif pour l'électrode principale, la cupule oculaire, posée sur le bord de l'appareil) et l'électrode de retour tenue par le patient dans ses mains.⁷⁸

En 1951, Swan note que l'iontophorèse transcornéenne de pénicilline était efficace dans le traitement des ulcères de cornée à pneumocoque.⁹⁵

En 1965, Lachaud a rapporté l'utilisation de l'iontophorèse transsclérale d'hydrocortisone dans le traitement des uvéites.⁹⁶

En 1966, Jones et Maurice ont pu mesurer le flux d'humeur aqueuse grâce à une iontophorèse transcornéenne de fluorescéine.⁹⁷

Dans les années 70 et 80, peu de publications ont été faites sur le sujet.

En 1984, Maurice et Hughes sont les premiers à décrire les phénomènes physiques qui gouvernent l'iontophorèse et proposent une équation pour prédire la quantité de produit qui peut pénétrer dans un tissu en tenant compte de la durée d'application, de l'intensité du courant, de la concentration du produit et de la concentration d'ions en compétition.⁹⁸

Différents produits ont été testés par voie transconjonctivale, transcornéenne ou transsclérale. L'iontophorèse transcornéenne avait pour but l'obtention de forte concentration du produit étudié dans la cornée et dans l'humeur aqueuse alors que l'iontophorèse transsclérale a été utilisée afin d'obtenir une forte concentration dans le segment postérieur.

Les principaux principes actifs évalués par des études expérimentales animales (la majorité sur le lapin)⁹⁹ sont des antibiotiques (tobramycine, gentamycine,¹⁰⁰ céfazoline, ciprofloxacine,¹⁰¹ vancomycine), des antifongiques (kétocazole), des antiviraux (acyclovir, ganciclovir, foscarnet), des corticostéroïdes ou encore du 5-fluorouracile (5-FU). L'administration d'acyclovir par iontophorèse pour le traitement des kératites herpétiques profondes a été évaluée favorablement par rapport au traitement topique¹⁰² ou intraveineux.¹⁰³

Chez l'homme, les essais ont porté sur des corticostéroïdes pour traiter des inflammations intraoculaires sévères, des rejets de greffes¹⁰⁴ ou encore des syndromes secs,¹⁰⁵ en administrant de la dexaméthasone ou de la méthylprednisolone par voie transsclérale (**Figure 12**, au milieu).^{105, 106} Le traitement par iontophorèse du syndrome sec a également été réalisé à l'aide d'iodure. En 2002, Yoo rapporte un cas de kératite fongique (à *Paecilomyces*) traité par iontophorèse de miconazole (**Figure 11**).¹⁰⁷

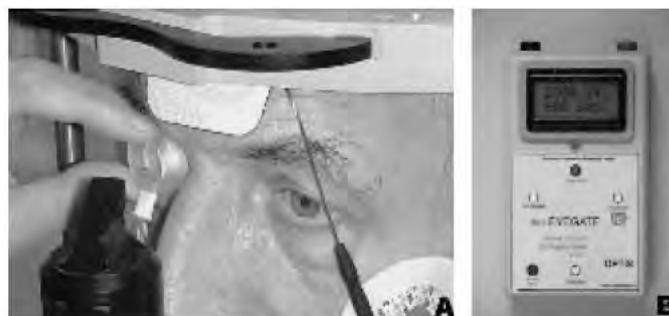


Figure 11 : Iontophorèse transcornéenne par Yoo : administration de miconazole pour une kératite fongique.¹⁰⁷

Pour toutes ces expérimentations, différents prototypes d'applicateurs ont été créés (**Figure 12**).⁹⁹



Figure 12: Différents dispositifs d'iontophorèse transsclérale : **A gauche** : utilisé par Barza et al.¹⁰⁸ **Au milieu** : utilisée par Behar-Cohen et al (Eyegate).¹⁰⁹ **A droite** : utilisée par Fisher et al (OcuPhor™).¹¹⁰

Malgré près d'un siècle de publications, l'iontophorèse en ophtalmologie s'est peu développée. Pourtant, elle pourrait trouver de nombreuses applications thérapeutiques, notamment dans le traitement des inflammations et des infections du segment postérieur en alternative ou en complément des injections intravitréennes, sous-conjonctivales ou latéro-bulbaires ou encore du traitement par voie générale. Elle pourrait potentiellement permettre la délivrance de facteurs trophiques ou anti-angiogéniques vers la rétine ou la choroïde.

C. Principe de l'iontophorèse

L'iontophorèse est une procédure non invasive durant laquelle un faible courant électrique est appliqué pour faciliter la pénétration d'une substance ionisée (électriquement chargée) à travers un tissu (**Figure 13**). La substance joue donc le rôle de conducteur de courant à travers le tissu.⁹⁹ L'iontophorèse est adaptée pour les substances positivement ou négativement chargées au pH physiologique et de préférence avec un faible poids moléculaire.¹¹¹

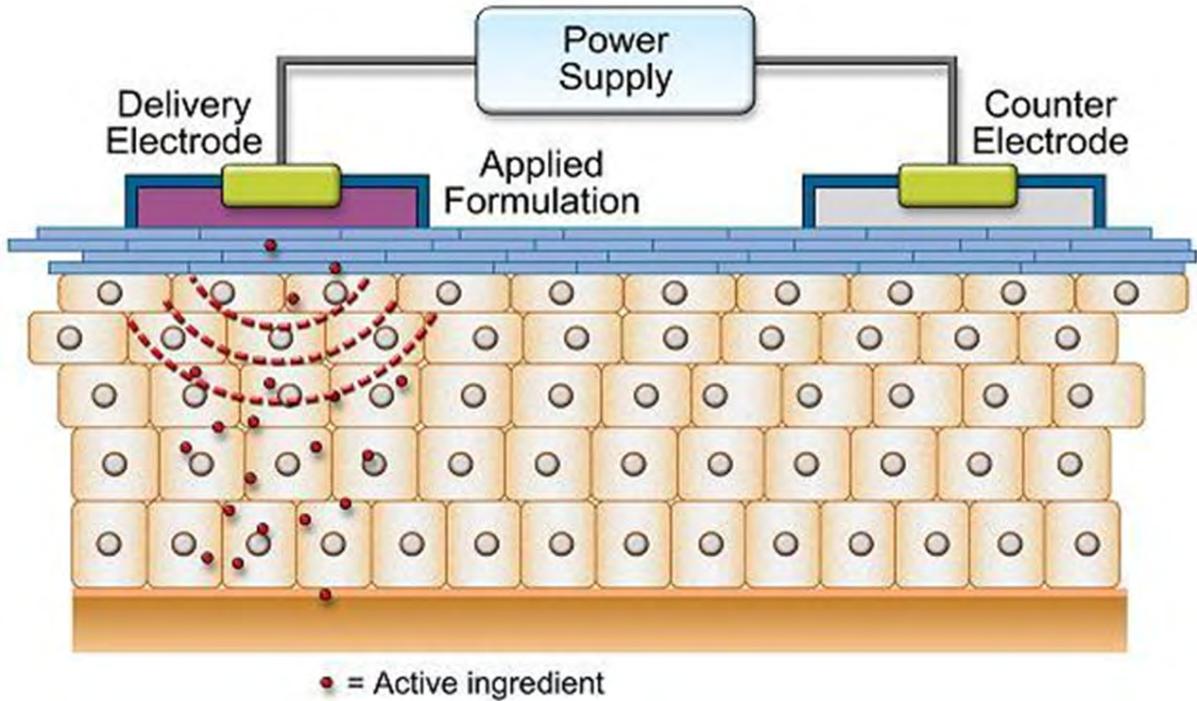


Figure 13: Schématisation du principe général de l'iontophorèse : la substance (Applied Formulation) en contact avec l'électrode principale (Delivery Electrode) et portant la même charge électrique qu'elle, va pénétrer dans le tissu après application de courant, grâce à un générateur électrique (Power Supply), entre cette électrode et l'électrode de retour de charge opposée.

Le mécanisme exact de pénétration n'est pas clairement identifié mais fait probablement appel à un passage de la molécule par voie trans-cellulaire et inter-cellulaire.

Ce transport, initialement étudié au niveau de la peau, fait appel aux phénomènes de diffusion passive, de pénétration active (par électro-migration) et d'électro-osmose.¹¹² Le transport de matière par un flux est la quantité de matière par unité de surface et par unité de temps. On le note J et s'exprime en $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$.

Dans le cadre de l'iontophorèse, ce transport répond donc à l'équation suivante :

$$J_{\text{TOT}} = J_P + J_{\text{EM}} + J_{\text{EO}}$$

Le J_{TOT} correspond au flux total, le J_P au flux passif, le J_{EM} au flux lié à l'électro-migration et le J_{EO} au flux d'électro-osmose.

La diffusion passive est en général négligeable par rapport aux deux autres mécanismes.¹¹³

L'électro-migration peut être définie par la loi de Faraday :

$$J_{EM,D} = (It_D)/(AF_{Z_D})$$

I est l'intensité du courant appliqué, t_D est le nombre de transport et valence du produit étudié (D, pour Drug), A est l'aire de contact, F est la constante de Faraday et Z_D la charge du produit étudié.

Le nombre de transport t_D définit la fraction de la charge totale portée par le produit étudié (D) selon l'équation :

$$t_D = (c_D z_D u_D) / \sum (c_i z_i u_i)$$

c_D représente la concentration du produit, z_D sa valence et u_D sa mobilité. c_i , z_i et u_i sont les paramètres correspondant aux autres porteurs de charge.

L'électro-osmose repose sur le principe qu'un solvant peut entraîner avec lui, lors de sa migration sous l'effet d'un courant continu, des substances dissoutes. Cet effet est pH-dépendant. Ainsi, dans des conditions physiologiques, la peau a une charge négative ce qui facilite le transport de molécules cationiques. Au cours de ce transport, le solvant entraîné pourrait à son tour permettre la diffusion de molécules dissoutes en son sein. Ce flux d'électro-osmose du solvant de l'anode vers la cathode ($V_{A \rightarrow C}$) dépend également de la concentration du produit selon l'équation :

$$J_{EO,D} = V_{A \rightarrow C} \cdot c_D$$

Au total, le transport d'une substance par iontophorèse repose sur l'équation de Nernst-Planck qui tient compte des phénomènes de diffusion et de migration de la substance:^{112, 113}

$$J_{TOT} = \left[\left(\frac{I}{AF} \right) \frac{U_{drug}}{\sum C_i U_i Z_i} + V_{A \rightarrow C} \right] \cdot C_{drug}$$

Les paramètres qui déterminent la pénétration du produit dans le tissu sont donc principalement :

- l'intensité du courant
- la concentration du produit étudié

- le temps d'application, qui a cependant moins d'influence que l'intensité du courant¹⁰⁰
- la présence de co-ions qui entrent en compétition avec le produit étudié.

Dans un champ électrique, chaque ion est soumis à la loi de Coulomb. Lorsqu'un ion, soumis à l'action de freinage due à la viscosité du milieu atteint une vitesse limite v , on obtient alors la loi de Stoke. Les lois de Stoke et de Coulomb sont les forces qui interviennent dans le système.

La sûreté de l'iontophorèse dépend principalement de la densité de courant appliquée sur la surface de l'œil, c'est à dire de l'intensité du courant par surface de contact entre la sonde et l'œil. Pour l'iontophorèse transcornéenne, des densités de 20 mA/cm² pendant 5 minutes se sont avérées sans danger.¹¹⁴ Les effets indésirables rapportés après iontophorèse transcornéenne sont une kératite ponctuée superficielle résolutive en moins de 24 heures.⁹⁹

Par le passé, de fortes densités de courant ont souvent été employées. Elles étaient responsables de brûlures électriques localisées en regard du site d'application de la sonde pouvant se traduire par des opacités cornéennes. Des brûlures chimiques peuvent aussi survenir lorsque le pH de la solution appliquée est acide ou basique, ou lorsque le pH de la solution est modifié au cours de l'électrolyse induite par l'iontophorèse.

D. L'iontophorèse transcornéenne de riboflavine

L'objectif de la procédure consiste à créer un courant électrique entre une électrode négative (cathode) placée au-dessus et au contact du réservoir de riboflavine (placé sur la cornée) et un patch positif (anode) collé sur le corps du sujet étudié (**Figure 14**).

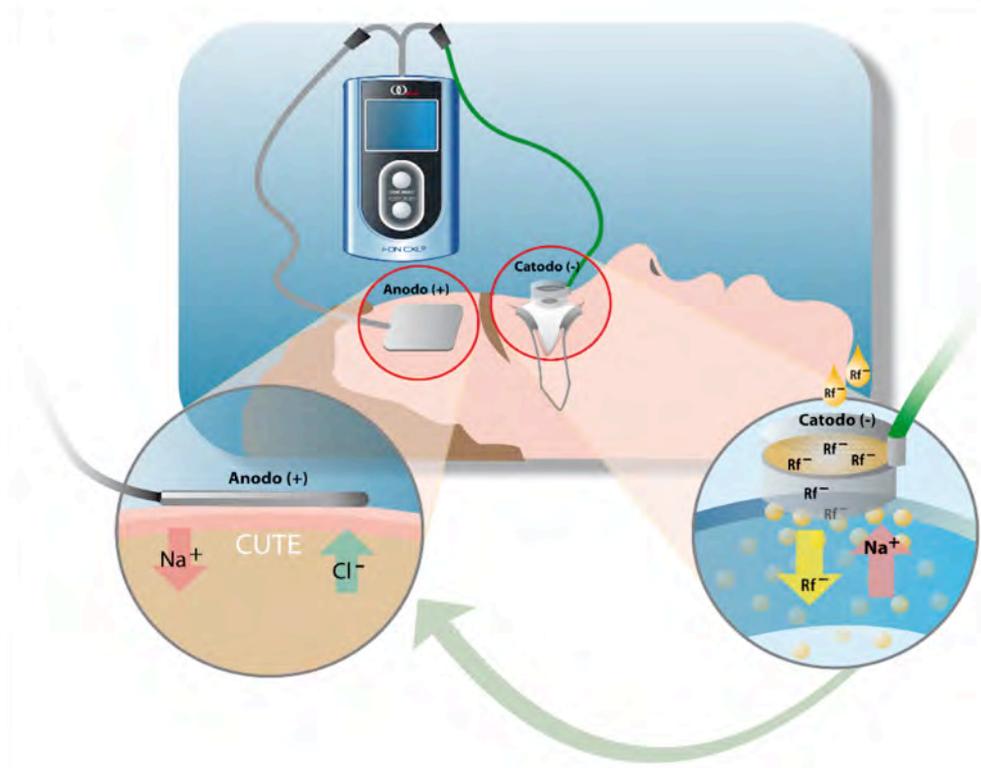


Figure 14 : Schématisation du principe d'iontophorèse chez l'homme.

La riboflavine est une candidate parfaite pour l'iontophorèse oculaire par sa structure négativement chargée et son faible poids moléculaire.¹¹⁵ La migration se faisant de l'anode vers la cathode, le courant électrique entraîne donc la riboflavine au travers de la cornée dans laquelle elle se dépose.

Une étude préliminaire, non publiée, a consisté à appliquer la riboflavine 0,1% par iontophorèse (sans désépithélialisation) pendant différentes durées. L'intensité du courant a été déterminée selon les études précédentes pour éviter tout effet secondaire. La durée de 5 minutes d'application avec une intensité de courant de 1mA a été retenue comme permettant d'aboutir à une imprégnation intrastromale optimale de riboflavine pour le CXL (données non montrées).

V/ Etude expérimentale

A. Introduction

Le CXL a prouvé son efficacité mais présente des effets indésirables qui sont dans la grande majorité des cas liés à la désépithélialisation, indispensable pour la pénétration de la riboflavine dans le stroma.

Une procédure préservant l'épithélium et conservant la même efficacité représente donc l'avenir pour les patients atteints d'un kératocône évolutif.

Devant les résultats incomplètement satisfaisants des différentes stratégies de CXL trans-épithélial proposées jusque-là, nous avons voulu évaluer une nouvelle technique permettant l'administration de riboflavine en préservant l'épithélium cornéen: l'iontophorèse.

Dans cette étude menée chez le lapin, nous avons comparé d'une part la diffusion de la riboflavine dans le stroma et l'humeur aqueuse et d'autre part les modifications de la structure du stroma cornéen après une administration conventionnelle de riboflavine ou après une application par iontophorèse. La diffusion de la riboflavine a été évaluée par HPLC et par microscopie biphotonique. L'analyse des modifications structurales cornéennes a reposé sur la microscopie biphotonique.

B. Matériels et Méthodes

1. Animaux

L'étude a été menée sur 108 lapins blancs, femelles, albinos « New-Zealand », pesant entre 2,2 et 3 Kg au début de l'expérimentation. Tous les animaux étaient sains et n'étaient pas atteints de pathologies oculaires.

Une anesthésie a été réalisée pour les différents traitements, à l'aide d'un mélange de kétamine et chlorhydrate de xylazine en injection intramusculaire. Cette anesthésie générale était complétée par une anesthésie topique à l'aide de gouttes d'oxybuprocaine et chlorure de benzalkonium.

Un seul œil était traité pour chaque animal.

Les lapins gardés en vie pendant 14 jours étaient placés dans des cages sombres, sans aucune lumière directe.

Les lapins ont été sacrifiés en leur administrant une overdose de pentobarbital immédiatement après le traitement ou 14 jours après (J14).

Toutes les expérimentations ont été approuvées par le comité d'éthique du CPTP (centre de physiopathologie de Toulouse) et menées conformément aux règles émises pour l'usage des animaux dans la recherche en ophtalmologie par l'ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology).

2. Procédure conventionnelle de crosslinking

La procédure conventionnelle de CXL était conforme au protocole de Dresde. Après une désépithélialisation mécanique, une solution de riboflavine 0.1% suspendue dans une solution de dextran T500 20% (Ricrolin®, Sooft, Montegiorgio, FM, Italie) était instillée chaque minute pendant 30 minutes puis toutes les 5 minutes pendant le traitement par UVA. La procédure s'achevait par une application d'acide fusidique en pommade, qui était renouvelée à deux reprises le lendemain de l'intervention pour les animaux gardés en vie 14 jours.

3. Procédure de crosslinking par iontophorèse

Le dispositif pour l'iontophorèse comprend une source de courant continu et deux électrodes de charge opposée. L'électrode principale était contenue dans une cupule-réservoir ronde de 0,45ml ayant un diamètre interne de 8mm et un anneau de succion périphérique afin de maintenir le dispositif pendant la procédure (**Figure 15**).



Figure 15: Représentation schématique du dispositif de l'électrode principale: cupule posée sur la cornée, maintenue par un anneau de succion et contenant la grille-électrode

Pour notre expérimentation sur le lapin, l'électrode de retour était connectée sur une aiguille de 30 gauges introduite en sous-cutanée dans le cou (**Photo 1**).

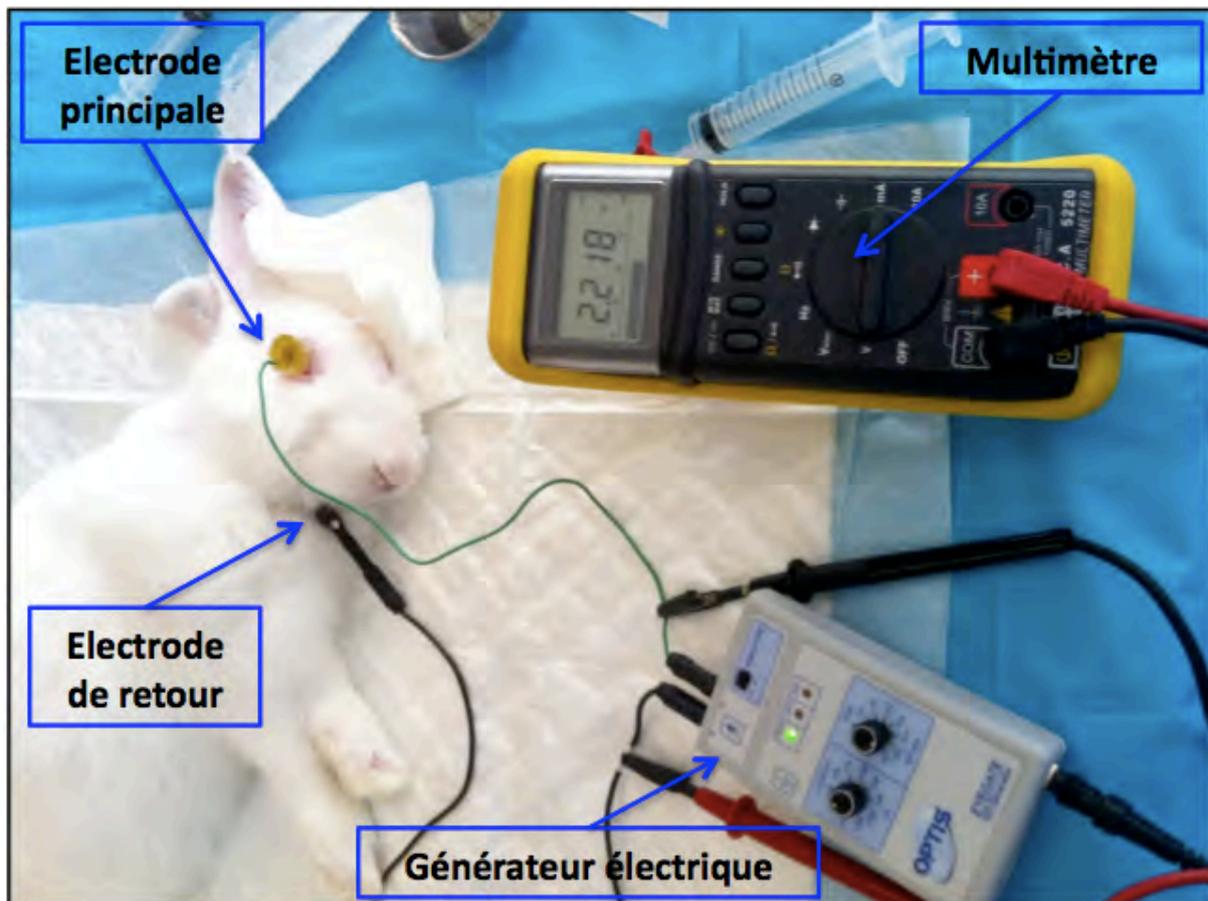


Photo 1 : Vue générale de l'installation pendant l'iontophorèse. Le générateur électrique délivrait un courant continu permettant à la solution de migrer de l'électrode principale vers l'électrode de retour. Le multimètre contrôlait la stabilité du voltage du circuit pendant toute la durée de l'application.

La cupule de l'électrode principale était remplie d'une solution hypo-osmolaire de riboflavine 0,1% et EDTA (Ricolin +[®], Sooft, Montegiorgio, FM, Italie) (**Photo 2**).

Un courant continu de 1mA (soit 0,5mA/cm²) était appliqué pendant cinq minutes. La stabilité du circuit était contrôlée par mesure du voltage grâce à un multimètre branché en dérivation sur les deux électrodes.

Les deux électrodes du dispositif étaient retirées avant l'application des UVA.

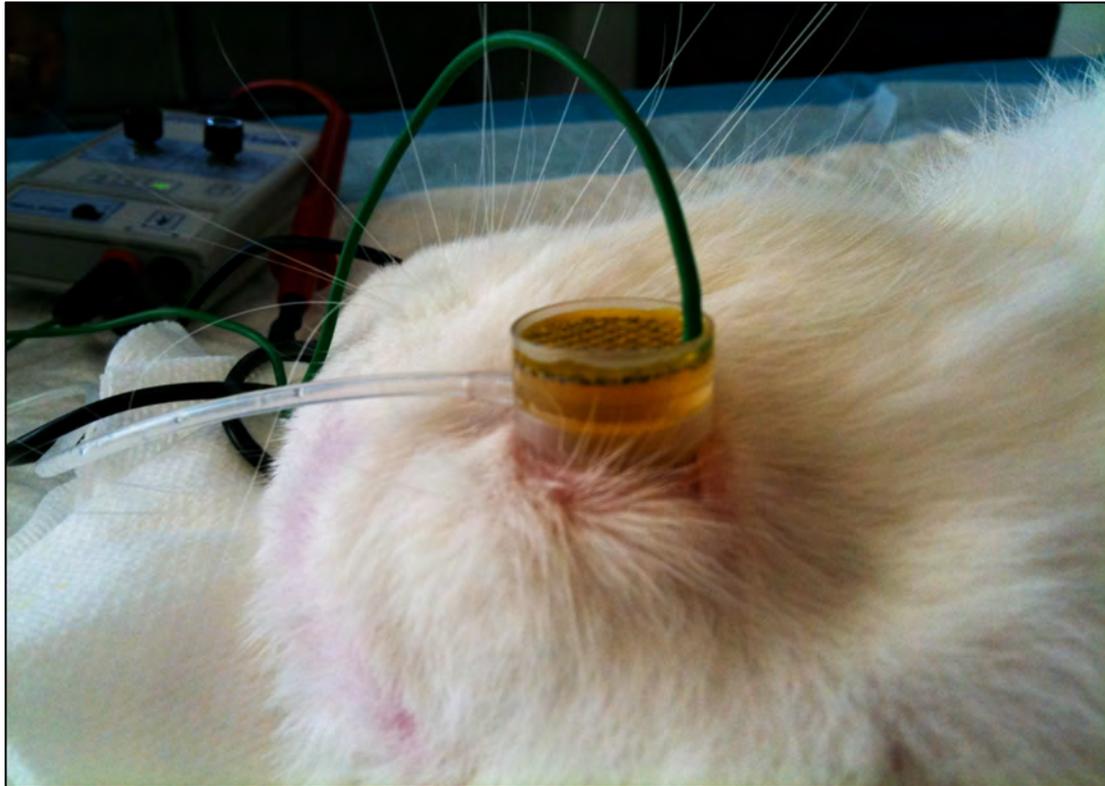


Photo 2: Dispositif d'iontophorèse positionné sur l'œil du lapin : l'électrode principale est submergée dans la cupule remplie de Ricrolin+®.

La procédure s'achevait, comme pour le crosslinking conventionnel, par une application d'acide fusidique en pommade, renouvelée à deux reprises le lendemain de l'intervention pour les animaux gardés en vie 14 jours.

4. Groupes de traitements

Les lapins ont été divisés en quatre principaux groupes :

- Le **groupe 1** était composé de 25 animaux traités par l'application d'une solution de **riboflavine** 0,1% hypo-osmolaire avec de l'EDTA disodique, en utilisant l'**iontophorèse** pendant cinq minutes. Ces animaux ont été sacrifiés immédiatement après le traitement et ont été destinés à l'étude de la toxicité épithéliale et à l'analyse de la diffusion intrastromale de la riboflavine (**Tableau 2**).

- Le **groupe 2** était constitué de 16 animaux traités, après désépithélialisation cornéenne, par une instillation de **riboflavine** en suspension avec une solution de Dextran T500 20% pendant 30 minutes (**application conventionnelle**). Les lapins ont été sacrifiés immédiatement après le traitement pour étudier la diffusion intrastromale de la riboflavine (**Tableau 2**).

- Le **groupe 3**, nommé **I-CXL**, était composé de 18 animaux traités par l'application d'une solution de riboflavine 0,1% hypo-osmolaire – EDTA disodique par iontophorèse pendant cinq minutes suivie d'un traitement :

- par UVA conventionnel (i.e. 3 mW/cm² pendant 30 minutes) (n=9)
- ou par UVA accéléré (i.e. 10 mW/cm² pendant 9 minutes) (n=9).

Les lapins étaient sacrifiés 14 jours après le traitement pour l'analyse des modifications structurales de la cornée (**Tableau 3**).

- Le **groupe 4**, nommé **C-CXL**, était constitué de 9 lapins traités par la procédure conventionnelle de CXL: désépithélialisation suivie d'une application de riboflavine 0,1% en suspension dans une solution de dextran T500 20% pendant 30 minutes et enfin UVA à 3 mW/cm² pendant 30 minutes (**Tableau 3**).

Nous avons comparé les cornées issues des groupes 3 et 4, destinées à l'étude des modifications structurales du stroma, avec des cornées de lapins contrôles traités par une application conventionnelle de riboflavine sans traitement UVA (n=6), avec des lapins contrôles traités par UVA sans instillation de riboflavine préalable (n=3) et avec des lapins contrôles non traités (n=5). Ces lapins étaient sacrifiés, comme ceux des groupes 3 et 4, 14 jours après le traitement (**tableau 3**).

Techniques d'analyse	Application par iontophorèse Groupe 1 (n=25)	Application conventionnelle Groupe 2 (n=16)	Contrôles non traités (n=15)
HPLC	10 (Tableau 4)	10 (Tableau 4)	9 (Tableau 4)
Microscopie biphotonique	9 (Fig 16B et 18A)	6 (Fig 16C et 18B)	3 (Fig 16A et 18C)
Immunohistochimie	6 (Fig 17)	0	3 (Fig 17)

Tableau 2 : Animaux et figures pour la diffusion de riboflavine : Répartition des lapins et figures correspondantes pour l'analyse de la diffusion intra-cornéenne de la riboflavine (n=47) et l'étude de la toxicité cornéenne épithéliale (n=9).

	I-CXL (iontophorèse) Groupe 3 (n=18)		C-CXL (conventionnel) Groupe 4 (n=9)	Contrôles (n=14)		
	Avec traitement UVA conventionnel (n=9)	Avec traitement UVA accéléré (n=9)		UVA convention- nel (sans application de riboflavine)	Application conventionnelle de riboflavine (sans UVA)	Non traités
Echantillons sur coupes de cornées	7 <i>(Fig 19A, 19C, 21A et 21B)</i>	7 <i>(Fig 19A, 19C, 21A et 21B)</i>	7 <i>(Fig 19B, 19D, 21D et 21E)</i>	3 <i>(Fig 21C)</i>	6 <i>(Fig 21C)</i>	5 <i>(Fig 21C)</i>
Cornées entières	2 <i>(Film 1)</i>	2 <i>(Film 1)</i>	0	0	0	2 <i>(Film 2)</i>

Tableau 3: Animaux et figures pour l'analyse des modifications structurales : Répartition des lapins et figures correspondantes pour l'analyse de la structure cornéenne par microscopie biphotonique à J14.

5. Microscopie biphotonique

a. Principe

Le principe de la microscopie biphotonique est basé sur la microscopie confocale qui utilise notamment un laser comme source d'excitation et un iris confocal (fenêtre placée devant le photodétecteur).

La technologie biphotonique, évolution de la microscopie confocale, utilise un laser infra-rouge. Cette source d'une lumière à une longueur d'onde élevée permet une plus grande pénétration dans l'échantillon et donc une étude plus en profondeur (jusqu'à 500µm au lieu de 150µm pour le confocal simple photon). Enfin, la photodestruction et le photoblanchiment sont moins importants : l'excitation étant limitée au point de focalisation, les plans adjacents sont épargnés.

b. Application expérimentale

Le microscope utilisé pour cette étude était le LSM 7MP (Zeiss, Jena, Allemagne). La lumière d'excitation est produite par un laser Ti:Sapphire Chameleon Ultra II

(Chameleon Ultra, Coherent Inc., Palo Alto, CA, USA) réglé à 830 nm. Les fluorescences émises sont divisées en deux canaux à l'aide d'un miroir dichroïque de 760 nm.

Dans le premier canal, on détecte le collagène par génération de seconde harmonique (SHG) émettant une fluorescence détectée à l'aide d'un filtre à bande passante à 485nm (SP 485). La SHG est un phénomène d'optique non linéaire induit par l'interaction du laser multiphoton sur les fibres de collagènes (collagène fibrillaire de type I).

Dans le deuxième canal, la fluorescence de la riboflavine est détectée à l'aide d'un filtre à bande passante de 500 nm à 550 nm (BP 500-550) correspondant au spectre d'émission de la riboflavine.

Les images ont été acquises à l'aide d'un objectif à immersion d'huile 40X (NA = 1.4, Plan-Apochromat; Zeiss). Afin de visualiser la cornée dans son intégralité, l'échantillon a été scanné à l'aide d'un module tile scan permettant l'acquisition d'une mosaïque de 3x3 images représentant l'ensemble de l'échantillon. La superposition des 3x3 images a nécessité dans un second temps un traitement d'images à l'aide du logiciel "plug Mosaic" Fiji.

Les cornées étaient excisées chirurgicalement, sous microscope. Elles étaient ensuite intégrées dans un milieu de congélation pour tissu (OCT®) et coupées à l'aide d'un cryostat à -20°C pour obtenir des échantillons de 5µm d'épaisseur. Ces coupes de cornée étaient montées dans un milieu Fluorescence Mounting Medium® (Dako, Glostrup, Danemark).

La lecture et l'analyse des images ont été réalisées en aveugle. Elles ont été acquises dans des conditions standardisées de gain et de compensation (luminosité et contraste).

Pour évaluer le « measurement of fluorescence intensity » (MFI) ou mesure de l'intensité de la fluorescence, des images brutes de cornées entières ont été analysées à l'aide de la fonction Region Measurements du logiciel Metamorph (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA). Ce logiciel calcule l'intensité de fluorescence de l'image entière. Les courbes de mesure de la diffusion de riboflavine ont été acquises sur les mosaïques d'images corrigées et à l'aide de la fonction Linescan du logiciel Metamorph. Une ligne de référence était tracée de l'épithélium jusqu'à l'endothélium. Le logiciel a calculé l'intensité de la fluorescence le long de cette ligne de référence de 25 pixels de large (12 de part et d'autre de chaque ligne de référence) et tracé la courbe de fluorescence.

Pour visualiser le collagène dans toute l'épaisseur de la cornée, les cornées sélectionnées ont été montées dans du Fluroescence Medium et analysées fraîches au microscope biphotonique à l'aide de la fonction Z-Stack permettant l'acquisition d'images sur plusieurs couches. Les images acquises toutes les 2 μm , représentant une série en Z de toute l'épaisseur de la cornée, ont par la suite été traitées à l'aide du logiciel Zen (Zeiss, Jena, Allemagne) et exportées sous format vidéo (.avi).

6. Histochimie et Immunohistochimie

Les échantillons de cornées traitées par iontophorèse et de cornées contrôles non traitées ont été fixés immédiatement dans du formol tamponné à 10% puis inclus en paraffine. Des coupes de 3 μm d'épaisseur ont été colorées à l'hématoxyline et éosine (H&E).

L'analyse immunohistochimique a été réalisée à l'aide d'un Benchmark XT immunostainer (Ventana, Tucson AZ, USA) avec un anticorps anti-caspase 3 active (α -CASP3; rabbit polyclonal, dilution 1:1000 Abcam, Cambridge, UK) identifiant les cellules apoptotiques.

7. HPLC

a. Principe

La chromatographie en phase liquide à haute performance (ou High Performance Liquid Chromatographie = HPLC) permet de séparer un ou plusieurs composés d'un mélange afin de les identifier ou de les quantifier.

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide à haute pression (phase mobile) dans une colonne remplie de grains extrêmement fins (phase stationnaire).

Le système est composé d'une pompe comportant le réservoir de phase mobile, d'un injecteur, de la colonne de séparation et du détecteur (qui était pour notre étude un détecteur à fluorescence) relié au logiciel d'intégration des données. Les résultats se lisent sous la forme d'une courbe de signal en fonction du temps qui présente plusieurs pics de forme gaussienne. La largeur de ces pics dépend du temps passé dans le volume mort de la colonne et dans sa phase stationnaire. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse données. Il est aussi le reflet de l'efficacité de séparation de la colonne. La surface du pic dépend de la quantité du constituant.

b. Application expérimentale

Dans notre étude l'objectif était donc de quantifier un composé connu, la riboflavine au sein d'un lysat de cornée ou d'humeur aqueuse.

L'humeur aqueuse a été prélevée, immédiatement après le traitement, à l'aide d'une aiguille 30G, puis déposée dans un tube eppendorf opaque et congelée dans l'azote liquide. Les 8 mm de cornée centrale des lapins ont été excisés chirurgicalement sous microscope et également congelés dans l'azote liquide.

Pour l'analyse biochimique, les cornées étaient broyées et homogénéisées dans 200µl de PBS- /- à 4°C avec un lyseur de tissu pendant deux minutes à 25 battements par seconde. Le lysat était alors centrifugé à 3500G à 4°C pendant 10 minutes.

Le kit ChromSystem® Reagent (Munich, Allemagne) pour l'analyse de la vitamine B2 a été utilisé pour la préparation de 100µl d'homogénat de cornée ou 100µl d'homogénat d'humeur aqueuse (extraction, précipitation et stabilisation).

Le système HPLC était composé d'une pompe et d'un échantillonneur isocratiques ICS, un détecteur à fluorescence programmable FP 1520 JASCO, connecté au programme d'intégration CHROMELEON® (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). Le spectrofluorimètre était réglé à 465nm de longueur d'onde d'excitation et 525 nm d'émission. Le seuil de détection de la riboflavine était de 4,16 ng/ml.

Les courbes de calibration ont été obtenues en traçant les surfaces des pics de riboflavine en fonction de la concentration, utilisant une calibration standard avec le kit ChromSystem® Diagnostic. La validation de la méthode était effectuée par les niveaux de contrôles internes Levels I and II du ChromSystem® et par un contrôle de qualité externe INSTAND (Dusseldorf, Allemagne).

8. Analyse Statistique

Le test t de Student a été utilisé pour comparer les concentrations de riboflavine mesurées par HPLC après application de riboflavine par iontophorèse avec celles relevées après l'application conventionnelle de riboflavine. Le test t de Student a été également utilisé pour la comparaison des MFI obtenues avec l'analyse biphotonique, sur des coupes de cornée entière, après I-CXL versus C-CXL (logiciel Graph Pad Prism 5).

Les valeurs des concentrations constatées par HPLC, exprimée en moyenne avec l'écart-type, étaient considérées comme statistiquement significative si p avait une valeur inférieure à 0.05.

C. Résultats

1. Etude de la diffusion de la riboflavine

a. Analyse histologique

L'observation en microscopie biphotonique des coupes cornéennes des groupes 1 et 2 montrait une fluorescence importante provenant du stroma antérieur et moyen par rapport aux contrôles qui ne présentaient aucune fluorescence (**Figures 16A, 16B et 16C**). Ce signal, qui était détecté avec le filtre BP 500-550, correspondait à l'émission de la riboflavine. Les courbes de diffusion obtenues par la mesure de l'émission de la riboflavine montraient une distribution cornéenne similaire dans les 2 groupes : l'intensité du signal émis était uniforme sur les deux tiers antérieurs du stroma et aucune différence significative ($p=0,6$) n'a été mise en évidence entre les échantillons des groupes 1 et 2 (**Figures 16D, 16E et 16F**).

Les images en mosaïque acquises à l'aide du module Tile scan et permettant la visualisation d'un champ large de cornée ont montré un signal de fluorescence uniformément distribué dans les deux tiers antérieurs du stroma (**Figures 16B et 16C**). L'iontophorèse permettait donc une pénétration de riboflavine dans le stroma sans désépithélialisation.

Les images obtenues avec le filtre BP 500-550 montraient également une fluorescence majorée provenant des cellules, c'est à dire des kératocytes (flèches blanches dans les **figures 16B et 16C**) et des cellules endothéliales (résultats non montrés). Cette fluorescence n'était pas observée dans les contrôles (**Figure 16A**).

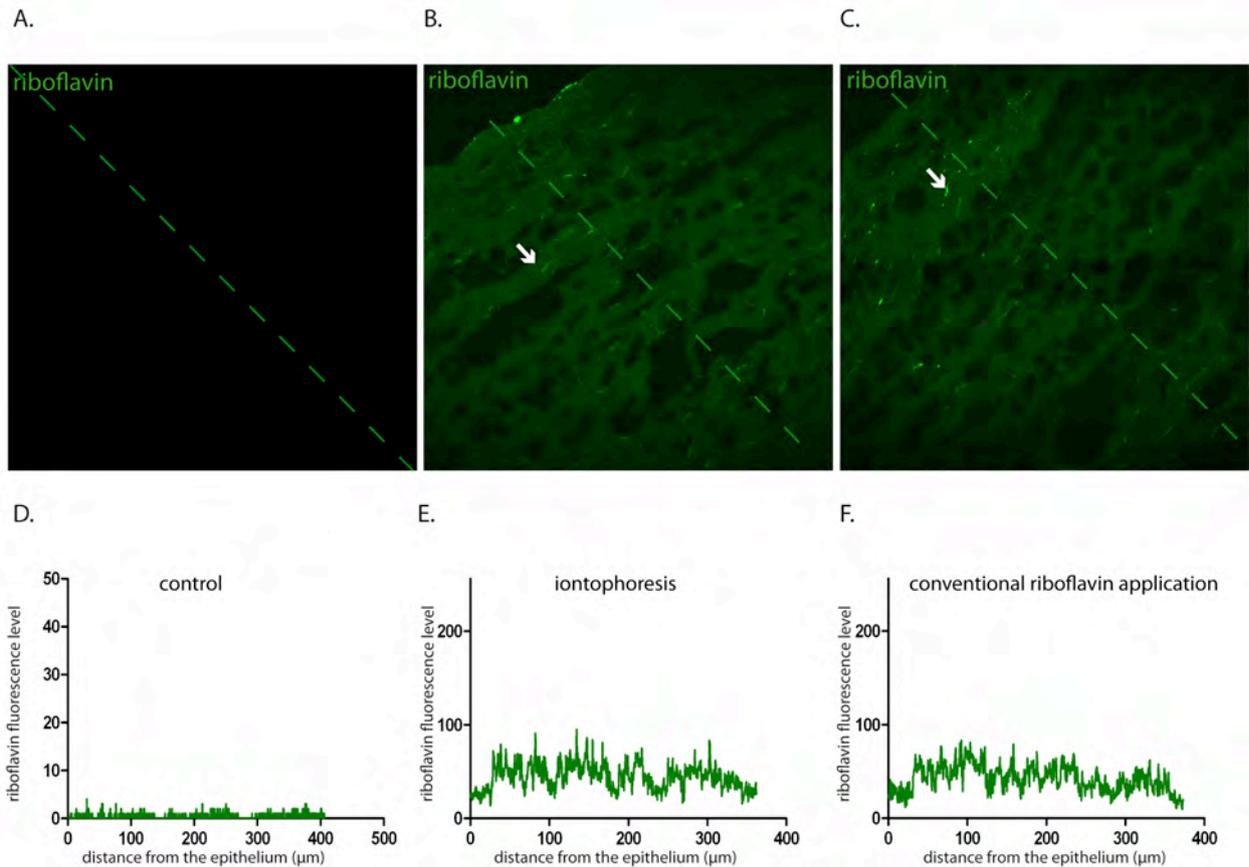


Figure 16 : Diffusion de riboflavine en microscopie biphotonique : Emission de fluorescence de la riboflavine sur les 2 /3 antérieurs du stroma de cornées contrôles (Fig 16A), de cornées traitées par une application de riboflavine par iontophorèse (groupe 1 – Fig 16B) et dans des cornées traitées par une application conventionnelle de riboflavine, après désépithélialisation (groupe 2- Fig 16C). Les courbes correspondent à l’intensité de fluorescence (en MFI) qui diffuse à travers l’épaisseur de la cornée (en μm) (ligne pointillée verte sur Fig 16A, 16B et 16C) sur des coupes de cornées contrôles (Fig 16D), de cornées traitées par iontophorèse (groupe 1 – Fig 16E) et sur des cornées traitées de façon conventionnelle (groupe 2 – Fig 16F). L’autofluorescence émise par les kératocytes est soulignée par les flèches blanches.

Nous avons étudié la toxicité de l’iontophorèse sur l’épithélium cornéen en la comparant aux épithéliums de cornées non traitées, par une analyse histologique puis immunohistochimique avec l’anticorps anti-aCASP3.

Comme le montre la **figure 17**, la structure histologique de l’épithélium analysé avec H&E n’était pas modifiée après l’iontophorèse par rapport à une cornée contrôle (**Figures 17A et 17C**).

De plus, l’iontophorèse ne montre pas d’augmentation significative du nombre de cellules épithéliales apoptotiques détectées à l’aide de l’anticorps anti-aCASP3 (**Figures 17B et 17D**).

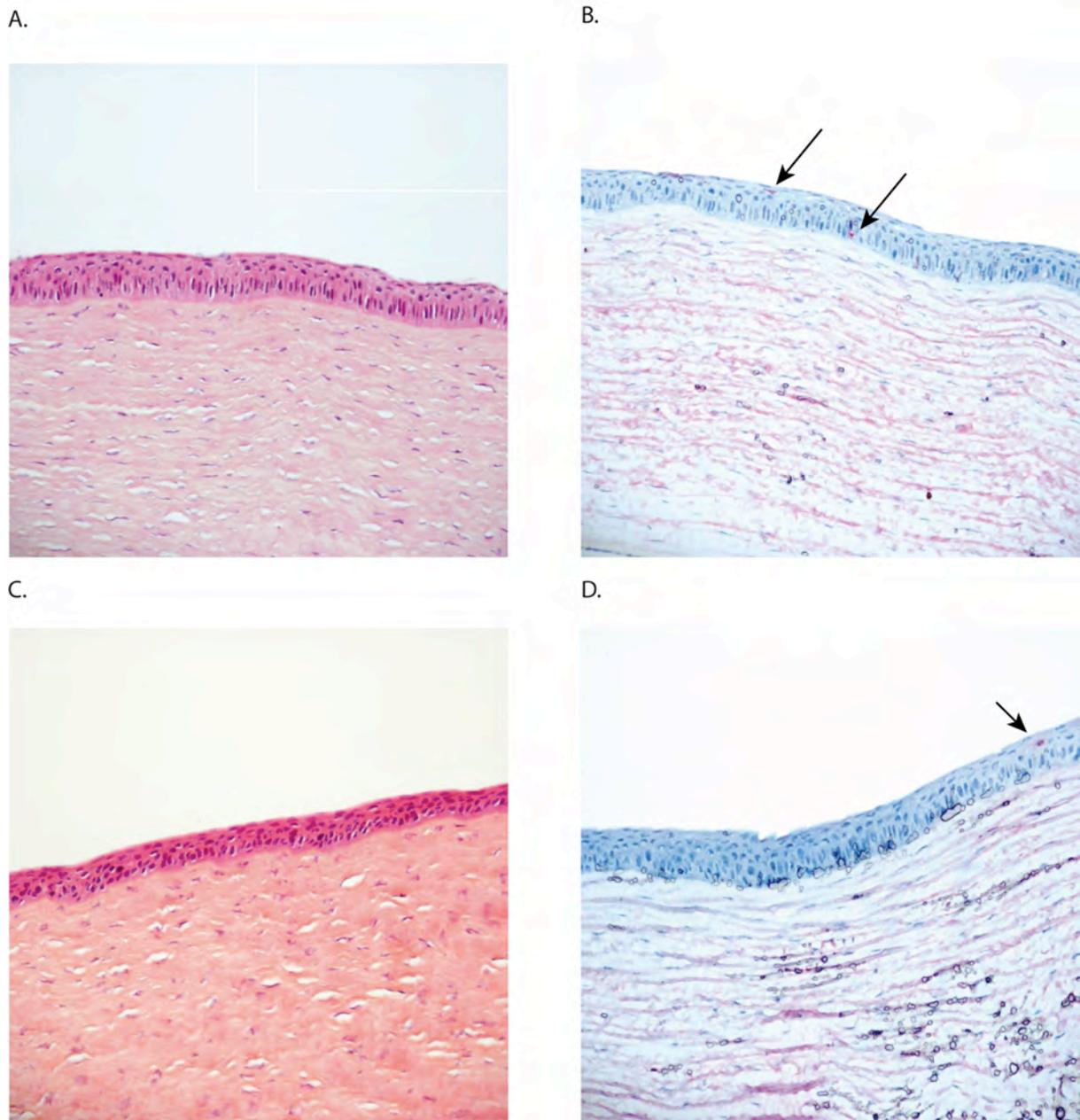


Figure 17 : Analyse de l'épithélium cornéen. Aspect morphologique de l'épithélium de cornées traitées par iontophorèse (Fig 17A ; Coloration Hématoxyline et Eosine, H&E, grossissement x200) et de cornées contrôles (Fig 17C, H&E, x200). Immunohistochimie utilisant l'anticorps anti caspase 3 active (aCASP3) dans des cornées traitées par iontophorèse (Fig 17B ; aCASP3, x200) et dans des cornées contrôles (Fig 17D, aCASP3, x200). Les flèches montrent quelques cellules épithéliales apoptotiques (en rouge) aCASP3+.

De même, pour évaluer une éventuelle toxicité locale, nous avons mesuré le pH de la solution de Ricrolin+® après le traitement par iontophorèse et constaté une stabilité du pH entre la solution pré et post-traitement (données non montrées).

En parallèle, nous avons également étudié le collagène du stroma de cornées traitées par riboflavine (de façon conventionnelle ou par iontophorèse) grâce à la technologie de génération de seconde harmonique (SHG). Nous avons alors observé que la fluorescence émise par les fibres de collagène était uniforme dans les groupes 1 et 2. Les images ainsi obtenues montraient dans les deux groupes un stroma strié avec des fibres de collagène denses, entremêlées et parfois dissociées par de l'oedème (**Figure 18**). Cette organisation collagénique était similaire au groupe contrôle non traité.

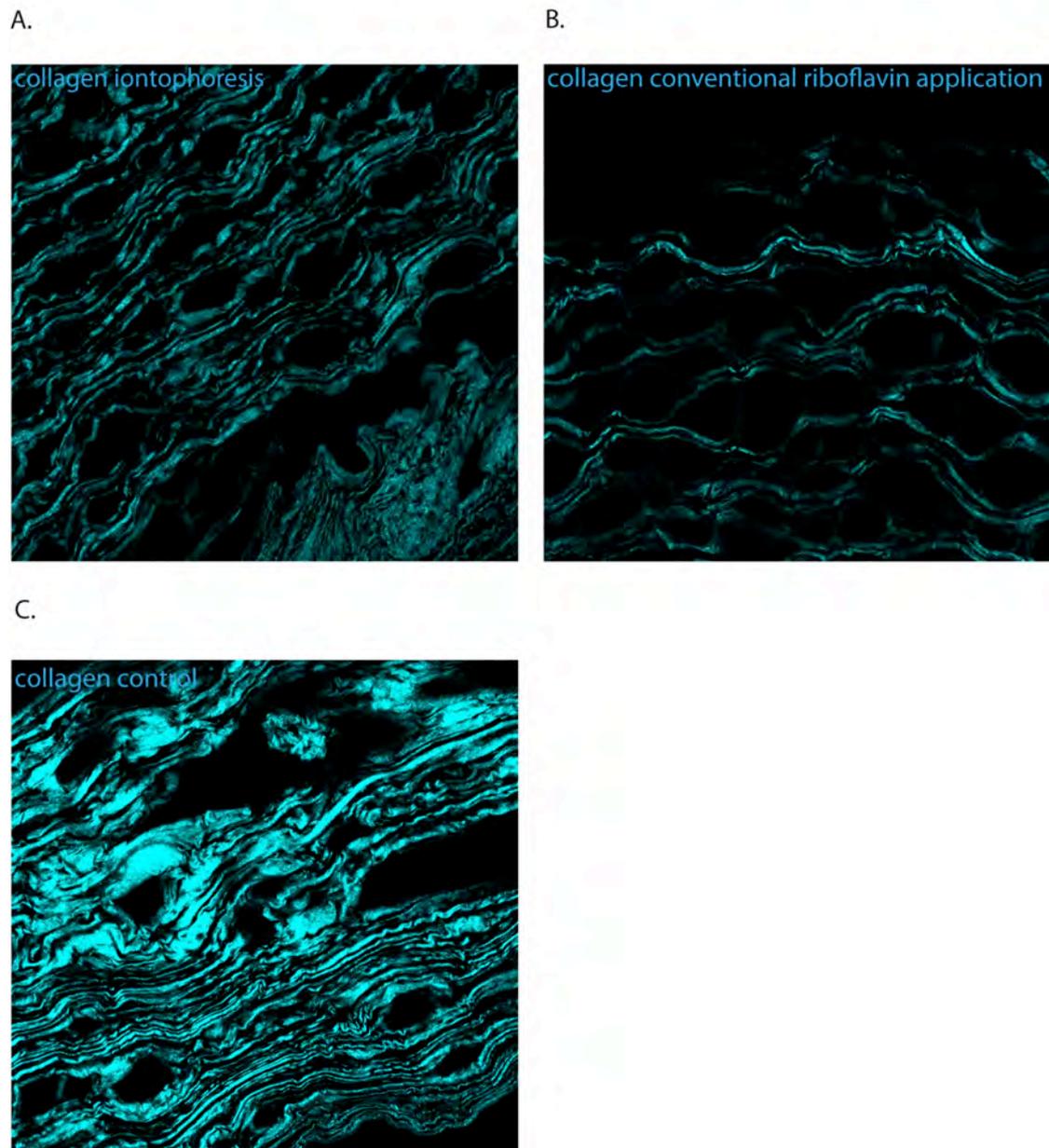


Figure 18 : Analyse du collagène en génération de seconde harmonique par microscopie biphotonique : organisation stromale du collagène dans des cornées imbibées de riboflavine par iontophorèse (groupe 1-Fig 18A), dans des cornées traitées par application conventionnelle de riboflavine (groupe 2 - Fig 18B) et dans des cornées contrôles (Fig 18C).

b. Résultats biochimiques

Comme le montre le **tableau 4**, nous avons constaté 45% de moins de riboflavine dans les cornées traitées par iontophorèse (936.2 ± 312.5 ng/ml) par rapport aux cornées traitées par une application conventionnelle de riboflavine (1708 ± 908.3 ng/ml). Cette différence était statistiquement significative ($p < 0.05$).

De même cette analyse par HPLC a montré une différence significative ($p < 0.001$) en ce qui concerne le taux de riboflavine dans l'humeur aqueuse: il était très faible dans le groupe des lapins traités par iontophorèse (groupe 1) (68 ± 69.8 ng/ml) par rapport à ceux traités de façon conventionnelle (groupe 2) (1497.4 ± 1168 ng/ml).

HPLC Dosage de Riboflavine (ng/mL)	APPLICATION PAR IONTOPHORESE (n= 10)		APPLICATION CONVENTIONNELLE (n=10)		CONTROLES NON TRAITES (n=9)	
	Humeur aqueuse	Cornée	Humeur aqueuse	Cornée	Humeur aqueuse	Cornée
	112.83	1 084.30	3 981.79	1701.81	12.09	32.71
	7.65	1 537.56	1 480.00	3 611.05	6.80	27.74
	202.21	827.71	3 119.00	1 531.44	6.08	34.34
	106.79	941.81	1 189.00	530.13	8.32	27.75
	18.97	1 129.62	700.51	2 021.33	7.66	21.13
	21.62	852.71	1 135.32	1 231.88	3.36	18.49
	148.90	1 215.61	421.58	2 229.53	4.82	23.78
	15.51	636.87	1 448.15	1 155.99	5.94	22.46
	42.71	572.66	334.22	2 082.55	6.32	21.28
	3.33	562.60	1 164.72	987.95		
Moyenne	68	936.2	1497.4	1708	6.82	25.52
± écart-type	±69.8	±312.5	±1168	±908.3	±2.46	±5.46
		(p<0.001)	(p<0.05)			

Tableau 4 : Dosage de riboflavine par HPLC dans l'humeur aqueuse et la cornée : sur des lapins traités par application de riboflavine grâce à l'iontophorèse, par application conventionnelle ou non traités.

De plus, nous n'avons pas constaté de différence de concentration en riboflavine dans les cornées contrôles non traitées (25.52 ± 5.46 ng/ml) par rapport aux cornées prélevées 14 jours après C-CXL (18 ± 5.87 ng/ml) ou 14 jours après application de riboflavine sans traitement UVA (15.97 ± 9.33 ng/ml).

2. Etude des modifications de la structure cornéenne

Comme le montre la **figure 19**, 14 jours après I-CXL (groupe 3 - **Figures 19A et 19C**) ou C-CXL (groupe 4 - **Figures 19B et 19D**), les coupes de cornée montraient une fluorescence importante du stroma cornéen dans sa partie antérieure et moyenne, en utilisant le filtre BP 500-550. Cette fluorescence était similaire après I-CXL avec traitement UVA conventionnel (données non montrées) ou accéléré. Ce signal était localisé dans la partie antérieure et médiane du stroma cornéen.

Cette fluorescence ne pouvait pas émaner de l'émission de la riboflavine car, comme cela est mentionné dans l'analyse biochimique, il n'a pas été mesuré par HPLC, davantage de riboflavine dans les cornées 14 jours après C-CXL que dans les cornées non traitées.

De plus, 14 jours après CXL (groupes 3 et 4), l'intensité de cette fluorescence était deux fois plus importante que celle observée immédiatement après l'application de riboflavine ($p < 0.006$) (groupes 1 et 2 - **Figures 16B et 16C**).

Il s'agissait donc bien d'une fluorescence différente de celle observée dans les cornées immédiatement après l'application de riboflavine.

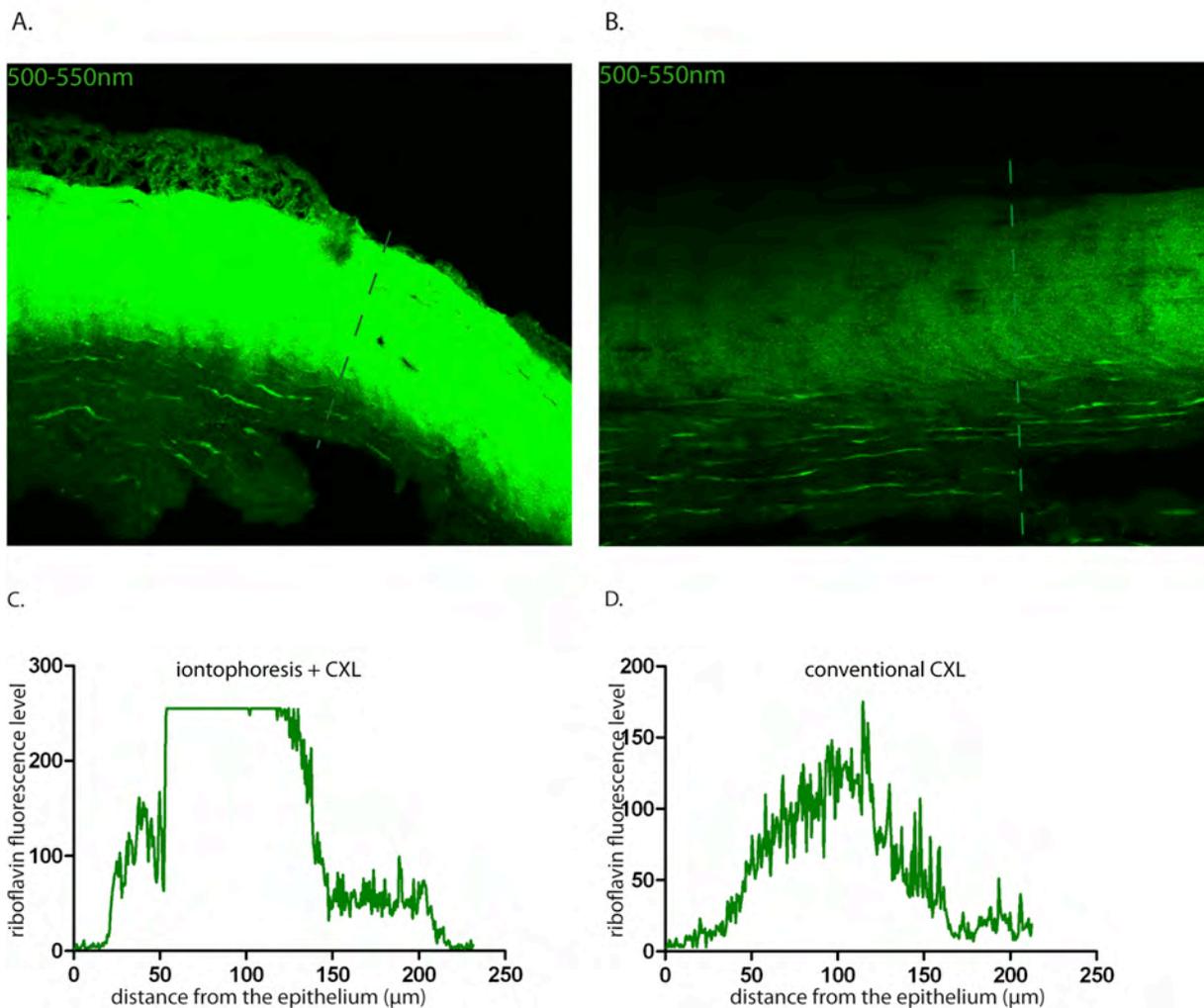


Figure 19 : Emission de fluorescence 14 jours après CXL: analyse de la fluorescence en microscopie biphotonique (500-550nm) sur des cornées traitées par CXL à l'aide de l'iontophorèse (I-CXL) (groupe 3 - Figure 19A) et après CXL conventionnel (C-CXL) (group 4 - Figure 19B).

Courbe de diffusion de l'intensité de fluorescence à 500-550 nm, de la surface vers la profondeur (le long des lignes pointillées vertes), dans des cornées traitées par I-CXL (groupe 3 - Figure 19C) et C-CXL (group 4 - Figure 19D).

Nous avons calculé l'intensité de fluorescence de la totalité des images de coupes cornéennes de toutes les cornées traitées par I-CXL (avec traitement UVA conventionnel) et de toutes les cornées traitées par C-CXL. Comme le montre la **figure 20**, aucune différence significative n'a été observée entre ces deux groupes concernant les mesures de MFI ($p > 0.7$).

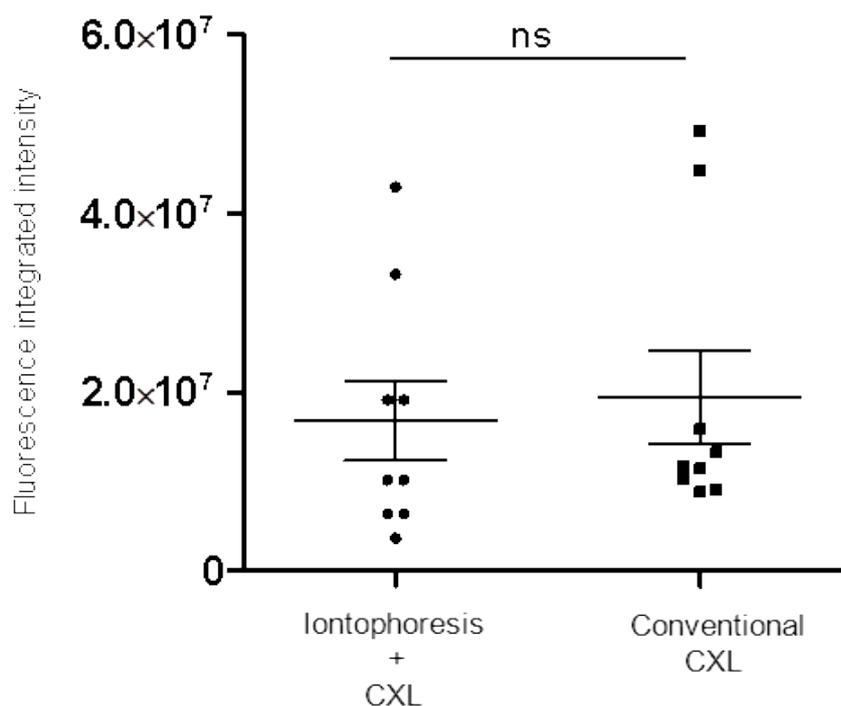


Figure 20 : Quantification de l'intensité de fluorescence (MFI) : fluorescence mesurée avec le filtre BP 500-550nm en microscopie biphotonique, sur des cornées traitées par CXL à l'aide de l'iontophorèse (groupe 3) et des cornées traitées par CXL conventionnel (groupe 4).

Par ailleurs, les cornées non traitées ou les cornées excisées 14 jours après un traitement par UVA seuls ou encore après une application de riboflavine sans irradiation UVA, ne mettaient en évidence aucune fluorescence (données non montrées).

Grâce à la microscopie biphotonique, nous avons observé une compaction des fibres de collagène qui était différente dans les cornées traitées par CXL par rapport aux cornées contrôles. Quatorze jours après I-CXL (groupe 3) ou C-CXL (groupe 4) le collagène cornéen présentait un réarrangement structural similaire dans les parties antérieures et médianes du stroma. En effet, les fibres de collagène du stroma cornéen du groupe 3 (**Figures 21A et 21B**) et du groupe 4 (**Figures 21D et 21E**) s'organisaient en faisceaux compacts et linéaires comparativement aux cornées non traitées (**Figure 21C**) ou traitées par application de riboflavine sans UVA (groupes 1 ou 2) (**Figure 18**).

Nous avons également constaté moins d'œdème (qui correspond probablement à un artefact de congélation) dans les cornées après I-CXL ou C-CXL par rapport aux cornées contrôles.

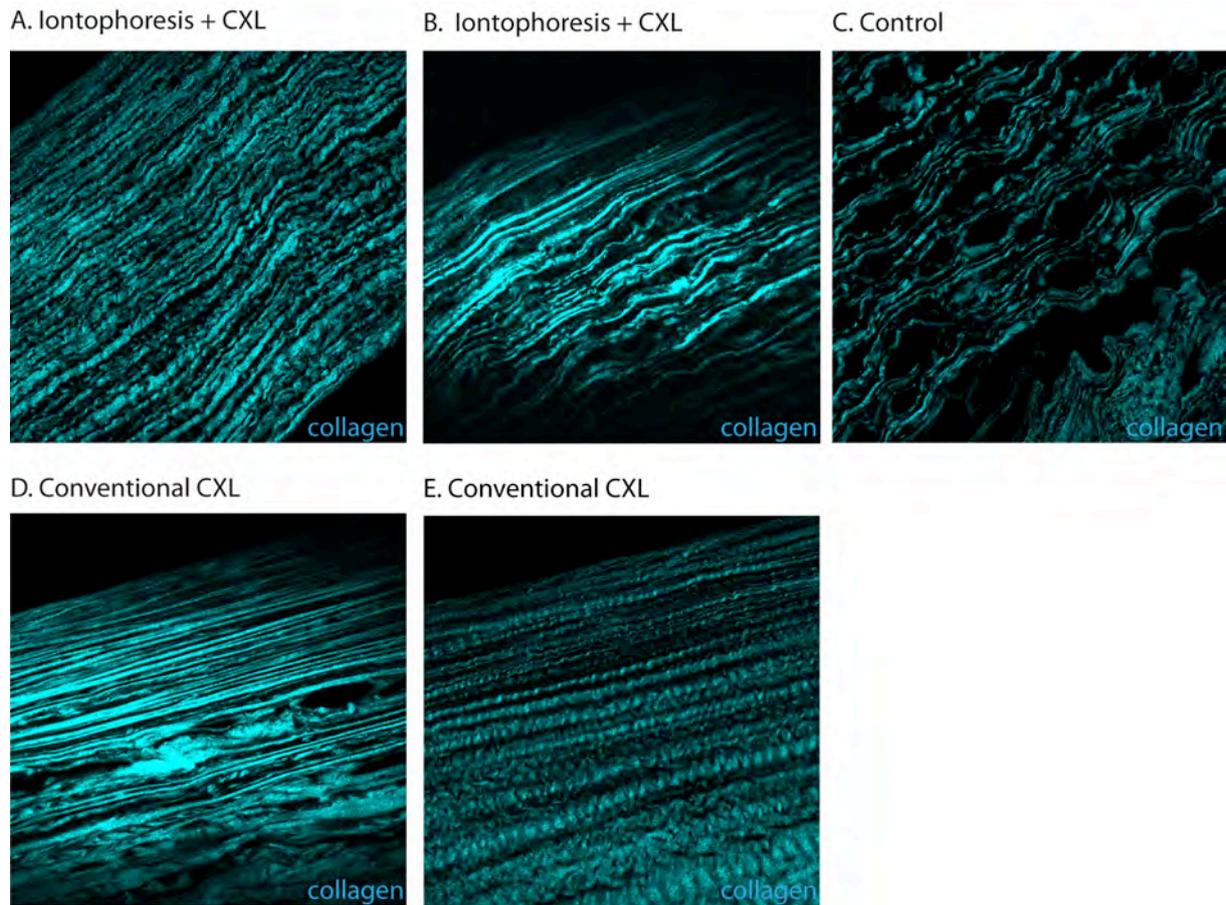


Figure 21 : Analyse des modifications structurales cornéennes à 14 jours après CXL: coupes de cornées analysées en génération de seconde harmonique par microscopie biphotonique montrant l'organisation du collagène stromal dans des cornées traitées par CXL avec iontophorèse (groupe 3 – Figures 21A et 21B), dans des cornées traitées par CXL conventionnel (groupe 4 – Figures 21D et 21E) et dans des cornées contrôles (Figure 21C).

Enfin, 14 jours après I-CXL (groupe 3), l'analyse vidéo (film 1, non montré) du stroma cornéen sur cornée entière a permis de constater un réseau de fibres de collagène organisé en lamelles dans la portion antérieure du stroma, en comparaison de cornées contrôles non traitées (film 2, non montré).

D. Discussion

Nous avons émis l'hypothèse que l'iontophorèse puisse être une stratégie intéressante pour la pénétration de la riboflavine au cours du CXL, sans entraîner de dommages épithéliaux.

L'analyse biochimique a montré une concentration de riboflavine significativement plus basse dans les cornées traitées par iontophorèse par rapport aux cornées traitées de façon conventionnelle. Cependant l'analyse en microscopie biphotonique a retrouvé une diffusion comparable dans les 2/3 antérieurs du stroma, dans ces deux groupes. Cette diffusion similaire a été constatée après analyse de la fluorescence des images et confirmée par une mesure quantitative (MFI).

La différence de conclusion entre les deux techniques peut être expliquée par le fait que pendant l'iontophorèse, la riboflavine pénètre dans le stroma « en bloc », comme un front de migration qui progresse de la surface vers la profondeur. Or, pour l'analyse biochimique, nous avons prélevé et broyé la cornée dans l'ensemble de son épaisseur. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la diffusion de la riboflavine est maximale dans la partie antérieure du stroma.

De plus, la partie antérieure de la cornée est considérée comme celle responsable des propriétés biomécaniques de la cornée.¹¹⁶ Plusieurs études ont montré que cette partie correspond également à la zone d'action du CXL.^{117, 118} La diffusion satisfaisante de la riboflavine par iontophorèse dans cette partie de la cornée nous laisse supposer que cette technique peut être efficace pour l'application de riboflavine dans le cadre du CXL.

L'analyse en microscopie biphotonique des cornées 14 jours après traitements confirme l'efficacité comparable entre les deux techniques I-CXL et C-CXL sur des cornées de lapins. A 14 jours, la linéarisation des fibres de collagène et la fluorescence anormale de la partie antérieure du stroma étaient similaires avec les deux méthodes (I-CXL et C-CXL). De plus, la constatation d'une moindre proportion d'œdème observable dans les cornées traitées par I-CXL ou C-CXL par rapport aux contrôles non traitées peut être un argument indirect de la rigidification de la cornée, ne se laissant pas distendre et déformer par de l'œdème. Cela constitue un argument supplémentaire pour penser que le I-CXL soit aussi efficace que le C-CXL pour rigidifier la cornée.

Nous avons observé une importante fluorescence du stroma antérieur quatorze jours après le CXL. Cette fluorescence a déjà été décrite grâce à la microscopie biphotonique et à la génération de seconde harmonique, par Steven et al, deux semaines après des procédures de CXL conventionnelles.¹¹⁹ La fluorescence des kératocytes et des cellules endothéliales a également été rapportées immédiatement après CXL sur des cornées de lapins.¹²⁰

Or, la microscopie biphotonique associée à la génération de seconde harmonique a montré sa pertinence pour l'analyse du collagène.¹²¹ De plus, il a été montré que cette auto-fluorescence du collagène était dépendante du degré de pontage (« cross-links ») entre les fibres de collagène.¹²²⁻¹²⁴ L'observation de cette fluorescence similaire tant après I-CXL qu'après C-CXL pourrait donc être le témoin d'une efficacité du I-CXL comparable à la procédure conventionnelle.

La cause de cette fluorescence très intense reste cependant inexpliquée. Cela semble être le résultat de l'action combinée de la riboflavine et des UVA puisque, dans notre étude, les cornées traitées par UVA seuls ne présentaient aucune fluorescence à J14. Cette fluorescence est probablement liée aux métabolites de la riboflavine qui pourraient être produits après l'application des UVA et qui auraient une longue durée de vie, plutôt qu'à des modifications structurales du collagène ou des protéoglycans. Elle ne correspond pas non plus à la persistance de riboflavine dans le stroma 14 jours après l'application : en effet, nous n'avons observé aucune fluorescence 14 jours après l'application de riboflavine sans traitement UVA. De plus, une faible concentration de riboflavine, identique à celle mesurée dans les cornées non traitées, a été détectée par HPLC dans les cornées 14 jours après une application de riboflavine qu'elle soit suivie ou non d'une irradiation par UVA. Ces résultats sont concordants avec la pharmacocinétique intrastromale des médicaments administrés par voie topique.^{125, 126}

La génération de seconde harmonique (SHG) est une technique de microscopie qui permet de visualiser l'organisation structurale du collagène et qui est applicable au tissu cornéen.^{121, 123, 127-129} Mais les résultats après C-CXL sont contradictoires. Steven et al¹¹⁹ ont noté une disparition du motif ondulé du stroma après CXL alors que Bueno et al¹³⁰ ont décrit une perte de la disposition régulière des fibres du collagène stromal. Dans notre étude, nous avons constaté un alignement, une compaction et une linéarisation des fibres collagéniques dans les deux tiers antérieurs du stroma. Cette compaction était identique dans les groupes C-CXL et I-CXL. Cette observation était

concordante avec la modification de la réflectivité du stroma antérieur après CXL décrite à l'aide des OCT time-domain de segment antérieur.¹³¹

Par ailleurs, pour raccourcir encore la durée de réalisation du CXL, il semblait intéressant d'associer le I-CXL aux techniques récemment proposées, basées sur une irradiation accélérée aux UVA. Nous avons donc associé l'iontophorèse non seulement au traitement UVA conventionnel mais aussi à la nouvelle procédure d'UVA accélérée. Les résultats étaient similaires dans les deux groupes (UVA conventionnels ou accélérés) en ce qui concerne la fluorescence et la linéarisation du collagène stromal.

L'analyse biochimique a montré que la riboflavine ne diffusait quasiment pas dans l'humeur aqueuse après une application par iontophorèse. Deux explications peuvent être avancées pour comprendre ces résultats. D'une part, le passage de riboflavine se fait strictement au niveau cornéen à cause de l'anneau d'application de 8mm de diamètre, ce qui élimine tout passage par voie transsclérale ou limbique. D'autre part, le principe d'administration de la riboflavine au cours de l'iontophorèse est une diffusion du produit en front de migration qui est stoppé à l'arrêt du courant électrique. Après ne persiste que la diffusion passive du produit qui est lente. Or, le temps d'application de l'iontophorèse est de cinq minutes. Le front de migration n'a probablement pas permis au produit de traverser la cornée entièrement et d'atteindre l'endothélium et l'humeur aqueuse.

Or, cette absence de diffusion dans le stroma postérieur et l'humeur aqueuse peut représenter un avantage également pour la préservation de l'endothélium cornéen qui peut être lésé au contact de la riboflavine.^{56,57}

Par ailleurs, la diffusion de riboflavine dans l'humeur aqueuse n'est pas nécessaire pour le CXL. En effet, aux commencements du traitement par CXL, il était recommandé aux cliniciens de contrôler le passage de riboflavine en chambre antérieure en recherchant un tyndall jaune à la lampe à fente, avant de réaliser l'irradiation par UVA, pour s'assurer de la pénétration de riboflavine dans le stroma cornéen. Enfin, la diffusion de riboflavine en chambre antérieure ne semble pas non plus essentielle pour la protection des autres structures intraoculaires (i.e. cristallin et rétine) contre les UVA.

E. Perspectives

Suite à cette étude expérimentale chez le lapin et d'autres études non publiées sur des cornées humaines *ex vivo*, le laboratoire industriel à l'origine de la fabrication du prototype d'applicateur d'iontophorèse a obtenu le marquage CE pour le dispositif, sous le nom d'Iontofor-CXL® (Sooft, Italie) et la solution de riboflavine sous celui de Ricrolin+® (Sooft, Italie). Il nous paraissait donc essentiel de poursuivre l'évaluation de cette technique par une étude randomisée en aveugle avec pour objectif de montrer la non infériorité de cette technique par rapport à une application conventionnelle de riboflavine (**Annexe 1**).

Dans un premier temps, nous avons évalué la faisabilité et la tolérance de cette technique chez l'homme. Les anciennes études n'avaient pas rapporté la tolérance peropératoire de l'iontophorèse lors d'une application oculaire.

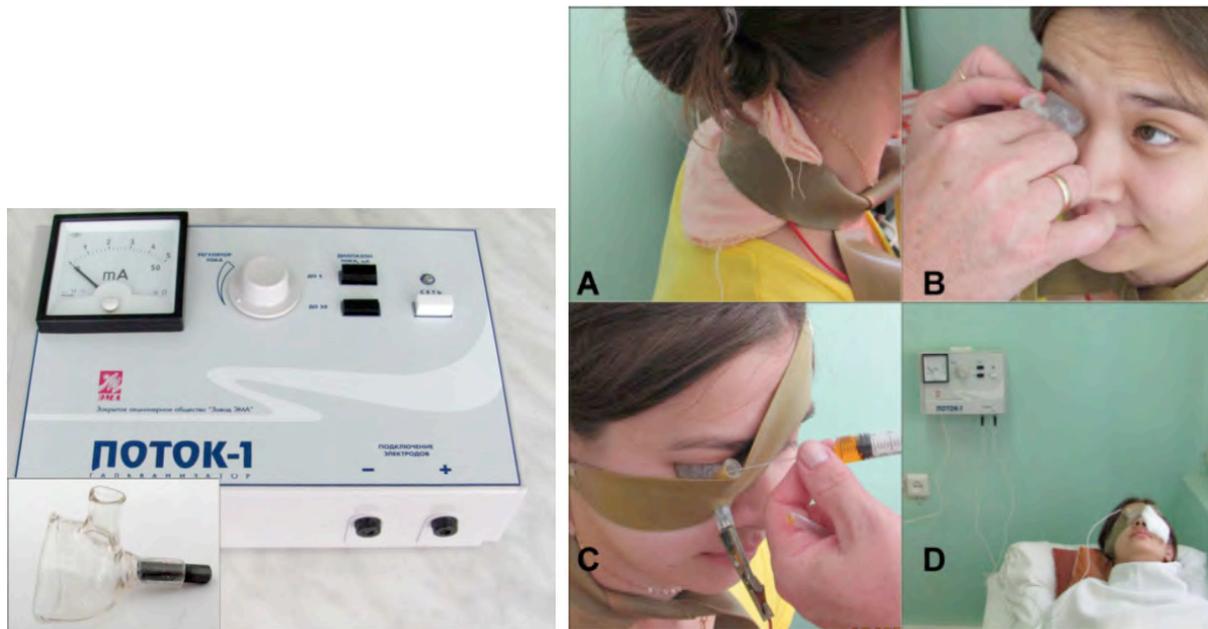
L'électrode principale était placée sur l'œil et maintenue par l'anneau de succion et l'électrode de retour placée sur le front (**Photo 3**).



Photo 3: Iontophorèse en cours de réalisation chez un patient : l'électrode principale est positionnée sur la cornée droite et l'électrode de retour sur le front.

Nous avons constaté une bonne tolérance peropératoire. Les patients n'ont pas décrit de douleurs. En post-opératoire, certains ont signalés des douleurs sur les 4 à 8 premières heures et nous avons pu constater une kératite ponctuée superficielle résolutive en 24 heures.

Ceci est en accord avec une étude russe portant sur le CXL par iontophorèse, menée sur 19 patients, utilisant un dispositif différent (**Photos 4**):¹³² l'électrode principale était un réservoir de 10/12 ml, l'intensité du courant était de 0,2 mA progressivement augmenté à 1mA toutes les 1 minute et 10 secondes. La durée totale était de 10 minutes. Ils n'ont décrit aucune plainte des patients, quelle que soit l'intensité du courant au cours de l'application. Leur évaluation à 12 mois était favorable sur la stabilisation, mais il faut rester prudent car l'étude n'a pas été randomisée et l'échantillon de patients est faible.



Photos 4: Matériel et installation pour l'iontophorèse de riboflavine 0,1% dans l'étude de Bikbova et al.¹³²

En parallèle, s'est posée la question du type de traitement UVA (conventionnel ou accéléré) à associer à l'iontophorèse pour la comparer au CXL conventionnel chez l'homme. En effet, d'un côté, l'association de l'iontophorèse aux UVA accéléré fait modifier deux paramètres par rapport au traitement conventionnel et rend plus difficile l'interprétation des résultats. D'un autre côté, il paraît davantage légitime de réaliser un traitement accéléré d'UVA après une application par iontophorèse car l'imbibition n'est pas poursuivie et maintenue pendant l'irradiation aux UVA (contrairement à

l'application conventionnelle) alors que la riboflavine va diffuser progressivement en chambre antérieure.

Pour répondre à cette question, nous avons choisi d'utiliser la fluoro-photométrie du segment antérieur grâce au Fluorotron Master FM-2® (Ocumetrics, Mountain View, CA, USA). Cette technique permet de mesurer de manière automatisée la concentration de molécules fluorescentes (principalement la fluorescéine) au niveau du film lacrymal, de la cornée et de la chambre antérieure *in vivo*. Le système stimule la fluorescéine à une longueur d'onde de 480 nm, et évalue sa concentration en mesurant l'émission de fluorescence à 520 nm en regard des différents points d'intérêt du segment antérieur. Les caractéristiques des pics d'excitation et d'émission de la riboflavine et de la fluorescéine étant très proches, l'étude de la concentration de la riboflavine peut être réalisée à l'aide du fluorotron au niveau de la cornée et de la chambre antérieure.

Nous effectuons les mesures par fluoro-photométrie avant traitement, après application de riboflavine, après irradiation par les UVA (i.e. à la fin du CXL) et enfin 20 minutes après la fin du traitement quand le patient a reçu un traitement UVA accéléré.

Les premiers résultats sur un faible échantillon, retrouvent des mesures inférieures dans les cornées après iontophorèse par rapport à l'application conventionnelle. Les dosages en fin de traitement dans le groupe I-CXL sont plus faibles quand le patient a eu des UVA conventionnels (30 minutes) versus accélérés (9 minutes). De plus, les mesures faites 20 minutes après la fin du traitement par I-CXL avec UVA accélérés semblent montrer une poursuite de la diminution de riboflavine dans la cornée de façon très significative. Ces premiers résultats soulèvent non seulement le problème de l'efficacité des UVA conventionnels sur une quantité de riboflavine intrastromale après iontophorèse de plus en plus faible en fin de traitement, mais aussi le problème de la quantité minimale de riboflavine nécessaire pour garantir l'innocuité de cette irradiation UVA sur les autres structures intraoculaires.

L'augmentation du nombre de patients traités dans ces différentes conditions nous permettra de confirmer le type d'UVA à associer à l'iontophorèse pour lancer l'essai clinique randomisé de non infériorité du I-CXL par rapport au C-CXL.

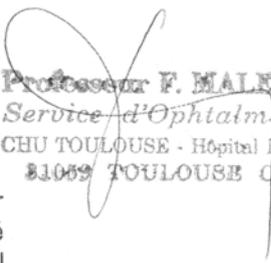
VI/ Conclusion

L'iontophorèse permet une diffusion de riboflavine dans le stroma cornéen qui semble suffisante pour induire des modifications stromales identiques au CXL conventionnel. Cette technique présente l'avantage d'éviter la désépithélialisation et les effets indésirables qui l'accompagnent. De plus, elle permettrait de raccourcir le temps d'application de 30 minutes à 5 minutes, de réaliser le CXL en dehors d'une salle de bloc opératoire et enfin d'améliorer le confort post-opératoire du patient.

Cette étude expérimentale animale nous a permis de montrer que le I-CXL est une nouvelle stratégie d'administration de riboflavine qui permet d'obtenir des résultats similaires au C-CXL à 14 jours sur des yeux de lapins.

Après l'obtention d'un marquage CE pour le dispositif, cette nouvelle stratégie nécessite une évaluation clinique au travers d'un essai prospectif randomisé de non infériorité par rapport à la technique conventionnelle. Nos premières évaluations chez l'homme sont satisfaisantes en terme de tolérance per et post-opératoires.

Cependant l'enjeu reste la stabilisation de la maladie et la préservation d'une bonne acuité visuelle à long terme. Malgré les avancées rapides et nombreuses dans le domaine du CXL, l'efficacité clinique de cette nouvelle technique ne pourra donc être jugée qu'au terme de cette étude.


Professeur F. MALECAZE
Service d'Ophtalmologie
CHU TOULOUSE - Hôpital PURPAN
31059 TOULOUSE Cedex

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
De Médecine Rangueil


D. ROUGE

Bibliographie

1. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Survey of ophthalmology* 1998;42:297-319.
2. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American journal of ophthalmology* 2003;135:620-627.
3. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Current opinion in ophthalmology* 2006;17:356-360.
4. Bowman W. On conical cornea and its treatment by operation. *Ophthalmic Hosp Rep and J R Lond Ophthalmic Hosp* 1859;9:157.
5. Pearson RM. Kalt, keratoconus, and the contact lens. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry* 1989;66:643-646.
6. Wheeler J, Hauser MA, Afshari NA, Allingham RR, Liu Y. The Genetics of Keratoconus: A Review. *Reproductive system & sexual disorders : current research* 2012.
7. Zadnik K, Barr JT, Gordon MO, Edrington TB. Biomicroscopic signs and disease severity in keratoconus. Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study Group. *Cornea* 1996;15:139-146.
8. Amsler M. Kératocône classique et kératocônes frustres, arguments unitaire. *Ophthalmologica* 1946;104:96-111.
9. McMahon TT, Edrington TB, Szczotka-Flynn L, et al. Longitudinal changes in corneal curvature in keratoconus. *Cornea* 2006;25:296-305.
10. Zadnik K, Steger-May K, Fink BA, et al. Between-eye asymmetry in keratoconus. *Cornea* 2002;21:671-679.
11. Rabinowitz YS, Nesburn AB, McDonnell PJ. Videokeratography of the fellow eye in unilateral keratoconus. *Ophthalmology* 1993;100:181-186.
12. Harrison RJ, Klouda PT, Easty DL, Manku M, Charles J, Stewart CM. Association between keratoconus and atopy. *The British journal of ophthalmology* 1989;73:816-822.
13. Kaya V, Karakaya M, Utine CA, Albayrak S, Oge OF, Yilmaz OF. Evaluation of the corneal topographic characteristics of keratoconus with orbiscan II in patients with and without atopy. *Cornea* 2007;26:945-948.
14. Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B. Atopy and keratoconus: a multivariate analysis. *The British journal of ophthalmology* 2000;84:834-836.
15. McMonnies CW, Boneham GC. Keratoconus, allergy, itch, eye-rubbing and hand-dominance. *Clinical & experimental optometry : journal of the Australian Optometrical Association* 2003;86:376-384.
16. Donnenfeld ED, Perry HD, Gibraltar RP, Ingraham HJ, Udell IJ. Keratoconus associated with floppy eyelid syndrome. *Ophthalmology* 1991;98:1674-1678.
17. Negris R. Floppy eyelid syndrome associated with keratoconus. *Journal of the American Optometric Association* 1992;63:316-319.
18. Bureau J, Fabre EJ, Hecquet C, Pouliquen Y, Lorans G. Modification of prostaglandin E2 and collagen synthesis in keratoconus fibroblasts, associated with an increase of interleukin 1 alpha receptor number. *Comptes rendus de l'Academie des sciences Serie III, Sciences de la vie* 1993;316:425-430.
19. Wilson SE, He YG, Weng J, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Experimental eye research* 1996;62:325-327.

20. Lee JE, Oum BS, Choi HY, Lee SU, Lee JS. Evaluation of differentially expressed genes identified in keratoconus. *Molecular vision* 2009;15:2480-2487.
21. Mackiewicz Z, Maatta M, Stenman M, Konttinen L, Tervo T, Konttinen YT. Collagenolytic proteinases in keratoconus. *Cornea* 2006;25:603-610.
22. Rabinowitz YS, Yang H, Brickman Y, et al. Videokeratography database of normal human corneas. *The British journal of ophthalmology* 1996;80:610-616.
23. Krumeich JH, Daniel J, Knulle A. Live-epikeratophakia for keratoconus. *Journal of cataract and refractive surgery* 1998;24:456-463.
24. Sandali O, El Sanharawi M, Temstet C, et al. Fourier-Domain Optical Coherence Tomography Imaging in Keratoconus: A Corneal Structural Classification. *Ophthalmology* 2013.
25. Ferrara G, Torquetti L, Ferrara P, Merayo-Llodes J. Intrastromal corneal ring segments: visual outcomes from a large case series. *Clinical & experimental ophthalmology* 2012;40:433-439.
26. Ertan A, Kamburoglu G. Intacs implantation using a femtosecond laser for management of keratoconus: Comparison of 306 cases in different stages. *Journal of cataract and refractive surgery* 2008;34:1521-1526.
27. Cheng YY, Visser N, Schouten JS, et al. Endothelial cell loss and visual outcome of deep anterior lamellar keratoplasty versus penetrating keratoplasty: a randomized multicenter clinical trial. *Ophthalmology* 2011;118:302-309.
28. Reinhart WJ, Musch DC, Jacobs DS, Lee WB, Kaufman SC, Shtein RM. Deep anterior lamellar keratoplasty as an alternative to penetrating keratoplasty a report by the american academy of ophthalmology. *Ophthalmology* 2011;118:209-218.
29. Epstein RJ, Seedor JA, Dreizen NG, et al. Penetrating keratoplasty for herpes simplex keratitis and keratoconus. Allograft rejection and survival. *Ophthalmology* 1987;94:935-944.
30. Kirkness CM, Ficker LA, Steele AD, Rice NS. The success of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Eye* 1990;4 (Pt 5):673-688.
31. Borderie VM, Boelle PY, Touzeau O, Allouch C, Boutboul S, Laroche L. Predicted long-term outcome of corneal transplantation. *Ophthalmology* 2009;116:2354-2360.
32. Arne JL, Fournie P. [Keratoconus, the most common corneal dystrophy. Can keratoplasty be avoided?]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* 2011;195:113-129.
33. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea* 2007;26:385-389.
34. Vinciguerra R, Romano MR, Camesasca FI, et al. Corneal cross-linking as a treatment for keratoconus: four-year morphologic and clinical outcomes with respect to patient age. *Ophthalmology* 2013;120:908-916.
35. Sloot F, Soeters N, van der Valk R, Tahzib NG. Effective corneal collagen crosslinking in advanced cases of progressive keratoconus. *Journal of cataract and refractive surgery* 2013;39:1141-1145.
36. Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *Journal of cataract and refractive surgery* 2008;34:796-801.
37. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T. Long-term results of riboflavin ultraviolet a corneal collagen cross-linking for keratoconus in Italy: the Siena eye cross study. *American journal of ophthalmology* 2010;149:585-593.

38. Wittig-Silva C, Whiting M, Lamoureux E, Lindsay RG, Sullivan LJ, Snibson GR. A randomized controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: preliminary results. *Journal of refractive surgery* 2008;24:S720-725.
39. Asri D, Touboul D, Fournie P, et al. Corneal collagen crosslinking in progressive keratoconus: multicenter results from the French National Reference Center for Keratoconus. *Journal of cataract and refractive surgery* 2011;37:2137-2143.
40. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Experimental eye research* 1998;66:97-103.
41. McCall AS, Kraft S, Edelhauser HF, et al. Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA). *Investigative ophthalmology & visual science* 2010;51:129-138.
42. Brummer G, Littlechild S, McCall S, Zhang Y, Conrad GW. The role of nonenzymatic glycation and carbonyls in collagen cross-linking for the treatment of keratoconus. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011;52:6363-6369.
43. Zhang Y, Conrad AH, Conrad GW. Effects of ultraviolet-A and riboflavin on the interaction of collagen and proteoglycans during corneal cross-linking. *The Journal of biological chemistry* 2011;286:13011-13022.
44. Kamaev P, Friedman MD, Sherr E, Muller D. Photochemical kinetics of corneal cross-linking with riboflavin. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012;53:2360-2367.
45. Skaat A, Zadok D, Goldich Y, et al. Riboflavin/UVA photochemical therapy for severe infectious keratitis. *European journal of ophthalmology* 2013;0.
46. Hayes S, Kamma-Lorger CS, Boote C, et al. The effect of riboflavin/UVA collagen cross-linking therapy on the structure and hydrodynamic behaviour of the ungulate and rabbit corneal stroma. *PloS one* 2013;8:e52860.
47. Raiskup F, Hoyer A, Spoerl E. Permanent corneal haze after riboflavin-UVA-induced cross-linking in keratoconus. *Journal of refractive surgery* 2009;25:S824-828.
48. Koller T, Mrochen M, Seiler T. Complication and failure rates after corneal crosslinking. *Journal of cataract and refractive surgery* 2009;35:1358-1362.
49. Greenstein SA, Fry KL, Bhatt J, Hersh PS. Natural history of corneal haze after collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: Scheimpflug and biomicroscopic analysis. *Journal of cataract and refractive surgery* 2010;36:2105-2114.
50. Sharma N, Maharana P, Singh G, Titiyal JS. Pseudomonas keratitis after collagen crosslinking for keratoconus: case report and review of literature. *Journal of cataract and refractive surgery* 2010;36:517-520.
51. Pollhammer M, Cursiefen C. Bacterial keratitis early after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A. *Journal of cataract and refractive surgery* 2009;35:588-589.
52. Perez-Santonja JJ, Artola A, Javaloy J, Alio JL, Abad JL. Microbial keratitis after corneal collagen crosslinking. *Journal of cataract and refractive surgery* 2009;35:1138-1140.
53. Zamora KV, Males JJ. Polymicrobial keratitis after a collagen cross-linking procedure with postoperative use of a contact lens: a case report. *Cornea* 2009;28:474-476.
54. Dhawan S, Rao K, Natrajan S. Complications of corneal collagen cross-linking. *Journal of ophthalmology* 2011;2011:869015.
55. Kymionis GD, Portaliou DM, Bouzoukis DI, et al. Herpetic keratitis with iritis after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A for keratoconus. *Journal of cataract and refractive surgery* 2007;33:1982-1984.

56. Kymionis GD, Portaliou DM, Diakonis VF, Kounis GA, Panagopoulou SI, Grentzelos MA. Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A irradiation in patients with thin corneas. *American journal of ophthalmology* 2012;153:24-28.
57. Zhang ZY. Corneal endothelial damage in the relatively thin cornea after collagen cross-linking treatment. *Cornea* 2012;31:967; author reply 967-968.
58. Raiskup F, Kissner A, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. [Corneal scar development after cross-linking in keratoconus]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 2010;107:837-842.
59. Raiskup F, Kissner A, Spoerl E, Pillunat LE. [Corneal cross-linking with hypo-osmolar riboflavin solution for keratoconus with thin corneas]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 2011;108:846-851.
60. Cherfan D, Verter EE, Melki S, et al. Collagen cross-linking using rose bengal and green light to increase corneal stiffness. *Investigative ophthalmology & visual science* 2013;54:3426-3433.
61. Raiskup F, Pinelli R, Spoerl E. Riboflavin osmolar modification for transepithelial corneal cross-linking. *Current eye research* 2012;37:234-238.
62. Koppen C, Wouters K, Mathysen D, Rozema J, Tassignon MJ. Refractive and topographic results of benzalkonium chloride-assisted transepithelial crosslinking. *Journal of cataract and refractive surgery* 2012;38:1000-1005.
63. Zhang Y, Sukthankar P, Tomich JM, Conrad GW. Effect of the synthetic NC-1059 peptide on diffusion of riboflavin across an intact corneal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012;53:2620-2629.
64. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T, Paradiso AL. Transepithelial corneal collagen crosslinking for keratoconus: qualitative investigation by in vivo HRT II confocal analysis. *European journal of ophthalmology* 2012;22 Suppl 7:S81-88.
65. Stojanovic A, Chen X, Jin N, et al. Safety and efficacy of epithelium-on corneal collagen cross-linking using a multifactorial approach to achieve proper stromal riboflavin saturation. *Journal of ophthalmology* 2012;2012:498435.
66. Filippello M, Stagni E, O'Brart D. Transepithelial corneal collagen crosslinking: bilateral study. *Journal of cataract and refractive surgery* 2012;38:283-291.
67. Salman AG. Transepithelial corneal collagen crosslinking for progressive keratoconus in a pediatric age group. *Journal of cataract and refractive surgery* 2013;39:1164-1170.
68. Zhang ZY, Zhang XR. Efficacy and safety of transepithelial corneal collagen crosslinking. *Journal of cataract and refractive surgery* 2012;38:1304; author reply 1304-1305.
69. Leccisotti A, Islam T. Transepithelial corneal collagen cross-linking in keratoconus. *Journal of refractive surgery* 2010;26:942-948.
70. Caporossi A, Mazzotta C, Paradiso AL, Baiocchi S, Marigliani D, Caporossi T. Transepithelial corneal collagen crosslinking for progressive keratoconus: 24-month clinical results. *Journal of cataract and refractive surgery* 2013;39:1157-1163.
71. Touboul D, Efron N, Smadja D, Praud D, Malet F, Colin J. Corneal confocal microscopy following conventional, transepithelial, and accelerated corneal collagen cross-linking procedures for keratoconus. *Journal of refractive surgery* 2012;28:769-776.
72. Wernli J, Schumacher S, Spoerl E, Mrochen M. The efficacy of corneal cross-linking shows a sudden decrease with very high intensity UV light and short treatment time. *Investigative ophthalmology & visual science* 2013;54:1176-1180.

73. Schumacher S, Oeftiger L, Mrochen M. Equivalence of biomechanical changes induced by rapid and standard corneal cross-linking, using riboflavin and ultraviolet radiation. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011;52:9048-9052.
74. Beshtawi IM, Akhtar R, Hillarby MC, et al. Biomechanical properties of human corneas following low- and high-intensity collagen cross-linking determined with scanning acoustic microscopy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2013;54:5273-5280.
75. Cinar Y, Cingu AK, Turkcu FM, et al. Accelerated corneal collagen cross-linking for progressive keratoconus. *Cutaneous and ocular toxicology* 2013.
76. Cingu AK, Sogutlu-Sari E, Cinar Y, et al. Transient corneal endothelial changes following accelerated collagen cross-linking for the treatment of progressive keratoconus. *Cutaneous and ocular toxicology* 2013.
77. Friedman MD, Pertaub R, Usher D, Sherr E, Kamaev P, Muller D. Advanced corneal cross-linking system with fluorescence dosimetry. *Journal of ophthalmology* 2012;2012:303459.
78. Selinger E. Iontophoresis with contract lens type and eyecup electrodes some points of the theory and technic of ion transfer. *Archives of ophthalmology* 1947;38:645-653.
79. Fleming N. IONTOTHERAPY (Ionic Medicationn Iontophoresis, Ionisation): AS AN AID IN OPHTHALMIC THERAPEUTICS. *The British journal of ophthalmology* 1943;27:354-367.
80. Sarraf D, Lee DA. The role of iontophoresis in ocular drug delivery. *Journal of ocular pharmacology* 1994;10:69-81.
81. Helmstadter A. The history of electrically-assisted transdermal drug delivery ("iontophoresis"). *Die Pharmazie* 2001;56:583-587.
82. Pivati GF. Dell'elleticita medica. 1747.
83. Richardson BW. On voltaic narcotism for the production of local anesthesia for surgical operations. *The Medical Times & Gazette* 1859;156_158:647-649.
84. Munk H. *Arch f Anat und Physiol* 1873.
85. Leduc S. Introduction of medical substances into the depth of tissues by electric current. *Ann d'électrobiologie* 1900;3:545-560.
86. Frankenhauser. Ueber perkutaneelektolytische Ioneneifuhr. *Zeits f med Elektol u Rontg* 1907.
87. Wei R, Simon L, Hu L, Michniak-Kohn B. Effects of iontophoresis and chemical enhancers on the transport of lidocaine and nicotine across the oral mucosa. *Pharmaceutical research* 2012;29:961-971.
88. Wirtz R. Die Ionentherapie in der Augenheilkunde. *Klinische Monatsblätter fur Augenheilkunde* 1908.
89. Birkhauser R. Résultats d'études cliniques et expérimentales sur la iontophorèse. *Rev Gen Ophtalmol* 1921;35:312-318.
90. Fietta P. Quelques essais d'iontophorèse à l'atropine. *Rev Gen Ophtalmol* 1924;38:317-328.
91. Morisot. L'ionothérapie ou ionisation appliquée au traitement des affections oculaires. *Clin Ophtalmol* 1927;31:5-16.
92. Erlanger G. On the Scientific and Practical Value of Ionization in Ophthalmology. Recent Advances and Researches. *The British journal of ophthalmology* 1936;20:213-229.
93. Karbowski M. Iontophoresis in ophthalmology. *Ophthalmologica* 1939;38:317-328.

94. Von Sallmann L. Iontophoretic introduction of atropine and scopolamine into the rabbit eye. *Archives of ophthalmology* 1943;29:711-719.
95. Swan KC. Corneal diseases, treatment. *Transactions - American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology* 1951;55:387-400.
96. Lachaud JP. [Considerations on the use of corticoids by ionization in certain ocular diseases]. *Bulletin des societes d'ophtalmologie de France* 1965;65:84-89.
97. Jones RF, Maurice DM. New methods of measuring the rate of aqueous flow in man with fluorescein. *Experimental eye research* 1966;5:208-220.
98. Hughes L, Maurice DM. A fresh look at iontophoresis. *Arch Ophthalmol* 1984;102:1825-1829.
99. Eljarrat-Binstock E, Domb AJ. Iontophoresis: a non-invasive ocular drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2006;110:479-489.
100. Frucht-Pery J, Mechoulam H, Siganos CS, Ever-Hadani P, Shapiro M, Domb A. Iontophoresis-gentamicin delivery into the rabbit cornea, using a hydrogel delivery probe. *Experimental eye research* 2004;78:745-749.
101. Yoshizumi MO, Cohen D, Verbukh I, Leinwand M, Kim J, Lee DA. Experimental transscleral iontophoresis of ciprofloxacin. *Journal of ocular pharmacology* 1991;7:163-167.
102. Kwon BS, Gangarosa LP, Park NH, et al. Effect of iontophoretic and topical application of antiviral agents in treatment of experimental HSV-1 keratitis in rabbits. *Investigative ophthalmology & visual science* 1979;18:984-988.
103. Hill JM, Kwon BS, Burch KD, et al. Acyclovir and vidarabine monophosphate: comparison of iontophoretic and intravenous administration for the treatment of HSV-1 stromal keratitis. *The American journal of medicine* 1982;73:300-304.
104. Halhal M, Renard G, Bejjani RA, Behar-Cohen F. [Corneal graft rejection and corticoid iontophoresis: 3 case reports]. *Journal francais d'ophtalmologie* 2003;26:391-395.
105. Patane MA, Cohen A, From S, Torkildsen G, Welch D, Ousler GW, 3rd. Ocular iontophoresis of EGP-437 (dexamethasone phosphate) in dry eye patients: results of a randomized clinical trial. *Clinical ophthalmology* 2011;5:633-643.
106. Cohen AE, Assang C, Patane MA, From S, Korenfeld M, Avion Study I. Evaluation of dexamethasone phosphate delivered by ocular iontophoresis for treating noninfectious anterior uveitis. *Ophthalmology* 2012;119:66-73.
107. Yoo SH, Dursun D, Dubovy S, et al. Iontophoresis for the treatment of paecilomyces keratitis. *Cornea* 2002;21:131-132.
108. Barza M, Peckman C, Baum J. Transscleral iontophoresis of cefazolin, ticarcillin, and gentamicin in the rabbit. *Ophthalmology* 1986;93:133-139.
109. Behar-Cohen FF, El Aouni A, Gautier S, et al. Transscleral Coulomb-controlled iontophoresis of methylprednisolone into the rabbit eye: influence of duration of treatment, current intensity and drug concentration on ocular tissue and fluid levels. *Experimental eye research* 2002;74:51-59.
110. Parkinson TM, Ferguson E, Febbraro S, Bakhtyari A, King M, Mundasad M. Tolerance of ocular iontophoresis in healthy volunteers. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2003;19:145-151.
111. Turner NG, Ferry L, Price M, Cullander C, Guy RH. Iontophoresis of poly-L-lysines: the role of molecular weight? *Pharmaceutical research* 1997;14:1322-1331.

112. Abla N, Naik A, Guy RH, Kalia YN. Contributions of electromigration and electroosmosis to peptide iontophoresis across intact and impaired skin. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2005;108:319-330.
113. Li SK, Jeong EK, Hastings MS. Magnetic resonance imaging study of current and ion delivery into the eye during transscleral and transcorneal iontophoresis. *Investigative ophthalmology & visual science* 2004;45:1224-1231.
114. Sisler HA. Iontophoretic local anesthesia for conjunctival surgery. *Annals of ophthalmology* 1978;10:597-598.
115. Costello CT, Jeske AH. Iontophoresis: applications in transdermal medication delivery. *Physical therapy* 1995;75:554-563.
116. Randleman JB, Dawson DG, Grossniklaus HE, McCarey BE, Edelhauser HF. Depth-dependent cohesive tensile strength in human donor corneas: implications for refractive surgery. *Journal of refractive surgery* 2008;24:S85-89.
117. Dias J, Diakonis VF, Kankariya VP, Yoo SH, Ziebarth NM. Anterior and posterior corneal stroma elasticity after corneal collagen crosslinking treatment. *Experimental eye research* 2013.
118. Kohlhaas M, Spoerl E, Schilde T, Unger G, Wittig C, Pillunat LE. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin and ultraviolet A light. *Journal of cataract and refractive surgery* 2006;32:279-283.
119. Steven P, Hovakimyan M, Guthoff RF, Huttmann G, Stachs O. Imaging corneal crosslinking by autofluorescence 2-photon microscopy, second harmonic generation, and fluorescence lifetime measurements. *Journal of cataract and refractive surgery* 2010;36:2150-2159.
120. Chai D, Gaster RN, Roizenblatt R, Juhasz T, Brown DJ, Jester JV. Quantitative assessment of UVA-riboflavin corneal cross-linking using nonlinear optical microscopy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011;52:4231-4238.
121. Zoumi A, Yeh A, Tromberg BJ. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:11014-11019.
122. Theodossiou T, Rapti GS, Hovhannisyan V, Georgiou E, Politopoulos K, Yova D. Thermally induced irreversible conformational changes in collagen probed by optical second harmonic generation and laser-induced fluorescence. *Lasers in medical science* 2002;17:34-41.
123. Raub CB, Suresh V, Krasieva T, et al. Noninvasive assessment of collagen gel microstructure and mechanics using multiphoton microscopy. *Biophysical journal* 2007;92:2212-2222.
124. Raub CB, Putnam AJ, Tromberg BJ, George SC. Predicting bulk mechanical properties of cellularized collagen gels using multiphoton microscopy. *Acta biomaterialia* 2010;6:4657-4665.
125. Zhang W, Prausnitz MR, Edwards A. Model of transient drug diffusion across cornea. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2004;99:241-258.
126. Miller SC, Himmelstein KJ, Patton TF. A physiologically based pharmacokinetic model for the intraocular distribution of pilocarpine in rabbits. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics* 1981;9:653-677.
127. Tan HY, Sun Y, Lo W, et al. Multiphoton fluorescence and second harmonic generation imaging of the structural alterations in keratoconus ex vivo. *Investigative ophthalmology & visual science* 2006;47:5251-5259.

128. Morishige N, Wahlert AJ, Kenney MC, et al. Second-harmonic imaging microscopy of normal human and keratoconus cornea. *Investigative ophthalmology & visual science* 2007;48:1087-1094.
129. Morishige N, Takagi Y, Chikama T, Takahara A, Nishida T. Three-dimensional analysis of collagen lamellae in the anterior stroma of the human cornea visualized by second harmonic generation imaging microscopy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011;52:911-915.
130. Bueno JM, Gualda EJ, Giakoumaki A, Perez-Merino P, Marcos S, Artal P. Multiphoton microscopy of ex vivo corneas after collagen cross-linking. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011;52:5325-5331.
131. Mencucci R, Paladini I, Virgili G, Giacomelli G, Menchini U. Corneal thickness measurements using time-domain anterior segment OCT, ultrasound, and Scheimpflug tomographer pachymetry before and after corneal cross-linking for keratoconus. *Journal of refractive surgery* 2012;28:562-566.
132. Bikbova G, Bikbov M. Transepithelial corneal collagen cross-linking by iontophoresis of riboflavin. *Acta ophthalmologica* 2013.

Annexes

Annexe 1 : Résumé du protocole soumis pour l'essai de non infériorité du crosslinking du collagène cornéen par iontophorèse par rapport au crosslinking du collagène cornéen standard dans le traitement du kératocône évolutif.

<p>INVESTIGATEUR PRINCIPAL</p>	<p>Pr. François Malecaze Service d'Ophtalmologie, Hôpital Purpan Place Dr Baylac, 31059 Toulouse Cedex, France Tél : (33)5 61 77 77 52 Mobile : (33)6 82 66 64 76 Fax : (33)5 61 77 77 96 E-mail : malecaze.fr@chu-toulouse.fr</p>
<p>TITRE</p>	<p>Essai de non infériorité du crosslinking du collagène cornéen par iontophorèse par rapport au crosslinking du collagène cornéen standard dans le traitement du kératocône évolutif</p> <p>Etude IontoCXL</p>
<p>JUSTIFICATION / CONTEXTE</p>	<p>Le kératocône est une dystrophie de la cornée, le plus souvent bilatérale, non inflammatoire, caractérisée par un amincissement progressif du stroma avec ectasie cornéenne et responsable d'une baisse plus ou moins importante de la vision.</p> <p>Le kératocône est traité depuis 2005 par la technique de réticulation du collagène cornéen, appelée Crosslinking (CXL) qui consiste à activer la réticulation du collagène stromal sous l'action d'un rayonnement UV-A (365 nm) et en présence de Riboflavine (Vitamine B2) administrée préalablement de façon topique sur la cornée désépithélialisée.</p> <p>Cette méthode de traitement a démontré cliniquement qu'elle était en mesure de ralentir ou arrêter l'évolution de cette pathologie, donc d'éviter de recourir à des traitements plus lourds, comme la greffe de cornée.</p> <p>La procédure de CXL standard consiste à désépithélialiser la cornée et à administrer de façon répétée en topique la solution de Riboflavine pendant 30 minutes, de sorte à obtenir une concentration intrastromale adéquate avant l'application d'UV-A. Il est nécessaire d'obtenir une concentration suffisante de Riboflavine qui, par son action filtrante sur les UV, permettra de protéger l'endothélium. C'est aussi pour cela qu'il est nécessaire d'enlever l'épithélium cornéen qui empêche toute pénétration de Riboflavine.</p> <p>En dehors de la douleur lors du processus de cicatrisation, cette procédure peut causer des complications, comme des</p>

	<p>infections, ulcères ou troubles de la cicatrisation.</p> <p>Pour permettre l'absorption de Riboflavine sans avoir à enlever l'épithélium, tout en réduisant la durée de la procédure, il est proposé d'utiliser la technique de iontophorèse, qui consiste à augmenter la pénétration de molécules ionisées dans les tissus, sous l'effet d'un courant électrique continu.</p> <p>L'iontophorèse a été utilisée en ophtalmologie par voie transconjonctivale, transcornéenne ou transsclérale. Les mécanismes précis de passage des produits pharmacologiques sont assez bien décrits grâce aux travaux effectués en dermatologie.</p> <p>Les travaux précliniques conduits sur les aspects de tolérance, biomécanique et de pharmacocinétique ont démontré l'applicabilité de cette technique à la délivrance efficace et sans risque de riboflavine à travers l'épithélium cornéen.</p>
<p>OBJECTIFS</p>	<p>OBJECTIF PRINCIPAL Evaluer la non-infériorité du CXL par iontophorèse par rapport au CXL standard dans la stabilisation du kératocône progressif par mesure de la kératométrie maximale à 1 an de suivi.</p> <p>OBJECTIFS SECONDAIRES</p> <ul style="list-style-type: none"> - Comparaison du CXL par iontophorèse au CXL standard dans la stabilisation du kératocône progressif par mesure de la kératométrie minimale à 1 an de suivi. - Comparaison du CXL par iontophorèse au CXL standard dans la stabilisation du kératocône progressif par mesure de la kératométrie moyenne à 1 an de suivi. - Comparaison de la douleur post-opératoire à J1, J3 et J7 du CXL par iontophorèse à celle du CXL standard par échelle visuelle analogique de la douleur. - Comparaison des complications post-opératoires du CXL par iontophorèse à celles du CXL standard par examen clinique à la lampe à fente et comptage cellulaire endothélial par microscopie spéculaire sur la durée du suivi. - Comparaison de l'acuité visuelle sans correction et de la meilleure acuité visuelle corrigée après CXL par iontophorèse à celle après CXL standard par mesure de l'acuité visuelle sur échelle décimale de Monoyer à 1 an de suivi. - Comparaison de la concentration cornéenne de riboflavine du CXL par iontophorèse à celle du CXL standard par mesure peropératoire par fluorophotométrie oculaire. - Comparaison de la profondeur de la cornée traitée par CXL par iontophorèse à celle par CXL standard par mesure optique par tomographie par cohérence optique à 1 et 3 mois post-opératoires. - Comparaison de la biomécanique de la cornée traitée par CXL par iontophorèse à celle par CXL standard par l'Ocular Response Analyzer (ORA, Reichert) à 1 an post-opératoire.

	<p>- Comparaison de l'épaisseur de la cornée traitée par CXL par iontophorèse à celle par CXL standard par pachymétrie ultrasonore et optique par imagerie OCT à 1 an post-opératoire.</p>
SCHEMA DE LA RECHERCHE	<p>Il s'agit d'une étude expérimentale prospective monocentrique, sous la forme d'un essai clinique comparatif de phase, de non-infériorité, randomisé en 2 groupes parallèles avec un ratio 1:1, comparant le CXL par iontophorèse, à l'étude, au traitement de référence, le CXL standard, sans insu.</p>
CRITERES D'INCLUSION	<ul style="list-style-type: none"> - Sujet \geq 18 ans, - Epaisseur cornéenne \geq 400 μm, - Porteur d'un kératocône <ul style="list-style-type: none"> - de stade I à III de la classification de Krumeich - progressif. <p>La progression est définie par une augmentation de la kératométrie maximale topographique d'au moins 1 dioptrie, constatée sur deux topographies successives à un an d'intervalle ou moins, ou par une diminution de la correction sphérique \geq 0,5 dioptrie, ou par une diminution du cylindre \geq 1 dioptrie sur le même intervalle de temps.</p> <ul style="list-style-type: none"> - En cas d'atteinte initiale fortement asymétrique, l'œil traité sera l'œil présentant la déformation la plus importante. - Consentement libre et éclairé, signé par le patient - Affiliation à un régime de sécurité sociale ou équivalent
CRITERES DE NON INCLUSION	<ul style="list-style-type: none"> - Epaisseur cornéenne inférieure à 400 μm - Kératocône de stade IV de la classification de Krumeich - Patients atteints d'une autre pathologie cornéenne (par exemple kératite herpétique, dystrophie cornéenne) - Antécédents de chirurgie oculaire - Patients porteurs d'implants électriques sensibles (pacemaker, etc). - Patients souffrant de lésions ou pathologies cutanées au niveau de la zone frontale. - Névrite optique quelle qu'en soit l'origine - Graves pathologies des paupières et de la surface oculaire pouvant empêchant un positionnement correct de l'applicateur. - Femmes enceintes ou allaitantes - Mineurs - Patients sous tutelle ou curatelle ou en sauvegarde de justice - Patients participants simultanément à une autre étude clinique
TRAITEMENTS/STRATEGIES/PROCEDURES DE LA RECHERCHE	<p>Le CXL standard consiste à débrider mécaniquement l'épithélium cornéen pour permettre la pénétration de la riboflavine dans la cornée. Des UV-A sont ensuite appliqués sur la surface oculaire pour permettre une photopolymérisation des fibres de collagène de la cornée.</p>

	<p>Le CXL par iontophorèse consiste, sur une cornée « intacte » non préalablement débridée, à appliquer un dispositif d'électrodes, l'une sur la surface oculaire, l'autre passive sur le front du patient, de façon à faire pénétrer la riboflavine dans la cornée par un faible courant électrique. Des UV-A sont ensuite appliqués sur la surface oculaire de la même façon que dans le CXL standard pour permettre une photopolymérisation des fibres de collagène de la cornée.</p>
CRITERES DE JUGEMENT	<p>CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL - Evolution après un an de suivi de la kératométrie maximale (Kmax) topographique (exprimée en dioptries)</p> <p>CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRES - Evolution après un an de suivi de la kératométrie minimale (Kmin) topographique - Evolution après un an de suivi de la kératométrie moyenne (Km) topographique - Douleur post-opératoire mesurée par échelle visuelle analogique : cotation de 0 à 10 - Complications post-opératoires par examen clinique à la lampe à fente et comptage cellulaire endothélial par microscopie spéculaire - Acuité visuelle sans correction et Meilleure acuité visuelle corrigée sur échelle décimale de Monoyer - Concentration cornéenne de riboflavine par fluorophotométrie oculaire - Profondeur de la cornée traitée par tomographie par cohérence optique</p>
TAILLE D'ETUDE	<p>Pour une borne de non-infériorité de -0,68D, un écart type de la mesure de l'évolution de Kmax = 1,4D, un risque alpha unilatéral de 5% et une puissance de 90%, le nombre de sujets nécessaire est de 162 patients (146 patients + majoration de 10% pour l'analyse per protocole). Soit un total de 162 patients, 81 patients par groupe.</p>
NOMBRE PREVU DE CENTRES	<p>Etude monocentrique</p>
DUREE DE LA RECHERCHE	<p>Durée de la période d'inclusion : 2 ans Durée de participation de chaque patient : 1 an Durée totale de la recherche : 3 ans</p>
ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES	<p>L'évolution de la kératométrie maximale après un an de suivi sera comparée entre les deux groupes d'intervention à l'aide d'une analyse de la covariance, ajusté sur le groupe d'intervention et sur la valeur Kmax en début d'étude. L'effet de l'intervention par iontophorèse par rapport à l'intervention standard sera estimée par ce modèle linéaire ($\Delta\Delta = \Delta K_{\text{max iontophorèse}} - \Delta K_{\text{max standard}}$). On considèrera que le crosslinking par iontophorèse est « non-</p>

	<p>inférieur » au crosslinking standard si la borne supérieure de l'intervalle de confiance unilatéral à 95% de $\Delta\Delta$ est inférieure à 0,68D.</p>
<p>RETOMBES ATTENDUES</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Améliorer la prise en charge des patients atteints de kératocône en stabilisant la maladie avec moins d'effets secondaires par rapport à la technique standard de CXL. - Elargissement des indications du CXL qui reste la progression du kératocône objectivée sur 2 examens successifs. Les patients pourraient bénéficier d'un traitement dès le diagnostic de kératocône, ce qui permettrait de traiter plus précocement et donc à un stade moins sévère avec moins de répercussions visuelles. - À une échelle collective : limiter le retentissement médico-économique de la maladie kératocônique qui touche des adultes jeunes avec une prise en charge contraignante générant : arrêts de travail, hospitalisations, prise en charge chirurgicale et handicap visuel.

Titre en Anglais

Trans-epithelial corneal collagen crosslinking:
iontophoresis pre-clinical evaluation.

Résumé en anglais

Comparative experimental animal study to evaluate iontophoresis riboflavin delivery technique for transepithelial corneal collagen crosslinking (CXL).

Riboflavin diffusion in rabbit eyes was investigated by two-photon microscopy and by high-performance liquid chromatography (HPLC). Corneal stromal collagen structure modifications 14 days after CXL were evaluated by second harmonic generation (SHG), using a two-photon microscope.

Images showed that after iontophoresis, riboflavin fluorescence and its diffusion throughout cornea were similar to that observed in a conventional application. Using HPLC, the corneal concentration of riboflavin was two-fold less after iontophoresis than after conventional application (936.2 ± 312.5 ng/ml and 1708 ± 908.3 ng/ml, respectively, $p < 0.05$). However, images from SHG showed the same strongly interlinked collagen fibers organization, in the anterior stroma, in both groups iontophoresis CXL and conventional CXL.

This experimental study suggests that iontophoresis is a promising alternative methodology for riboflavin delivery in CXL treatment, preserving the epithelium.

Mots clés en anglais

Iontophoresis, Transepithelial Crosslinking, riboflavin, keratoconus, two-photon
microscopy

**CROSSLINKING TRANS-EPITHELIAL DU COLLAGENE CORNEEN:
EVALUATION PRE-CLINIQUE DE L'IONTOPHORESE**

Résumé :

Objectif: Evaluer une nouvelle technique d'administration de la riboflavine, l'iontophorèse, pour réaliser un crosslinking du collagène cornéen (CXL) évitant la désépithélialisation source de complications lors de la procédure de référence.

Matériels et Méthodes: 108 yeux de lapins « New Zealand » ont été utilisés pour comparer le CXL via l'iontophorèse (I-CXL) au CXL conventionnel (C-CXL). L'iontophorèse consistait en l'administration d'une nouvelle formulation de riboflavine chargée (Ricrolin+®) en appliquant un faible courant électrique de 1mA pendant 5 minutes. La diffusion de riboflavine a été évaluée par microscopie biphotonique et par HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Les modifications de la structure du collagène stromal ont été analysées en microscopie biphotonique utilisant la génération de seconde harmonique (SHG) 14 jours après traitement par I-CXL ou par C-CXL.

Résultats: Les images obtenues par microscopie biphotonique ont montré que la distribution cornéenne de la fluorescence liée à la riboflavine était comparable après son application conventionnelle ou par iontophorèse. En HPLC, la concentration de riboflavine dans les cornées traitées par iontophorèse était deux fois moins élevée que dans les cornées après une application conventionnelle (936.2 ± 312.5 ng/ml et 1708 ± 908.3 ng/ml, respectivement, $p < 0.05$). Cependant 14 jours après CXL, l'analyse en SHG a révélé une linéarisation et une régularisation des fibres de collagène dans la partie antérieure du stroma, similaires entre les deux groupes I-CXL et C-CXL.

Perspectives: Une étude prospective randomisée de non infériorité du I-CXL par rapport au C-CXL chez les patients atteints de kératocône évolutif permettra de poursuivre l'évaluation de cette technique.

Conclusion: Cette étude suggère que l'iontophorèse est une technique prometteuse pour l'administration de riboflavine dans le cadre d'un CXL préservant l'épithélium cornéen.

Titre en anglais: Trans-epithelial corneal collagen crosslinking: iontophoresis pre-clinical evaluation.

Discipline administrative: MEDECINE SPECIALISEE CLINIQUE

Mots-clés: iontophorèse, crosslinking, trans-épithélial, riboflavine, kératocône, bi-photon

Intitulé et adresse de l'UFR :

Université Toulouse III-Paul Sabatier
Faculté de Médecine Toulouse Purpan – 37, Allées Jules Guesde – BP 7202
31073 Toulouse Cedex 7

Directeurs de Thèse : M. le Dr Vincent SOLER et M. le Pr Pierre FOURNIE