



Thèse

2018

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Cross-linking cornéen multiple et biomécanique cornéenne

Tabibian, David

How to cite

TABIBIAN, David. Cross-linking cornéen multiple et biomécanique cornéenne. Doctoral Thesis, 2018.
doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:108014

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:108014>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:108014](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:108014)

Cross-linking cornéen multiple et biomécanique cornéenne

Applicant

David Tabibian

Genève

Suisse

Thèse réalisée sous la responsabilité du directeur de thèse :

Professeur Farhad Hafezi

Faculté de Médecine

Université de Genève

Suisse

TABLE DES MATIERES

Page de titre	1
Introduction	3
Thèse de doctorat	6
Conclusion	14
Références	16

INTRODUCTION

Le cross-linking cornéen est une technique chirurgicale qui a été développée par le Professeur Théo Seiler à la fin du XXe siècle dans le but d'arrêter la progression du kératocône, une maladie oculaire invalidante pouvant mener à la malvoyance chez le jeune adulte. Les quelques lignes qui vont introduire cette maladie et son traitement puis le sujet de la thèse de doctorat en médecine dont l'objet est d'évaluer les effets d'un traitement multiple à l'aide d'un modèle murin.

L'œil et la cornée

La fonction principale de l'œil est la transmission de la lumière à travers toute sa structure propre pour la faire parvenir à la rétine. La cornée est la structure transparente la plus antérieure de l'œil et ses fonctions consistent premièrement à focaliser la lumière sur la rétine grâce à sa courbure, deuxièmement à maintenir l'intégrité structurelle du globe oculaire. Pour assumer ces rôles, la cornée est composée de cinq couches cellulaires différenciées qui lui donnent une certaine résistance biomécanique lui permettant de maintenir sa forme, sa structure et donc ses fonctions.

La cornée est tout d'abord recouverte d'un épithélium en contact direct avec le film lacrymal. La couche de Bowmann constitue la partie antérieure du stroma cornéen qui compose 90% de la cornée. Cette épaisse couche est composée de collagène, de protéoglycans et de cellules appelées kératocytes. Le collagène y est arrangé de manière régulière et les kératocytes y sont rares afin de maintenir la transparence de la cornée. La membrane de Descemet marque la fin postérieure du stroma et marque le début de l'endothélium cornéen qui régule les échanges entre la cornée et le liquide intraoculaire appelé humeur aqueuse.¹

Le kératocône

Les ectasies cornéennes (du grec *ektasis* : dilatation) forment un groupe de maladies qui se caractérisent par une déformation de la cornée. Dans ce groupe nous retrouvons le

kératocône, une maladie progressive, non inflammatoire et la plupart du temps bilatérale qui se déclenche à l'adolescence et présente une prévalence d'environ 50-200 cas/100'000 personnes.² Cette maladie affaiblit progressivement la structure de la cornée et lui donne une forme conique qui va compromettre la vision de manière permanente chez le patient. Certaines populations d'individus sont plus à risque, comme les personnes atteintes d'une trisomie 21 avec une prévalence variant entre 5% et 15% dans la littérature.³

Le stroma cornéen est atteint, il s'amincit progressivement surtout près de l'axe visuel et perd de sa résistance mécanique laissant petit à petit les forces de tension le pousser vers l'avant pour former une protrusion conique. Cette déformation pathologique va entraîner une perte visuelle imputable au changement de forme de la cornée. Dans les formes avancées des cicatrices peuvent se développer au centre de la cornée et rendre la vision encore plus basse.

Initialement le kératocône se manifeste par un astigmatisme cornéen qui va être compensé par le plus souvent par des lentilles de contacts durs après avoir échoué avec des lunettes. Les patients développant des formes avancées ou cicatricielles ne peuvent la plupart du temps plus compenser la perte visuelle avec des lentilles de contact et peuvent ainsi devenir malvoyant. Ils se voient alors offrir une prise en charge chirurgicale qui consiste à réaliser une greffe de cornée dite transfixiante, c'est-à-dire que l'on va remplacer l'ensemble des couches de la cornée. En remplaçant l'ensemble du tissu pathologique par celui d'un donneur, la greffe restaure la structure cornéenne et permet ainsi d'améliorer la vision.

Le cross-linking cornéen

En combinant une émission de lumière ultraviolette de type A (365nm de longueur d'onde) et une cornée imbibée d'un photo-réactant, la riboflavine (vitamine B₂), cette technique arrive à créer de nouvelles liaisons covalentes entre les fibrilles de collagène et les protéoglycans au sein du stroma cornéen à travers la libération de radicaux libres.^{4,5} L'augmentation du nombre de liaisons covalentes au sein du stroma cornéen permet une augmentation drastique de la résistance biomécanique de la cornée et arrête ainsi la progression de la maladie.⁶

L'avènement du cross-linking cornéen a révolutionné la prise en charge de ces patients. En permettant de renforcer la structure biomécanique de la cornée, cette opération permet dans une grande majorité des cas de stopper la progression de la maladie. Des nos jours les patients diagnostiqués d'un kératocône progressif peuvent se voir désormais proposer ce traitement, stabilisant définitivement leur vision et la réhabilitant la plupart du temps avec de simples lentilles de contact. Ils évitent ainsi une progression vers les formes avancées et cicatricielles nécessitant des prises charge chirurgicales lourdes.

Sujet de thèse

Depuis le développement de cette technique par le Professeur Seiler, de nombreux groupes de recherche ont cherché à développer et améliorer le protocole de traitement. Dans le cadre de mon travail de thèse de doctorat, notre groupe de recherche, dirigé par le Professeur Farhad Hafezi, a tout d'abord cherché à développer un modèle murin de traitement qui a donné lieu à une publication.⁷ Ce modèle nous a permis ensuite de tester le cross-linking in vivo sur un modèle permettant une plus grande variété génétique et un suivi plus facile que les précédents modèles (porc et lapin). Dans le domaine clinique nous avons observé des patients dont la maladie a progressé malgré un premier traitement et qui se sont ensuite stabilisés uniquement après un second traitement. Notre groupe a entre autre publié un case report sur le sujet en 2014.⁸

Dans le cadre de cette thèse je me suis donc intéressé in vivo aux effets biomécaniques du cross-linking répété chez la souris. Avec mes collègues nous avons cherché à décrire ces changements afin d'obtenir des informations essentielles sur les modifications cornéennes que produit ce traitement et améliorer notre compréhension de ce phénomène pour à terme mieux traiter les patients qui récidivent.

THESE DE DOCTORAT

Corneal cross-linking with riboflavin and UV-A (CXL) is a treatment modality that halts the progression of keratoconus with good long-term results.^{6,9-12} It is also effective in arresting the progression of postoperative ectasia after laser-assisted in-situ keratomileusis (LASIK) and photorefractive keratectomy (PRK).^{13,14} Currently, PACK (photoactivated riboflavin for infectious keratitis)-CXL is under investigation for its effect on infectious keratitis.^{15,16}

Typically, CXL for keratoconus and postoperative ectasia shows a high success rate in stabilizing the cornea biomechanically.^{9,17} However, in certain cases, the ectasia continues to progress even after the CXL procedure. The question arises whether a second CXL may further help stabilizing the cornea.

Recently, our group reported the clinical case of a patient with progressive keratoconus who received a first CXL, but whose cornea showed progression again, and only stabilized after a second CXL procedure four years after the first treatment. Nevertheless, an experimental study that addressed biomechanical changes after repeated cross-linking sessions (control, single, double and triple treatment groups) in post mortem human corneas,¹⁸ did not find any additional stiffening after the 2nd and 3rd CXL.¹⁸ It is unclear, if ex vivo corneal tissue loses its capacity to be cross-linked after a certain post-mortem time.

In this study, we aimed to learn more about the dynamic processes related to corneal cross-linking and repeated treatments. For this purpose we have chosen an *in vivo* mouse model and an observation time that allows for complete corneal re-epithelialization between cross-linking sessions.

MATERIALS AND METHODS

The CXL procedures were timed to ensure maximal reproducibility. To ensure complete re-epithelialization, the interval between the first and the second treatment session was set to

three days. The experimental set-up is illustrated in Table 1. The biomechanical stiffening effect was measured using static and dynamic stress-strain tests.

All procedures concerning animals in this study have been conducted after approval by the local ethical committee and in adherence to the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research.

Animals

Four-week-old male C57BL/6 wild-type mice (n=9) were used in the experiments. Corneas (n=18) were equally divided into three groups: one-time cross-linking (1xCXL group), repeated cross-linking (2xCXL group), and un-irradiated controls (C group).

For each CXL treatment, the mice were anesthetized with an intra-peritoneal dosis of Ketamin (100 mg/kg, Ketalar Pfizer AG, Zurich, Switzerland) and Xylazine (10 mg/kg, Rompun Bayer AG, Zurich, Switzerland). After instillation of local anesthesia drops (Tetracaine SDU Faure 1%, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) for 20 s and 35%-ethanol for 180 seconds, the epithelium was removed with a hockey knife. An antibiotic ointment (Floxal, Bausch & Lomb AG, Zug, Switzerland) was applied once after each treatment session on the eye. Mice were monitored for pain between treatments and systemic pain medication was adapted as needed. Complete re-epithelialization was assessed under the microscope. For the biomechanical characterization, the mice were euthanized with an intra-peritoneal dose of Pentobarbital (0.5 g/10 ml, 100 µl/animal, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Switzerland).

Corneal cross-linking (CXL)

We have previously established a CXL protocol adapted to mice,⁷ where the treatment parameters are modified according to the Lambert-Beer law in order to account for the 5x thinner corneal thickness. Thereby the relative ultra-violet (UV) absorption, i.e. the absorbed UV-energy per corneal cross-section, in the mouse cornea is the same as with the Dresden protocol in the human cornea.⁶

Accordingly, 0.27% riboflavin solution (diluted in phosphate buffered saline) was applied on the de-epithelialized corneas for 20 minutes, followed by an UVA irradiation of 9 mW/cm² for 170 seconds at 365 nm. This corresponds to a fluence of 1.53 J/cm².

Biomechanical testing

Immediately after sacrifice, the corneas were excised with a small scleral rim and mounted on a customized 2D-flap-holder.⁷ The biomechanical analysis consisted of three parts: (i) pre-conditioned during three cycles from 0.04 to 0.4 N, (ii) stress relaxation during 120 s following 0.4 N force application and (iii) stress-strain curve until break. The stress relaxation curve was then fitted to the Prony series expression:⁷

$$E = E_{\infty} + \sum_{i=1}^N E_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

where E_{∞} is the long term elastic modulus (at complete relaxation), E_i are the short term elastic moduli and τ_i are the corresponding relaxation times.

$$E(t) = \frac{\sigma(t)}{\varepsilon_{const}}$$

where $\sigma(t)$ is the measured stress relaxation curve and ε_{const} the strain, which was kept constant. The slope of the stress-strain curves corresponds to the tangent elastic modulus E (Young's modulus) and was determined at 5% and 10% of strain.

RESULTS

All corneas were measured on the 7th day after starting the experiment. At that time all corneas had been operated twice – on the 1st and on the 4th day: The 2xCXL condition has received twice the CXL treatment; the 1xCXL condition has received the riboflavin instillation on the 1st day and CXL treatment on the 4th day; the riboflavin condition has received twice the riboflavin instillation.

Stress relaxation

After the relaxation period of 120 seconds, we found highly significant differences ($p < 0.001$) between controls and the 1xCXL group, and between controls and the 2xCXL group, but not between the 1xCXL and 2xCXL groups ($p = 0.70$). The stress remaining after relaxation was 355 ± 25.2 kPa in controls, 457 ± 34.1 kPa in the 1xCXL group and 463 ± 22.2 kPa in the 2xCXL group.

Viscoelastic parameters:

The first part of Table 2 summarizes the results from the numerical fitting procedure. The two time-constants were initially left variable, but were set constant for the final fitting procedure since no significant differences were found between conditions. The retrieved parameters show that both, the instantaneous (G_0) and the infinite (G_∞) modulus, were most affected by CXL. G_0 increased by a factor 1.6 and G_∞ by a factor 2.2 after treatment. Among the viscoelastic components tested, the modulus at 70 seconds decreased (G_2 , factor 0.77), while the modulus at 6 seconds increased (G_1 , factor 1.14).

Elastic parameters:

The second part of Table 2 shows the elastic moduli obtained from the stress-strain extensimetry measurements. On average, corneal stiffness decreased from 0.5% to 1% strain by a factor 0.81 in the first test (i.e. before pre-conditioning), and by a factor 0.85 in the second test (i.e. after stress-relaxation). No significant differences in the elastic moduli between conditions were found.

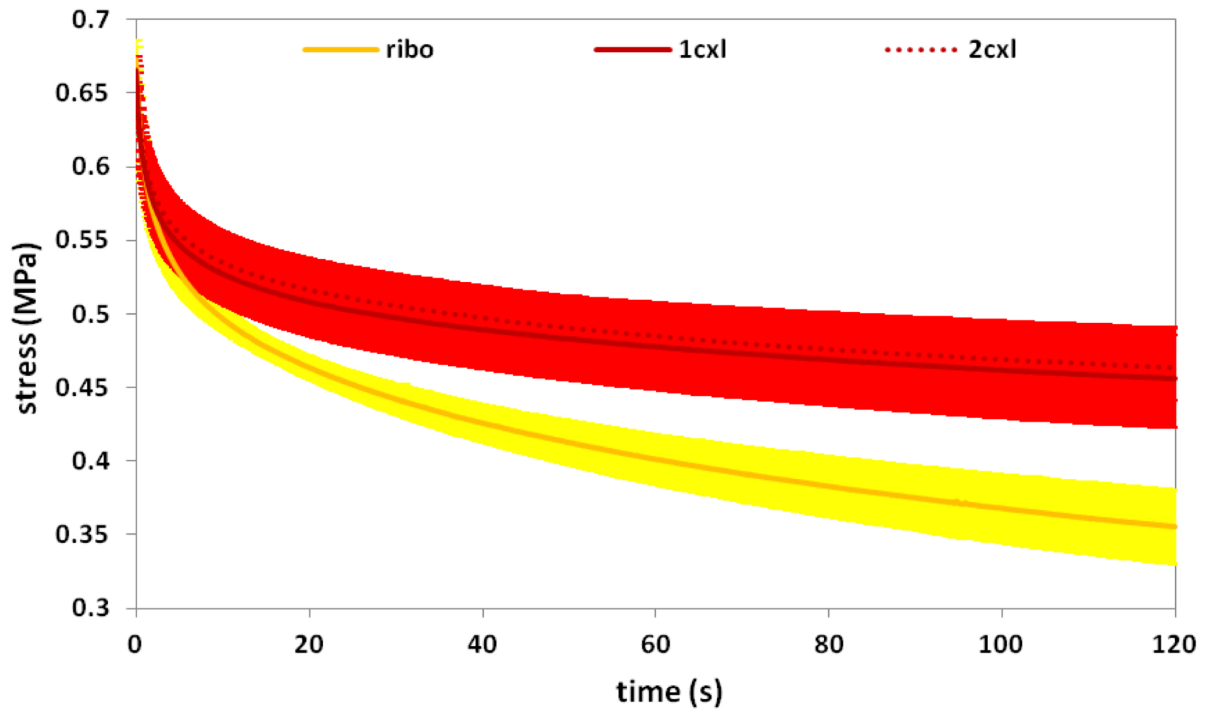


Figure 1. Stress relaxation for 1xCXL, 2xCXL, and un-irradiated controls: Highly significant differences ($p < 0.001$) were found between the controls and 1xCXL and between controls and 2xCXL corneas. No significant differences ($p = 0.70$) were found between 1xCXL and 2xCXL corneas.

Group	Mouse	OS	OD	Day 1 OS/OD	Day 4 OS/OD
1	1	ribo	1x cxl	ribo/ribo	ribo/cxl
	2	ribo	1x cxl	ribo/ribo	ribo/cxl
	3	ribo	1x cxl	ribo/ribo	ribo/cxl
2	4	1x cxl	2x cxl	ribo/cxl	cxl/cxl
	5	1x cxl	2x cxl	ribo/cxl	cxl/cxl
	6	1x cxl	2x cxl	ribo/cxl	cxl/cxl
3	7	ribo	2x cxl	ribo/cxl	ribo/cxl
	8	ribo	2x cxl	ribo/cxl	ribo/cxl
	9	ribo	2x cxl	ribo/cxl	ribo/cxl

Table 1. Treatment protocol, with timing of the procedures. OS = left eye, OD = right eye, C = unirradiated control (de-epithelialization and riboflavin administration), 1xCXL = single corneal cross-linking treatment, 2xCXL = repeated corneal cross-linking treatment.

	2cxl	1cxl	ribo	P_(ribo-1cxl)	P_(ribo-2cxl)	P_(1cxl-2cxl)
τ_1 (s)	6	6	6	-	-	-
τ_2 (s)	70	70	70	-	-	-
E_1 (kPa)	14.3±1.2	14.8±3.5	20.4±4.7	0.044	0.012	0.71
E_2 (kPa)	19.5±2.73	19.1±5.1	40.2±7.8	<0.001	<0.001	0.86
E_∞ (kPa)	100±5.2	99.0±8.4	72.7±7.0	<0.001	<0.001	0.74
E_0 (MPa)	1.34	1.33	1.33	-	-	-
$E_{0_5\%}$ (MPa)	0.862±0.32	0.841±0.19	0.714±0.18	0.26	0.35	0.90
$E_{0_10\%}$ (MPa)	1.06±0.37	0.916±0.26	0.853±0.17	0.72	0.60	0.46
$E_{\infty_5\%}$ (MPa)	2.69±0.41	2.38±0.36	2.81±0.38	0.76	0.61	0.19
$E_{\infty_10\%}$ (MPa)	3.81±0.62	3.29±0.83	3.87±0.36	0.91	0.84	0.24

Table 2. Viscoelastic parameters (E_∞ = infinite modulus, E_i = short term moduli, τ_i = retardation time constants, E_0 = instantaneous modulus) and elastic parameters ($E_{0_5/10\%}$ = tangent elastic moduli during pre-conditioning and $E_{\infty_5/10\%}$ = tangent elastic moduli after pre-conditioning, both at 5% and 10% of strain).

DISCUSSION

Corneal cross-linking with riboflavin and UV-A shows a high success rate of more than 90%.^{9,10,17} However, under certain circumstances, treatment failure may occur and/or CXL needs to be repeated. These circumstances include CXL in extremely thin corneas,¹⁹ pregnancy-related changes in estrogen levels and their influence on corneal biomechanics,²⁰ and CXL in children.²¹ Here, the question remains whether the second CXL procedure will provide an additional increase in biomechanical stiffness.

Raiskup *et al.* reported recurrences of progressive corneal ectasia at 5 and 10 years after the initial treatment in their 10 year follow-up study.⁹ In a recent clinical study⁸ it has been shown that repeating CXL (fluence: 5.4 J/cm²; irradiation: 30 minutes at 3mW/cm²) four years after the first treatment could again successfully stop the recurrent progression.

In this study, we measured the biomechanical changes after repeated cross-linking *in vivo* in mice. Our setup and study power allowed us to detect a significant biomechanical difference between the groups, if it was higher than 7,6%. Detecting a smaller difference, i.e. 1%, would have required a higher power and sacrificing up to 200 mice, which was in our opinion not ethically acceptable regarding the aim of this study. We have chosen this measurement set-up as we could show in a previous study that stress relaxation is a more sensitive technique²² than stress-strain extensometry to measure CXL efficacy, especially in mice.⁷ Limitations are that the obtained biomechanical parameters from the 2D testing approach cannot be directly compared to the elastic moduli from 1D testing reported in literature. We found a large difference in the relaxation behavior between control and 1xCXL corneas. However, 2xCXL did not lead to a significant additional increase in corneal stiffness. These *in vivo* animal data are in line with the work published by Beshtawi et al in 2014.

An explanation for the differences between *in vivo* and *ex vivo* results could be that the effect of corneal cross-linking is not only due to immediate biomechanical changes occurring within hours to days after treatment, but also related to secondary mid- to long-term remodeling processes in the cornea. Accordingly, in human eyes, changes are observed even years after the treatment and recurrence of keratoconus can occur up to ten years after the initial surgery.^{9,10} In our experiments, the time between treatments and measurement was limited to seven days, which does not allow for detection of long-term changes.

As cross-linking increases corneal stiffness, typically the biomechanical properties are measured in order to describe the efficacy of the treatment. A major problem to date is that biomechanical parameters cannot be measured readily *in vivo*. Most accurate stress-strain tests are performed *ex vivo*, although even here limitations occur due to changes in tissue hydration and the fact that most testing procedures do not consider the original tissue loading. The state-of-the-art of mechanical characterization is stress-strain extensometry, which addresses the static material properties.²³ However, recently we have demonstrated that

corneal cross-linking is also sensitive to the dynamic properties, i.e. viscoelastic parameters.^{22,24} We were able to confirm these findings in the current study.

As most biological tissues are viscoelastic, measuring changes in these parameters is extremely interesting, especially as the temporal corneal stiffness is more clinically important than the immediate response to a linearly increasing stress. Stress-strain extensimetry was performed at a speed of 0.5 mm/min (load at 0.5% strain applied within 2.4 seconds and 1% strain within 4.9 seconds). This temporal range comes close to the identified differences between CXL and controls in our viscoelastic testing approach.

Caution should be taken when transferring these conclusions to cross-linking in human corneas: as the mouse cornea is considerably thinner (factor 5) than a human cornea, we recently showed that its oxygen diffusion is distinctly higher, allowing for a more efficient CXL.²⁵ Thus, if cross-linking in humans is actually limited by oxygen diffusion, then a first CXL might not be able to create all potential cross-links between stromal molecules. The same applies to less effective treatment protocols, such as trans-epithelial CXL. In this case, a second CXL could potentially induce additional stiffening in humans by completing the residual potential cross-links not exploited by the first treatment due to oxygen disposal limitation.²⁶

While the temporal distance between the first and the repeated CXL treatment session was enough to re-establish the physiologic oxygen saturation and to complete the immediate and intermediate cross-linking and wound healing effects, it was too short to evaluate long-term remodeling effects of the corneal stroma. Therefore, we only could demonstrate that on the short-term, repeated CXL did not additionally increase the corneal stiffness. Long-term effects may be addressed in future studies by measuring the demarcation line in patients receiving a second CXL treatment years after the first treatment.

In conclusion, a second corneal cross-linking after short time did not significantly increase the corneal stiffness *in vivo* in mice. Although similar results have been reported in human post mortem corneas,¹⁸ clinical evidence shows that a second CXL, performed years after the first

CXL procedure, may be efficient in stabilizing the cornea in recurrent ectasia. This suggests that in certain patients the biomechanical effect of the first CXL procedure may wear off, e.g. due to an increased matrix-metalloproteinase production. In this case a second CXL procedure potentially can induce additional corneal stiffening and restore the biomechanical resistance that was present immediately after the initial CXL.

CONCLUSION

Le cross-linking cornéen est désormais reconnu comme un traitement efficace dans l'ensemble de la communauté ophtalmologique à travers le monde. Ayant été développé puis utilisé en Europe au début du millénaire il est désormais aussi utilisé aux Etats-Unis d'Amérique depuis 2016 et reconnu par la FDA (United-States Food and Drug Administration).

Les premières études avec un suivi à long terme des patients commencent à voir le jour ces dernières années dans les revues spécialisées et montrent qu'effectivement une partie des patients progresse à nouveau passé un certain temps après le premier traitement par cross-linking.⁹ De plus certaines catégories de patients sont plus à risque de présenter une rechute comme mentionné plus haut. Récemment cette question a été posée à main levée à l'assemblée lors du congrès international du cross-linking en 2015 et une grande partie des cliniciens présents s'est manifestée comme ayant été déjà confronté à de tels cas. La littérature rejoint ainsi la vie réelle du clinicien ophtalmologue sur cette question précise et des retraitements plus fréquents sont à prévoir maintenant que la première génération de patient a un suivi post-opératoire dépassant la décennie.

Nos résultats sont à mettre en parallèle avec l'expérience clinique qui montre qu'un second traitement réalisé plusieurs années après le premier permet tout de même de stabiliser la maladie dans la majorité des cas. Cette différence entre les résultats in vivo chez la souris et la pratique clinique chez l'être humain ouvre un nouveau champ de questions concernant le fonctionnement de la cornée et les modifications structurelles inhérentes qui doivent se produire au cours de notre vie pour pouvoir expliquer un tel phénomène. Il est donc désormais

nécessaire de mener de nouvelles études afin d'étudier plus en profondeur la dynamique structurelle cornéenne sur le long-terme après un traitement par cross-linking.

L'importance de la compréhension des mécanismes qui sous-tendent le bon fonctionnement d'un second traitement est essentielle car de nouvelles applications du cross-linking se développent à ce jour et pourraient à terme mener à retraiter un patient plusieurs fois au cours de sa vie. Récemment il a été suggéré que le cross-linking pourrait être utilisé comme traitement adjuvant lors d'une chirurgie réfractive. La chirurgie réfractive sur des cornées fines comprend le risque de créer de provoquer de manière iatrogénique une ectasie cornéenne similaire au kératocône après le traitement chirurgical qui mènerait potentiellement à une perte visuelle significative. Il est intéressant de noter que même si la maladie semble présenter dans son ensemble le même développement pathophysiologique qu'un kératocône, à savoir l'affaissement biomécanique cornée provoquant la protrusion antérieure habituelle, il existe des différences notables avec une ectasie cornéenne classique. Les changements topographiques et probablement biomécaniques semblent avoir leurs propres profils et suivre une évolution légèrement différente des kératocônes classiques. De nos jours le traitement de référence des ectasies cornéennes iatrogéniques reste le cross-linking, néanmoins les protocoles de traitement et le timing de celui-ci sont amenés à être modifiés. Le cross-linking prend aussi une place dans la prévention de ces maladies iatrogéniques. Les patients présentant des cornées à risques se voient désormais proposer dans certains centres un cross-linking cornéen en même temps que la chirurgie corrective. Ceci dans le but de stabiliser la cornée et d'éviter toute progression vers une maladie ectatique et ce à chaque fois qu'un traitement ou retraitement correctif serait réalisé.²⁷

Actuellement il existe un nombre de plus en plus important de publications sur l'utilisation du cross-linking dans le cadre des infections cornéennes. En effet la lumière ultraviolette mais aussi la riboflavine elle-même ont un effet bactéricide et leur combinaison potentialise cet effet comme cela a été démontré in vitro par différents groupes dont le nôtre.^{28,29} Ces résultats montrent une efficacité notable contre les bactéries et plus discutable en ce qui concerne les

champignons et les amibes liés aux infections cornéennes. L'efficacité clinique du cross-linking pour traiter les infections bactériennes cornéennes a par la suite été démontrée aussi cliniquement au travers de plusieurs études cliniques chez l'homme et l'animal.³⁰⁻³² Les protocoles de traitements doivent encore être adaptés à cette nouvelle indication (modification du temps d'exposition, de l'intensité, etc), mais à l'avenir ce dernier deviendra un outil thérapeutique additionnel dans le traitement des infections de l'œil. Une première infection oculaire étant un facteur de risque connu pour en développer d'autres, il est probable que des patients se voient à l'avenir offrir des cross-linking cornéens répétés au cours de leur vie afin d'éradiquer leur infection. Les dernières innovations techniques permettent désormais de produire des machines fournissant un cross-linking dont l'action peut être focalisée sur une partie de la cornée afin de traiter uniquement la zone infectée et d'épargner le reste de la surface. Certaines proposent aussi de moduler l'intensité du traitement à la surface de la cornée. Des retraitements exposeraient donc certaines zones de la cornée à des expositions multiples avec des énergies variables et se pose alors la question des changements induits au long court dans ces zones.

Le cross-linking cornéen est ainsi une technologie en plein développement avec de nombreux groupes de recherche travaillant à perfectionner les protocoles actuels mais aussi à les adapter à ces nouvelles applications. Au travers de celles-ci, les patients se verront probablement offrir de plus en plus fréquemment des traitements répétés et il est dès lors nécessaire à notre avis de multiplier les études cliniques et fondamentales pour mieux comprendre les conséquences biomécaniques et biologiques que la répétition des opérations aura à long-terme chez nos patients.

REFERENCES

1. Jack J Kanski BB. *Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach, 7th Edition*. 7th Edition ed: Elsevier Saunders 2011.
2. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea*. Mosby/Elsevier ed: Mosby/Elsevier; 2011.
3. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Survey of ophthalmology*. 1998;42(4):297-319.
4. Spoerl E, Huhle M, Kasper M, Seiler T. [Increased rigidity of the cornea caused by intrastromal cross-linking]. *Ophthalmologie*. 1997;94(12):902-906.

5. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res.* 1998;66(1):97-103.
6. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 2003;135(5):620-627.
7. Hammer A, Kling S, Boldi M-O, et al. Establishing Corneal Cross-Linking with riboflavin and UV-A in the mouse cornea in vivo: biomechanical analysis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2015.
8. Hafezi F, Tabibian D, Rychos O. Additive Effect of Repeated Corneal Collagen Cross-linking in Keratoconus. *J Refract Surg.* 2014;30(10):716-718.
9. Raiskup F, Theuring A, Pillunat LE, Spoerl E. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in progressive keratoconus: ten-year results. *J Cataract Refract Surg.* 2015;41(1):41-46.
10. Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg.* 2008;34(5):796-801.
11. Theuring A, Spoerl E, Pillunat LE, Raiskup F. [Corneal collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A light in progressive keratoconus : Results after 10-year follow-up.]. *Ophthalmologie.* 2014.
12. 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(7):S720-725.
13. Kohlhaas M, Spoerl E, Speck A, Schilde T, Sandner D, Pillunat LE. [A new treatment of keratectasia after LASIK by using collagen with riboflavin/UVA light cross-linking]. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 2005;222(5):430-436.
14. Rychos O, Mavroukian N, Pajic B, Hafezi F. Corneal Collagen Cross-Linking for Ectasia after LASIK and Photorefractive Keratectomy: Long-Term Results. *Ophthalmology.* 2013.
15. Makdoui K, Mortensen J, Sorkhabi O, Malmvall BE, Crafoord S. UVA-riboflavin photochemical therapy of bacterial keratitis: a pilot study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012;250(1):95-102.
16. Said DG, Elalfy MS, Gatzoufas Z, et al. Collagen Cross-Linking with Photoactivated Riboflavin (PACK-CXL) for the Treatment of Advanced Infectious Keratitis with Corneal Melting. *Ophthalmology.* 2014;121(7):1377-1382.
17. Koller T, Mrochen M, Seiler T. Complication and failure rates after corneal crosslinking. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35(8):1358-1362.
18. Beshtawi IM, Akhtar R, Hillarby MC, et al. Biomechanical changes after repeated collagen cross-linking on human corneas assessed in-vitro using scanning acoustic microscopy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2014.
19. Hafezi F. Limitation of Collagen Cross-Linking With Hypoosmolar Riboflavin Solution: Failure in an Extremely Thin Cornea. *Cornea.* 2011.
20. Hafezi F, Iseli HP. Pregnancy-related exacerbation of iatrogenic keratectasia despite corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg.* 2008;34(7):1219-1221.
21. Chatzis N, Hafezi F. Progression of Keratoconus and Efficacy of Corneal Collagen Cross-linking in Children and Adolescents. *J Refract Surg.* 2012;28(11):753-758.

22. Richoz O, Kling S, Zandi S, Hammer A, Spoerl E, Hafezi F. A constant-force technique to measure corneal biomechanical changes after collagen cross-linking. *PLoS One*. 2014;9(8):e105095.
23. Kenedi RM, Gibson T, Evans JH, Barbenel JC. Tissue mechanics. *Phys Med Biol*. 1975;20(3):699-717.
24. Kling S, Marcos S. Contributing factors to corneal deformation in air puff measurements. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(7):5078-5085.
25. Kling S, Richoz O, Hammer A, et al. Increased Biomechanical Efficacy of Corneal Cross-linking in Thin Corneas Due to Higher Oxygen Availability. *J Refract Surg*. 2015;31(12):840-846.
26. Richoz O, Hammer A, Tabibian D, Gatzoufas Z, Hafezi F. The Biomechanical Effect of Corneal Collagen Cross-Linking (CXL) With Riboflavin and UV-A is Oxygen Dependent. *Translational vision science & technology*. 2013;2(7):6.
27. Li N, Peng XJ, Fan ZJ. Progress of corneal collagen cross-linking combined with refractive surgery. *International journal of ophthalmology*. 2014;7(1):157-162.
28. Richoz O, Kling S, Hoogewoud F, et al. Antibacterial efficacy of accelerated photoactivated chromophore for keratitis-corneal collagen cross-linking (PACK-CXL). *J Refract Surg*. 2014;30(12):850-854.
29. Martins SA, Combs JC, Noguera G, et al. Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365 nm) in vitro for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(8):3402-3408.
30. Papaioannou L, Miligkos M, Papathanassiou M. Corneal Collagen Cross-Linking for Infectious Keratitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cornea*. 2015.
31. Said DG, Elalfy MS, Gatzoufas Z, et al. Collagen Cross-Linking with Photoactivated Riboflavin (PACK-CXL) for the Treatment of Advanced Infectious Keratitis with Corneal Melting. *Ophthalmology*. 2014.
32. Famose F. Evaluation of accelerated collagen cross-linking for the treatment of melting keratitis in eight dogs. *Veterinary ophthalmology*. 2014;17(5):358-367.