



Thèse

2024

Open Access

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

La combinaison de la Riboflavine/lumière UV-A et du Rose de Bengale/lumière verte pour le cross-linking cornéen augmente la résistance de la digestion enzymatique de la cornée

Aydemir, Muhammed Enes

How to cite

AYDEMIR, Muhammed Enes. La combinaison de la Riboflavine/lumière UV-A et du Rose de Bengale/lumière verte pour le cross-linking cornéen augmente la résistance de la digestion enzymatique de la cornée. Doctoral Thesis, 2024. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:177609

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:177609>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:177609](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:177609)

Section de *médecine Clinique, Fondamentale,
ou Dentaire*

Département d'Ophtalmologie

Service.....

Thèse préparée sous la direction du Prof. Dr. Dr. med. Farhad Hafezi, FARVO

" La combinaison de la Riboflavine/lumière UV-A et du Rose de Bengale/lumière verte pour le cross-linking cornéen augmente la résistance de la digestion enzymatique de la cornée "

Thèse
présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine
par

muhammed enes AYDEMIR
(*Prénom(s) en minuscule(s) et nom en majuscules*)
de

Dietikon (Zurich)
(*lieu d'origine*)

Thèse n° 11214

Translational Vision Science & Technology
(*lieu de publication*)

2024
(*année*)

La combinaison de la Riboflavine/lumière UV-A et du Rose de Bengale/lumière verte pour le cross-linking cornéen augmente la résistance de la digestion enzymatique de la cornée

M. Enes Aydemir, MSc¹ ; Nikki L. Hafezi, MAS IP ETHZ^{1,2} ; Nan-Ji Lu, MD, MSc^{1,2} ; Emilio A. Torres-Netto MD, PhD^{1,3} ; Mark Hillen PhD¹ ; Carina Koppen MD, PhD² ; Farhad Hafezi, MD, PhD, FARVO^{1,3,4,5}

¹ ELZA Institute, Dietikon, Suisse

² Département d'ophtalmologie, Hôpital universitaire Antwerp, Antwerp, Belgique

³ Laboratoire de biologie cellulaire oculaire, Université de Zurich, Zurich, Suisse

⁴ Faculté de médecine, Université de Genève, Genève, Suisse

⁵ Département d'ophtalmologie de la New York University Grossman School of Medicine, New York University, New York, États-Unis.

Auteur correspondant: Farhad Hafezi. Université de Zurich, Centre de biotechnologie appliquée et de médecine moléculaire, Winterthurerstrasse 190, Zurich, Suisse ; E-mail: farhad@hafezi.ch

Titre abrégé : Résistance enzymatique combinant riboflavine/lumière UV-A et Rose de Bengale/lumière verte

Mots-clés : Kératocône ; cross-linking cornéen ; Résistance enzymatique ; Digestion enzymatique, Riboflavine; rose de bengale

Financement et déclarations financières : Cette étude a été soutenue par la Fondation Light for Sight. Divulgateur : M. E. Aydemir, Aucun ; N. L. Hafezi, EMAGine AG (E) ; N. Lu, Aucun ; E.A. Torres-Netto, Aucun ; M. Hillen, Aucun ; C. Koppen, Aucun ; F. Hafezi, Appareil pour le traitement et/ou la prévention des maladies de la cornée (P), EMAGine AG (I).

Table des matières

1. RESUME.....	2
2. INTRODUCTION	3
3. MATERIELS ET METHODES.....	5
3.1 ACQUISITION ET PREPARATION DES ECHANTILLONS	5
3.2 ATTRIBUTION DES GROUPES D'ETUDE ET PROTOCOLES CXL.....	5
3.3 DIGESTION ENZYMATIQUE DES BOUTONS DE CORNEE ET EVALUATION	6
3.4 ANALYSE STATISTIQUE	7
4. RESULTATS	8
5. DISCUSSION	9
5.1 REMERCIEMENTS	14
6. REFERENCES.....	15
7. FIGURES.....	20
8. TABLEAUX	20
9. RAPPORT DU DIRECTEUR DE THESE.....	24

1. Résumé

Objectif: Déterminer si la combinaison de la riboflavine/lumière UV-A (RF/UV-A) et du rose de Bengale/lumière verte (RB/vert) épi-off PACK-CXL améliore la résistance de la cornée à la digestion enzymatique par rapport à des traitements séparés chromophore/lumière.

Méthodes: Des cornées porcines ex-vivo ont été réparties comme suit. Les cornées du groupe A ont été imbibées de riboflavine (RF) et n'ont pas été irradiées (A1, contrôles) ou ont été irradiées avec respectivement 10 (A2) ou 15 J/cm² (A3) de lumière UV-A à 365 nm. Les cornées du groupe B ont été imbibées de rose de Bengale (RB) et n'ont pas été irradiées (B1, contrôles) ou ont été irradiées avec respectivement 10 (B2) ou 15 J/cm² (B3) de lumière verte à 522 nm. Les cornées du groupe C ont été imbibées de RF et de RB et n'ont pas été irradiées (C1, contrôles) ou ont été soumises à une irradiation consécutive aux UV-A et à la lumière verte avec respectivement 10 J/cm² (C2) ou 15 J/cm² (C3) pendant la même session. Après le traitement, toutes les cornées ont été exposées à la collagénase A à 0,3 % pour évaluer le temps de digestion jusqu'à la dissolution du bouton cornéen.

Résultats: Les temps de digestion des groupes A1-A3 étaient respectivement de 21,38, 30,5 et 32,25 heures, A2 et A3 montrant une résistance accrue à A1. Les temps de digestion des groupes B1-B3 étaient de 31,2, 33,81 et 34,38 heures, B3 résistant mieux que B1. Les temps de digestion des groupes C1-C3 étaient de 33,47, 39,81 et 51,94 heures ; C3 présentait une résistance supérieure à C1 et C2 ($p < 0,05$ dans les deux cas).

Conclusion: Le cross-linking combinée RF/UV-A et RB/vert, réalisé au cours d'une même séance, augmente de manière significative la résistance enzymatique de la cornée par rapport aux traitements isolés.

Pertinence translationnelle : La combinaison du PACK-CXL à base de riboflavine et de rose de Bengale augmente considérablement la résistance à la digestion de la collagénase cornéenne, réduisant potentiellement la taille de l'ulcère dans des contextes cliniques.

2. Introduction

La kératite infectieuse (KI) est une cause majeure de cécité dans le monde^{1 2} et peut être causée par plusieurs organismes, notamment des bactéries, des champignons, des amibes et des virus. Un traitement rapide, idéalement avant l'atteinte stromale et l'apparition d'un ulcère, améliore considérablement le pronostic.³ L'identification des agents pathogènes et le choix d'une thérapie appropriée pour la KI peuvent s'avérer difficiles. Des choix de traitement inappropriés font perdre du temps et risquent d'aboutir à des résultats plus médiocres en raison de la progression rapide de la maladie.

Le cross-linking de la cornée (CXL),⁴ initialement utilisée pour traiter les ectasies cornéennes, est devenue une thérapie pour la KI. Hafezi and Randleman l'ont ensuite désigné sous le nom de « chromophore photoactivé pour le cross-linking de la kératite infectieuse » (PACK-CXL),⁵ cette approche a connu une utilisation croissante comme traitement de la kératite infectieuse depuis 2008. Le CXL implique l'application d'un chromophore sur le stroma cornéen et l'irradiation du stroma avec une longueur d'onde spécifique de la lumière pour activer le chromophore. Lorsque la riboflavine (RF) et la lumière UV (365-370 nm) sont utilisées, ce processus produit des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui induisent un cross-linking des molécules stromales - principalement les fibres de collagène et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire - ce qui a pour effet de rigidifier le tissu cornéen.⁶ Deux mécanismes antiseptiques primaires sous-tendent l'efficacité du CXL dans la réduction de la charge pathogène. Le premier est la destruction directe des pathogènes par les dommages causés par les ROS aux membranes cellulaires et aux acides nucléiques.^{7 8} La seconde est l'entrave stérique du CXL médiée par les ROS qui obstrue les sites de liaison de la collagénase et augmente la résistance de la cornée à la digestion enzymatique, ce qui devrait contribuer à limiter le développement de l'ulcère et à restreindre la taille de la cicatrice cornéenne.⁹ Ces mécanismes permettent de diagnostiquer les pathogènes et, à une époque où la résistance antimicrobienne des pathogènes augmente, ont fait du CXL une approche

prometteuse pour le traitement de la KI.⁵ Initialement explorée comme thérapie adjuvante pour la KI ulcéreuse avancée par Iseli et al, la technique a ensuite été appelée " Photo Activated Chromophore for Keratitis - Corneal Cross-linking " (PACK-CXL).¹⁰ Le PACK-CXL sert actuellement de traitement adjuvant pour la kératite infectieuse ulcéreuse avancée, mais un essai prospectif randomisé de phase III récemment publié a montré qu'une seule application de PACK-CXL est aussi efficace qu'un traitement antimicrobien standard pour les kératites bactériennes ou fongiques précoces à modérées.¹¹

Outre la riboflavine et la lumière UV-A à 365 nm (RF/UV-A), le PACK-CXL peut également être réalisé en utilisant du rose de Bengale (RB) et une lumière verte à 522 nm (RB/vert). Des études de laboratoire ont démontré une sensibilité variable aux pathogènes pour le PACK-CXL utilisant la RF/UV-A et le RB/vert.^{12 13} La profondeur de pénétration stromale des deux chromophores varie également : RF/UV-A cross-link jusqu'à 400 à 600 µm dans le stroma cornéen, en fonction de sa formulation et de son application, tandis que le RB/vert ne cross-link qu'à une profondeur de 100 µm.¹⁴⁻¹⁷ Notamment, les spectres d'absorption des deux chromophores ne présentent qu'un chevauchement minimal, ce qui signifie qu'ils n'entrent pas en compétition pour les mêmes longueurs d'onde de l'énergie lumineuse. Ici, nous avons étudié si la résistance de la cornée à la digestion pouvait être augmentée par une application de RF/UV-A et de RB/vert dans le PACK-CXL par rapport à l'utilisation d'une seule combinaison chromophore/lumière.

3. Matériels et méthodes

3.1 Acquisition et préparation des échantillons

Des yeux de porc fraîchement énucléés (moins de 6 heures après la mort) ont été obtenus auprès d'un abattoir local. L'épithélium a d'abord été retiré à l'aide d'un couteau de hockey (FEATHER®, pfm medical ag, Cologne, Allemagne). Les cornées ont été excisées circonférentiellement à l'aide de ciseaux de Westcott en laissant un bord cornéoscléral de 3 mm. Les boutons de cornée ont été immergés dans une solution de Tampon phosphate salin (PBS) à 400 mOsmol/L pendant 10 minutes avant d'être prélevés au centre avec un poinçon à biopsie de 8 mm (SMI AG, Vith, Belgique) pour obtenir des boutons de cornée. La raison de l'immersion dans le PBS est de contrôler l'hydratation. La solution iso-osmolaire empêche tout gonflement ou déshydratation. Les boutons de cornée ont ensuite été trempés soit dans une solution de 0,1% RF (Ribo-Ker, EMAGine AG, Zug, Suisse) ou 0,1% RB (Bengalrosa, Bichsel AG, Interlaken, Suisse) pendant 10 minutes. Après trempage, les boutons ont été rincés avec une solution de PBS à 400 mOsmol/L et placés dans une plaque à 24 puits (Merck AG, Darmstadt, Allemagne). Enfin, les cornées traitées par RF ont subi une CXL à l'aide d'une source lumineuse UV-A de 365 nm disponible dans le commerce (appareil C-eye, EMAGine, Zug, Suisse), tandis que les cornées traitées par RB ont subi un CXL à l'aide d'une source lumineuse verte de 522 nm (appareil expérimental fabriqué sur mesure).

3.2 Attribution des groupes d'étude et protocoles CXL

Nous avons réparti au hasard 144 yeux de porc dans l'un des trois groupes d'étude (A, B et C), chacun contenant 48 cornées (**tableau 1**).

Groupe A (RF/UV-A): toutes les cornées ont subi 10 minutes de trempage RF. Les cornées A1 non irradiées (n=16) ont servi de témoins, tandis que les cornées A2 et A3 (n=16 chacune)

ont été irradiées par une lumière UV-A de 365 nm à raison de 10 J/cm² (18 mW/cm², 9 minutes 15 secondes) ou 15 J/cm² (30 mW/cm² pendant 8 minutes 20 secondes).

Groupe B (RB/verte): toutes les cornées ont subi 10 minutes de trempage dans le RB. Les cornées B1 non irradiées ont servi de contrôle, tandis que les cornées B2 et B3 ont été irradiées avec une lumière verte de 522 nm à 10 J/cm² (15 mW/cm², 11 min 7 sec) ou 15 J/cm² (15 mW/cm², 16 min 40 sec).

Groupe C (même-session RF/UV-A and RB/verte): Toutes les cornées ont subi 10 minutes de trempage dans la RF, suivies de 10 minutes de trempage dans le RB. Les cornées C1 non irradiées ont servi de témoins. Les cornées C2 ont été irradiées avec des UV-A (18 mW/cm², 9 min 15 sec), puis avec de la lumière verte (15 mW/cm², 11 min 7 sec). Les cornées C3 ont été irradiées avec des UV-A (30 mW/cm², 8 min 20 sec), puis avec la lumière verte (15 mW/cm², 16 min 40 sec).

3.3 Digestion enzymatique des boutons de cornée et évaluation

Après le PACK-CXL, toutes les cornées ont été transférées dans une nouvelle plaque de 24 puits (Merck AG, Darmstadt, Allemagne) remplie de 2,0 ml d'une solution de collagénase A à 0,3 % (Roche, Bâle, Suisse) par puits. La plaque a été placée sur un thermostat à 37°C avec 150 tours par minute.

Les boutons de cornée ont été inspectés visuellement et photographiés toutes les heures (Figure 1). La durée de la digestion enzymatique de chaque cornée a été enregistrée. La digestion était complète lorsque les cornées se fragmentaient complètement, formant une couche semblable à de la poussière.

3.4 Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de R Studio (version 2022.12.0), Prism 9 (version 9.5.1) et Microsoft Excel (version 16.70). Les statistiques descriptives ont été présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type. L'analyse de la variance (ANOVA) a été utilisée pour analyser les différences entre les groupes.

L'analyse de la variance (ANOVA) a été utilisée pour analyser les différences entre les groupes, une valeur de $p < 0,05$ indiquant une signification statistique.

4. Résultats

Cette étude a porté sur un total de 144 cornées. Les résultats de la digestion sont présentés dans la **figure 2**.

Pour les groupes A1 à A3, les temps de digestion moyens étaient respectivement de $21,38 \pm 1,15$, $30,5 \pm 1,63$ et $32,25 \pm 2,27$ heures. Les cornées des groupes A3 et A2 présentaient une résistance à la digestion significativement plus importante que les cornées du groupe A1 ($p < 0,05$), mais aucune différence de résistance à la digestion entre les cornées des groupes A3 et A2 n'a été observée ($p = 1$).

Parmi les groupes B1 à B3, les durées moyennes de digestion étaient respectivement de $31,2 \pm 2,78$, $33,81 \pm 1,52$ et $34,38 \pm 1,2$ heures.

Les cornées du groupe B3 étaient plus résistantes à la digestion que celles du groupe B1 ($p < 0,05$). Les cornées du groupe B2 ne présentaient pas de différence significative de résistance par rapport aux cornées des groupes B1 ou B3 ($p = 0,087$ et $p = 1$, respectivement).

Pour les groupes C1 à C3, les temps de digestion moyens étaient respectivement de $33,47 \pm 2,58$, $39,81 \pm 2,23$, et $51,94 \pm 4,2$ heures. Les cornées du groupe C3 étaient plus résistantes à la digestion que les cornées des groupes C1 et C2 ($p < 0,05$ dans les deux cas). De plus, les cornées du groupe C2 présentaient un temps de digestion moyen significativement plus élevé que celles du groupe C1 ($p < 0,05$).

5. Discussion

L'intégrité structurale et les propriétés optiques de la cornée humaine reposent largement sur sa composition en sous-types de collagène I, III et IV. Cependant, le PACK-CXL initie un processus de réticulation des molécules du stroma, par l'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ciblant particulièrement les fibres de collagène et les protéoglycanes au sein de la matrice extracellulaire. Cette réticulation renforce la structure cornéenne, améliorant sa résistance à la digestion enzymatique et aux agressions pathogènes. Au niveau cellulaire, le PACK-CXL exerce ses effets antimicrobiens à travers deux mécanismes clés. Premièrement, les ROS générés pendant le traitement ciblent directement et tuent les agents pathogènes, perturbant leurs membranes cellulaires et leurs acides nucléiques. Deuxièmement, le PACK-CXL utilise un mécanisme unique appelé entrave stérique pour renforcer davantage ses propriétés antimicrobiennes. En induisant une réticulation au sein de la matrice cornéenne, le PACK-CXL modifie la conformation tridimensionnelle des molécules de collagène, obstruant ainsi les sites de liaison des collagénases. Ces enzymes sont essentielles pour la dégradation du collagène et sont souvent exploitées par les agents pathogènes pour faciliter l'invasion et la destruction tissulaires. Cependant, l'entrave stérique imposée par le PACK-CXL empêche les collagénases d'accéder à leurs cibles, limitant ainsi efficacement la digestion enzymatique et préservant l'intégrité de la cornée. Cette approche à double action non seulement combat les causes sous-jacentes de la kératite infectieuse, mais aide également à atténuer le risque de développement d'ulcères et à réduire la taille finale des cicatrices cornéennes. ^{1-4 6-11 18-39}

En plus d'utiliser la riboflavine et la lumière UV-A à 365 nm, le PACK-CXL peut également être efficacement réalisé en utilisant le rose de Bengale et la lumière verte à 532 nm. Des investigations en laboratoire ont révélé des niveaux de susceptibilité différents des agents pathogènes avec le PACK-CXL utilisant la riboflavine/lumière UV-A et le rose de

Bengale/lumière verte. Des différences remarquables s'étendent à la profondeur de pénétration stromale de ces chromophores : tandis que la riboflavine atteint 400 à 600 μm dans le stroma cornéen selon sa formulation et son application, le rose de Bengale atteint une profondeur de seulement 100 μm . De plus, les spectres d'absorption de ces chromophores présentent un chevauchement minimal, suggérant qu'ils utilisent principalement des longueurs d'onde de lumière énergétique distinctes. Dans ce travail, il a été démontré que l'utilisation du PACK-CXL RF/UV-A et RB/vert, appliqués consécutivement au cours de la même session, améliore nettement la résistance de la cornée à la digestion enzymatique par rapport à un protocole PACK-CXL à un seul chromophore/lumière. Cette amélioration pourrait être due à un certain nombre de raisons, y compris la fluence totale, les spectres d'absorption des différents chromophores et les profondeurs de pénétration, provoquant des effets de cross-linking à différentes couches de la cornée. Cependant, nous nous sommes concentrés uniquement sur les temps de digestion globaux, et non sur les effets spécifiques à la profondeur. ^{12-17 40-43}

La résistance la plus élevée à la digestion a été observée dans les cornées qui ont subi une combinaison de RF et de RB PACK-CXL, recevant une fluence de 15 J/cm^2 dans chaque procédure. L'importance de la fluence dans les traitements PACK-CXL a considérablement évolué. Historiquement, les paramètres d'irradiation reflétaient le protocole de Dresden établi pour le kératocône, avec une fluence UV-A de 5,4 J/cm^2 administrée à une intensité de 3 mW/cm^2 pendant 30 minutes. Cependant, reconnaissant l'impératif pour le PACK-CXL de servir d'alternative plus rapide et plus efficace aux médicaments antimicrobiens, des protocoles cliniques accélérés ont ensuite été élaborés. Les études les plus récentes ont démontré une augmentation linéaire de la résistance à la digestion dépendante de la fluence, avec un maximum à 15 J/cm^2 . Les préoccupations initiales concernant les dommages potentiels à l'endothélium à des fluences plus élevées ont été apaisées par des enquêtes

récentes sur les niveaux seuils d'UV-A endothéliaux. Les études de Seiler et al. ont notamment montré que des fluences totales allant jusqu'à 15 J/cm² étaient bien tolérées par l'endothélium, en accord avec les résultats des traitements personnalisés de CXL pour le kératocône, qui utilisaient des niveaux de fluence similaires sans effets endothéliaux indésirables. Ces niveaux de seuil de dommage élevés ont ouvert la voie au développement de protocoles de cross-linking accélérée à haute fluence, généralement compris entre 10 et 15 J/cm². Par conséquent, les protocoles de cross-linking accélérée à haute fluence ont émergé comme des options viables pour traiter à la fois l'ectasie et la kératite infectieuse, presque triplant la fluence standard de 5,4 J/cm².^{4 11 22-24 27 28} Dans nos études récentes, nous avons constaté que les cornées traitées avec le PACK-CXL RB/lumière verte présentent une résistance enzymatique supérieure à celle des cornées traitées avec le PACK-CXL RF/UV-A, à la fois dans les contrôles non irradiés et après irradiation. Une explication possible de l'augmentation de la résistance dans les groupes témoins pourrait être que la saturation du stroma cornéen avec les chromophores modifie l'accessibilité des sites de clivage pour la collagénase. Pourquoi le rose de Bengale montre un effet inhibiteur encore plus élevé que la riboflavine ne peut pas être facilement expliqué. L'oxygène pourrait jouer un rôle clé. Le CXL engage deux voies photochimiques fondamentales. La première implique l'acceptation d'un électron par l'état excité triplet du chromophore à partir d'une molécule donneuse, via un transfert d'électrons. La deuxième voie comprend le transfert d'énergie à l'oxygène, entraînant la génération d'oxygène singulet. Les deux voies, par des réactions subséquentes, peuvent conduire à la formation de liaisons covalentes, favorisant les liaisons croisées à l'intérieur et entre les macromolécules telles que le collagène. Une distinction notable réside dans le fait que la voie de transfert d'électrons fonctionne indépendamment de l'oxygène, soulignant le rôle crucial de l'oxygène dans le CXL. Par conséquent, la consommation d'oxygène et sa disponibilité dans le stroma agissent comme des facteurs limitants, entravant l'avancement des protocoles CXL accélérés. Par exemple, l'application

rapide d'une fluence UV de 5,4 J/cm² diminue l'effet de rigidification en raison d'un réapprovisionnement plus lent en oxygène depuis l'atmosphère par rapport à sa consommation dans le stroma.^{8 21 44-47}

D'autre part, dans le PACK-CXL, l'objectif principal n'est pas uniquement d'améliorer la résistance biomécanique de la cornée, mais plutôt d'éliminer les agents pathogènes et de renforcer la résistance cornéenne à la dégradation enzymatique induite par les protéases produites par les agents pathogènes. Remarquablement, l'efficacité des protocoles PACK-CXL dans l'éradication des agents pathogènes ne semble pas influencée par la présence ou l'absence d'oxygène dans la cornée. Cette flexibilité permet d'accélérer les protocoles PACK-CXL, une capacité impossible dans les protocoles CXL pour l'ectasie. De même, l'impact du CXL sur l'amélioration de la résistance cornéenne à la digestion enzymatique dépend également de la disponibilité de l'oxygène. Des études récentes ont montré que, que ce soit la combinaison de chromophore et de longueur d'onde de lumière de riboflavine/UV-A, de rose de Bengale/lumière verte, ou les deux utilisées successivement lors d'une seule séance, la présence ou l'absence d'oxygène ne semble pas entraver l'augmentation de la résistance à la digestion enzymatique (sous presse).

La digestion enzymatique avec les défauts tissulaires qui s'ensuivent est une caractéristique de la KI et est causée par la production de quantités excessives d'enzymes protéolytiques libérées par les pathogènes. Dans cette étude, nous avons utilisé la collagénase A pour digérer les boutons de cornée. La collagénase A est une collagénase bactérienne et est largement utilisée comme enzyme standard pour évaluer la résistance enzymatique des biomatériaux³⁹ et sa grande puissance et sa large spécificité lui permettent de digérer tous les types de collagène et de cibler de multiples sites sur l'hélice du collagène. Spoerl *et al.* ont comparé l'efficacité de la collagénase A à celle d'autres enzymes digérant le collagène, la pepsine et la trypsine. Ils ont constaté que la collagénase A était plus puissante que la pepsine pour digérer la cornée.

Nos résultats s'alignent sur ceux d'études antérieures qui ont examiné l'effet de combinaisons chromophore/lumière uniques, en utilisant soit RF/UV-A, soit RB/vert. Ces études ont démontré une résistance significativement accrue avec les deux combinaisons RF/UV-A et CXL RB/vert.^{41 42} Morgan *et al.* ont observé une résistance accrue dans les boutons de cornée porcine traités avec de la collagénase A à 0,3 % et des protocoles de cross-linking accélérée. Notre étude représente la première utilisation en même temps de la RF et de la RB combinées pour le PACK-CXL. La fluence totale utilisée dans ces traitements combinés dans la même séance était respectivement de 20 et 30 J/cm². Ceci est nettement plus élevé que le maximum de 15 J/cm² utilisé jusqu'à présent dans le PACK-CXL par radiofréquence.⁴⁸ Cependant, cette fluence combinée a été obtenue avec 2×10 et 2×15 J/cm² par chromophore en utilisant différentes longueurs d'onde avec, potentiellement, différents seuils endothéliaux. Il convient également de mentionner l'estrogène. C'est un facteur critique affectant le pronostic de la kératite infectieuse. Les récepteurs aux œstrogènes sont largement répartis dans les tissus conjonctifs à travers le corps. Pendant la fin de la grossesse, les niveaux élevés d'estradiol préparent le corps à l'accouchement en relâchant et en ramollissant ces tissus. Cet effet d'affaiblissement s'étend à la cornée, comme en témoigne la découverte de récepteurs à l'estradiol à l'intérieur. Les récepteurs aux œstrogènes alpha et bêta ont été identifiés dans ce contexte. Par conséquent, les fluctuations hormonales, telles que les niveaux élevés de sérum d'estradiol mais aussi l'hypothyroïdie, affectent la biomécanique cornéenne. À la fois l'estradiol lui-même et les thérapies de remplacement hormonal, telles que le tibolone, ont été démontrés pour réduire la résistance à la digestion. De plus, l'exposition à des substances qui stimulent sélectivement l'activité œstrogénique dans les tissus compromet davantage la capacité du stroma à résister à la digestion enzymatique. En fin de compte, les niveaux élevés d'œstrogène, tels que ceux éprouvés pendant la grossesse et le traitement avec des agents œstrogéniques, présentent un facteur de risque

supplémentaire pour les cas de kératite infectieuse et pourraient nécessiter la prise en compte de traitements comme le PACK-CXL.⁴⁹⁻⁶¹

Outre la résistance à la digestion, un autre aspect crucial de l'efficacité du PACK-CXL est sa destruction microbienne directe par le stress oxydatif et l'inhibition de la réplication par l'intercalation de l'ADN/ARN avec le chromophore photoactivé, qui constituent ensemble les piliers fondamentaux du PACK-CXL. La question de savoir si une fluence combinée de 30 J/cm² représente également un optimum pour le taux de destruction microbienne devrait être évaluée dans de futures études.

Les limites de cette étude incluent sa nature ex-vivo. En outre, nous avons examiné des cornées transparentes, alors que la KI rend généralement les cornées opaques, ce qui peut diminuer la pénétration de la lumière dans la cornée. D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre l'impact du PACK-CXL sur les taux de digestion de la cornée infectée, en particulier dans un contexte clinique.

En conclusion, la combinaison de la RF/UV-A et du PACK-CXL RB/vert en une seule procédure peut présenter une nouvelle approche pour le traitement de la KI. Cette approche peut renforcer l'impact que le PACK-CXL peut avoir à une époque où la résistance aux antimicrobiens augmente.

5.1 Remerciements

Cette étude a été soutenue par la Fondation Light for Sight (Zurich, Suisse).

Divulgateur : M. E. Aydemir, Aucun ; N. L. Hafezi, EMAGine AG (E) ; N. Lu, Aucun ; E.A. TorresNetto, Aucun ; M. Hillen, Aucun ; C. Koppen, Aucun ; L. Kollros, Aucun ; F. Hafezi, Appareil pour le traitement et/ou la prévention des maladies de la cornée (P), EMAGine AG (I).

6. Références

1. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2017;5(12):e1221-e34.
2. Ung L, Bispo PJM, Shanbhag SS, et al. The persistent dilemma of microbial keratitis: Global burden, diagnosis, and antimicrobial resistance. *Surv Ophthalmol* 2019;64(3):255-71.
3. Upadhyay MP, Karmacharya PC, Koirala S, et al. Epidemiologic characteristics, predisposing factors, and etiologic diagnosis of corneal ulceration in Nepal. *Am J Ophthalmol* 1991;111(1):92-9.
4. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003;135(5):620-7.
5. Hafezi F, Randleman JB. PACK-CXL: defining CXL for infectious keratitis. *J Refract Surg* 2014;30(7):438-9.
6. Raiskup F, Spoerl E. Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles. *Ocul Surf* 2013;11(2):65-74.
7. Kumar V, Lockerbie O, Keil SD, et al. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. *Photochem Photobiol* 2004;80:15-21.
8. Lu NJ, Koliwer-Brandl H, Gilardoni F, et al. The Antibacterial Efficacy of High-Fluence PACK Cross-Linking Can Be Accelerated. *Transl Vis Sci Technol* 2023;12(2):12.
9. Randleman JB, Khandelwal SS, Hafezi F. Corneal cross-linking. *Surv Ophthalmol* 2015;60(6):509-23.
10. Iseli HP, Thiel MA, Hafezi F, et al. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea* 2008;27(5):590-4.
11. Hafezi F, Hosny M, Shetty R, et al. PACK-CXL vs. antimicrobial therapy for bacterial, fungal, and mixed infectious keratitis: a prospective randomized phase 3 trial. *Eye Vis (Lond)* 2022;9(1):2.
12. Cherfan D, Verter EE, Melki S, et al. Collagen cross-linking using rose bengal and green light to increase corneal stiffness. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(5):3426-33.
13. Atalay HT, Dogruman-AI F, Sarzhanov F, et al. Effect of Riboflavin/Rose Bengal-Mediated PACK-CXL on Acanthamoeba Trophozoites and Cysts in Vitro. *Curr Eye Res* 2018;43(11):1322-25.
14. Germann JA, Martínez-Enríquez E, Martínez-García MC, et al. Corneal Collagen Ordering After In Vivo Rose Bengal and Riboflavin Cross-Linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2020;61(3):28.

15. Lorenzo-Martín E, Gallego-Muñoz P, Ibares-Frías L, et al. Rose Bengal and Green Light Versus Riboflavin-UVA Cross-Linking: Corneal Wound Repair Response. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59(12):4821-30.
16. Singh M, Li J, Han Z, et al. Evaluating the Effects of Riboflavin/UV-A and Rose-Bengal/Green Light Cross-Linking of the Rabbit Cornea by Noncontact Optical Coherence Elastography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(9):OCT112-20.
17. Cui L, Huxlin KR, Xu L, et al. High-resolution, noninvasive, two-photon fluorescence measurement of molecular concentrations in corneal tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(5):2556-64.
18. Gonzales CA, Srinivasan M, Whitcher JP, et al. Incidence of corneal ulceration in Madurai district, South India. *Ophthalmic Epidemiol* 1996;3(3):159-66.
19. Keay L, Edwards K, Naduvilath T, et al. Microbial keratitis predisposing factors and morbidity. *Ophthalmology* 2006;113(1):109-16.
20. Whitcher JP, Srinivasan M. Corneal ulceration in the developing world--a silent epidemic. *Br J Ophthalmol* 1997;81(8):622-3.
21. Richoz O, Mavranakas N, Pajic B, et al. Corneal collagen cross-linking for ectasia after LASIK and photorefractive keratectomy: long-term results. *Ophthalmology* 2013;120(7):1354-9.
22. Kirgiz A, Eliacik M, Yildirim Y. Different accelerated corneal collagen cross-linking treatment modalities in progressive keratoconus. *Eye Vis (Lond)* 2019;6:16.
23. Lang PZ, Hafezi NL, Khandelwal SS, et al. Comparative Functional Outcomes After Corneal Crosslinking Using Standard, Accelerated, and Accelerated With Higher Total Fluence Protocols. *Cornea* 2019;38(4):433-41.
24. Ozulken K, Aksoy Aydemir G, Aydemir E, et al. Comparison of Two Different Accelerated Corneal Cross-linking Procedure Outcomes in Patients with Keratoconus. *Balkan Med J* 2020;37(3):131-37.
25. Hafezi F, Torres Netto EA, Randleman JB, et al. Corneal Cross-linking for Keratoglobus Using Individualized Fluence. *J Refr Surg Case Rep* 2021;1(1):e10-e14.
26. Raiskup F, Herber R, Lenk J, et al. Corneal Crosslinking With Riboflavin and UVA Light in Progressive Keratoconus: Fifteen-Year Results. *Am J Ophthalmol* 2023;250:95-102.
27. Knyazer B, Krakauer Y, Tailakh MA, et al. Accelerated Corneal Cross-linking as an Adjunct Therapy in the Management of Presumed Bacterial Keratitis: A Cohort Study. *J Refract Surg* 2020;36(4):258-64.
28. Achiron A, Elhaddad O, Regev T, et al. PACK Cross-Linking as Adjuvant Therapy Improves Clinical Outcomes in Culture-Confirmed Bacterial Keratitis. *Cornea* 2022;41(9):1069-73.
29. Newsome DA, Foidart JM, Hassell JR, et al. Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;20(6):738-50.

30. Kling S, Hafezi F. Corneal biomechanics - a review. *Ophthalmic Physiol Opt* 2017;37(3):240-52.
31. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Survey of ophthalmology* 1998;42(4):297-319.
32. Ikema K, Matsumoto K, Inomata Y, et al. Induction of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs correlates with outcome of acute experimental pseudomonal keratitis. *Exp Eye Res* 2006;83(6):1396-404.
33. Rohini G, Murugeswari P, Prajna NV, et al. Matrix metalloproteinases (MMP-8, MMP-9) and the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in patients with fungal keratitis. *Cornea* 2007;26(2):207-11.
34. Saravani R, Yari D, Saravani S, et al. Correlation between the COL4A3, MMP-9, and TIMP-1 polymorphisms and risk of keratoconus. *Japanese journal of ophthalmology* 2017;61(3):218-22.
35. Galvis V, Sherwin T, Tello A, et al. Keratoconus: an inflammatory disorder? *Eye (Lond)* 2015;29(7):843-59.
36. O'Brien TP. Management of bacterial keratitis: beyond exorcism towards consideration of organism and host factors. *Eye (Lond)* 2003;17(8):957-74.
37. Pahuja N, Kumar NR, Shroff R, et al. Differential Molecular Expression of Extracellular Matrix and Inflammatory Genes at the Corneal Cone Apex Drives Focal Weakening in Keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(13):5372-82.
38. Shetty R, Rajiv Kumar N, Pahuja N, et al. Outcomes of Corneal Cross-Linking Correlate With Cone-Specific Lysyl Oxidase Expression in Patients With Keratoconus. *Cornea* 2018;37(3):369-74.
39. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res* 2004;29(1):35-40.
40. Hafezi NL, Aydemir ME, Lu NJ, et al. Effect of accelerated high-fluence riboflavin and rose bengal-mediated corneal cross-linking on resistance to enzymatic digestion. *BMC Ophthalmol* 2024;24(1):37.
41. Wang T, Peng Y, Shen N, et al. Photochemical activation increases the porcine corneal stiffness and resistance to collagenase digestion. *Exp Eye Res* 2014;123:97-104.
42. Morgan SR, Hayes S, Quantock A, et al. An investigation into the impact of corneal rinsing during riboflavin/UVA corneal cross-linking. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2022;63(7):2410 – A0213-2410 – A0213.
43. Fadlallah A, Zhu H, Arafat S, et al. Corneal Resistance to Keratolysis After Collagen Crosslinking With Rose Bengal and Green Light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(15):6610-14.
44. 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):850-54.

45. Gomes JA, Tan D, Rapuano CJ, et al. Global consensus on keratoconus and ectatic diseases. *Cornea* 2015;34(4):359-69.
46. Hafezi F, Munzinger A, Goldblum D, et al. Repeated High-Fluence Accelerated Slitlamp-Based Photoactivated Chromophore for Keratitis Corneal Cross-Linking for Treatment-Resistant Fungal Keratitis. *Cornea* 2022;41(8):1058-61.
47. Kowalska M, Mischi E, Stoma S, et al. How Modifications of Corneal Cross-Linking Protocols Influence Corneal Resistance to Enzymatic Digestion and Treatment Depth. *Transl Vis Sci Technol* 2023;12(5):18.
48. Seiler TG, Batista A, Frueh BE, et al. Riboflavin Concentrations at the Endothelium During Corneal Cross-Linking in Humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019;60(6):2140-45.
49. Hall G, Phillips TJ. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol* 2005;53(4):555-68; quiz 69-72.
50. Calder AA, Greer IA. Pharmacological modulation of cervical compliance in the first and second trimesters of pregnancy. *Semin Perinatol* 1991;15(2):162-72.
51. Suzuki T, Kinoshita Y, Tachibana M, et al. Expression of sex steroid hormone receptors in human cornea. *Curr Eye Res* 2001;22(1):28-33.
52. Spoerl E, Zubaty V, Raiskup-Wolf F, et al. Estrogen-induced changes in biomechanics in the cornea as a possible reason for keratectasia. *Br J Ophthalmol* 2007
53. Tachibana M, Kasukabe T, Kobayashi Y, et al. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(3):668-70.
54. Wickham LA, Gao J, Toda I, et al. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye. *Acta Ophthalmol Scand* 2000;78(2):146-53.
55. Torres-Netto EA, Randleman JB, Hafezi NL, et al. Late-onset progression of keratoconus after therapy with selective tissue estrogenic activity regulator. *J Cataract Refract Surg* 2019;45(1):101-04.
56. Hafezi F, Iseli HP. Pregnancy-related exacerbation of iatrogenic keratectasia despite corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg* 2008;34(7):1219-21.
57. Hoogewoud F, Gatziofas Z, Hafezi F. Transitory topographical variations in keratoconus during pregnancy. *J Refract Surg* 2013;29(2):144-6.
58. Mackensen F, Paulus WE, Max R, et al. Ocular changes during pregnancy. *Dtsch Arztebl Int* 2014;111(33-34):567-75; quiz 76.
59. Tabibian D, de Tejada BM, Gatziofas Z, et al. Pregnancy-induced Changes in Corneal Biomechanics and Topography Are Thyroid Hormone Related. *Am J Ophthalmol* 2017;184:129-36.

60. Lee R, Hafezi F, Randleman JB. Bilateral Keratoconus Induced by Secondary Hypothyroidism After Radioactive Iodine Therapy. *J Refract Surg* 2018;34(5):351-53.
61. Suzuki T, Sullivan DA. Comparative effects of estrogen on matrix metalloproteinases and cytokines in immortalized and primary human corneal epithelial cell cultures. *Cornea* 2006;25(4):454-9.

7. FIGURES

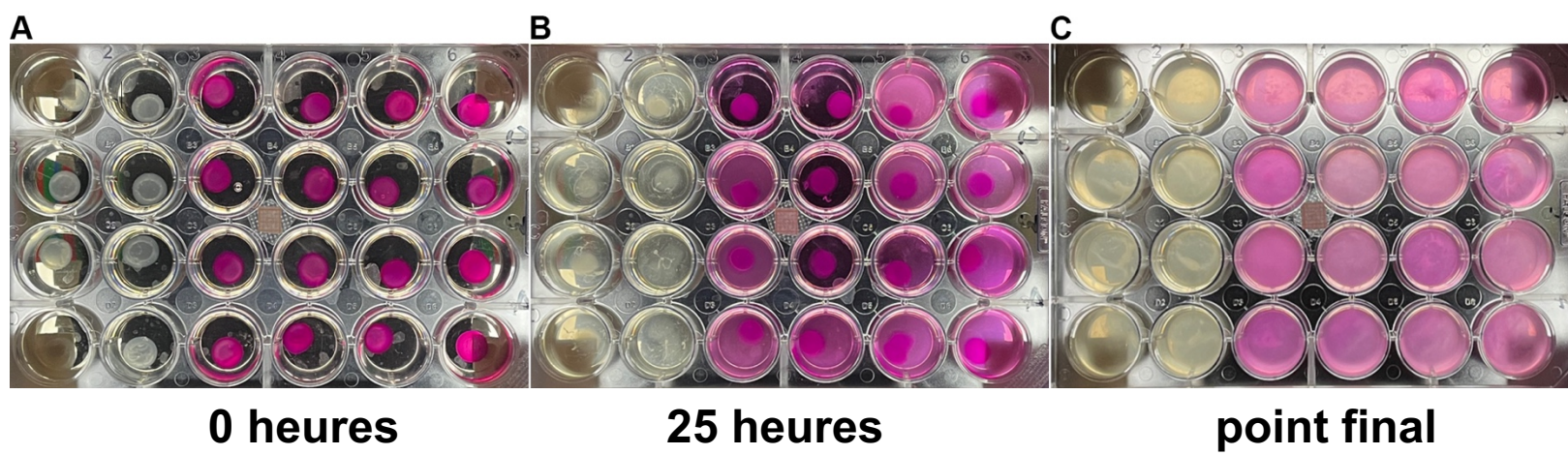
Figure 1. Image représentative d'une plaque à 24 puits contenant des cornées immédiatement après immersion dans une solution de collagénase à 0,3 % (A) et après 25 heures (B) de digestion dans une solution de collagénase A à 0,3 %, et au point final (C).

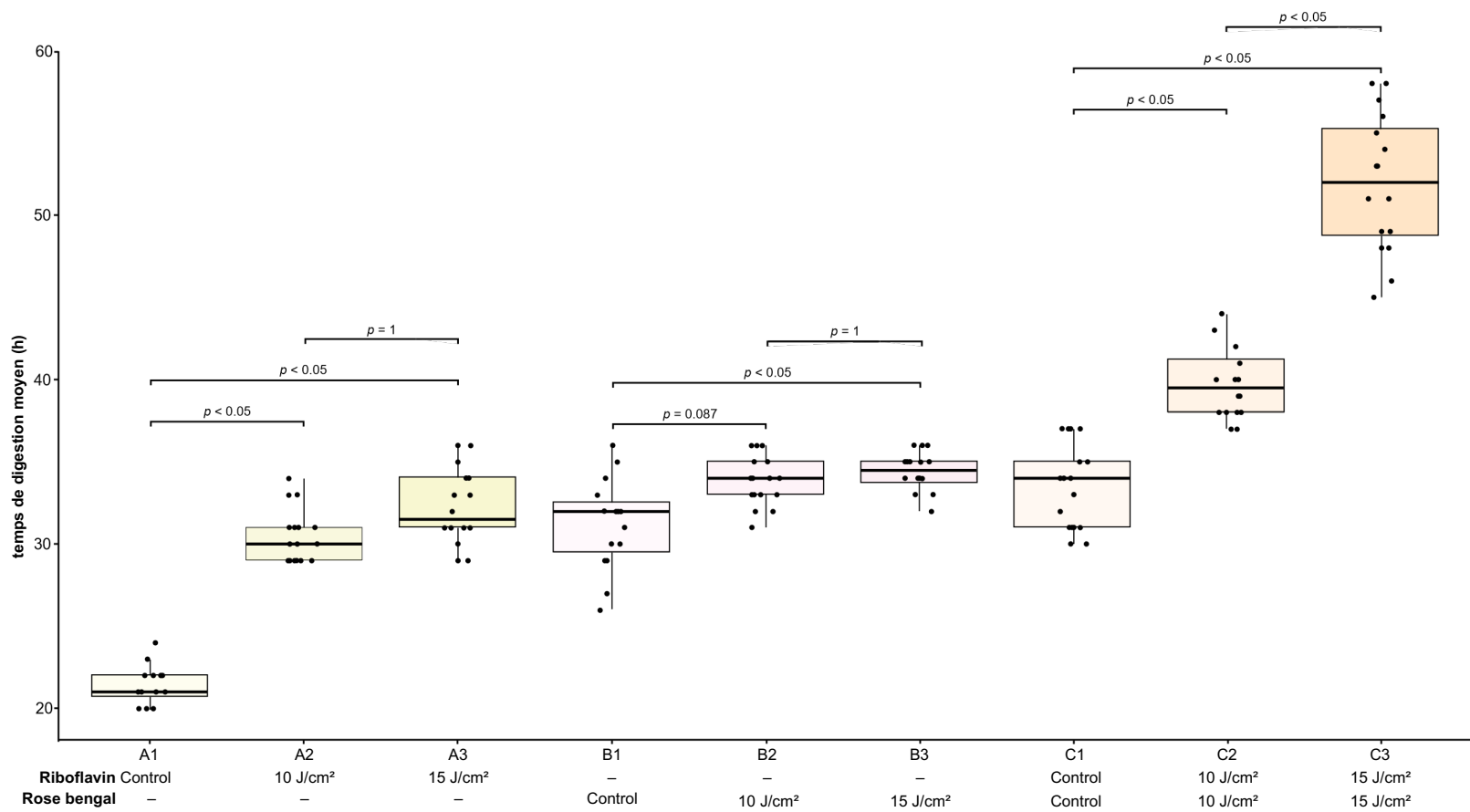
Figure 2. Comparaison des temps de digestion entre les groupes expérimentaux.

8. TABLEAUX

Tableau 1: Configuration expérimentale. Groupes riboflavine (contrôle (A1), 10 J/cm² (A2), 15 J/cm² (A3)), Groupes d'irradiation au rose bengale (contrôle (B1), 10 J/cm² (B2), 15 J/cm² (B3)), Groupes d'irradiation combinée (contrôle (C1), 10 + 10 J/cm² (C2), 15 + 15 J/cm² (C3))
min = minutes ; sec = secondes ; mW/cm² = milliwatts par centimètre carré.

Groupes expérimentaux	Chromophore Riboflavin / Rose Bengal	Description	Intensité (mW/cm ²), Temps d'irradiation (min, sec)	Fluence / Irradiance J/cm ²
A1	✓ / ✗	Contrôle non irradié	aucun	aucun
A2	✓ / ✗	10.0 J/cm ²	18 mW/cm ² , 9 min 15 sec	10
A3	✓ / ✗	15.0 J/cm ²	30 mW/cm ² , 8 min 20 sec	15
B1	✗ / ✓	Contrôle non irradié	aucun	aucun
B2	✗ / ✓	10.0 J/cm ²	15mW/cm ² , 11 min 7 sec	10
B3	✗ / ✓	15.0 J/cm ²	15 mW/cm ² , 16 min 40 sec	15
C1	✓ / ✓	Contrôle non irradié	aucun	aucun
C2	✓ / ✓	10.0 J/cm ² + 10.0 J/cm ²	18 mW/cm ² , 9 min 15 sec + 15mW/cm ² , 11 min 7 sec	20
C3	✓ / ✓	15.0 J/cm ² + 15.0 J/cm ²	30 mW/cm ² , 8 min 20 sec + 15 mW/cm ² , 16 m 40 sec	30





9. Rapport du directeur de thèse

Chers et chères collègues,

J'ai l'honneur de vous présenter un rapport détaillé sur la contribution de Monsieur Aydemir à sa thèse de doctorat dans le domaine de l'ophtalmologie.

Contribution de Monsieur Aydemir au travail : “La combinaison de la Riboflavine/lumière UV-A et du Rose Bengale/lumière verte pour cross-linking de la cornée augmente la résistance de la digestion enzymatique de la cornée”

Monsieur Aydemir a apporté une contribution impressionnante et complète à sa thèse de doctorat, couvrant toutes les phases du processus de recherche. Son engagement et ses compétences sont évidents à chaque étape du projet :

1. Planification et conception expérimentale : Monsieur Aydemir a joué un rôle essentiel dans la planification de l'expérience. Il a élaboré une conception expérimentale soigneusement réfléchie permettant d'étudier les effets synergiques de la combinaison de la riboflavine/UV-A et du rose bengale/vert epi-off PACK-CXL. Sa capacité à développer et mettre en œuvre des protocoles expérimentaux complexes a grandement contribué à la qualité du travail.

2. Réalisation des expériences : Monsieur Aydemir a mené les travaux expérimentaux de manière autonome et avec une grande précision. Cela comprenait l'acquisition de cornées de porc ex-vivo, le traitement des cornées avec les traitements requis, et l'exposition aux rayons UV-A. Son engagement envers des expériences précises et fiables a grandement contribué à la validité des résultats.

3. Collecte et analyse des données : Monsieur Aydemir a effectué la collecte de données de manière méticuleuse et supervisé l'ensemble du processus d'analyse des données. Il a effectué des analyses statistiques de manière autonome et présenté les résultats sous forme de graphiques et de diagrammes significatifs. Ses compétences en analyse de données ont contribué à tirer des conclusions claires et fondées à partir des résultats.

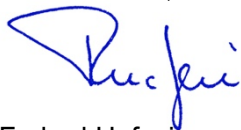
4. Rédaction du manuscrit : Monsieur Aydemir a largement rédigé le manuscrit de la thèse par lui-même. Il a non seulement démontré une remarquable capacité à rédiger de manière scientifique, mais aussi la capacité à rendre des concepts scientifiques complexes compréhensibles. La qualité du manuscrit reflète son engagement pour l'excellence dans la communication scientifique.

5. Encadrement de la recherche et travail d'équipe : Bien que Monsieur Aydemir ait principalement mené le projet de manière autonome, il a toujours été un membre actif de notre équipe. Il a contribué aux discussions sur les idées de recherche et à la prise de décisions collective. Sa volonté de partager ses connaissances et de collaborer avec les autres a été un facteur essentiel du succès du projet.

Le travail de Monsieur Aydemir a déjà été soumis à la revue TVST, et la décision de la revue est en attente. Nous sommes confiants que le travail, en raison de sa qualité et de sa valeur scientifique, recevra une réponse positive de la communauté scientifique.

Monsieur Aydemir a non seulement apporté une contribution significative aux connaissances scientifiques de cette thèse, mais il a également démontré ses compétences en tant que chercheur et scientifique indépendant. Son engagement, sa précision et sa capacité à relever des défis scientifiques complexes méritent une reconnaissance de la plus haute importance.

Cordialement,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Hafezi', with a stylized flourish at the end.

Farhad Hafezi
Prof. Dr. Dr. med.
Université de Genève