

Université de Montréal

Une nouvelle génération de substituts cornéens biosynthétiques

Modèle d'évaluation de la fonctionnalité ex vivo humaine et in vivo animale

Par

Antoine Sylvestre-Bouchard

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maitrise

en Sciences biomédicales, option Médecine expérimentale

Décembre, 2019

© Antoine Sylvestre-Bouchard, 2020

Université de Montréal

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Une nouvelle génération de substituts cornéens biosynthétiques
Modèle d'évaluation de la fonctionnalité ex vivo humaine et in vivo animale

Présenté par

Antoine Sylvestre-Bouchard

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Pierre Hardy

Président-rapporteur

Isabelle Brunette

Directrice de recherche

May Griffith

Codirectrice

Farida Cheriet

Membre du jury

Résumé

Introduction : La cécité cornéenne est la 4^e cause de cécité dans le monde et la greffe de cornée demeure le seul traitement accepté. Toutefois, dans bien des pays, les banques d'yeux n'arrivent pas à répondre à la demande et il existe un besoin croissant pour des alternatives aux cornées humaines. De plus, chez les patients souffrant de pathologies cornéennes avec inflammation sévère, le pronostic d'une greffe est à haut risque de complications, d'échec et de perte de vision complète. Il est donc nécessaire de développer des implants capables de dépasser les importantes limites des greffons natifs humains pour ces patients à haut risque.

Objectif : Développer et évaluer diverses techniques d'examen cliniques permettant de mesurer la biocompatibilité et la performance de substituts cornéens biosynthétiques implantés dans des cornées humaines *ex vivo* et *in vivo*, en vue de leur implantation ultérieure chez l'humain.

Méthodes : Des protocoles chirurgicaux ont été développés et testés avec des substituts cornéens solides et liquides. La lampe à fente, la tomographie par cohérence optique, la tonométrie, l'esthésiométrie, la pachymétrie par ultrasons, la microscopie spéculaire et confocale, la topographie de la surface cornéenne, ainsi que l'angiographie ont été optimisées pour les modèles *ex vivo* humain et *in vivo* animal. Enfin, le prélèvement, l'entretien et la préparation des tissus cornéens frais ont été adaptés pour des études futures de l'histopathologie, de la microscopie électronique par transmission et de l'immunohistopathologie.

Résultats et analyses : Les procédures développées ont généré des données permettant de comprendre l'impact des implants dans le tissu cornéen dans le but de perfectionner les implants injectables et de mettre en évidence la régénération cornéenne des implants *in vivo*. Les défis rencontrés lors du développement des techniques d'examen et leur solution ont également été recueillis.

Conclusion : Ces techniques utilisées à travers les deux modèles étudiés ont permis de recueillir des données préliminaires qui serviront à l'élaboration et l'optimisation d'un implant injectable qui sera testé chez les patients à haut risque de rejet dans le cadre d'un essai clinique.

Mots-clés : cécité cornéenne, substitut cornéen biosynthétique, kératoplastie intrastromale

Abstract

Introduction: Corneal blindness is the 4th leading cause of blindness in the world and corneal transplantation remains the only accepted treatment. However, in many countries, eye banks are failing to meet demand and there is a growing need for alternatives to human corneas. In addition, in patients with corneal pathologies with severe inflammation, the prognosis of a transplant is at high risk of complications, failure and complete loss of vision. It is therefore necessary to develop implants capable of exceeding the important limits of native human grafts for these high-risk patients.

Objective: To develop and test various clinical examination techniques to measure the biocompatibility and performance of corneal biosynthetic substitutes on *ex vivo* human corneas and *in vivo* feline corneas, for a subsequent implantation in humans.

Methods: Surgical protocols were developed and tested with solid and liquid corneal substitutes. Slit lamp, optical coherence tomography, tonometry, esthesiometry, ultrasound pachymetry, specular and confocal microscopy, corneal surface topography, and angiography were optimized for *ex vivo* human corneas and *in vivo* animal models. Finally, the collection, maintenance and preparation of fresh corneal tissue were adapted for future studies of histopathology, transmission electron microscopy and immunohistopathology.

Results and analyzes: The developed procedures have generated data to understand the impact of implants in corneal tissue in order to improve injectable implants and highlight the corneal regeneration of implants *in vivo*. Challenges encountered in the development of examination techniques and their solution were also collected.

Conclusion: These techniques used across the different models have yielded preliminary data that will be used to develop and optimize an injectable implant that will be tested in patients at high risk of rejection as part of a clinical trial.

Keywords: corneal blindness, corneal biosynthetic substitute, intrastromal keratoplasty

Table des matières

RÉSUMÉ	3
ABSTRACT	4
TABLE DES MATIÈRES	5
LISTE DES TABLEAUX	10
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES SIGLES	14
LISTE DES ABRÉVIATIONS	17
REMERCIEMENTS	19
AVANT-PROPOS	22
1 – INTRODUCTION	24
1.1 La cécité cornéenne dans le monde	24
1.2 L’anatomie fonctionnelle de la cornée	27
1.2.1 Épithélium et film lacrymal.....	28
1.2.2 Couche de Bowman.....	30
1.2.3 Stroma.....	30
1.2.4 Membrane de Descemet.....	32
1.2.5 Endothélium.....	32
1.2.6 Vascularisation et innervation.....	32
1.3 La transplantation cornéenne	34
1.3.1 Physiopathologie de l’opacité cornéenne.....	34
1.3.2 Kératoplastie transfixiante.....	36
1.3.3 Kératoplastie lamellaire antérieure.....	39
1.3.4 Kératoplastie lenticulaire intrastromale.....	39
1.4 La réaction cornéenne aux insultes et l’échec de greffe	41
1.4.1 Épithéliopathie.....	41
1.4.2 Néovascularisation.....	41
1.4.3 Échec de greffe.....	42
1.5 La kératoprothèse de Boston	44
1.6 Les substituts cornéens biosynthétiques	47

1.7	Le choix du modèle animal	52
1.7.1	Rongeur et lapin	52
1.7.2	Primate non humain	52
1.7.3	Porc.....	53
1.7.4	Félin.....	53
1.8	Imagerie spécialisée	55
1.8.1	Quantification de la transparence cornéenne	55
1.8.1.1	Utilisation actuelle de la méthode	56
1.8.2	La tomographie en cohérence optique	57
1.8.3	Quantification de la néovascularisation	58
1.8.4	Quantification de la repopulation et réinnervation cornéenne	59
2	– OBJECTIFS	61
2.1	Objectif principal	61
2.2	Objectifs secondaires	61
3	– MATÉRIEL ET MÉTHODES	62
3.1	Substituts solides dans la cornée animale <i>in vivo</i>	62
3.1.1	Implants	62
3.1.2	Population.....	62
3.1.3	Protocole chirurgical	63
3.1.3.1	Traitement médical.....	63
3.1.3.2	Kératoplastie lamellaire antérieure.....	64
3.1.3.3	Kératoplastie lenticulaire intrastromale	65
3.1.4	Évaluation préopératoire et suivi postopératoire.....	65
3.1.4.1	Suivi clinique de base.....	65
3.1.4.2	Sensibilité cornéenne.....	66
3.1.4.3	Tomographie par cohérence optique	67
3.1.4.4	Microscopie spéculaire.....	67
3.1.4.5	Topographie et transparence cornéenne	67
3.1.4.6	Microscopie confocale	68
3.1.4.7	Angiographie cornéenne	68
3.1.5	Évaluation post-mortem	69

3.1.5.1	Histologie, Microscopie électronique et Immunofluorescence.....	69
3.2	Substituts injectables dans la cornée humaine <i>ex vivo</i>	70
3.2.1	Implants.....	70
3.2.2	Population.....	70
3.2.3	Protocole chirurgical	71
3.2.3.1	Kératectomie par SMILE	71
3.2.3.2	Kératotomie manuelle	71
3.2.4	Injection de l'implant liquide et irradiation.....	72
3.2.5	Évaluation préopératoire et suivi postopératoire.....	73
3.3	Analyses et statistiques.....	75
3.3.1	Biocompatibilité et performance	75
3.3.2	Mesures et statistiques.....	76
4 –	RÉSULTATS ET ANALYSES.....	77
4.1	Substituts solides dans la cornée animale <i>in vivo</i>.....	77
4.1.1	Résultats généraux.....	77
4.1.1.1	Transparence des implants	77
4.1.1.2	Inflammation de la chambre antérieure.....	78
4.1.1.3	Pression intraoculaire	78
4.1.1.4	Guérison épithéliale.....	79
4.1.1.5	Sensibilité cornéenne centrale.....	79
4.1.1.6	Endothélium	79
4.1.1.7	Microscopie confocale	80
4.1.1.8	Topographie et densitométrie cornéenne	82
4.1.1.9	Pachymétrie centrale par ultrasons.....	84
4.1.2	F1 & F2 : PC-MPC par ALK	85
4.1.2.1	Évolution générale.....	85
4.1.2.2	Taille et remodelage des implants.....	86
4.1.3	F3 : CLP-PEG-MPC et PC-MPC par ILK	89
4.1.3.1	Évolution générale.....	89
4.1.3.2	Complications : séquestre cornéen.....	89
4.1.3.3	Taille et remodelage des implants.....	90

4.1.4	F4 : CLP-PEG-MPC et CLP-PEG par ILK.....	92
4.1.4.1	Évolution générale.....	92
4.1.4.2	Taille et remodelage des implants.....	92
4.1.5	Discussion	95
4.1.5.1	Biocompatibilité, régénération et transparence	95
4.1.5.2	Inflammation et néovascularisation	98
4.1.5.3	Guérison épithéliale et examens sous sédation	104
4.1.5.4	Imagerie clinique <i>in vivo</i>	105
4.2	Substituts injectables dans la cornée humaine ex vivo.....	109
4.2.1	Expérience A : Essai préliminaire avec SMILE.....	109
4.2.1.1	Analyse.....	110
4.2.1.2	Discussion	111
4.2.2	Expérience B : Nouvelle recette et impact de la PIO.....	111
4.2.2.1	Analyse.....	113
4.2.2.2	Discussion	114
4.2.3	Expérience D : Contrôle des paramètres de production et d’irradiation	115
4.2.3.1	Analyse.....	118
4.2.3.2	Discussion	119
4.2.4	Expérience F : Évolution des implants avec et sans irradiation	119
4.2.4.1	Analyse.....	124
4.2.4.2	Discussion	128
4.2.5	Expérience G : SMILE, riboflavine, [CLP] et délai pré-CXL	129
4.2.5.1	Analyse.....	131
4.2.5.2	Discussion	133
4.2.6	Expérience H : Pré-réticulation avec EDC/NHS et intensité de l’irradiation	133
4.2.6.1	Analyse.....	135
4.2.6.2	Discussion	137
4.2.7	Expérience J : EDC/NHS, irradiation pulsative et implant solide	138
4.2.7.1	Analyse.....	140
4.2.7.2	Discussion et bilan	142
5	– CONCLUSION	143

6 – BIBLIOGRAPHIE.....	145
ANNEXE 1 : KARDEX DES COUPES <i>IN VIVO</i> MANUELLES.....	162
ANNEXE 2 : PRÉPARATION DES MÉDICAMENTS INJECTABLES.....	164
ANNEXE 3 : COMPTE-RENDU OPÉRATOIRE <i>IN VIVO</i>	167
ANNEXE 4 : PROTOCOLE D’EXAMEN À LA LAMPE À FENTE	169
ANNEXE 5 : FEUILLET CLINIQUE POUR 1 IMPLANT.....	170
ANNEXE 6 : FEUILLET CLINIQUE POUR 2 IMPLANTS.....	174
ANNEXE 7 : FEUILLET CLINIQUE POUR EXAMENS HORS PROTOCOLE	176
ANNEXE 8 : UTILISATION DE L’OCT THORLABS.....	177
ANNEXE 9 : UTILISATION DU TOPOGRAPHE PENTACAM HR.....	188
ANNEXE 10 : UTILISATION DU MICROSCOPE CONFOCAL CONFOSCAN 3	194
ANNEXE 11 : UTILISATION DE L’ANGIOGRAPHE HRA.....	197
ANNEXE 12 : FEUILLET DES EXAMENS D’IMAGERIE SPÉCIALISÉE.....	200
ANNEXE 13 : KARDEX DES COUPES <i>EX VIVO</i> AU LASER – SMILE	203
ANNEXE 14 : KARDEX DES COUPES <i>EX VIVO</i> MANUELLES.....	205
ANNEXE 15 : DÉTAILS ET COMPTE-RENDU DES EXPÉRIENCES <i>EX VIVO</i>	207
ANNEXE 16 : EXPÉRIENCES <i>EX VIVO</i> COMPLÉMENTAIRES	209
Expérience C : Impact de la kératotomie, de la lumière bleue et de la riboflavine	209
Analyse.....	211
Expérience E : Répétabilité de la kératotomie manuelle	212
Analyse.....	213
Expérience I : Concentration en oxygène lors de la réticulation.....	213
Analyse.....	214

Liste des tableaux

Tableau 1. Répartition des chirurgies et des implants chez les animaux	63
Tableau 2. Pression exercée par l'esthésiomètre Cochet-Bonnet selon la longueur du fil.	67
Tableau 3. Revue de la littérature sur les implants cornéens biosynthétiques en recherche translationnelle.	102

Liste des figures

Figure 1. Coupe axiale schématique de l'œil humain.	27
Figure 2. Théorie XYZ de l'homéostasie épithéliale.	30
Figure 3. Les différentes techniques de kératoplastie utilisées fréquemment.	38
Figure 4. La kératoprothèse de Boston type 1	45
Figure 5. Schéma de la conjugaison du RHCIII-MPC formant un réseau interpénétrant.	48
Figure 6. Coupe du segment antérieur telle que donnée par le Pentacam HR™.	55
Figure 7. La mesure de l'épaisseur cornéenne par l'OCT.	57
Figure 8. Processus de l'analyse de l'angiographie.	59
Figure 9. Principe de la microscopie confocale.	60
Figure 10. Exemples d'images obtenues à l'aide d'un microscope confocal <i>in vivo</i>	60
Figure 11. Mise en place de la cornée et de la succion lors de la chirurgie SMILE.	71
Figure 12. Injection de l'implant liquide à l'aide une canule 27G.	72
Figure 13. Réticulation de l'implant liquide à l'aide de la lumière bleue.	73
Figure 14. Mesures de la coupe axiale de la cornée <i>ex vivo</i> avec l'implant injectable	74
Figure 15. Système de perfusion des chambres antérieures grâce à une pompe à seringues.	75
Figure 16. F1-4 : Évolution de la transparence de la cornée en regard des implants et centrale. .	77
Figure 17. F1-4 : Évolution de l'inflammation de la chambre antérieure selon le Tyndall.	78
Figure 18. F1-4 : Distribution de toutes les pressions intraoculaires.	78
Figure 19. F1-4 : Microscopie confocale au regard des implants biosynthétiques.	81
Figure 20. F4 : Cliché scheidpflug des implants intrastromaux par le Pentacam.	82
Figure 21. F2 : Cartes de courbure, d'élévation et de pachymétrie.	83
Figure 22. F1-4 : Cartes de densitométrie moyenne en fin de suivi.	84
Figure 23. F1-4 : Évolution de la pachymétrie centrale.	85
Figure 24. F1 et F2 : Suivi à la lampe à fente des cornées opérées.	87
Figure 25. F1 : Infiltrat périphérique de l'implant et cicatrisation épithéliale à 1 mois.	88
Figure 26. F1 et F2 : Transparence des implants et de la cornée à 6 mois de suivi.	88
Figure 27. F1 et F2 : Suivi à l'OCT Thorlabs™ des cornées opérées.	89
Figure 28. F2 : Coupe de l'OCT Visante™ de l'implant à 6 mois de suivi.	89
Figure 29. F3 : Transparence des implants et de la cornée à 6 mois de suivi.	91

Figure 30. F3 : Suivi à la lampe à fente de la cornée opérée.....	91
Figure 31. F3 : Séquestre et néovascularisation de la cornée opérée.	91
Figure 32. F4 : Transparence des implants et de la cornée après 12 mois de suivi.....	93
Figure 33. F4 : Coupe OCT Visante™ des implants après 12 mois de suivi.....	93
Figure 34. F4 : Suivi à la lampe à fente de la cornée opérée.....	94
Figure 35. F4 : Évolution de l'épaisseur de la cornée et des implants sur 12 mois.	95
Figure 36. Exemple d'image prise sur la lampe à fente avec la caméra DXC-390.	105
Figure 37. Exemple d'image prise sur la lampe à fente avec la caméra BCE-C050-U.....	106
Figure 38. Exemple d'image prise sur la lampe à fente munie d'un flash et d'une D200.....	107
Figure 39. C1 : Coupe OCT de la cornée opérée par SMILE puis injectée avec l'implant.	109
Figure 40. L'implant injectable se solidifiant à l'air ambiant au bout d'une canule 27 G.....	112
Figure 41. C2 : Photo à la LAF montrant la fuite de l'implant après une hausse de la PIO.	112
Figure 42. C3 : Opacification blanchâtre après l'irradiation par la lumière bleue.	113
Figure 43. C7 : Perte progressive de l'implant et fuite totale post hausse de la PIO à 24h.	116
Figure 44. C8 : Poche stromale très postérieure et perte partielle de l'implant.	117
Figure 45. C8 : Décoloration progressive de l'implant et cornée claire à partir de 4h postop....	117
Figure 46. C8 : Coupes OCT prises avec le Visante™ à intervalle de 45° sur la C8 à 24h.....	118
Figure 47. Corrélation entre l'aire de coupe et la hauteur des implants.	121
Figure 48. C15 et C16 : Coupes OCT durant 14 jours de suivi.	122
Figure 49. C15 et C16 : Aire de coupe OCT des implants avec ou sans CXL durant 14J.....	123
Figure 50. C15 et C16 : Hauteur de coupe OCT des implants avec ou sans CXL durant 14J.	123
Figure 51. C15 et C16 : Largeur de coupe OCT des implants avec ou sans CXL durant 14J. ...	123
Figure 52. C15 et C16 : Épaisseur de la paroi antérieure avec ou sans CXL durant 14J.....	124
Figure 53. C15 et C16 : Épaisseur de la paroi postérieure avec ou sans CXL durant 14J.	124
Figure 54. C17-20 : Disparition des implants en 48h.....	130
Figure 55. C17 : Dissection incomplète du lenticule intrastromal.	131
Figure 56. C20 : Infection d'allure fongique au 9 ^e jour postopératoire.	131
Figure 57. C21-24 : Disparition des implants en 24h.....	135
Figure 58. Concentration en oxygène du stroma saturé en riboflavine et soumis à des UV.....	137
Figure 59. C25-27 : Aire de coupe OCT des implants durant 10J.	139
Figure 60. C25-27 : Hauteur de coupe OCT des implants durant 10J.	139

Figure 61. C25-27 : Épaisseur de la paroi antérieure durant 10J.	140
Figure 62. C25-27 : Épaisseur de la paroi postérieure durant 10J.	140
Figure 63. C4-6 : Évolution de la transparence cornéenne sur 24h.	210
Figure 64. C4-6 : Impact cornéen de la kératotomie, de l'irradiation et de la réticulation.	211
Figure 65. C9-14 : Répétabilité de la kératotomie manuelle.....	212
Figure 66. Consistance d'implants produits à un taux d'oxygène atmosphérique ou faible.	214

Liste des sigles

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien
ALK : *anterior laminar keratoplasty*
ASB : Antoine Sylvestre Bouchard
ATB : antibiotique
ATP : Adénosine triphosphate
bFGF : *basic fibroblast growth factor*
BID : *bis in die* (deux fois par jour)
BSS : *balanced salt solution*
CAT : cellules amplificatrices transitoires
CLP : *collagen-like Peptide*
CXL : *cross-linking*
D : dioptries (unité de mesure)
DALK : *deep anterior laminar keratoplasty*
DIE : *quaque die* (chaque jour)
DSAEK : *Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty*
EA : Emilio Alarcon
EDC : *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide*
FA : *Fluorescein angiography*
FCN : facteur de croissance neuronal
FDA : *U.S. Food and Drug Administration*
FLISK : *femtosecond laser-assisted intra-stromal keratoplasty*
FRQS : Fonds de recherche du Québec – Santé
FX : François-Xavier Gueriot
G : *gauge*
GSU : *gray scale units*
H : heures (d'examen postopératoire)
HMR : Hôpital Maisonneuve-Rosemont
HR : haute résolution
HRA : *Heidelberg Retina Angiography*

HSV : *herpes simplex virus*
IB : Isabelle Brunette
ICGA : *Indocyanine green angiography*
ILK : *intrastromal lenticular keratoplasty*
IM : intramusculaire
IRSC : Instituts de recherche en santé du Canada
J : jours (d'examen postopératoire)
kDa : kilodalton
KPro : kératoprothèse
LAF : lampe à fente
LASIK : *laser-assisted in situ keratomileusis*
M : mois (d'examen postopératoire)
MEC : matrice extracellulaire
mmHg : millimètre(s) de mercure
MMP : métalloprotéinase
MPC : *2-Methacryloyloxyethyl PhosphorylCholine*
NHS : *N-hydroxysuccinimide*
NS : naso-supérieur
OCT : *Optical Coherence Tomography*
PC : *porcine collagen*
PEG : *multi-armed Poly(Ethylene Glycol)*
PK : *penetrating keratoplasty*
PKR : *photorefractive keratectomy*
PIO : pression intraoculaire
PMMA : *Poly(methyl methacrylate)*
PRN : *pro re nata* (lorsque nécessaire)
RHC : *recombinant human collagen*
RPM : rotation(s) par minute
SMILE : *Small Incision Lenticule Extraction*
TI : temporo-inférieur
TILK : *"Tuck In" Lamellar Keratoplasty*

UOHI : *University of Ottawa Heart Institute*

USA : *United States of America*

UV : ultraviolet

VA : Vasantha Atmuri

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

Liste des abréviations

Coll. : collaborateurs

Préop : préopératoire

Postop : postopératoire

À Maurice, mon E2 préféré

Remerciements

Mes premiers et plus grands remerciements vont à Dre Isabelle Brunette, sans qui ma passion pour la recherche n'aurait jamais pris son envol. J'avais déjà un grand intérêt pour l'ophtalmologie en débutant mon doctorat de médecine, et pour tenter d'y mettre pied, j'ai décidé de prendre un simple stage de recherche d'été. C'est à travers la banque de stage d'été en recherche de l'Université de Montréal que je trouve un seul stage d'ophtalmologie, offert par le laboratoire de Dre Brunette. Étant motivé à concrétiser ma carrière en ophtalmologie, j'ai alors sauté les deux pieds joints dans cette aventure qui dure maintenant depuis 5 ans. Dre Brunette m'a aidé à monter un dossier académique et de recherche à une vitesse incroyable : d'un simple stagiaire, grâce à son aide, je suis devenu étudiant à la maîtrise sous sa tutelle, avec des bourses et des prix tout au long de ce parcours. Ce parcours, elle l'a supervisé de façon attentive et attentionnée, en me guidant et en m'offrant des opportunités toujours plus intéressantes. Elle m'a fait voyager, rencontrer et présenter devant une multitude de chercheurs brillants et intéressants, et découvrir des facettes à la recherche, notamment les banques de données et la programmation, qui m'ont grandement passionné et qui influenceront certainement ma future carrière de clinicien-chercheur. Cette carrière, justement, je ne l'aurai jamais cru réalisable sans l'aide précieuse de Dre Brunette. Il me reste encore quelques étapes cruciales à traverser avant d'y arriver, mais par son support, je suis certain que toutes les chances sont de mon côté.

Dre Brunette ne travaille évidemment pas seule dans son laboratoire et c'est également à son équipe dynamique et stimulante que je dois la progression de mes travaux de recherche et de rédaction. Il faut cependant que je débute par faire une mention spéciale à mon ami et partenaire de maîtrise, Dr François-Xavier Guériot. Connus aussi comme étant le plus beau gosse de la planète, François-Xavier — qu'on nommera FX — a grandement contribué à rendre chaque jour au laboratoire agréable et productif. Travaillant sur un projet assez parallèle au mien et ayant des intérêts assez similaires, nous ne devons pas être loin de faire la paire parfaite. En nous entraînant tour à tour dans nos projets respectifs, et en prenant plaisir à le faire, nous avons bâti une relation professionnelle très constructive et profitable. Concrètement, tous les résultats présentés dans ce présent ouvrage ont reçu de près ou de loin la participation de FX et je lui en serai éternellement redevable. Mais par-delà le travail de laboratoire, j'ai trouvé en FX une amitié que je chéris profondément. Nous sommes maintenant retournés chacun de notre côté de l'océan dans nos

longues études médicales, mais nous gardons un fort lien qui traverse l'Atlantique et qui traversera certainement l'épreuve du temps. Parce qu'après tout, j'ai appris à apprécier ce « maudit » Français!

Bien que FX ait pris beaucoup d'espace dans le laboratoire — sans doute aussi parce qu'il fait deux fois ma taille — le vrai moteur du laboratoire est son équipe professionnelle d'assistants et de techniciens. Khampoun, qui a remplacé Marilyse comme assistant de recherche peu de temps après mon arrivée au laboratoire, a vraiment été d'une aide exemplaire. Toujours de bonne humeur, avec de nombreuses années d'expérience, mais prêt à tout apprendre ce qu'il faut, Khampoun a définitivement joué un rôle clé dans mes travaux de recherche. Si c'était de son aide plus discrète de préparation de la salle d'opération à son assistance plus concrète avec l'équipement et les examens des animaux, il a su impacter positivement et faire avancer chacune des facettes de mon projet.

Aux côtés de Khampoun pour une bonne partie de mon année à l'HMR, Nadia, technicienne en santé animale pour l'équipe de Dre Brunette, a grandement contribué à alléger le suivi quotidien de nos sujets d'étude. Constamment à nos côtés pour nous assister dans nos examens ou l'installation des instruments, Nadia était d'une aide précieuse pour mon train de vie quotidien et a permis de mener à bien mes projets sur les animaux. De façon similaire, Marilyse, bien que je l'aie côtoyée moins souvent, a été d'une assistance inestimable tant pour la gestion de l'équipement du laboratoire et son inventaire que pour l'évaluation des animaux et la révision des protocoles de recherche. Nadia et Marylise ont également grandement aidé à la poursuite des expérimentations et du développement des implants après mon retour aux études à temps plein en médecine. Je ne peux aussi oublier la participation active de Vasantha dans l'organisation de certaines de nos opérations et sa collaboration dans l'examen des animaux. Enfin, il me faut souligner la participation active de Dr Marcelo Muñoz, PhD et du laboratoire d'Émilio Alarcon, PhD, à University of Ottawa Heart Institute (UOHI) qui sont ceux qui ont mis au point les implants injectables qui seront présentés dans le présent mémoire.

J'aimerais remercier le département d'ophtalmologie de l'Université de Montréal et la Chaire Suzanne Véronneau-Troutman, le Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) et les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) qui ont cru en moi et qui m'ont offert un support financier qui m'a permis de me concentrer sur ma maîtrise pendant ma formation médicale. Sur ce, je

remercie la Faculté de médecine et l'administration du Doctorat en médecine de l'Université de Montréal de m'avoir accordé une année de suspension pour la réalisation d'une bonne part de mes travaux de recherche.

Bien qu'ils n'aient pas été présents physiquement au laboratoire, il faut maintenant que je passe aux remerciements de mes collègues et amis, qui m'ont permis d'apprécier la vie en dehors du laboratoire. À Sébastien, merci de m'avoir permis de me reposer et de me changer les idées ces dernières années. À mes collègues en médecine, je veux dire merci de m'avoir supporté dans l'écriture de ce mémoire en me laissant y poser quelques mots entre deux consultations sur nos longues gardes de fin de semaine. Et aux membres de mon « Medband », je veux dire merci d'avoir donné du rythme à nos soirées de pratique et d'avoir voulu embarquer dans mes projets musicaux assez rocambolesques. Je tiens à remercier particulièrement Amarylis, ma bonne amie, qui n'était pas en médecine à l'époque, mais qui m'a guidé dans cette carrière de recherche et dans l'écriture de ce mémoire. Enfin, je tiens à remercier ma mère qui m'a toujours supporté dans mes plans toujours plus ambitieux, qui y a toujours cru et qui s'assure de temps en temps que j'y survis et que je prends le temps de respirer. Et je termine mes remerciements par la personne qui m'a offert le support des plus appréciés : Aude, ma dulcinée, qui a su me rendre le sourire à la fin de ces longues journées et qui a donné sens à tout ça quand j'avais l'impression de me perdre dans tous mes projets. Pour ton appui quotidien, pour le temps et l'énergie que tu mets afin de nous garder à flots et pour ton amour, je te remercie, ma très chère amie.

Avant-propos

Ce mémoire traite des fruits des travaux de recherche effectués du mois de juin 2017 au mois d'août 2018, au centre de recherche BioFemtoVision de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont à Montréal, Canada au sein de l'équipe de Dre Isabelle Brunette.

La première partie de ce travail consiste en l'exploration de la physiologie de la cornée humaine et du mécanisme par lequel différentes pathologies peuvent venir perturber son équilibre précaire à travers le monde. Afin de remédier aux maux de la cornée, nous serons amenés à comprendre quelles sont les méthodes utilisées actuellement en clinique pour traiter ces pathologies et à réaliser l'importance de la recherche sur les bio-implants. Puis, nous discuterons du développement d'un programme d'évaluation translationnelle des implants biosynthétiques implantés dans des cornées animales *in vivo* et dans des cornées humaines *ex vivo*, ainsi que des résultats qui en ont découlé.

La présentation et l'analyse des résultats de l'étude *in vivo* chez le félin sont le fruit des travaux de collaboration de François-Xavier Guériot et de moi-même. FX a soutenu publiquement sa thèse de médecine portant sur le modèle animal à l'étude, à l'Université de Grenoble en France le 19 septembre 2019. Le « **Tableau 3** » et certaines figures montées par FX pour sa thèse (en utilisant des photographies que j'ai prises ou des données que j'ai colligées avec son aide et celle du laboratoire) ont été adaptées et annotées par moi dans le présent ouvrage (ces figures sont marquées par : © ASB et FX). L'utilisation de ces informations a été faite avec l'accord de FX. Toutes les autres figures ont été obtenues avec l'autorisation des détenteurs des droits d'auteurs, le cas échéant. Le manuscrit du présent mémoire est un travail original.

Concernant l'étude *ex vivo*, les implants injectables sont très coûteux à produire et chaque opération chirurgicale nécessite la participation active d'un grand nombre d'intervenants (chimistes, chirurgiens, assistants, etc.). Dans le but d'optimiser les coûts et parce qu'il s'agit avant tout d'un projet novateur, plusieurs expériences de petits échantillons ont été réalisées l'une après l'autre, chacune tentant de répondre aux questions et problématiques soulevées par la précédente. Seront donc présentées ici ces diverses expériences, dans l'ordre chronologique de leur réalisation. Pour chacune des expériences, nous analyserons au fur et à mesure ce que les résultats indiquent afin de mieux comprendre le raisonnement derrière les modifications apportées aux expériences subséquentes. Chaque expérience permettait de recueillir des données sur le succès de la

formulation de l'implant comme tel, mais aussi sur les procédures chirurgicales et la collecte de données cliniques. L'élaboration et l'amélioration des formulations d'implants, en plus de leur réticulation à la lumière bleue, étaient uniquement du recours du laboratoire d'Émilio Alarcon (EA), PhD, à l'UOHI et ne sont pas le sujet principal du présent ouvrage. Plus spécifiquement, la conception et la préparation des implants présentés dans les expériences *ex vivo* sont le fruit des travaux de Dr Marcelo Muñoz, PhD. De plus, lorsqu'une nouvelle formulation était essayée, il n'était pas toujours possible d'obtenir la recette exacte du laboratoire d'EA qui utilisait parfois des noms de code pour ce faire. La partie chirurgicale et clinique sera donc celle qui sera discutée dans plus de détails ici, mais seront également mentionnés les objectifs spécifiques de l'équipe d'EA pour chaque expérience.

La totalité des expérimentations a été réalisée sous la supervision de ma directrice de recherche, Dre Isabelle Brunette, et de ma co-directrice, Dre May Griffith, PhD, en partenariat avec Dr Emilio Alarcon, PhD. Mon rôle au sein de l'équipe était de mettre au point les protocoles de recherche visant l'amélioration des résultats anatomiques et fonctionnels des chirurgies, d'organiser et d'aider au bon déroulement des chirurgies, de faire le suivi pré- et postopératoire des sujets de recherche ainsi que de collectionner et de synthétiser les données cliniques.

1 – Introduction

1.1 La cécité cornéenne dans le monde

La cornée est la partie antérieure de l'œil à travers laquelle la lumière doit passer pour arriver à la rétine. Elle possède deux propriétés essentielles à la vision. D'une part, elle est responsable du 2/3 de la réfraction totale de la lumière et joue donc un rôle primordial dans l'acuité visuelle, le reste de la réfraction étant assumée par le cristallin.¹ D'autre part, grâce à sa très grande transparence, elle assure un passage maximal de la lumière du milieu extérieur vers la rétine. En présence d'anomalies réfractives, il existe de nombreux procédés chirurgicaux permettant de modifier la forme de la cornée pour restituer sa fonction optique. Cependant, les choix sont beaucoup plus limités lors d'une perte de transparence pathologique ou accidentelle. En effet, l'option thérapeutique la plus largement acceptée pour traiter la cécité cornéenne est la greffe de cornée.²

La cécité cornéenne représente la 3^e cause de cécité dans le monde³ et, en 2010, on estimait à 4,9 millions le nombre d'individus touchés par la cécité cornéenne bilatérale, alors que la cécité unilatérale en affecterait près de 23 millions.² Des données plus récentes montrent qu'en 2017, l'opacité cornéenne, toutes causes confondues, était la cause de cécité de près de 4,2% des gens aveugles.⁴ En Inde et en Afrique, la cécité cornéenne serait en cause chez 14,6–15,4% et 11–30% des cas.⁵⁻⁷ Dans ces régions, les maladies de la cornée sont étroitement associées à la pauvreté et sont associées à une réduction marquée de l'espérance de vie, en particulier chez les enfants. L'intervention auprès des communautés les plus pauvres permet notamment de limiter l'impact des déficiences en vitamine A, de la rougeole, du trachome, de l'ophtalmie néonatale, des traumatismes, des ulcères cornéens et de l'utilisation dangereuse de remèdes traditionnels.⁸ Toutefois, lorsque la prévention est un échec et que la cécité est irréversible par des traitements médicaux, la transplantation cornéenne devient nécessaire.

Alors que 82% de la cécité mondiale touche les personnes âgées de 50 ans et plus, dans les pays en développement, la cécité cornéenne, comparativement aux autres formes de cécité, affecte une population nettement plus jeune³ : les greffes de cornée sont donc potentiellement plus rentables dans ces pays, en termes d'années de vie fonctionnelle gagnées, que la chirurgie de cataracte. Les banques d'yeux sont cependant loin de répondre efficacement à la demande en greffons cornéens, celle-ci ne cessant de s'accroître même dans les pays développés.⁹⁻¹² En effet, le principal obstacle

à la réduction de la cécité cornéenne est le manque généralisé de tissus de donneurs à un coût raisonnable.

Au niveau mondial, près de 185 000 kératoplasties ont été réalisées en 2012, la majorité étant aux États-Unis, en Inde et au Brésil.¹³ Cependant, ce chiffre ne répond adéquatement qu'au tiers des besoins, la moitié des patients qui auraient besoin d'une transplantation cornéenne n'y ayant pas accès.¹³ En effet, dans bien des pays en développement, les services de transplantations sont sous-optimaux, notamment à cause du manque de ressources humaines qualifiées, de chirurgies inefficaces, de lois restrictives, d'une infrastructure de distribution insuffisante, du coût élevé des supports de stockage à long terme, de normes médicales mal implantées et de facteurs socioculturels associés au don d'organes.² Par ailleurs, dans les pays développés, les chirurgies comme la kératectomie photoréfractive (PKR) et le laser *in situ* keratomileusis (LASIK) pour corriger certaines erreurs réfractives (myopie, hypermétropie et astigmatisme) deviennent de plus en plus populaires et rendent les cornées inutilisables pour la greffe.¹⁴ Heureusement, les techniques chirurgicales de greffe de cornée continuent de progresser dans le monde entier en la faveur des procédures lamellaires, comme la kératoplastie lamellaire antérieure et la kératoplastie endothéliale, se limitant au remplacement sélectif de la couche cornéenne malade. L'adoption de ces techniques dans les pays en développement promet d'améliorer les résultats visuels à long terme grâce à des suivis moins intensifs et plus faciles à respecter, ainsi qu'à une diminution des taux de rejet de greffe, de glaucome induit par les stéroïdes et de complications liées aux sutures.¹⁵ Les techniques lamellaires peuvent également aider à élargir l'offre cornéenne en permettant à un donneur de cornée de restaurer la vue chez deux receveurs,¹⁶ en plus de faciliter l'utilisation de cornées à faible densité de cellules endothéliales ainsi que de celles conservées plus d'un an dans des supports de stockage telle que la glycérine.¹⁷

Or, même si une solution est trouvée au problème d'accessibilité aux tissus cornéens, chez les patients souffrant de pathologies cornéennes avec inflammation sévère (maladies auto-immunes, brûlures chimiques, infection HSV, etc.), de glaucome ou de maladies de la rétine, le pronostic d'une greffe est à haut risque de complications, d'échec et de perte de vision complète.¹⁸⁻²⁰ Ces patients doivent souvent subir de nombreuses chirurgies et leur risque de devenir complètement aveugle augmente proportionnellement au nombre d'échecs des greffes qu'ils subissent.^{14, 21} Les prothèses cornéennes (kératoprothèses : KPro) sont en constante amélioration et la KPro de Boston commence à faire ses preuves dans les pays en développement comme alternative à la

kératoplastie,²² mais elle demeure un moyen de dernier recours.²³ Tous ces problèmes ont ainsi mis de l'avant le besoin criant d'une solution alternative aux tissus humains pour la greffe de cornée, tant pour la pénurie de tissus humains qui s'accroît que pour les patients à risque élevé. C'est ici qu'entrent en jeu les implants cornéens biosynthétiques. Toutefois, pour pouvoir synthétiser une cornée artificielle de toute pièce, il faut savoir comment chacune de ces « pièces » fonctionne chez une cornée normale.

1.2 L'anatomie fonctionnelle de la cornée

La cornée est la couche à la surface de l'œil à travers laquelle la lumière doit tout d'abord passer pour arriver à la rétine (**Figure 1**). Grâce à sa composition et à sa courbure, la cornée permet de transmettre les rayons lumineux de l'extérieur vers la rétine en minimisant la dispersion optique.²⁴

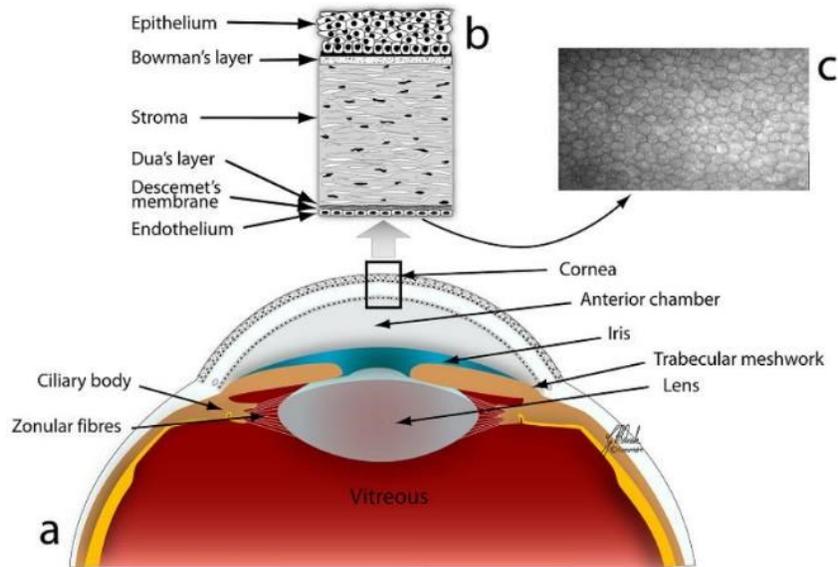


Figure 1. Coupe axiale schématique de l'œil humain.

(a) portion antérieure de l'œil; (b) section histologique schématique des 6 couches de la cornée; (c) microscopie confocale *in vivo* de l'endothélium cornéen. Tiré de Navaratnam et coll.²⁴

Chez l'adulte, le diamètre cornéen moyen est de 11,5 à 12 mm sur l'axe horizontal et de 10,5 à 11,5 mm sur l'axe vertical.^{25,26} L'apex cornéen est défini comme son point le plus courbe ou « pointu ».²⁷ La cornéenne normale a une épaisseur à l'apex de $536 \pm 31 \mu\text{m}$.²⁸ La cornée s'épaissit en périphérie, et à 7 mm de l'apex cornéen, elle se peut se rendre à $582 \pm 33,41 \mu\text{m}$.^{29,30} La cornée n'a une forme ni régulière ni sphérique parfaite : la courbure centrale antérieure de la cornée est d'environ $7,72 \pm 0,27 \text{ mm}$, mais sa surface devient évasée en périphérie.^{31,32} De plus, à cause de l'épaississement cornéen périphérique, sa surface interne (ou postérieure) concave est plus courbe que sa surface antérieure convexe, avec un rayon de courbure central postérieur environnant les $6,24 \pm 0,34 \text{ mm}$.^{33,34} Ce sont ces différentes courbures, ainsi que la différence entre l'indice de réfraction de l'air (1,000), du film lacrymal (1,337)³⁵ et de la cornée (1,376)³⁶ qui lui permettent de participer à la majeure partie de la concentration des rayons lumineux sur la rétine, avec un pouvoir réfractif de $44,60 \pm 1,68 \text{ D}$.³⁷ Cependant, la cornée est bien plus qu'une simple lentille et chacune

de ses couches possède un rôle physiologique qui leur est propre. La cornée est composée de trois couches cellulaires distinctes, soit un épithélium, un stroma et un endothélium, séparées les unes des autres par des membranes spécialisées, soit la membrane de Bowman sous l'épithélium et la membrane de Descemet soutenant l'endothélium. Une sixième couche de la cornée a récemment été décrite, la couche de Dua, qui est acellulaire, mesure $10,15 \pm 3,6 \mu\text{m}$ d'épais, est surtout composé de collagène I et se situe entre la membrane de Descemet et le stroma.³⁸ Cette couche ne sera pas discutée plus en détail ici.

1.2.1 Épithélium et film lacrymal

L'épithélium cornéen est la couche cellulaire la plus antérieure de la cornée et elle repose sur la membrane de Bowman. Composé 5 à 7 couches de cellules épithéliales squameuses stratifiées non kératinisées, l'épithélium constitue approximativement 10% (40 μm) de l'épaisseur cornéenne totale.^{31, 39}

L'épithélium est recouvert d'un film lacrymal qui protège la cornée de la déshydratation et qui lisse les micro-irrégularités de sa surface antérieure, ce qui lui permet d'avoir des propriétés optiques optimales.^{31, 40} En fait, l'épithélium, le film lacrymal et les paupières ont une relation symbiotique tant au plan anatomique que physiologique, et communiquent par des signaux endocrinologique, neurologique, vasculaire et immun.⁴¹

L'épithélium cornéen est constitué de trois principales couches cellulaires : superficielle, intermédiaire et basale. Les deux ou trois rangées antérieures contiennent des cellules polygonales pavimenteuses.⁴² Le film lacrymal, quant à lui, peut être divisé en deux couches, soit la couche lipidique, en contact avec l'air, et la couche mucineuse, qui repose directement sur l'épithélium. Cette dernière est sécrétée par les cellules à gobelet situées dans la conjonctive et s'associe au glycocalix des cellules superficielles de l'épithélium cornéen pour permettre la propagation hydrophile et la répartition uniforme des larmes à chaque battement de paupière.⁴³ Ceci permet au film lacrymal d'être la première ligne de défense cornéenne contre l'invasion microbienne, et contre les dommages chimiques et mécaniques provoqués par des corps étrangers. De plus, au niveau des cellules épithéliales superficielles, on retrouve des jonctions serrées sur leur paroi latérale (zonula occludens) les reliant entre-elles et formant une barrière physique qui permet de garder les larmes, les gouttes ophtalmiques, les toxines et les pathogènes hors de l'espace intercellulaire.³¹

Sous les cellules superficielles, on retrouve les cellules intermédiaires – ou cellules ailées – disposées en deux à trois rangées. Celles-ci sont dans un état de différenciation intermédiaire entre les cellules basales et superficielles. Elles ont une forme cuboïde et sont aussi connectées par des jonctions serrées.⁴⁴

Enfin, la couche la plus profonde de l'épithélium est la couche de cellules basales.⁴⁵ Fortement polarisées, ces cellules mesurent près 20 μm de haut et sont connectées latéralement par des jonctions communicantes et des zonula adherens.⁴⁶ Les cellules basales reposent sur une membrane basale à laquelle elles adhèrent grâce à des hémidesmosomes.⁴⁶ Cette membrane, épaisse de 0,05 μm , est sécrétée par les cellules basales et les kératocytes du stroma et est composée principalement de collagène de type IV, de laminines et d'autres protéines.^{47,48} La membrane basale prévient la séparation de l'épithélium des couches cornéennes sous-jacentes, permet l'organisation verticale de l'épithélium et agit comme plateforme pour la migration des cellules épithéliales.⁴⁹

Les cellules épithéliales ont un cycle de vie de 7 à 10 jours, ce après quoi elles subissent une involution, apoptose et desquamation dans les larmes.³¹ Les cellules épithéliales superficielles et ailées n'ayant pas de capacité mitotique, la régénération épithéliale est assurée par des cellules souches épithéliales qui proviennent du limbe cornéen, situé à l'intersection de la cornée transparente et de la conjonctive.⁵⁰

Plus précisément, dans la région limbique se trouvent les palissades de Vogt qui sont des replis fibrovasculaires d'orientation radiale qui s'étendent sur 1 à 2 mm et qui abritent les cellules souches épithéliales.⁵¹ Les cellules souches limbiques se divisent asymétriquement : une cellule fille se différencie en cellule amplificatrice transitoire, tandis que l'autre demeure non différenciée afin de maintenir la réserve de cellules souches. Les cellules amplificatrices transitoires migrent vers le centre de la cornée (de façon centripète) sur la membrane basale pour ainsi former la couche de cellules basales de l'épithélium cornéen. Ces cellules, en progressant vers la surface cornéenne, subiront plusieurs cycles de réplication et de dédifférenciation pour devenir séquentiellement des cellules ailées puis superficielles.⁵⁰ Cette explication donnée au renouvellement épithélial provient d'une hypothèse formulée en 1983 par Thoft et coll. (**Figure 2**), qui stipule que la somme de X (prolifération et migration antérieure) et d'Y (migration centripète) doit être égale à Z (desquamation épithéliale superficielle).⁵²

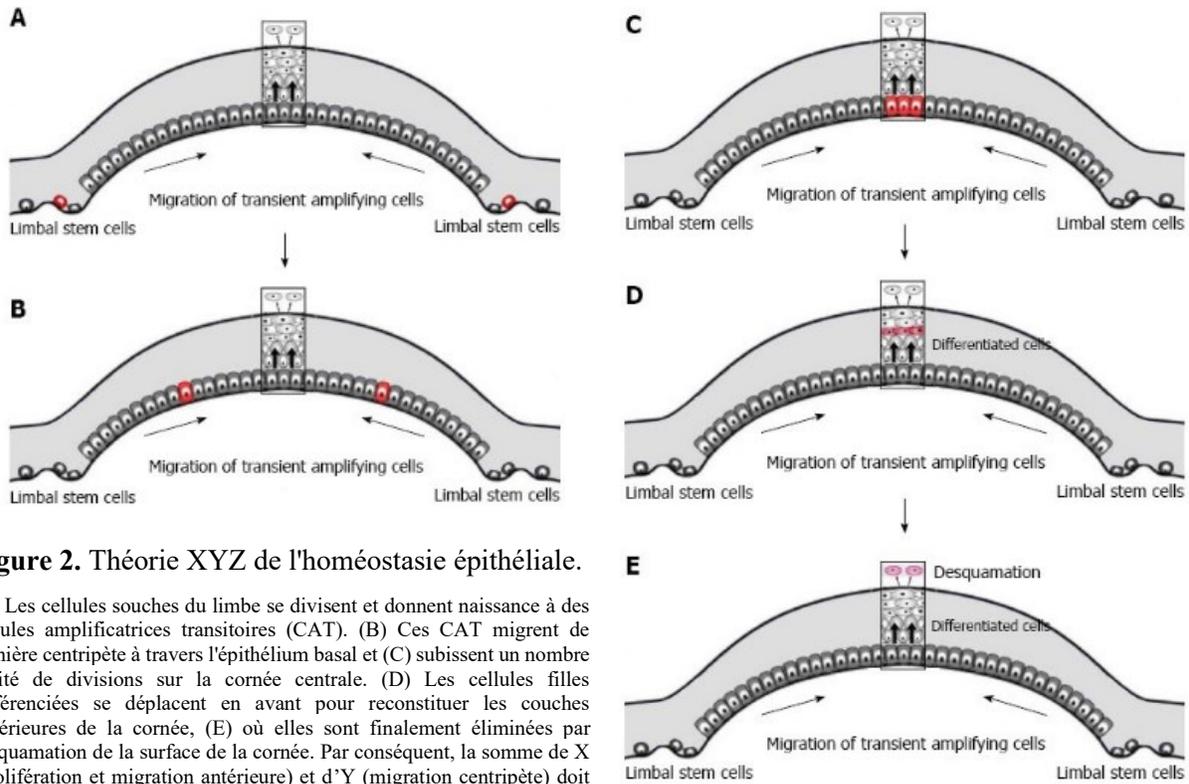


Figure 2. Théorie XYZ de l'homéostasie épithéliale.

(A) Les cellules souches du limbe se divisent et donnent naissance à des cellules amplificatrices transitoires (CAT). (B) Ces CAT migrent de manière centripète à travers l'épithélium basal et (C) subissent un nombre limité de divisions sur la cornée centrale. (D) Les cellules filles différenciées se déplacent en avant pour reconstituer les couches supérieures de la cornée, (E) où elles sont finalement éliminées par desquamation de la surface de la cornée. Par conséquent, la somme de X (prolifération et migration antérieure) et d'Y (migration centripète) doit être égale à Z (desquamation des cellules superficielles) pour le maintien de l'épithélium cornéen. Adapté de Yoon et coll.⁵⁰

1.2.2 Couche de Bowman

La couche de Bowman (ou membrane de Bowman) se situe sous l'épithélium et n'est pas une membrane à proprement parler. C'est plutôt une zone acellulaire de la partie la plus antérieure du stroma composée de fibres de collagène condensées, orientées aléatoirement et dispersées à travers une matrice amorphe.²⁹

Cette couche lisse mesure environ 15 µm d'épaisseur et aiderait la cornée à conserver sa forme, bien que son rôle physiologique exact demeure inconnu. Lorsqu'elle est perturbée, la couche de Bowman ne se régénère pas et peut former une cicatrice.³¹

1.2.3 Stroma

Le stroma cornéen constitue la majeure partie de la cornée, soit environ 500 µm ou 80 à 85% de l'épaisseur cornéenne totale.^{31, 42} Ce qui distingue le stroma des autres tissus conjonctifs du corps humain est sa grande transparence, possible grâce à l'arrangement de la matrice extracellulaire (MEC) et des fibres parallèles (fibrilles) de collagène en couches – ou lamelles.⁵³ De même, au

centre de la cornée, les fibres de collagène sont plus densément arrangées, ce qui permettrait de préserver la force et la courbe cornéenne dans cette région plus mince.⁵⁴ Cependant, déterminer la configuration précise des lamelles de collagène dans l'ensemble du stroma et son rôle dans la transparence cornéenne demeure à ce jour un inconnu et un défi de taille qui tentent d'être relevés grâce aux avancées en imagerie nucléaire et en modélisation 3D.⁵⁵

Le stroma est en fait composé essentiellement de collagène et de protéoglycans, avec un contenu cellulaire ne représentant que 5% de son volume. La densité cellulaire moyenne du stroma se chiffre aux alentours de $39\ 000 \pm 1\ 200$ cellules/mm³, avec une densité qui décroît plus on s'approche du stroma postérieur.⁵⁶⁻⁵⁸ Les kératocytes forment presque la totalité de ces cellules et sont en grande partie responsables de l'entretien de la MEC. Ces derniers contiennent des « cristallins », représentant 25 à 30% de leur contenu protéique, qui préservent la transparence stromale et réduisent la diffraction postérieure de la lumière.⁵⁹ Ils sont aussi capables de synthétiser du collagène, des glycosaminoglycans, en plus de générer des métalloprotéinases (MMPs) ; tous ces éléments sont essentiels au maintien de la structure, de la courbure et de la transparence stromale.³¹

Les fibrilles de collagène du stroma sont composées de complexes hétérodimériques de collagène I et V qui leur confèrent leur fin diamètre.^{60, 61} La préservation de la structure des fibrilles est assurée par des fibres de collagène VI et par des protéoglycans (lumican et keratocan) qui permettent la rétention aqueuse de la cornée (qui contient 78% d'eau), essentielle à maintenir sa clarté.^{62, 63} Les fibrilles sont réparties en 200 à 250 couches, toutes parallèles à la surface cornéenne et arrangées à peu près à angle droit par rapport à la précédente, avec une orientation plutôt circonférentielle près du limbe.⁵³ L'organisation des lamelles de collagène varie également avec la profondeur. Antérieurement, le stroma est surtout composé par des couches courtes et étroites fortement imbriquées et entrelacées, tandis que le collagène postérieur forme de longues, larges et épaisses lamelles, allant d'un limbe à l'autre, sans connexion interlamellaire significative.⁴² Cette différence dans la distribution antéro-postérieure des composantes stromales, ainsi que la restriction structurale imposée par le limbe, explique la plus grande susceptibilité à l'œdème de la partie postérieure du stroma.⁶⁴ La surface stromale postérieure s'aplatit en effet rapidement lors d'une accumulation de liquide, ce qui cause des plis (stries) dans la membrane de Descemet.³¹

1.2.4 Membrane de Descemet

La membrane de Descemet est la membrane basale des cellules de l'endothélium cornéen. Elle recouvre la surface postérieure du stroma et se fusionne en périphérie avec les faisceaux trabéculaires au niveau de la ligne de Schwalbe. La membrane de Descemet a une épaisseur d'environ 3 μm chez l'enfant, augmentant graduellement chez l'adulte pour atteindre 10 μm .⁶⁵ Elle est composée de deux couches. La couche antérieure est « striée » et est formée de lamelles de collagènes de type IV et VIII et de protéoglycanes apparaissant vers la 8^e semaine de gestation.³¹ Ces fibres de collagènes ont une configuration en treillis et forment des bandes à intervalles de 110 nm.⁶⁶ La couche postérieure est d'apparence plus granuleuse, est sécrétée par les cellules endothéliales et s'épaissit au fil du temps.⁴²

1.2.5 Endothélium

L'endothélium est composé d'une monocouche de cellules plates de forme hexagonale, ayant une épaisseur de 5 μm et un diamètre de 20 μm . Les cellules endothéliales recouvrent l'entièreté de la surface postérieure de la cornée et sont en contact direct avec l'humeur aqueuse. Elles ne prolifèrent pas ou très peu, de sorte que la densité cellulaire de l'endothélium à la naissance, soit de 3000 à 4000 cellules/ mm^2 , diminue à raison d'environ 10,92 cellules/ mm^2 par année pour atteindre 2500 cellules/ mm^2 à la fin de l'âge adulte.^{42, 67, 68} Lorsqu'une cellule meurt, les cellules adjacentes s'étirent pour prendre sa place et ainsi maintenir une barrière physique et osmotique. Cependant, lorsque les cellules endothéliales s'élargissent (polymégatisme) et perdent leur forme hexagonale (pléomorphisme), elles sont moins aptes à exercer leur fonction.⁶⁹ Ces cellules doivent maintenir une densité cellulaire supérieure à 500 cellules/ mm^2 pour faire sortir l'excédent aqueux du stroma cornéen.⁶⁷ Ce rôle est notamment accompli grâce à des pompes sodium-potassium $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase et Mg^{2+} ATPase dépendantes du bicarbonate qui expulsent des ions Na^+ et des bicarbonates dans l'humeur aqueuse.⁴² Cette sortie d'ions vers l'humeur aqueuse crée alors un gradient osmotique qui permet la sortie de l'eau et des déchets métaboliques du stroma, processus essentiel au maintien de la transparence cornéenne.⁷⁰

1.2.6 Vascularisation et innervation

Bien qu'une cornée normale soit avasculaire, ses cellules dépendent physiologiquement des mêmes composants sanguins que le reste des cellules humaines. Ces constituants sont fournis par de

nombreux vaisseaux millimétriques situés à la périphérie de la cornée ainsi que par les branches terminales des artères faciales et ophtalmiques, via l'humeur aqueuse et le film lacrymal.³¹ Parmi ces constituants, on retrouve certaines neurotrophines, dont le facteur de croissance neuronal (FCN) qui est nécessaire à la survie et à la fonction neuronales, à la ramification et à l'élongation axonales, ainsi qu'à la germination et la régénération des nerfs de la cornée après une lésion.⁷¹

La cornée est l'un des tissus les plus innervés du corps humain. Les nerfs cornéens proviennent du nerf crânien trijumeau et plus spécifiquement de la branche naso-ciliaire de la division ophtalmique (nerf crânien V₁).⁷² En provenance du plexus limbique, des troncs nerveux pénètrent dans le stroma cornéen périphérique à une profondeur de $293 \pm 106 \mu\text{m}$ avant de progresser antérieurement, pour finalement perforer la membrane de Bowman et former un plexus riche sous la couche épithéliale basale.⁷³

1.3 La transplantation cornéenne

1.3.1 Physiopathologie de l'opacité cornéenne

Un certain nombre de pathologies de la cornée peuvent augmenter la dispersion de la lumière ou la rendre moins transparente. Lorsque la pathologie avance, la cornée peut apparaître trouble ou opaque, mais cette dissémination de la lumière peut avoir plusieurs origines structurales différentes.

Les sources de dispersion de la lumière les plus puissantes dans la cornée sont, dans l'ordre, la surface épithéliale antérieure (incluant la membrane de Bowman) et la surface postérieure endothéliale. En effet, en optique, les rayons lumineux subissent plus de déviations à l'interface entre les milieux que dans un seul milieu donné à cause du changement de l'indice de réfraction : on comprend donc pourquoi la lumière se disperse beaucoup au niveau de l'interface entre, par paires, l'air, le film lacrymal, l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma, l'endothélium et l'humeur aqueuse. À l'opposé, la dispersion est minime dans le stroma seul, grâce, entre autres, à l'arrangement en treillis très organisé et très serré des minces fibres de collagène qui sont superposées en feuillets.^{74, 75} À ceci s'ajoute, comme mentionné ci-haut, l'arrangement hautement précis de la matrice extracellulaire qui joue un rôle majeur dans la rétention d'eau et dans le maintien de l'hydratation des tissus cornéens dans les limites saines^{74, 76} (autour de 78 %), ce qui est un facteur déterminant dans la transparence cornéenne.^{75, 77} Néanmoins, puisque le stroma contribue beaucoup plus à l'épaisseur de la cornée que les autres tissus, c'est ce dernier qui est responsable de la plus grande partie de la dispersion lumineuse totale. De plus, on note qu'à la périphérie (> 6 mm de diamètre) la dispersion lumineuse est généralement plus élevée et qu'elle a tendance à augmenter avec l'âge.⁷⁸

Toute perturbation de l'une des structures précédentes peut entraîner une perte de la transparence et de la qualité visuelle. Par exemple, lors d'une kératite infectieuse, à cause de la libération de cytokines pro-inflammatoires, la cornée se trouve envahie, en plus des bactéries, de cellules inflammatoires (principalement des neutrophiles et macrophages), ce qui la fait enfler, nécroser et, parfois, ulcérer au site de l'infection.⁷⁹ S'en suivra alors une perte de la transparence due à l'action combinée des toxines et enzymes bactériennes (incluant élastases et protéase alcaline), ainsi que des protéinases (collagénases, métalloprotéinases, etc.) libérées par les granulocytes et l'épithélium

en guérison qui provoqueront une nécrose du stroma et, par conséquent, une disruption de l'organisation de la matrice de collagène.⁷⁹⁻⁸¹ À ceci s'ajoute l'apoptose des kératocytes, ce qui a un rôle à jouer dans la protection contre l'agent infectieux, mais qui nuit également à la transparence.⁸¹

De plus, la cicatrisation cornéenne à la suite de l'infection, ou même après une chirurgie réfractive ou une réticulation (*cross-linking* – CXL) de la cornée, est un facteur significatif dans la diminution de la transparence cornéenne. Ceci est dû à une augmentation des kératocytes activés au niveau de la cicatrice, à des modifications au niveau de la matrice extracellulaire, à une augmentation et à un désordre des fibres de collagènes nouvellement formées.^{76, 79, 81-83}

Les kératocytes, une fois activés, ont un indice de réfraction inférieur à celui du tissu conjonctif environnant et perturbent le passage normal de la lumière à travers le stroma. Toujours au niveau de la cicatrice, l'originel collagène I, dont le diamètre est de 25-30 nm, est remplacé par du collagène III, dont le diamètre est de 30-50 nm.^{84, 85} Ces fibres plus larges et plus irrégulières augmentent la dispersion lumineuse diminuant ainsi la transparence cornéenne.⁸⁶ La présence de fibrilles de collagène surdimensionnées, probablement formées par la fusion de fibrilles, est également une cause majeure de la diffusion de la lumière observée dans les mucopolysaccharidoses, bien que les dépôts de protéoglycanes dans les cellules ou la matrice du stroma peuvent également contribuer à cette diffusion.⁵⁵

Dans le cas d'une infection, ces modifications perdurent généralement 4 semaines après la guérison. Toutefois, à ce stade, la dispersion lumineuse est normalement moins importante au niveau de la cicatrice qu'elle ne l'était au site de l'infection active, à cause de l'élimination des colonies microbiennes et des cellules inflammatoires.⁷⁹ Les zones éloignées de l'infection peuvent également voir leur transparence diminuer durant l'épisode aigu. Ceci serait dû à la migration importante des cellules inflammatoires du limbe vers le site de l'infection, ainsi qu'à l'activation des kératocytes dans le stroma. Encore une fois, ces changements provoquent une diminution de la transparence pendant au moins 4 semaines après la guérison clinique, mais de façon moins importante que durant l'infection. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la désactivation des kératocytes et l'élimination des cellules inflammatoires prennent beaucoup de temps dans la cornée ou bien que les kératocytes activés, se transformant alors en fibroblastes, ne peuvent retourner à leur forme quiescente.⁷⁹ Somme toute, dès qu'il y a destruction ou perturbation du stroma normal,

que son origine soit infectieuse ou chimique, comme lors d'une brûlure oculaire,⁸⁰ on peut s'attendre à une diminution de la transparence au site de l'insulte ainsi qu'au reste de l'œil, quoique de façon moins importante. Celle-ci sera due, dans un premier temps, à une disruption exogène et endogène de l'organisation de la matrice de collagène, dans un deuxième temps, à la réparation et à la réorganisation du stroma et, dans un dernier temps, à la présence de cicatrices et à l'activation résiduelle des kératocytes.

Enfin, dans les endothéliopathies telles la kératopathie bulleuse et la dystrophie de Fuchs, c'est l'œdème cornéen qui cause la diffraction, notamment par une baisse focale de l'indice de réfraction secondaire à l'accumulation de fluide dans des poches stromales.⁸⁷ L'entrée du liquide dans le stroma modifie également l'organisation des fibrilles et elles ne peuvent alors plus diriger la lumière correctement.⁵⁵ Par contre, les opacités associées aux dystrophies cornéennes stromales (maculaire, granulaire, en treillis (*lattice*), de Schnyder, etc.) sont surtout dues à différents types de dépôts qui se forment dans le stroma.⁸⁸ Ces dépôts provoquent une modification locale de l'indice de réfraction stromal, et cette variation de l'indice de réfraction, si elle est comparable à la longueur d'onde de la lumière, entraîne une diffraction accrue de la lumière.⁵⁵ Des changements dans la composition de la matrice extracellulaire peuvent également se produire dans ces dernières pathologies, mais ceux-ci contribuent moins à la dispersion de la lumière.⁸⁹

Puisque ces pathologies sont généralement dégénératives et qu'elles laissent des séquelles permanentes affectant la qualité de la vision, la transplantation d'une cornée saine d'un donneur humain, appelée kératoplastie, est considérée comme étant la seule option thérapeutique pour restituer une vision fonctionnelle chez ces patients.

1.3.2 Kératoplastie transfixiante

La kératoplastie transfixiante conventionnelle (PK – *penetrating keratoplasty*) – consiste dans le remplacement de la pleine épaisseur de la cornée par celle d'un greffon d'un donneur humain. La PK a longtemps été la procédure standard de transplantation de tissu cornéen dans les cas d'opacité cornéenne. En fait, dans un rapport détaillant les transplantations cornéennes des années 1980 à 2004 aux États-Unis, la PK représentait 95% (42% en 2014)⁹⁰ des transplantations cornéennes et ses indications principales étaient la kératoplastie bulleuse post chirurgie de cataracte (pseudophaque), le kératocône, la dystrophie endothéliale de Fuchs et la reprise de greffe.⁹¹ La PK était alors associée au meilleur résultat optique potentiel parce qu'elle ne crée pas de nouvelle interface

optique, en plus d'être la technique qui nécessite le moins de préparation du greffon du donneur.⁹² La survie des greffons était alors déjà évaluée à 90% sur 5 ans et à 53% pour les reprises de greffe.⁹³

Le faible taux de rejet de greffe cornéenne par rapport à d'autres types de greffes peut être expliqué, entre autres, par l'absence de vaisseau sanguin et de vaisseau lymphatique dans la cornée, la physiologie immunitaire unique et quiescente de la chambre antérieure, l'expression quasi inexistante des antigènes majeurs d'histocompatibilité I et II, l'hibernation des cellules présentatrices d'antigène cornéennes, ainsi que la présence dans la cornée de facteurs apoptotiques aux cellules T, tels que le ligand Fas (CD95L) et le ligand de mort programmée-1 (PD-L1).⁹⁴⁻⁹⁶

De nos jours, on comprend mieux ce qui influence le rejet de greffe. D'une part, on sait maintenant que le taux de succès dépend de l'indication de la PK : la survie du greffon à 10 ans est de 89% pour le kératocône, de 73% pour la dystrophie cornéenne de Fuchs, de 70% pour les cicatrices cornéennes non herpétiques, de 60% pour les cicatrices herpétiques, de 40% pour les œdèmes cornéens post chirurgie de cataracte et de 37% pour les reprises de greffe.⁹⁷ D'autre part, la cause prédominante de rejet de greffe dans la PK est la dysfonction endothéliale du greffon. Mis à part le rejet immun de l'endothélium implanté, dont il sera question dans la prochaine section, la perte de cellules endothéliales lors de l'opération (entre 30 à 40%) et durant les 20 années subséquentes est le principal déterminant qui explique pourquoi après cette période de temps, le taux de survie pour les kératocônes se rapproche de celui des autres indications de PK en tombant à moins de 50%.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Cette importunité est, entre autres, ce qui a poussé les chercheurs à développer de nouvelles techniques chirurgicales ciblant davantage la cause de la cécité cornéenne de chaque patient, de façon à éviter de remplacer la cornée dans son entièreté. Ainsi, depuis lors, des techniques permettant de replacer uniquement la couche de la cornée qui fait défaut ont vu le jour (**Figure 3**) et présentent plusieurs avantages par rapport à la PK (diminution du risque de rejet endothélial, moins d'astigmatisme postopératoire et convalescence plus rapide),^{90, 101} comme il sera discuté dans la section suivante. Certaines de ces techniques permettent de remplacer uniquement l'endothélium cornéen (**Figure 3**, E et F), mais ceci dépasse le sujet du présent ouvrage et elles ne seront pas discutées ici-bas.

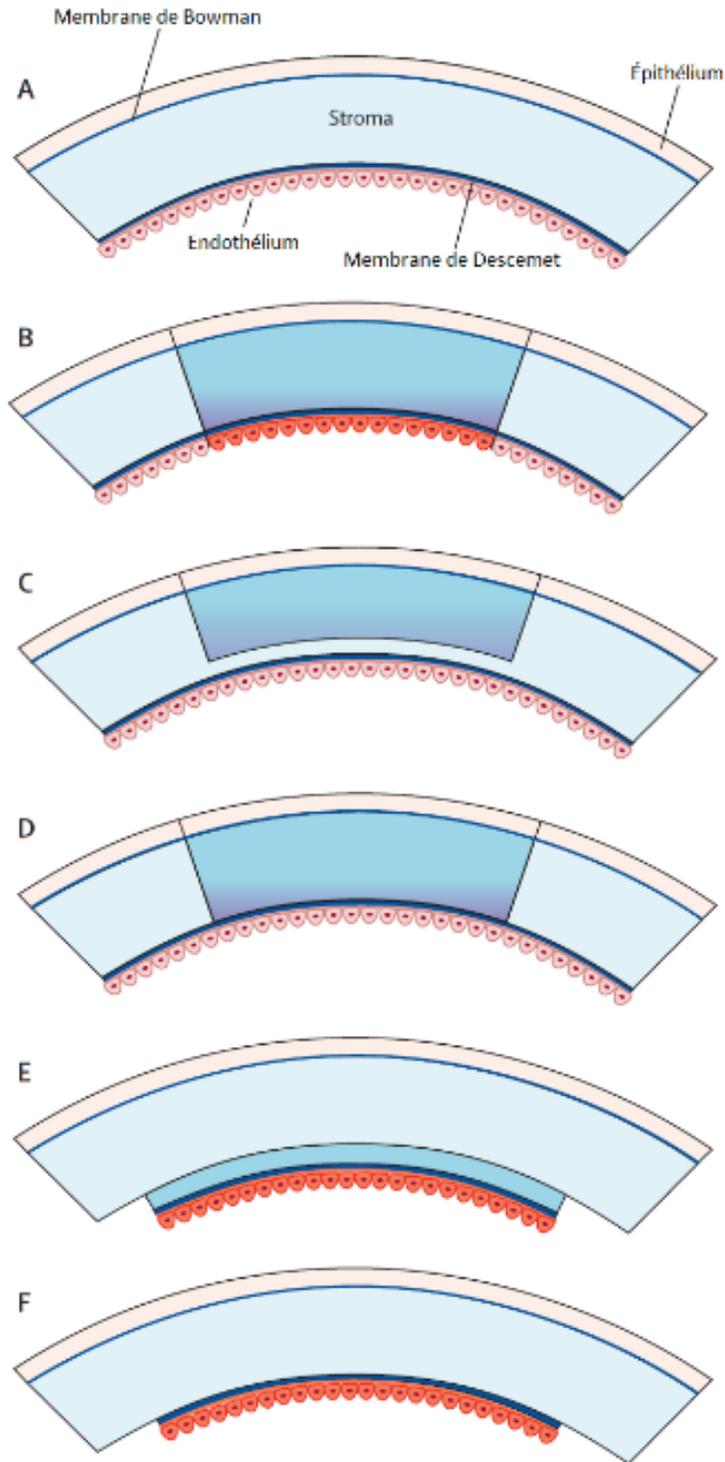


Figure 3. Les différentes techniques de kératoplastie utilisées fréquemment.

(A) Rappel des différentes couches de la cornée. (B) Kératoplastie transfixiante. (C) Kératoplastie lamellaire antérieure. (D) Kératoplastie lamellaire antérieure profonde. (E) Kératoplastie endothéliale avec stripping automatisé. (F) Kératoplastie endothéliale de la membrane de Descemet. Adapté avec l'autorisation de Tan et coll.⁹²

1.3.3 Kératoplastie lamellaire antérieure

Comme le nom l'indique, la kératoplastie lamellaire antérieure (ALK – *anterior lamellar keratoplasty*) permet de remplacer uniquement la partie antérieure de la cornée du patient receveur et ainsi de préserver son endothélium natif. Une variante de cette technique, la DALK (*deep anterior lamellar keratoplasty*), retire près de 95% de la cornée du receveur, pour ne laisser que la membrane de Descemet et l'endothélium. Ces chirurgies ont pour objectif de remplacer les cornées opacifiées par des dystrophies et des cicatrices qui n'affectent que la partie antérieure de la cornée, les ectasies cornéennes tel le kératocône qui sont associées avec un amincissement cornéen et certains troubles immunologiques comme l'arthrite rhumatoïde qui peuvent provoquer une fonte cornéenne.⁹² Comparativement à la PK, l'AKL et la DALK ont un très faible risque de décompensation endothéliale dû à la préservation de l'endothélium du receveur. De plus, parce qu'il s'agit de chirurgies de surface, elles ne peuvent pas provoquer de complication intraoculaire comme un œdème maculaire kystique, un décollement rétinien, une exacerbation du glaucome, une cataracte traumatique, une hémorragie choroïdienne ou une endophtalmie.¹⁰² Cependant, tout comme la PK, ces techniques peuvent provoquer un déficit épithélial persistant (l'épithélium du donneur étant souvent perdu durant l'opération), une kératite neurotrophique (nerfs cornéens sectionnés durant l'opération : regain de seulement 40% de la sensibilité cornéenne après 3 ans et peut induire une épithéliopathie chronique), une kératite bactérienne (5% des cas), et une importante réaction inflammation postopératoire (2% des cas de kératocônes).⁹² La PK, ALK et DALK peuvent induire un astigmatisme important (au moins 4 à 5 dioptries) chez 10% des cas, mais chez 15 à 50% des patients opérés pour le kératocône, l'astigmatisme irrégulier induit par l'opération peut être corrigé par des verres de contact.¹⁰³ De plus, l'ALK crée une interface stroma-stroma dans la cornée, ce qui nuit au pronostic visuel des patients, mais qui est potentiellement évité avec la DALK, qui elle a toutefois un plus haut risque de perforation de la membrane de Descemet.¹⁰⁴

1.3.4 Kératoplastie lenticulaire intrastromale

La kératoplastie lenticulaire intrastromale (*intrastromal lenticular keratoplasty* – ILK) est encore une technique expérimentale. Chez l'animal, on parle d'une technique par micro poche (micropockets) intrastromale.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ Chez l'humain, elle consiste à insérer un implant dans le stroma du receveur pour en augmenter le volume et la résistance. Ceci est théoriquement l'effet recherché

dans les cas d'ectasie cornéenne ou la cornée est dangereusement amincie. Les premiers essais en la matière ont été décrits en 2008 par Vajpayee RB et coll.¹⁰⁹ qui décrivent la TILK ("*Tuck In Lamellar Keratoplasty*") comme une méthode chirurgicale efficace pour le traitement des ectasies cornéennes périphériques, car elle permet de renforcer la cornée amincie des patients, dont ceux ayant déjà subi une PK qui souffrent d'un amincissement à la jonction de leur cornée native avec l'implant.¹¹⁰ Les greffons alors implantés dans le stroma étaient des cornées pleine épaisseur au centre avec une périphérie plus étroite. Ceci permettait de fournir un support structural important au centre de la cornée, mais également à la périphérie, au-delà de la jonction originelle entre la PK et la cornée du receveur. Dans le contexte d'une étude sur la biocompatibilité d'un implant cornéen, cette technique permet théoriquement de mesurer directement la réaction stromale du receveur en réduisant l'effet confondant des dommages épithéliaux, endothéliaux et dans la chambre antérieure que les PK et ALK peuvent induire.

Avec l'apparition de la technique SMILE (*Small Incision Lenticule Extraction*) pour la chirurgie réfractive, l'idée est venue d'utiliser le lenticule extrait durant l'opération pour l'insérer dans la cornée de patients avec une hyperopie importante,^{111, 112} chez les patients souffrant d'un ulcère ou une perforation cornéenne,¹¹³ ainsi que chez les patients dont la chirurgie LASIK (*laser-assisted in situ keratomileusis*) s'est compliquée d'une ectasie cornéenne.¹¹⁴ Les données de suivi dans ces dernières études montraient très peu ou aucun effet secondaire sur les receveurs, qui notaient même une amélioration de leur acuité visuelle 12 mois après l'opération. Ce type de chirurgie, dénommée FLISK (*femtosecond laser-assisted intra-stromal keratoplasty*), minimise aussi les perturbations de l'épithélium et de l'endothélium, mais maintient la forme et la courbure de la cornée sans nécessiter de points de suture, évitant ainsi une réponse agressive lors de la guérison de la plaie.¹¹⁵ En outre, cette chirurgie peut servir de procédure thérapeutique pour le remplacement de stroma natif endommagé, contrairement aux modèles d'insertion de micropoches dans lesquels le tissu natif n'est pas excisé, ce qui entraîne une perturbation de la réfraction et de l'architecture stromale, une plus grande inflammation et la nécessité de sutures chirurgicales et de stéroïdes postopératoires.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸

Peu importe la technique d'ILK, aucune donnée de suivi à très long terme (> 1 an) n'existe chez les humains ou animaux et il est donc difficile de bien en apprécier les limites.

1.4 La réaction cornéenne aux insultes et l'échec de greffe

1.4.1 Épithéliopathie

Comme mentionné précédemment, l'épithélium forme la partie antérieure de la cornée et lui sert de protection. Cependant, l'épithélium ne travaille pas seul et dépend également des glandes lacrymales et des paupières. La perturbation du fonctionnement de l'une de ces structures peut mener à un cycle vicieux d'inflammation et de dommages cellulaires qui doit être rapidement contrôlé au risque de chroniciser la pathologie de la surface oculaire.¹¹⁶

La perturbation de son organisation et les dommages cellulaires dans cette couche cellulaire sont souvent dus à des facteurs mécaniques (abrasion, érosion), comme dans le contexte de la kératoplastie. En fait, dans les ALK, DALK, et PK, l'épithélium du donneur est souvent perdu durant l'opération, mais le dommage épithélial peut s'étendre au-delà de la zone opérée à cause de la manipulation de l'œil et par le manque d'hydratation.³¹

À la suite d'une insulte aigüe, l'épithélium aux alentours de l'abrasion commence dans un premier temps à s'étendre et à migrer sans division cellulaire pour couvrir le déficit. En effet, grâce à la membrane extracellulaire, les cellules épithéliales en profondeur se déplacent vers le centre de la lésion tout en tirant sur leurs consœurs.¹¹⁷ Ce recouvrement initial peut se faire à un rythme de 60 à 80 µm par heure.¹¹⁸ Dans un second temps, après un laps de 24 à 30 heures, la division cellulaire mitotique des cellules souches, amplificatrices et basales permet la régénération d'un épithélium sain.⁴⁵

Cependant, une neuropathie épithéliale, des yeux secs et trop longtemps exposés, des infections (par exemple, la kératite herpétique), des brûlures chimiques ou thermiques peuvent tous mener à des bris ou un retard de réparation de la barrière épithéliale et exposer le stroma sous-jacent qui se trouve alors à risque d'ulcération, d'œdème, de néovascularisation et de fibrose.

1.4.2 Néovascularisation

La néovascularisation cornéenne a pour définition l'apparition et la prolifération de vaisseaux sanguins au niveau du stroma qui est normalement avasculaire. Ceci peut se produire en réponse à une agression tissulaire aigüe ou chronique : cette dernière est responsable d'une production locale élevée de facteurs proangiogéniques tels que le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ou le

bFGF (*basic fibroblast growth factor*).^{119, 120} Ayant pour dénominateur commun l'inflammation tissulaire, on retrouve, parmi les diverses pathologies qui en sont responsables, les séquelles de traumatismes et de brûlures, les complications des kératites infectieuses, certaines maladies inflammatoires chroniques de la peau et des muqueuses, le port excessif de lentilles de contact, certaines dystrophies cornéennes héréditaires et les suites de kératoplasties.¹²¹ La conséquence principale de la présence de néovaisseaux est une diminution de la transparence de la cornée. L'opacification stromale a alors pour cause la présence même des vaisseaux, la désorganisation du collagène entre ces derniers, l'exsudation intrastromale responsable de l'œdème et des dépôts de lipides autour des néovaisseaux et les possibles hémorragies intrastromales.¹²² De plus, l'arrivée de tels vaisseaux provoque un afflux important de cellules immunitaires, ce qui est un facteur déterminant dans le rejet de greffes.^{122, 123} Il s'agit donc d'un élément qu'il est important de quantifier lorsque l'on veut étudier le pronostic des greffes de cornées.¹²³

1.4.3 Échec de greffe

L'échec de greffe cornéenne est défini par la perte irréversible de la transparence et de la capacité réfractive du greffon cornéen, qui peut être médiée de façon immunitaire ou non. Le rejet immunitaire est la principale cause d'échec de greffe, représentant plus de la moitié des cas. Les infections non virales (10%), le glaucome (10%), la décompensation des cellules endothéliales (8%) et les infections herpétiques virales (7%) sont les autres importantes causes d'échec de greffes cornéennes.¹²⁴ De façon générale, 30% des cornées greffées présentent au moins un épisode de réaction immunitaire et un cinquième d'entre eux se conclut par le rejet du greffon.^{125, 126} Une cornée hôte avasculaire, non inflammé (qualifiée de greffe cornéenne à faible risque) peut espérer de nos jours un taux de survie à 5 ans de 90% avec seulement une immunosuppression topique.¹²⁷ Cependant, le taux de survie à 5 ans du greffon diminue considérablement jusqu'en deçà de 54.2% dans les cornées vascularisées et inflammée.¹²⁸

Chez ces patients « à haut risque », une transplantation cornéenne va plus souvent progresser vers un échec si elle subit une perte de sa clarté ou de sa puissance réfractive, un défaut d'épithélialisation conduisant à une ulcération stromale, ou une dégradation du tissu secondaire à une importante réaction inflammatoire.⁹² Comme mentionné ci-haut, ceci résulte généralement du rejet immunologique, mais peut également être dû aux effets délétères d'une pathologie sous-jacente qui reprend le dessus. En fait, certaines maladies cornéennes peuvent réapparaître après la

chirurgie : une kératite infectieuse récidivante,¹²⁹ une kératite neurotrophique post zona ophtalmique,^{130, 131} un déficit en cellules souches épithéliales comme on peut le voir chez les cas de brûlure chimique,¹³² etc. On sait également que les patients ayant les yeux secs, des allergies oculaires ou l'arthrite rhumatoïde sont plus à risque de déficits épithéliaux et d'ulcération.¹³³

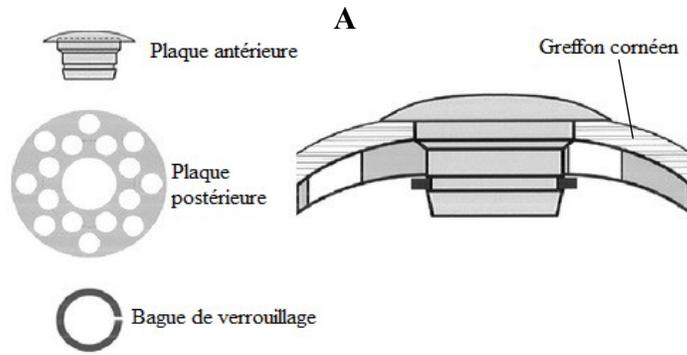
Les risques augmentent de plus belle chez certains patients qui subissent une greffe à des fins thérapeutiques (plutôt que réfractive) ou tectoniques. Des indications courantes pour les chirurgies thérapeutiques sont les infections ne répondant pas au traitement médical (comme la kératite fongique),¹³⁴ la guérison des ulcères et le soulagement de la douleur chez les patients atteints de kératopathie bulleuse.^{90, 135} Les greffes tectoniques sont souvent réalisées dans le contexte de globes perforés secondairement à un trauma, une infection ou une maladie inflammatoire. Ces cas cliniques sont souvent associés à d'importants troubles inflammatoires de la cornée et de la surface oculaire, à une sécheresse oculaire importante et à une malposition de la paupière.⁹² Ces greffes risquées sont ainsi tentées dans le but premier de diminuer les symptômes et de minimiser les risques associés à la progression naturelle de ces pathologies oculaires, plutôt que d'améliorer la qualité de la vision. Cependant, ces patients doivent souvent subir de multiples greffes cornéennes ou une première greffe n'est tout simplement pas tentée lorsqu'elle est jugée trop risquée pour le patient.

1.5 La kératoprothèse de Boston

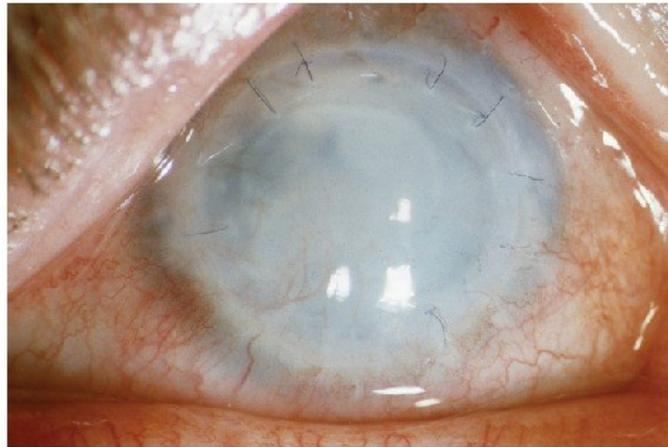
C'est dans ces cas compliqués que les kératoprothèses – ou cornées artificielles – deviennent une option. Différents modèles existent, mais c'est la kératoprothèse de Boston type 1 (KPro) qui est la plus utilisée dans le monde (**Figure 4**).¹³⁶⁻¹³⁸ Depuis sa création en 1968 par Dr Claes H. Dohlman et son approbation en 1992 par la FDA aux États-Unis, son design et la composition ont été optimisés à maintes reprises. Actuellement, un greffon cornéen d'un donneur est placé entre une plaque antérieure en PMMA – *Poly(methyl methacrylate)* – solide et une plaque postérieure en titane de 8,5 mm de diamètre percée à 16 endroits pour faciliter le support nutritionnel de l'humeur aqueuse, avec un anneau en titanium pour maintenir ses deux portions attachées ensemble et en place sur la cornée.¹³⁸

La KPro est surtout utilisée pour les patients qui ont eu un échec de greffe par PK, mais son usage est accepté également dans les cas d'aniridie, de brûlure chimique, de kératite herpétique, de maladie auto-immune et d'opacité cornéenne chez les enfants.¹³⁹ Après l'opération, ces patients peuvent alors espérer avoir une vision à long terme aux alentours de 20/200 sur l'échelle de Snellen (la normale étant de 20/20).¹⁴⁰ Cependant, malgré sa composition non organique, cet implant ne peut être installé que dans des yeux qui ont une fonction lacrymale normale. Si ce n'est pas le cas, il peut s'ensuivre une fonte stromale, avec une extrusion de l'implant, ce qui mène à un bris de la barrière cornéenne. L'intérieur de l'œil peut alors s'infecter (endophtalmie) et ainsi mener à sa perte totale.¹³⁸ Pour ces derniers patients, on peut alors considérer implanter une kératoprothèse de type 2 qui, elle, est installée à travers la paupière fermée.

De plus, même si l'implantation est un succès, l'entretien de l'implant, la prophylaxie antibiotique et le contrôle des effets secondaires – qui sont assez notables – deviennent une priorité.¹³⁸ En fait, l'amélioration souvent légère de la fonction visuelle des patients se fait au prix de complications assez importantes : 25 à 26,7% de membranes rétroprothétiques, 13,9 à 15% d'hypertonie (glaucome) oculaire post-chirurgicale, 17,8% de nécrose cornéenne stérile, 11,9% d'infiltrats cornéens, 8,9% d'endophtalmie, 5% de décollement de rétine, 4% d'hyalite aseptique et 3% d'œdème maculaire cystoïde.^{136, 141}



B



C

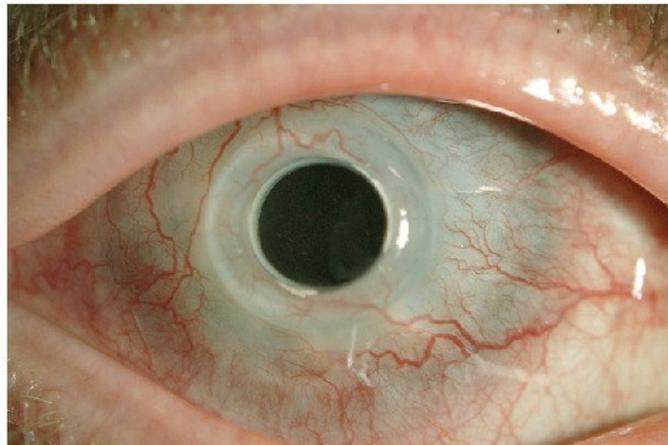


Figure 4. La kératoprothèse de Boston type 1

(A) Assemblage de la prothèse. (B) Patient avec échec de PK à la suite d'une infection à candida (C) 13 ans après l'implantation de la prothèse. Adapté de Cruzat et coll.¹⁴²

Tout le restant de leur vie, les patients doivent ainsi prendre des antibiotiques et des corticostéroïdes topiques (en gouttes) dans leur œil opéré, en plus de porter un verre de contact en tout temps. L'apparition ou la progression d'un glaucome étant une complication très fréquente des KPro et difficilement évaluable (la seule façon de prendre la pression intraoculaire après l'opération est de peser sur le globe avec son doigt); les patients doivent prendre des gouttes pour le glaucome en plus de leur régime habituel. En comparaison, les patients qui subissent une PK simple n'ont pas à porter un verre de contact, les antibiotiques prophylactiques sont nécessaires qu'à la première semaine postopératoire et les corticostéroïdes peuvent être cessés ou être poursuivis à faible dose après trois mois si aucune contre-indication n'existe.^{143, 144} On comprend donc que la KPro est en effet une solution de dernier recours pour les patients dont la cornée est incapable de tolérer un greffon humain normal. En fait, la littérature récente démontre que la KPro peut être plus bénéfique à long terme si elle implantée tôt lors d'un échec de greffe, plutôt qu'après de multiples échecs de PK.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ Cependant, cette prothèse demeure une solution suboptimale pour ces patients à haut risque. Bien que ceci représente un défi de taille, il leur serait grandement avantageux de pouvoir retrouver une vision normale grâce à des implants qui permettent la régénération de la cornée. En ce sens, la bio-ingénierie tissulaire se montre comme un domaine prometteur dans la recherche à une alternative aux greffes cornéennes conventionnelles.¹⁴⁹

1.6 Les substituts cornéens biosynthétiques

Des cellules souches capables de régénération sont présentes dans presque tous les organes du corps humain, y compris la cornée, mais leur travail est souvent limité à la suite d'une blessure ou une maladie. Le facteur limitant est souvent la matrice extracellulaire (MEC) qui est alors fréquemment remplacée par du tissu cicatriciel n'ayant pas l'intégrité structurelle requise pour la régénération d'une cornée fonctionnelle.¹⁵⁰ Le remplacement du tissu cicatriciel par une nouvelle MEC ou des biomatériaux imitant sa structure et sa fonction pourrait donc favoriser la régénération tissulaire.¹⁵¹

L'équipe de Griffith et coll. a récemment démontré dans des études cliniques que la transplantation d'une MEC cornéenne sans cellules faite à partir de collagène humain recombinant III (*recombinant human collagen* - RHCIII), réticulé (*crosslinked*) à l'aide de *1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide* (EDC)/*N-hydroxysuccinimide* (NHS), permettait la régénération de la cornée.^{152, 153} En effet, en 2014, l'équipe de May Griffith (Université de Linköping, Suède) a publié le suivi à quatre ans d'une étude clinique de phase 1 où, pour la toute première fois chez l'humain, des substituts cornéens biosynthétiques ont été implantés par ALK chez 10 patients. Ces implants de collagène III humain recombinant étaient demeurés fonctionnels et transparents durant toute la durée de l'étude. La microscopie confocale a également démontré qu'ils ont été recolonisés par les cellules et les nerfs de la cornée des patients receveurs, témoignant de la haute qualité de leur biointégration et permettant ainsi la régénération d'un tissu cornéen très similaire à la cornée native.¹⁵³ Les expériences chez l'animal démontrent en fait, qu'après 1 an, le collagène III des implants (normalement absent dans la cornée native) a entièrement été remplacé par le collagène I sécrété par les kératocytes des cornées hôtes, une première en médecine régénératrice de la cornée.¹⁵⁴

Cependant, ces implants de RHCIII ne faisaient au mieux que répliquer une cornée native qui est facilement dégradable par les collagénases des patients avec des pathologies inflammatoires de la cornée. Afin de répondre plus spécifiquement à cette condition, du *2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine* (MPC), aux propriétés anti-inflammatoires reconnues, peut être ajoutée aux implants (**Figure 5**).¹⁵⁵⁻¹⁵⁸ Deux essais cliniques ont ainsi été tentés chez des patients souffrant d'infection herpétique ou fongique, de brûlure cornéenne, de rejet de greffe ou de kératite neurotrophique, auxquels on a implanté un substitut cornéen composé de RHCIII-MPC.^{152, 159} Ces

implants ont été recouverts d'un épithélium après 6 semaines et sont demeurés exempts de néovascularisation durant la période d'observation d'un an, en plus de ne présenter aucun œdème, inflammation chronique ou infection. Ils avaient également une bonne transmission de la lumière (98,3%) et un très faible taux de diffusion (0%).¹⁶⁰ Cependant, comme beaucoup d'autres biopolymères de la MEC, le RHC est composé de grosses protéines difficiles à manipuler.¹⁶¹ La possibilité d'utiliser de petits peptides capables de s'autoassembler en nanofibres pour former une MEC a donc été examinée.¹⁶²

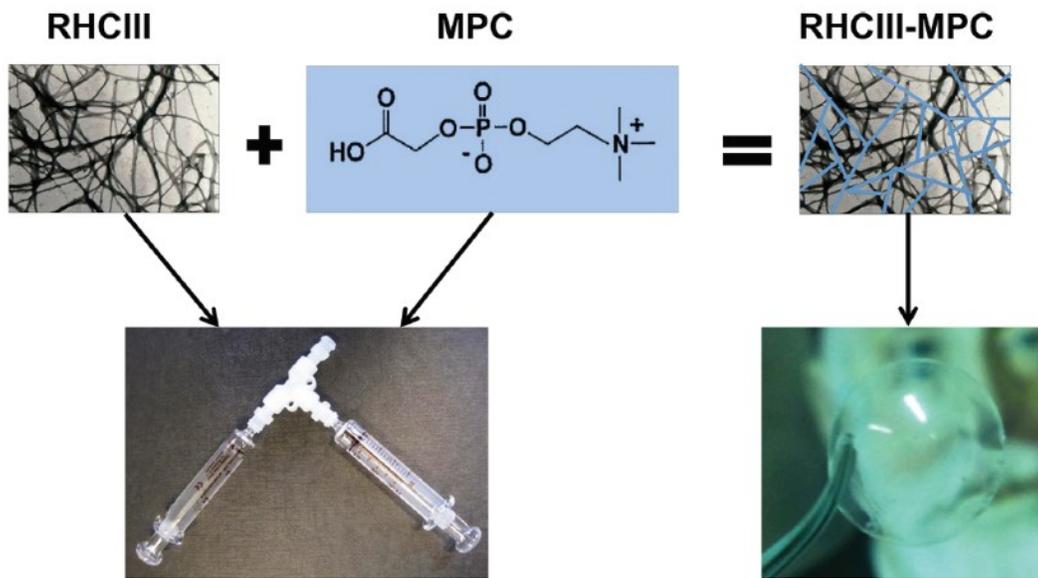


Figure 5. Schéma de la conjugaison du RHCIII-MPC formant un réseau interpénétrant.

Le RHCIII et le MPC ont été combinés à l'aide de seringues et l'hydrogel résultant a été modelé dans la forme d'un implant cornéen. Tiré de Buznyk et coll.¹⁵²

Les peptides apparentés au collagène (CLP – *Collagen-like peptide*) ont ainsi été étudiés comme une solution de remplacement au collagène, étant capables de s'autoassembler et de former des nanofibres à triple hélice à l'instar du collagène.¹⁶³⁻¹⁷¹ Le CLP originellement décrit par O'Leary et coll.¹⁶⁹ [Formule : (Pro-Lys-Gly)₄(Pro-Hyp-Gly)₄(Asp-Hyp-Gly)₄] s'autoassemblait sous la forme d'un hydrogel. Or, la transplantation cornéenne nécessite traditionnellement un composé solide étant manipulable à l'aide de pinces. En ajoutant un espaceur de glycine et une cystéine au peptide originel, ce dernier peut former des liens covalents avec le *multi-armed poly(ethylene glycol)* (PEG).¹⁶⁶ Ceci permet de donner aux structures générées avec ce peptide une consistance entre rigidité et flexibilité. Par la réticulation de cette nouvelle supramolécule avec de l'EDC dans un moule approprié, il est possible de générer un implant CLP-PEG en forme de cornée humaine.¹⁶¹

Ces implants étaient extrêmement résistants à des concentrations très élevées de collagénases (5 U/ml) en comparaison aux implants de RHC qui se dégradait en moins de 50 heures lorsque soumis au même test.¹⁶¹ Un an après la transplantation par ALK de ces implants dans la cornée de porc, les analyses et imageries démontraient la présence d'un épithélium et d'un stroma régénéré (composé de collagène I et V, non présents au départ), ainsi que de nerfs de morphologie similaire à une cornée normale.¹⁶¹ Enfin, ces implants avaient une transmission de la lumière similaire ($92,4\% \pm 0,95\%$) à celle des cornées humaines ($87,1\% \pm 2,0\%$), mais une composante hydrique ($91,65\% \pm 1,10\%$) bien au-delà des cornées humaines (78%).¹⁶¹

Tous les implants solides décrits plus haut devaient, pour être bien intégrés à la cornée de l'hôte après une ALK, être maintenus en place par des sutures pendant environ 6 semaines chez les patients à faible risque¹⁷² et jusqu'à 11 semaines chez les patients à risque élevé.¹⁵² Chez ces deux types de cas, des sutures sus-jacentes avaient été utilisées, car les implants n'étaient pas suffisamment robustes pour passer l'aiguille et le fil directement à travers.¹⁵⁴ Cependant, des zones de dommages focaux avec un amincissement de l'implant ont été décelées au centre des cornées opérées, correspondant à l'empreinte de l'intersection des points de suture sur la surface cornéenne. La présence de sutures serrées avait également retardé l'épithélialisation, créant un déficit épithélial, une réponse inflammatoire, un amincissement de l'implant et une cicatrisation avec invasion locale de fibroblastes. Cet amincissement localisé rendait ainsi la surface cornéenne irrégulière (astigmatisme irrégulier), ce qui a nécessité la mise en place de lentilles de contact rigides pour permettre aux patients d'avoir une meilleure acuité visuelle.¹⁷² D'autres problèmes ont également été relevés par l'analyse topographique des cornées opérées plusieurs années après le retrait des sutures : en plus de l'astigmatisme irrégulier, le centre des cornées (délimité par le patron des anciennes sutures en surjet) était souvent bombé vers l'avant et leur partie supérieure était généralement aplatie par la paupière supérieure.¹⁷³

Dans ce contexte, l'équipe de Griffith et coll. a comparé les résultats postopératoires après 12 mois d'implantation de substituts cornéens RHCIII maintenus en place soit par des sutures en surjet (*overlying sutures*), soit par des sutures perforantes interrompues, deux techniques couramment utilisées en greffe de cornée.¹⁵⁴ Chez les greffés cornéens, les sutures continues sont le plus fréquemment utilisées, mais dans les cas à haut risque, les sutures interrompues sont jugées préférables, car une rupture de suture entraîne moins de risque de déhiscence et une seule suture doit être remplacée.¹⁵⁴ La seule différence qui a été notée, à travers des implants de différentes

concentrations de RHCIII et avec ou sans une membrane amniotique humaine (aux propriétés anti-inflammatoire, anti-cicatrice et anti-angiogénique reconnues)¹⁷⁴, a été que les sutures individuelles induisaient plus de néovascularisation de la cornée.¹⁵⁴ Or, pour éviter les complications secondaires à l'utilisation des points de suture, il est en fait possible de profiter des effets déjà bien étudiés de la réticulation du collagène grâce à l'irradiation de rayons ultraviolets A (UV-A) sur des implants imbus de riboflavine (vitamine B2).¹⁷⁵

La réticulation cornéenne induite par la riboflavine – UV-A est actuellement un des traitements acceptés pour le kératocône. De nombreuses études ont démontré que ce type de réticulation augmente la stabilité biomécanique de la cornée à long terme ainsi que sa résistance aux collagénases,¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ ce qui serait dû à l'augmentation du diamètre des fibres de collagène dans le stroma antérieur.¹⁷⁹ Au niveau biochimique, ceci s'explique par la production de radicaux libres (réaction photochimique de type I) ou d'oxygène singulet (réaction de type II) par la riboflavine qui interfèrent avec les acides aminés du collagène ce qui conduit à des liaisons covalentes intrafibrillaires et interfibrillaires.¹⁷⁵ C'est une procédure normalement sans risque important, tant que l'irradiation ne dépasse pas le seuil cytotoxique des kératocytes ou de l'endothélium.¹⁸⁰⁻¹⁸² Une limite potentielle à la technique, cependant, est que l'effet de la réticulation se fait surtout dans les 200 µm antérieurs du stroma (où 65% des rayons UV-A sont absorbés), avec un effet moindre, mais toujours notable, jusqu'à 400 µm de profondeur.¹⁷⁵

Lorsque tenté sur des yeux *ex vivo* de porc et de lapins, la réticulation d'implants RHCIII par UV-A et par la riboflavine avait pour effet de réduire significativement le volume des implants (supposément par rapprochement des fibres de collagène réticulées) et de fixer l'implant au stroma hôte par la formation de liens entre les implants biosynthétiques et la cornée du receveur.¹⁷⁵ Ceci promettait donc d'éliminer les effets néfastes induits par les sutures, sans toutefois venir à bout de l'astigmatisme, des irrégularités de la surface et de la forme imparfaite des implants, limites inhérentes à la nature solide de ces implants.¹⁷³ La forme des implants est d'ailleurs d'une importance capitale, car, rappelons-nous, la cornée est le tissu de l'œil qui est responsable de la plus grande part de sa puissance réfractive et donc de l'acuité visuelle. Les chirurgiens ont actuellement atteint un plateau en ce qui a attiré à l'optimisation de la transplantation cornéenne traditionnelle de tissu natif.¹⁸³ L'utilisation d'implants biosynthétiques épousant la forme de la cornée hôte pourrait enfin venir à bout de ces limitations et améliorer grandement le pronostic visuel.

En sommes, au fil des années, plusieurs variations des implants biosynthétiques ont été analysées, dans des yeux animaux ou humains : le collagène porcin (*porcine collagen* - PC),¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ le RHCIII,^{153, 186} le CLP-PEG,^{161, 187} ainsi que les implants réticulés avec du MPC.^{157, 159, 160, 188} Les avantages de la production de tels implants sont nombreux : la réduction potentielle de la pénurie de cornées dans le monde, le contrôle de la qualité et de la stérilité, la production à faible coût, ainsi que l'absence de rejet immunologique de ces implants acellulaires.¹⁷² À ceci s'ajoute la possibilité de personnaliser leur forme afin d'offrir une meilleure acuité visuelle postopératoire et d'y incorporer les dernières avancées en biomatériaux, notamment les revêtements de surface et les nanoparticules, qui permettraient de protéger davantage la cornée opérée contre les collagénases, les infections et la néovascularisation.¹⁸³

1.7 Le choix du modèle animal

L'utilisation d'un modèle *ex vivo* de cornées humaines permet une appréciation anatomiquement et physiquement similaire à la cornée vivante, mais dans une optique à court terme seulement. Afin de faciliter le transfert des résultats de recherche aux patients, un modèle animal demeure idéal pour le développement et l'optimisation des techniques d'évaluation des implants biosynthétiques et se doit d'avoir des caractéristiques cornéennes anatomiques et physiologiques similaires à celles des humains, être facilement manipulable et être disponible à un prix acceptable.

1.7.1 Rongeur et lapin

La souris et le rat sont les animaux les plus utilisés en recherche.¹⁸⁹ En ophtalmologie, comme dans bien des domaines, ce modèle animal est principalement utilisé en recherche fondamentale. Toutefois, ce dernier se prête mal à la chirurgie cornéenne et aux examens de l'œil avec des outils standardisés pour l'humain à cause de la petite taille de leurs yeux, qui est d'environ 6-7 mm de diamètre chez le rat, soit le tiers de la taille d'un œil humain adulte.¹⁹⁰

Les dimensions des yeux des lapins sont comparables à celles des humains. Le diamètre cornéen est d'environ 15 mm sur l'axe horizontal et 14 mm sur l'axe vertical,¹⁹¹ permettant l'utilisation des mêmes instruments chirurgicaux que chez les humains.¹⁹² Cependant, la cornée du lapin est beaucoup moins rigide que la cornée humaine et plus fine avec une épaisseur autour de 400 μm ¹⁹³ (550 μm chez l'humain),^{31,39} ce qui peut rendre les chirurgies cornéennes plus difficiles. De plus, ces cornées cicatrisent de façon plus agressive et sont nettement plus susceptibles à la néovascularisation,¹⁹⁴ ce qui pourrait potentiellement masquer l'évolution de l'implant.

Toutefois, les cellules endothéliales des rongeurs et des lapins, après un dommage tissulaire, peuvent entrer en mitose et proliférer pour recouvrir la région endommagée.^{192,195} Cette caractéristique les distingue des cornées humaines et limite les conclusions qui peuvent être tirées des études de transplantations cornéennes réalisées grâce à ces modèles animaux.

1.7.2 Primate non humain

Les primates non humains partagent de nombreuses similarités avec l'humain et apparaissent comme un modèle idéal de pathologie clinique. En recherche en sciences de la vision, les espèces qui ressemblent le plus au modèle humain sont les macaques rhésus (*Macaca mulatta*) et les singes

cynomologus (*Macaca fascicularis*).¹⁹⁶ Leurs dimensions cornéennes sont très proches de celles des humains, avec un diamètre de 9,8-10,6 mm et une épaisseur centrale de 470-550 µm. Cependant, le grand obstacle à l'utilisation de ce modèle en Amérique du Nord réside en son coût très important (achat, livraison, hébergement à long terme) et en sa disponibilité très limitée.^{196, 197}

1.7.3 Porc

Le modèle porcin a largement été employé dans le cadre d'études d'optimisation de techniques de kératoplastie et de chirurgies réfractives cornéennes,¹⁹⁸⁻²⁰¹ sa cornée étant grande avec un diamètre de 12,5 par 14,5 mm, mais aussi beaucoup plus épaisse (665 à 880 µm) que la cornée humaine.^{202, 203} Plusieurs aspects limitent cependant l'utilisation du modèle porcin : sa manipulation difficile, tant pour l'intervention chirurgicale que pour le suivi à la lampe à fente, son plus grand risque de complications anesthésiques et sa propension à engendrer une inflammation intraoculaire postopératoire importante.¹⁹⁸ En fait, dans une étude de notre laboratoire comparant la greffe transfixiante chez le modèle porcin versus félin, les greffes ont montré, en postopératoire, une transparence moyenne inférieure chez le porc à $0,88 \pm 0,99$ sur 4 contre $3,93 \pm 0,19$ sur 4 chez le modèle félin, un œdème plus marqué chez le porc (préop : postop = 671 ± 93 : 1198 ± 246 µm) que chez le félin (606 ± 77 : 671 ± 95 µm) et une cicatrisation stromale au pourtour de l'implant et le long des points de suture chez le porc uniquement.¹⁹⁸

1.7.4 Félin

Le modèle félin est couramment utilisé dans la recherche en sciences de la vision, notamment en greffes cornéennes²⁰⁴⁻²⁰⁷ et en transplantation de greffons cornéens issus du génie tissulaire, une autre forme de greffe cornéenne biosynthétique.^{208, 209}

Le félin présente une anatomie et une physiologie cornéenne similaire à l'humain. Son œil est assez grand, avec une cornée de 15,5-18 mm de diamètre.²¹⁰ L'épaisseur de sa cornée se situe autour de 545-650 µm.²¹⁰⁻²¹³ Sa pression intraoculaire est évaluée à environ $22,6 \pm 4$ mmHg.¹⁹⁴ De plus, tout comme chez l'humain et le primate, les cellules endothéliales du félin n'ont pas de capacité de réplication *in vivo* et le décompte endothélial, en décroissance progressive tout au long de la vie de l'animal, est de l'ordre de 2300 à 2900 cellules/mm²,²¹⁴⁻²¹⁶ ce qui est très similaire à l'humain.²¹⁷ Enfin, le seuil de sensibilité cornéenne des félins est de 0,4 g/mm² au centre de la cornée et de 1,7

g/mm² en périphérie,¹⁰⁸ contre 0,5 g/mm² au centre de la cornée et 0,55 g/mm² en périphérie chez l'humain.²¹⁸

Ce modèle animal est moins coûteux que le primate et plus facilement manipulable que le cochon. De plus, il s'agit d'un modèle avec lequel notre laboratoire a développé une expertise, avec plus d'une centaine de félins utilisés dans le cadre de projet de recherche en cornée. Ce modèle animal est donc une option avantageuse sur bien des aspects et c'est pourquoi il a été choisi comme modèle *in vivo* pour le projet actuel, bien que ce soit la première fois qu'une implantation de substituts cornéens biosynthétiques soit tentée sur ce dernier.

1.8 Imagerie spécialisée

Afin de recueillir des données de qualité sur les cornées des animaux opérés, certains outils de mesures ont dû être adaptés pour leur utilisation chez l'animal. De plus, pour évaluer les implants chez l'animal vivant, il a fallu développer des méthodes d'imagerie et de quantification non invasives. Voici ici-bas quelques outils qui peuvent s'ajouter à l'arsenal usuel des suivis cliniques des cornées animales.

1.8.1 Quantification de la transparence cornéenne

Comme expliqué plus haut, la transparence cornéenne est un paramètre fondamental à la fonction visuelle et son évaluation objective et détaillée est donc hautement pertinente.

Le Pentacam (Oculus, Inc., Wetzlar, Germany) est un appareil de mesure ophtalmologique alliant la lampe à fente et une caméra rotative permettant la prise de mesures précises de la partie antérieure de l'œil grâce au principe de Scheimpflug (**Figure 6**).

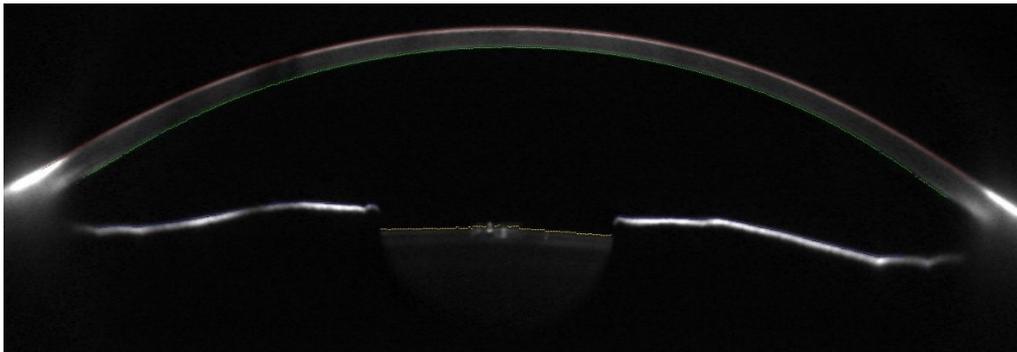


Figure 6. Coupe du segment antérieur telle que donnée par le Pentacam HR™.

Puisque les composantes de l'œil ne sont pas parfaitement transparentes, elles provoquent une dispersion de la lumière émise par l'appareil. Ce dernier capte alors la lumière qui lui revient (*backscattered light*) et ceci qui lui permet de calculer, entre autres, la densité cornéenne (une densité nulle aurait une transparence parfaite). En fait, le Pentacam détermine le taux de dispersion lumineuse et ce taux est automatiquement transformé en une échelle de 0 à 100 GSU (*gray scale units*), où un indice de 0 indique une densité nulle et de 100, une densité maximale.⁷⁸ Ainsi, plus la densité d'un milieu est faible, moins ce dernier a tendance à absorber ou à réfléchir la lumière et la transparence est alors maximale, comme c'est le cas dans une cornée normale. L'indice de densité donne donc une indication de la transparence de la cornée.⁷⁹ Autrement dit, puisque le

Pentacam mesure originellement la dispersion lumineuse, il donne en fait la mesure de l'opacité du milieu, qui est inversement proportionnelle à la transparence, beaucoup plus qu'il en donne la densité (masse/volume) au sens propre du terme. Il est aussi à noter que l'appareil ne mesure pas la lumière dispersée postérieurement et réfléchi sur la rétine (*forward-scattered light*) pouvant causer des halos, de l'éblouissement²¹⁹ et une diminution des performances visuelles dans des conditions lumineuses ambiantes défavorables.²²⁰ Toutefois, puisque des perturbations dans l'arrangement des structures cornéennes peuvent provoquer une dispersion lumineuse tant vers l'avant que vers l'arrière, le Pentacam peut théoriquement donner une idée de grandeur de cette dernière.²²⁰

1.8.1.1 Utilisation actuelle de la méthode

Actuellement, la méthode la plus utilisée autant en clinique et qu'en recherche pour quantifier la transparence cornéenne est une échelle semi-quantitative allant généralement de 0 à 4, où 4 est une transparence parfaite. Afin de vérifier si la densitométrie du Pentacam peut remplacer de façon cohérente la méthode traditionnelle à la lampe à fente utilisant une échelle semi-quantitative, quelques études ont, en parallèle de leur but principal, pratiqué les deux types de mesures et il a été conclu que les résultats étaient assez similaires pour que le Pentacam soit utilisé pour faire une mesure objective de la transparence.^{221, 222} Ainsi, bien que le principe de Scheimpflug soit connu et utilisé depuis de nombreuses années pour quantifier la transparence cornéenne,²²³ l'usage de technologies plus récentes, comme celle du Pentacam, a permis de faciliter et de standardiser la prise de cette mesure. Celle-ci sert maintenant, entre autres, à identifier et évaluer les infiltrats cornéens,^{79, 224} l'opacité (*haze*) subépithéliale et la cicatrisation du stroma suite à une chirurgie réfractive^{225, 226} ou un CXL (*Corneal collagen cross-linking*),²²² et la transparence de la cornée des patients souffrant de diverses pathologies telles une kératite⁷⁹ ou une mucopolysaccharidose.²²¹ Toutefois, la dispersion lumineuse mesurée par le Pentacam ou la lampe à fente (*backscattered light*) ne semble avoir qu'une faible corrélation avec l'acuité visuelle à haut contraste, telle que testée sur le tableau de Snellen.^{219, 222} Cette dernière est surtout influencée par les aberrations et déformations cornéennes²²⁰ ou par des microremaniements, survenant par exemple suite à un CXL.²²² Ceci dit, une amélioration de la transparence cornéenne peut être corrélée avec une amélioration de l'acuité visuelle, comme on peut le voir suite à une DSAEK (*Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty*),^{227, 228} mais cela serait plutôt signe d'un rétablissement global

des structures cornéennes et non d'un phénomène de cause à effet. Il est aussi à noter qu'à ce jour, aucune étude n'a cherché à mesurer la densité cornéenne à l'aide du Pentacam dans le contexte d'une greffe d'un implant biosynthétique. Ceci pourrait s'avérer particulièrement utile, afin de quantifier la différence et la progression de la transparence en postopératoire.

1.8.2 La tomographie en cohérence optique

La pachymétrie aux ultrasons est une méthode fréquemment utilisée en ophtalmologie pour mesurer l'épaisseur totale de la cornée. La tomographie en cohérence optique (OCT : *Optical Coherence Tomography*) est une technique non invasive et sans contact basée sur l'interférométrie à faible cohérence.^{229, 230} Son usage est également très répandu en ophtalmologie, notamment grâce à la reproductibilité et à la très grande résolution des coupes transversales des tissus oculaires qu'elle permet de produire.²³¹ L'OCT 930 SR (Thorlabs, Inc., Newton, États-Unis), utilisé par notre équipe, produit des images en coupe transversale de la cornée avec une grande résolution (2000x512 pixels; 6000x1300 μ m). Ceci permet d'analyser qualitativement l'inflammation et l'homogénéité cornéenne (facteur d'évaluation important de la biointégration des implants), mais, surtout, il offre une méthode beaucoup plus détaillée de la mesure de l'épaisseur cornéenne (**Figure 7**) et des implants que la technique traditionnelle aux ultrasons, car on peut quantifier l'épaisseur des tissus couche par couche.

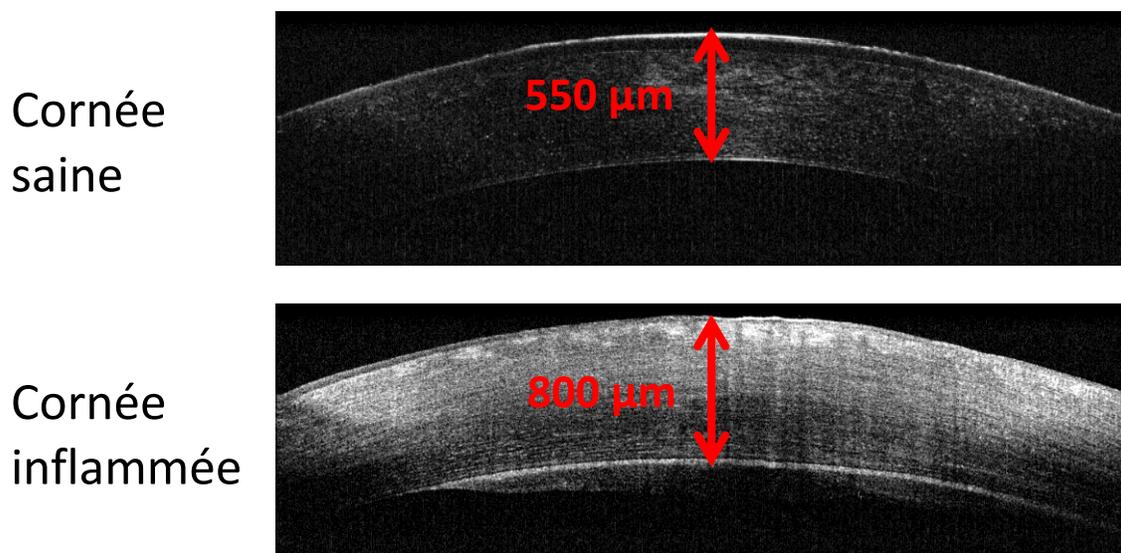


Figure 7. La mesure de l'épaisseur cornéenne par l'OCT.

L'OCT permet de voir l'impact de l'inflammation cornéenne avec beaucoup de détails.

1.8.3 Quantification de la néovascularisation

Comme mentionné plus haut, une complication possible des greffes de cornée est l'apparition de néovascularisation qui accompagne l'inflammation. Dans le contexte où l'on désire mettre au point des implants qui limitent ou résistent à cette inflammation, une quantification précise d'une de ses conséquences (la néovascularisation) permettrait de mieux évaluer la réponse cornéenne à l'implant.

Il existe de nombreuses méthodes pour effectuer une telle mesure, notamment en imagerie cornéenne, où l'on retrouve la photographie couleur, l'angiographie à la fluorescéine (FA : *Fluorescein angiography*) ou à l'indocyanine (ICGA : *Indocyanine green angiography*)²³² et la microscopie confocale *in vivo*.¹²⁰ Parmi celles-ci, l'angiographie est, de loin, la méthode la plus efficace pour mesurer la néovascularisation, car elle permet, par la fluorescence des vaisseaux, de photographier directement et uniquement le tissu désiré. Or, il n'existe présentement aucun appareil dédié à l'angiographie de la cornée. Cependant, il est aisé de prendre un appareil conçu pour l'angiographie de la rétine et d'ajuster la mise au point pour être capable de réaliser une image à haute définition des vaisseaux de la cornée. Le HRA (Heidelberg Retina Angiography; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) était disponible à l'HMR pour utilisation sur l'animal et il a été possible de réaliser ces ajustements. Son utilisation était donc la méthode la plus accessible et la plus efficace pour notre équipe de recherche. Cet appareil peut faire à la fois l'angiographie à la fluorescéine et à l'indocyanine, mais, pour des raisons budgétaires, il était préférable d'utiliser la fluorescéine. Après l'injection intraveineuse périphérique de fluorescéine, le HRA prend une vidéo en niveaux de gris (vaisseaux remplis de fluorescéines apparaissant en blanc) de la cornée, ce qui permet de garder la meilleure image de la séquence, de la transformer en image binaire avec le seuil adéquat et d'obtenir le rapport précis entre le nombre de pixels blancs (les vaisseaux sanguins) et noirs (la cornée avasculaire) dans la zone d'intérêt choisie (**Figure 8**).²³² Cette méthode offre ainsi une mesure en pourcentage fiable, objective et reproductible. Dans le cas où la prolifération des néovaisseaux ne serait pas uniforme partout autour de la cornée, il est aussi possible de séparer la zone d'intérêt en quadrants.

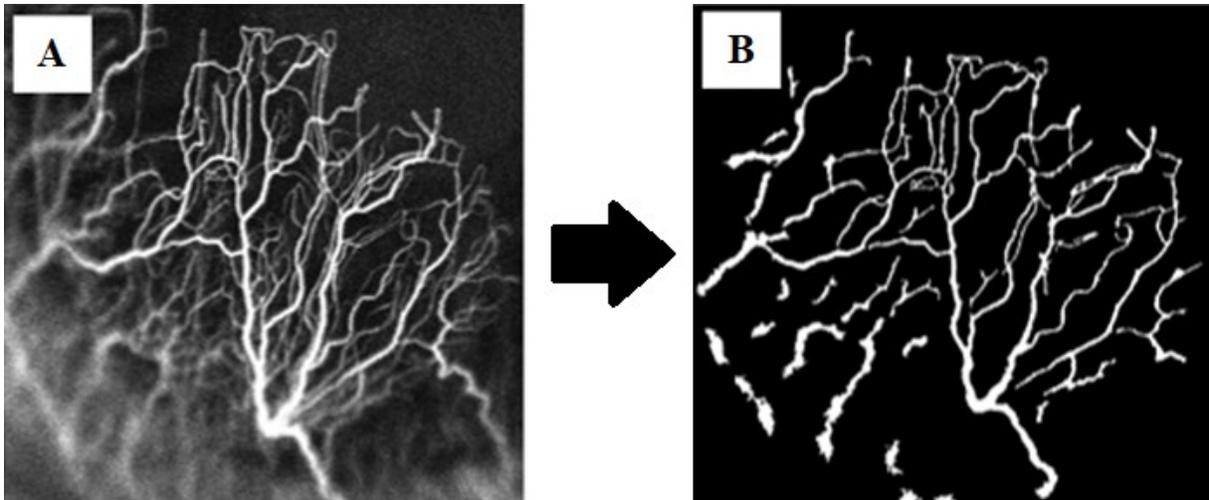


Figure 8. Processus de l'analyse de l'angiographie.

Transposition de l'image originale en niveaux de gris (A) dans un format utilisable (binaire – B) pour des analyses statistiques. On voit ici qu'un ajustement trop agressif du seuil de niveau de gris provoque la perte des vaisseaux profonds qui sont en dehors de la mise au point. Adapté avec l'autorisation de Brunner et coll.²³³

1.8.4 Quantification de la repopulation et réinnervation cornéenne

En microscopie optique traditionnelle, la lumière réfléchie des structures autour du point d'observation peut obscurcir l'image en diminuant le contraste final de l'image. Ceci a pour effet de limiter grandement la résolution des images à grand grossissement sur le biomicroscope de la lampe à fente, l'observation des cellules de la cornée étant déjà difficile puisqu'elle ne reflète qu'à peu près 1 % de la lumière incidente. C'est ici qu'intervient la microscopie confocale : en donnant à la lumière incidente et à la lumière observée le même point focal (d'où le nom de « confocal »), on augmente énormément la résolution des images et la capacité de grossissement en éliminant la lumière parasite autour du point d'observation (**Figure 9**).²³⁴ Un appareil comme le Confoscan 3 (Nidek, Inc., Fremont, CA), permet ainsi de photographier des coupes coronales à la profondeur voulue d'un milieu transparent comme la cornée et d'y voir, avec grande précision (région visible = 379x286 μm^2), les structures cellulaires de la surface cornéenne à l'endothélium²³⁵, soit l'épithélium, les nerfs et les kératocytes (**Figure 10**).¹⁵³

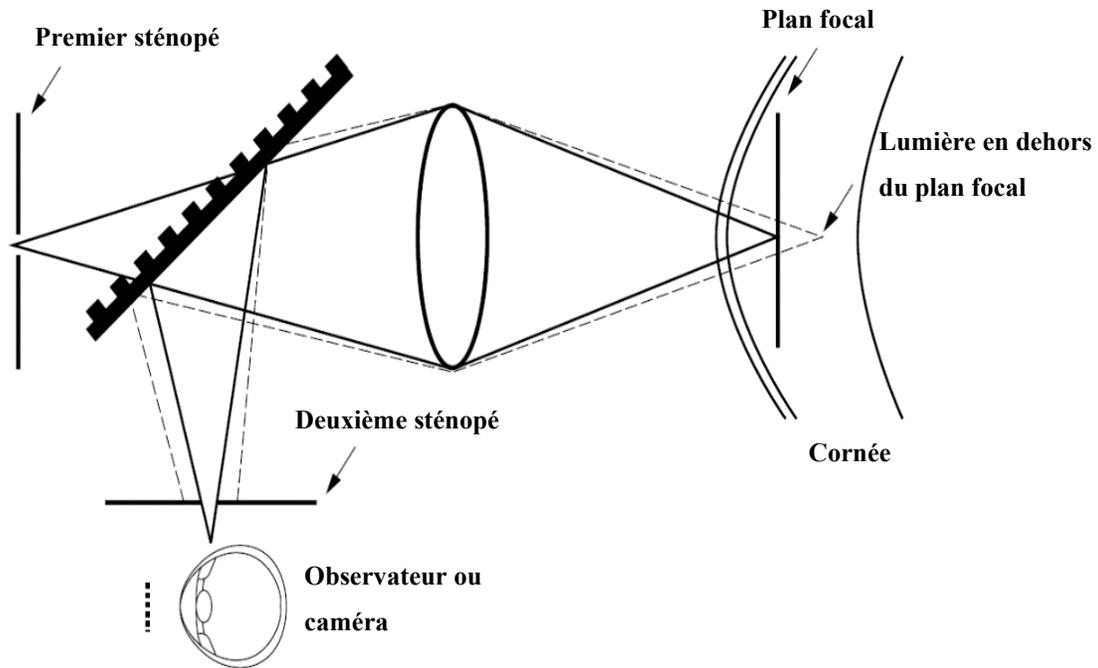


Figure 9. Principe de la microscopie confocale.

Le point focal commun à lumière incidente et observée permet d'éliminer la lumière parasite. Adapté avec l'autorisation de Jalbert et coll.²³⁴

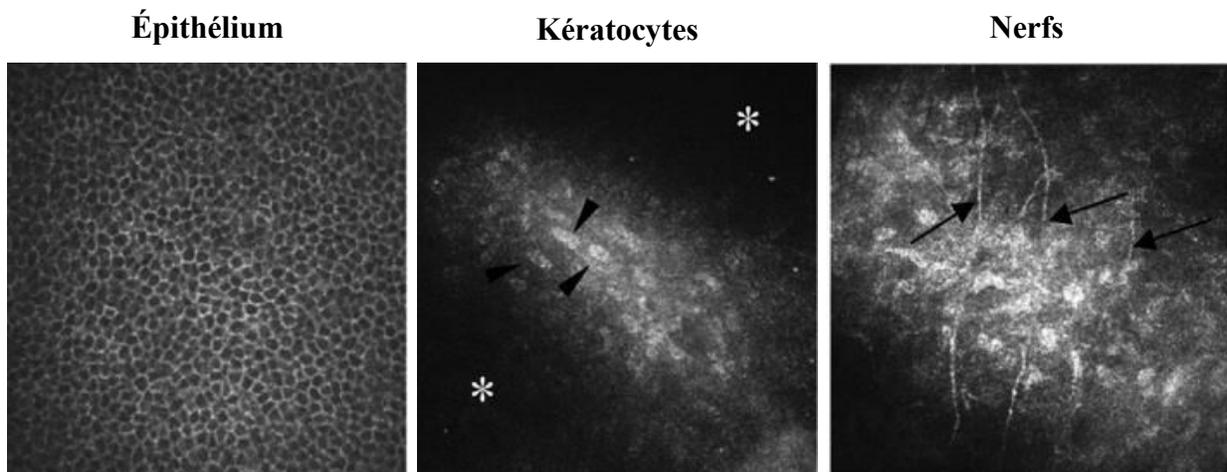


Figure 10. Exemples d'images obtenues à l'aide d'un microscope confocal *in vivo*.

Le microscope confocal permet de bien voir l'épithélium, les kératocytes (têtes de flèches noires) qui migrent dans la matrice biosynthétique (astérisques blancs) et les nerfs cornéens (flèches noires). Adapté avec l'autorisation de Fagerholm et coll.¹⁵³

2 – Objectifs

2.1 Objectif principal

Établir, perfectionner et mettre à l'épreuve un programme d'évaluation clinique de la biocompatibilité et de la performance de substituts cornéens biosynthétiques, de leur confection en laboratoire à leur implantation chez l'animal, en vue de leur utilisation chez l'humain.

2.2 Objectifs secondaires

Tester différentes formulations d'implant cornéen liquide afin de déterminer celle qui est facilement manipulable et injectable en salle d'opération, qui se solidifie, qui s'intègre à la cornée hôte et qui conserve sa morphologie durant une période d'un mois.

Évaluer l'évolution postopératoire de différents implants solides implantés *in vivo* dans la cornée du félin afin de vérifier que leur biocompatibilité est adéquate et comparable aux autres modèles animaux déjà testés, et ainsi préparer le terrain pour l'analyse des implants liquides chez l'animal.

Par l'amélioration de la qualité et de la quantité des données recueillies sur les sujets de recherche, permettre un raffinement et une réduction du nombre total de sujets nécessaires lors d'études ultérieures qui demanderont d'autres sujets animaux ou des patients humains.

3 – Matériel et méthodes

Une bonne part du projet actuel étant de nature expérimentale, de nombreux protocoles ont évolué en cours d'expérimentation. Dans la section actuelle ne sera présentée que la version finale de chacune des diverses techniques utilisées. Cependant, la section des résultats plus bas retracera de façon plus détaillée l'historique des modifications apportées aux protocoles en cours de projet.

3.1 Substituts solides dans la cornée animale *in vivo*

3.1.1 Implants

Les différents implants solides analysés dans cette étude ont été produits comme décrits dans les précédentes études du groupe Griffith et coll. : le PC,¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ le CLP-PEG,^{161, 187} et la réticulation du MPC.^{157-160, 188} Brièvement, le CLP composé de Cys-Gly-(Pro-LysGly)₄(Pro-Hyp-Gly)₄(Asp-Hyp-Gly)₄ fut synthétisé (UAB Ferentis, Vilnius, Lituanie), mélangé à du MPC (Paramount Fine Chemicals Co. Ltd., Dalian, Chine) et conjugué à un maléimide de PEG à 8 bras de 40 kDa (Creative PEG Works, NC, ÉU) en remuant continuellement dans du ddH₂O à pH de 4,5 pour 2 jours à un ratio molaire de 32 :1. Puis, il fut dialysé contre de l'eau distillée en utilisant des tubes avec un seuil de coupe nominal de 12 à 14 kDa pendant 2 à 3 jours avant la lyophilisation. 500 mg de solution à 8,6 % (p/p) de CLP-PEG préparée ont été réticulés avec EDC et NHS à des équivalents molaires de CLP-PEG-NH₂:EDC (1 : 2) et à un rapport molaire égal d'EDC:NHS. Tous les réactifs ont été moulés en feuilles plates de 1 x 1 cm et de 210 ± 10 µm.¹⁸⁷

3.1.2 Population

Toutes les expérimentations ont été conduites en respectant les recommandations de l'ARVO sur l'utilisation des animaux en recherche ophtalmologique et en suivant les lignes directrices établies par le comité de protection des animaux de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Dès leur arrivée à l'animalerie et pour toute la durée de l'étude, les animaux ont reçu une dose orale de famciclovir prophylactique (125 mg DIE; Famvir; PMS, Montreal, QC, Canada) contre le virus de l'herpès félin 1 (FHV-1), présent de façon endémique chez presque 50% des chats adultes.²³⁶

Au total, 4 cornées d'animaux adultes *in vivo* ont été opérées dans le cadre de cette étude (ces animaux seront dorénavant numérotés comme suit : F1 à F4). L'œil droit était choisi par défaut

pour la chirurgie, alors que l'œil gauche faisait office de contrôle. L'œil gauche de F4 a cependant été préféré pour la chirurgie, car son œil droit présentait un léger amincissement stromal au niveau d'un emplacement privilégié pour la chirurgie, soit en temporo-supérieur.

Les deux premiers animaux (F1 et F2) ont bénéficié d'une ALK unique. Les deux derniers animaux (F3 et F4) ont bénéficié d'une double ILK: un implant a été installé en temporal inférieur et un autre en nasal supérieur (ou en supérieur). Les caractéristiques des animaux, chirurgies et implants sont listées ici-bas (**Tableau 1**).

Tableau 1. Répartition des chirurgies et des implants chez les animaux

Nom	Type de chirurgie	Type d'implant(s)	Diamètre (mm)	Épaisseur (µm)	Durée du suivi (jours)
F1	ALK	TS : PC-MPC	5	350	189
F2	ALK	TS : PC-MPC	5	350	191
F3	ILK	NS : PC-MPC	4	200	53
		TI : CLP-PEG-MPC	4	200	
F4	ILK	NS : CLP-PEG	4	200	442
		TI : CLP-PEG-MPC	4	200	

F : Félin ; NS : Naso-supérieur ; TI : Temporo-inférieur

ALK : Kératoplastie lamellaire antérieure ; ILK : Kératoplastie lenticulaire intrastromale

CLP : Peptides mimétiques du collagène ; MPC : *2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine* ; PC : Collagène porcine ; PEG : Polyethylene glycol

3.1.3 Protocole chirurgical

3.1.3.1 Traitement médical

Durant trois jours avant et après la chirurgie, les animaux ont reçu un stéroïde, un AINS et un ATB :

- Prednisone PO 5 mg DIE;
- Diclofénac 0.1% 1 goutte BID dans l'œil opéré (Voltaren Ophtha; Alcon, Mississauga, ON, Canada);
- Moxifloxacin 1 goutte BID dans l'œil opéré (Vigamox; Alcon)

Les chirurgies ont été réalisées par IB sous anesthésie générale : Isoflurane 2%, Buprénorphine et curares peropératoires. La prémédication administrée une heure avant l'intervention consistait en un traitement anti-reflux et antalgique-sédatifs:

- Glycopyrrolate 0,2 mg/ml × 0,01 ml/kg IM;
- Buprénorphine 0,3 mg/ml × 0,1 ml/kg IM;
- Kétamine 100 mg/ml × 8,5 ml/kg IM.

En fin d'intervention antibiotique et anti-inflammatoire ont été administrés :

- Céfazolin (50 mg/0,25 ml) juxtabulbaire;
- Tobramycine (10 mg/0,25 ml) juxtabulbaire;
- Dexaméthasone (1,2 mg/0,3 ml) juxtabulbaire.

Un traitement analgésique était administré 4 à 6 heures après l'opération, puis au lendemain de l'intervention :

- Buprénorphine 0,3 mg/ml × 0,1 ml/kg IM.

Le traitement topique postopératoire de l'œil opéré incluait un AINS et un stéroïde combiné à un antibiotique, jusqu'au retrait des sutures et à la disparition de signes inflammatoires:

- Diclofenac 0.1% 1 goutte BID (Voltaren Ophtha; Alcon);
- Dexaméthasone et tobramycine onguent BID (Tobradex onguent; Alcon).

Un onguent salin hyperosmolaire a été appliqué BID jusqu'à la disparition du déficit épithélial (cornée complètement recouverte de l'épithélium), puis DIE si une épithéliopathie (ex. surface épithéliale irrégulière) ou un œdème cornéen persistait :

- Onguent ophtalmique hypertonique de chlorure de sodium à 5 % (Muro 128 onguent; Bausch & Lomb, Rochester, USA)

Parallèlement, une collerette vétérinaire était placée autour du cou des animaux jusqu'à cicatrisation épithéliale complète et au retrait des points de suture afin d'éviter toute extrusion de ou des implants par l'animal.

3.1.3.2 Kératoplastie lamellaire antérieure

F1 et F2 ont été opérés par ALK, soit la transplantation de la partie antérieure de la cornée. Une incision limbique de 5 mm de long et 350 µm de profondeur a été réalisée au couteau diamant (Meyco ; Anton Meyer & Co., Ltd., Biel, Suisse) en temporal supérieur. Une dissection lamellaire intrastromale centripète de 7 mm de long a ensuite été réalisée au couteau Crescent (Alcon Canada, Inc., Mississauga, Canada). Enfin, une kératectomie antérieure avec ablation de la lamelle

antérieure a été effectuée par trépanation (5-mm Acupunch ; Acuderm, Inc., Fort Lauderdale, USA) en protégeant le stroma postérieur grâce à un guide mis lors de la dissection intrastromale. Il en résultait une ALK de 5 mm de diamètre et profonde de 350 µm avec un espace de 2 mm entre le greffon et le limbe. Le maintien en place de l'implant s'effectuait par 3 points doubles en surjet (*overlying sutures*), dont les nœuds étaient enfouis au pourtour de l'implant. L'incision limbique a été fermée par 4 points interrompus dont les nœuds étaient enfouis (CU-1 10-0 nylon ; Alcon Surgical, Fort Worth, USA). Tous les points ont été retirés 3 semaines après l'opération. La liste du matériel utilisé lors de cette procédure et le contre rendu opératoire sont disponibles à la fin (**Annexe 1, Annexe 2 et Annexe 3**).

3.1.3.3 Kératoplastie lenticulaire intrastromale

F3 et F4 ont été opérés par ILK, soit par la mise en place d'un implant lenticulaire dans une poche stromale. Deux incisions limbiques de 4,5 mm de long, 350 µm de profondeur et diamétralement opposées ont été pratiquées dans les quadrants naso-supérieur (NS) et temporo-inférieur (TI) à l'aide d'un couteau diamant, puis des poches intrastromales de 4 mm de long ont été disséquées à l'aide d'un couteau Crescent. Deux greffons de 4 mm de diamètre et de 200 µm d'épais ont été découpés avec un Acupunch et ont été placés dans chaque poche stromale en veillant à laisser une zone de cornée claire de 2 mm entre le limbe et l'implant. Aucun point n'était nécessaire au maintien en place de ces implants, mais l'incision limbique a été fermée par 3 ou 4 points interrompus dont les nœuds étaient enfouis (CU-1 10-0 nylon ; Alcon Surgical, Fort Worth, USA). Ces points ont été retirés 14 jours après l'opération. La liste du matériel utilisé lors de cette procédure et le contre rendu opératoire sont disponibles à la fin (**Annexe 1, Annexe 2 et Annexe 3**).

3.1.4 Évaluation préopératoire et suivi postopératoire

3.1.4.1 Suivi clinique de base

Un examen complet était pratiqué avant la chirurgie (peu après ou à leur arrivée pour s'assurer de l'absence de pathologies oculaires irréversibles), quotidiennement pour les 4 jours postopératoires, 2 fois par semaine dans le premier mois, puis tous les mois. De plus, des examens complémentaires étaient réalisés devant toute évolution notable sur les yeux (ulcère, néovascularisation, etc.). Des

examens plus allégés étaient effectués régulièrement entre les examens complets pour surveiller l'apparition de complications.

L'évaluation comprenait un examen du segment antérieur des deux yeux des animaux à la lampe à fente munie d'un flash (BX 900, Haag-Streit, Bern, Suisse) sur laquelle était montée une caméra NIKON (D200, NIKON corp., Tokyo, Japon). À l'instar du suivi clinique des patients greffés, l'examen à la lampe à fente était un moment crucial dans l'évaluation et le suivi des implants. En effet, à chaque examen, voici ce qui était colligé : la transparence de la cornée et des implants (indice modifié MacDonald-Shadduck),²³⁷ l'étude des différentes couches (stroma, interface, périphérie), la recherche d'une néovascularisation, l'étude de l'épithélium et de l'endothélium, la recherche d'une inflammation dans la chambre antérieure (classification de Jabs),²³⁸ ainsi que l'examen de l'iris et du cristallin. Le protocole détaillé de l'examen à la LAF est disponible à la fin (**Annexe 4**).

L'évaluation clinique de base comprenait également une évaluation de la pression intraoculaire (PIO) grâce à un tonomètre (TonoVet TV01; Tiolat, Finlande), ainsi qu'une mesure de la pachymétrie centrale (Ultrasound pachymeter SP 3000, Tomey, Nagoya - Japon). Pour la pachymétrie, la moyenne et l'écart-type de 5 mesures successives étaient colligés.

Le feuillet clinique rempli à chaque examen et le feuillet clinique simplifié (pour les examens en dehors de l'horaire standard) sont disponibles à la fin (**Annexe 5**, **Annexe 6** et **Annexe 7**).

3.1.4.2 Sensibilité cornéenne

Une évaluation de la sensibilité cornéenne par esthésiomètre Cochet-Bonnet (Nylon 0.12 mm; Luneau, Chartres, France)²³⁹ était réalisée en préopératoire, puis 3, 6, 9 et 12 mois en postopératoire. Sur un animal réveillé en début d'examen (sans instillation de collyre), un monofilament de nylon de 6 mm de long était appliqué perpendiculairement à la surface oculaire et raccourci progressivement par palier de 0,5 mm. La longueur de filament la plus longue capable de générer un réflexe de clignement dans au moins 3 de 5 applications était retenue comme valeur de sensibilité cornéenne. Une table d'équivalence de la longueur du filament et de la pression exercée en g/mm² est affichée ici-bas (**Tableau 2**).

Tableau 2. Pression exercée par l'esthésiomètre Cochet-Bonnet selon la longueur du fil.

Longueur du fil (mm)	60	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5
Pression (g/mm ²)	0,4	0,5	0,55	0,7	0,8	1	1,4	1,8	2,8	5,1	10,3	15,9

3.1.4.3 Tomographie par cohérence optique

À l'instar des cornées humaines *ex vivo*, un examen à l'OCT 930 SR de Thorlabs était réalisé en préopératoire, une fois par semaine dans le premier mois, puis tous les mois. Un examen complémentaire par OCT Visante™ était réalisé en préopératoire, à 3, 6, 9, 12 mois en postopératoire, puis à l'euthanasie. Ceci a permis de recueillir l'épaisseur et de visualiser les modifications morphologiques de la cornée et des greffons. Le protocole détaillé de cette procédure est disponible à la fin (**Annexe 8**).

3.1.4.4 Microscopie spéculaire

Une étude sans contact et *in vivo* de l'endothélium a été réalisée par microscopie spéculaire (NSP 9900; Konan Medical Inc., Nishinomiya, Japon) en préopératoire puis à 3, 6, 9 et 12 mois en postopératoire. Un minimum de 100 cellules par cornée était nécessaire pour une analyse fiable (Logiciel KSS-409SP, Konan medical Inc., Irvine, États-Unis).

3.1.4.5 Topographie et transparence cornéenne

Une topographie cornéenne (Pentacam HR; Oculus Inc., Wetzlar, Allemagne) était réalisée en préopératoire puis à 3, 6, 9 et 12 mois en postopératoire. Cet examen permet d'analyser les courbures et élévations cornéennes et de générer une carte pachymétrique de la cornée entière *in vivo* et de façon non invasive (sans contact). De plus, comme mentionné dans l'introduction, cet appareil peut être utilisé pour quantifier la densité optique de la cornée centrale. L'appareil évalue automatiquement la densitométrie moyenne dans des profondeurs (120 µm antérieurs, 60 µm postérieurs, stroma compris entre ces deux couches et la cornée totale) et des rayons concentriques prédéterminés. Cependant, puisque les implants étaient greffés à la périphérie de la cornée et que la transparence cornéenne centrale redevenait cliniquement normale 3 mois après l'opération (voir résultats plus loin), l'évaluation automatique de la densitométrie n'était pas utile dans l'évaluation de la performance de ces implants dans le projet actuel. Une évaluation manuelle de la

densitométrie peut toujours être réalisée directement sur l'interface de l'appareil, point par point, mais il n'y a aucune façon de définir une zone d'intérêt à examiner à chaque examen. Puisque le Pentacam génère sa topographie et sa densitométrie avec la même capture d'images, la procédure d'acquisition des données sur les animaux est la même, peu importe les résultats relevés dans l'étude. Le protocole détaillé de cette procédure est disponible à la fin (**Annexe 9**).

3.1.4.6 Microscopie confocale

Une microscopie confocale (ConfoScan 3; Nidek Technologies Srl., Vigonza, Italie) était réalisée en préopératoire, puis à 3, 6, 9 et 12 mois en postopératoire. Elle permet d'obtenir une visualisation en trois dimensions de la cornée avec une résolution de l'ordre de $379 \times 286 \mu\text{m}^2$ en acquisition semi-automatique. Des acquisitions ont été faites au centre de la cornée et au niveau de chaque implant. Comme décrit précédemment, cet examen sert à évaluer la biointégration des implants par la repopulation des kératocytes et des nerfs de la cornée du receveur. Le protocole détaillé de cette procédure est disponible à la fin (**Annexe 10**).

3.1.4.7 Angiographie cornéenne

L'angiographie cornéenne à l'aide de l'HRA (Heidelberg Retina Angiography; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) n'est utile qu'en présence de néovascularisation cornéenne, la cornée normale étant dépourvue de vaisseaux sanguins. Lors de néovascularisation légère (comme ceci a été le cas dans nos résultats présentés plus bas), il est facile d'évaluer la quantité de néovascularisation en comptant le nombre de vaisseaux provenant du limbe et le nombre d'« heures » (si la cornée est représentée comme une horloge) ou les vaisseaux sont présents. Cette technique visuelle est beaucoup plus simple que l'angiographie (qui demande une sédation de l'animal, ainsi que l'injection d'un colorant intraveineux) et permet d'évaluer et de suivre adéquatement la néovascularisation cornéenne. Dans le cas où les implants généreraient une réaction inflammatoire importante dans les cornées opérées et qu'il deviendrait intéressant de quantifier précisément la néovascularisation pour comparer adéquatement la biocompatibilité des différents implants, l'angiographie deviendrait alors la méthode de choix. Bien que notre hypothèse était que les implants biosynthétiques ne généreraient pas une inflammation disproportionnée de la cornée, cette technique a tout de même été mise au point pour son utilisation chez l'animal. Le protocole détaillé de cette procédure est disponible à la fin (**Annexe 11**).

Un feuillet pour vérifier et comptabiliser les détails quant aux examens d'imagerie spécialisée est disponible à la fin (**Annexe 12**).

3.1.5 Évaluation post-mortem

La durée prévue du suivi était d'un an afin de suivre l'évolution des implants sur le long cours. En cas de complication majeure (endophtalmie, déficit épithélial persistant, kératite infectieuse, déhiscence de l'implant ou formation d'un séquestre), et après avoir tenté par tous les moyens médicaux ou chirurgicaux de préserver la santé de la cornée sans agir directement sur l'implant en soi (ex. : greffe), il a été déterminé qu'il valait mieux interrompre le suivi. Cela avait pour objectif de limiter les dommages à la cornée et à l'implant, permettant ainsi une analyse post-mortem sans facteur de confusion majeur. Au terme de leur suivi, les sujets d'études ont été euthanasiés suivant les règles éthiques en vigueur et conformément au protocole établis par l'animalerie de l'HMR (Glycopyrrolate 0.2 mg/mL à 0.01mL/kg ; Kétamine 100 mg/mL à 11mL/kg ; Euthanyl IV 240 mg/mL à 2mL/kg). Les yeux greffés et de contrôle ont été énucléés et ont bénéficié d'un examen complet.

3.1.5.1 Histologie, Microscopie électronique et Immunofluorescence

Ces procédures ont été effectuées sur toutes les cornées énucléées (implantés et contrôles). Chaque région implantée a été subdivisée en trois : un tiers fixé dans du Glutaraldéhyde à 4°C pour l'analyse en microscopie électronique, un tiers fixé dans du formaldéhyde 10% à 4°C pour l'analyse histologique et en immunofluorescence et le dernier tiers fixé dans de l'OCT (*optimal cutting temperature solution*; Somagen, Edmonton, AB, Canada) pour usage ultérieur au besoin. L'analyse histologique a cependant été effectuée par le personnel de recherche après mon départ du laboratoire et est encore en cours. Elle ne sera donc pas présentée dans le présent ouvrage. À titre indicatif, les anticorps qui ont été utilisés pour l'immunofluorescence sont l'anti-phalloïdine (Alexa Fluor 488) pour la structure générale, DAPI (marquage de l'ADN-noyaux), l'anti-COL I et l'anti-COL V afin d'évaluer les fibres collagènes et remodelage sous-jacent, l'anti-ZO1 pour la survie et fonction endothéliale (marquage des jonctions serrées endothéliales), l'anti-Na-K ATPase pour la fonction de la pompe endothéliale et l'anti-SMA pour la détection des cellules stromales activées et fibroblastiques.

3.2 Substituts injectables dans la cornée humaine *ex vivo*

3.2.1 Implants

Une nouvelle génération d'implants liquides a été confectionnée dans le cadre de ce projet. Ces implants sont produits à l'UOHI par le laboratoire de Dr Emilio Alarcon (EA), PhD. Plus spécifiquement, la conception et la préparation des implants ont été du recours de Dr Marcelo Muñoz, PhD. Ils sont composés de CLP-PEG-MPC, dont les concentrations de PEG ont été ajustées pour offrir une consistance plus gélatineuse leur permettant d'être montés dans une seringue et d'être injectés à travers une aiguille fine. Afin de permettre leur solidification et leur fusion à la cornée hôte, de la riboflavine (vitamine B2) a été ajoutée à la formulation initiale. Enfin, afin d'éviter leur solidification ou dégradation durant le transport, les différents composés des implants étaient amenés sur glace du laboratoire chimique d'Ottawa et ils étaient mélangés juste avant l'opération dans un milieu stérile par l'équipe d'EA, puis transvidés dans une seringue, prête pour l'injection. Durant la préparation des implants, la concentration finale de chaque composante, le temps total de préparation et le délai entre la fin de la préparation et l'injection étaient notés.

3.2.2 Population

Les cornées humaines de donneurs humains non conformes pour une transplantation ont été obtenues à partir de la Banque d'yeux du Québec établie à l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (Montréal, QC, Canada). Ces cornées entières avec leur anneau scléral étaient conservées à 4°C dans une solution d'Optisol-GS (Bausch & Lomb Surgical, Inc., San Dimas, USA), solution physiologique et antibiotique qui maintient leur viabilité cellulaire durant au moins 14 jours.²⁴⁰ Lors des chirurgies, les cornées étaient transférées dans une chambre antérieure artificielle (Baron; Katena, Denville, USA) où leur forme physiologique convexe était préservée. Elles étaient perfusées par une solution saline balancée (*Balanced salt solution* – BSS) sur leur face endothéliale et la pression intracamérale était maintenue à environ 16 mmHg.

Afin de pouvoir introduire l'implant injectable dans la cornée, il fallait tout d'abord créer une ouverture dans le stroma. Deux techniques ont été utilisées pour ce faire : l'extraction d'un lenticule cornéen à travers une micro-incision (*Small Incision Lenticule Extraction* – SMILE) à l'aide d'un laser femtoseconde (n = 11) ou la kératotomie manuelle (n = 16).

3.2.3 Protocole chirurgical

3.2.3.1 Kératectomie par SMILE

L'extraction lenticulaire par SMILE a été effectuée à la clinique Invisia (Verdun, Canada) par Dr. Michel Podtetenev. Après avoir retiré l'épithélium de la cornée *ex vivo* un lentille d'une zone optique de 6,80 mm et d'une épaisseur maximale de 175 μm a été découpé à une profondeur de 120 μm par un laser femtoseconde (VisuMax; Zeiss, Oberkochen, Germany) et extrait de la cornée à travers une petite incision de 2.2 mm (*sidecut*) générée par le même laser (**Figure 11**). L'appareil Visumax™ enregistrait la séquence vidéo de l'opération. La liste du matériel utilisé lors de cette procédure est disponible à la fin (**Annexe 13**).



Figure 11. Mise en place de la cornée et de la succion lors de la chirurgie SMILE.

3.2.3.2 Kératotomie manuelle

Cette technique a été réalisée par IB. Une incision limbique de 4 mm de long, à environ 200 μm de profondeur, a été effectuée à l'aide d'un couteau diamant (Anton Meyer & Co Ltd, Biel, Suisse), puis une poche intrastromale de 6 mm de diamètre a été disséquée à l'aide d'un couteau Crescent (Alcon, Mississauga, Canada). La liste du matériel utilisé lors de cette procédure est disponible à la fin (**Annexe 14**).

3.2.4 Injection de l'implant liquide et irradiation

Une fois la poche intrastromale créée, le *sidecut* a été suturé (Nylon CU-1, 10-0-12; Alcon, Mississauga, Canada) à l'aide de 2 ou 3 points individuels, afin d'éviter que l'implant ne soit expulsé lors de l'injection. La lumière projetée par le microscope a alors été mise au jaune (qui ne fait pas partie du spectre d'absorption de la riboflavine). L'implant liquide, monté dans une seringue de 5 ml est injecté à travers le *sideport* suturé, à l'aide d'une canule 27G (**Figure 12**). Durant cette étape, la facilité d'expulsion de l'implant, sa consistance (liquide, visqueuse ou gélatineuse), et son homogénéité (visuellement : présences de différentes phases, bulles ou débris) sont notées par IB sous forme de commentaires, qui donne par la suite son appréciation globale de l'opération.

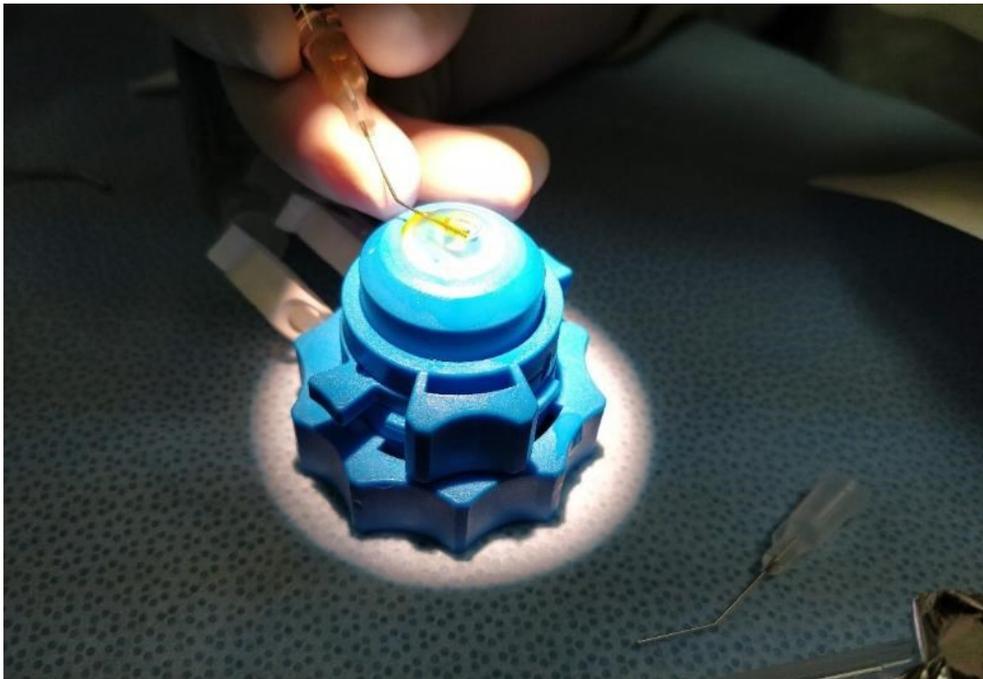


Figure 12. Injection de l'implant liquide à l'aide une canule 27G.

Immédiatement après l'injection, la cornée, toujours montée sur la chambre antérieure artificielle, est placée à 1,5 cm d'une source lumineuse (Aco series 8000, Luxtec, Sturbridge, USA) produisant 5 mW/cm² de lumière bleue ($\lambda = 480$ nm) sur la surface cornéenne (**Figure 13**) pour une durée totale de 20 minutes. La surface cornéenne est irriguée par du BSS (température = 20°C) à raison de 1 ml/5 min pour lui permettre de rester hydratée et de se refroidir. La liste des étapes et le compte-rendu de cette procédure sont disponibles à la fin (**Annexe 15**).

La lumière bleue a été préférée aux UV, car, en plus de faire partie du spectre d'excitation de la riboflavine, elle possède l'avantage théorique de pénétrer plus profondément les tissus, en plus de réduire les dommages phototoxiques induits par l'irradiation.^{241, 242}

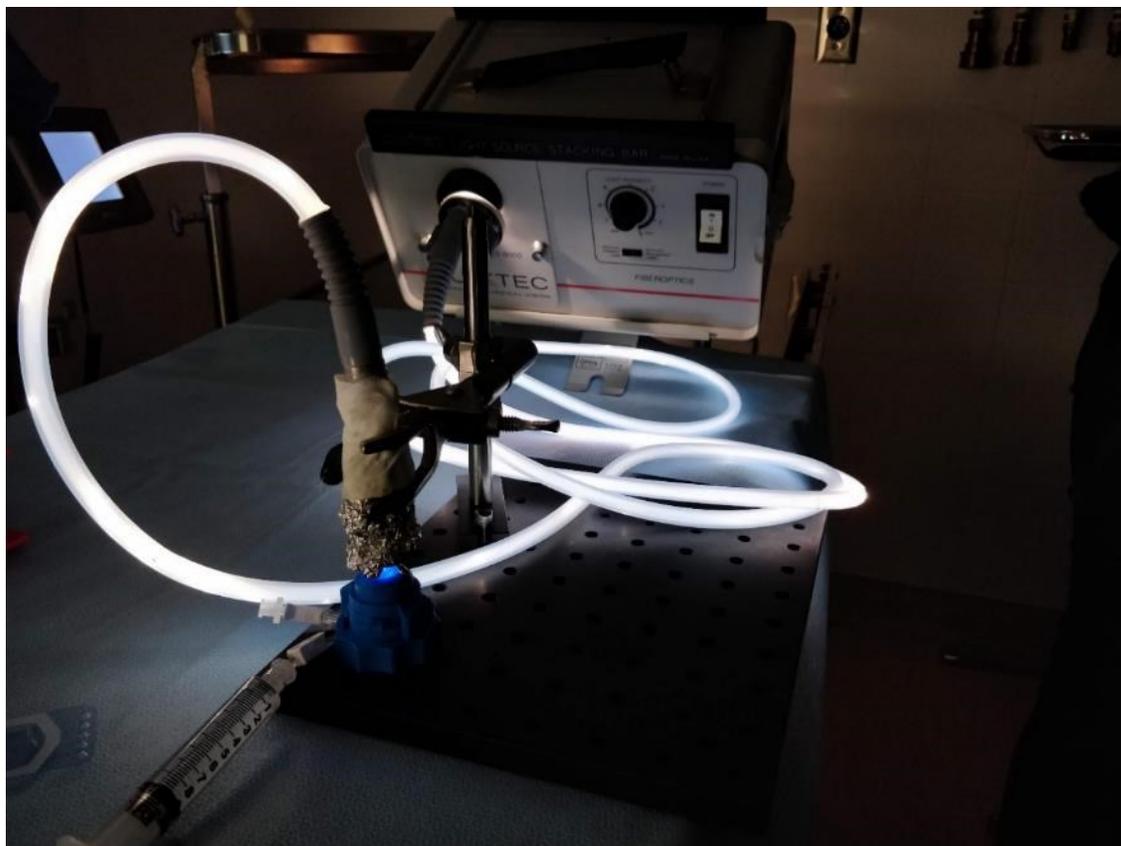


Figure 13. Réticulation de l'implant liquide à l'aide de la lumière bleue.

3.2.5 Évaluation préopératoire et suivi postopératoire

L'évaluation pré et postopératoire des cornées humaines *ex vivo* comprenait un examen à l'OCT grand angle (Visante 1000; Zeiss, Oberkochen, Germany), à l'OCT angle étroit haute résolution (OCT 930 SR, Thorlabs Inc., Newton, NJ, USA) et un examen à la lampe à fente (LAF) munie d'un flash (BX 900, Haag-Streit, Bern, Suisse) sur laquelle était montée une caméra NIKON (D200, NIKON corp., Tokyo, Japan). Ces examens étaient réalisés avant l'opération, puis toutes les 2 heures durant 6 heures, puis tous les jours durant une semaine, puis toutes les semaines durant un mois. La durée totale du suivi de 1 mois a été jugée la plus optimale, car elle permettait de confirmer la stabilité *ex vivo* des implants, tout en permettant de tester de nouvelles formulations rapidement en cas d'échec.

L'OCT grand-angle Visante™ permettait de voir une coupe de la cornée dans son ensemble (512 x 1024 pixels; 10000 x 4000 µm) et ainsi de mesurer précisément la largeur, la hauteur et l'aire de coupe de l'implant (**Figure 14**).

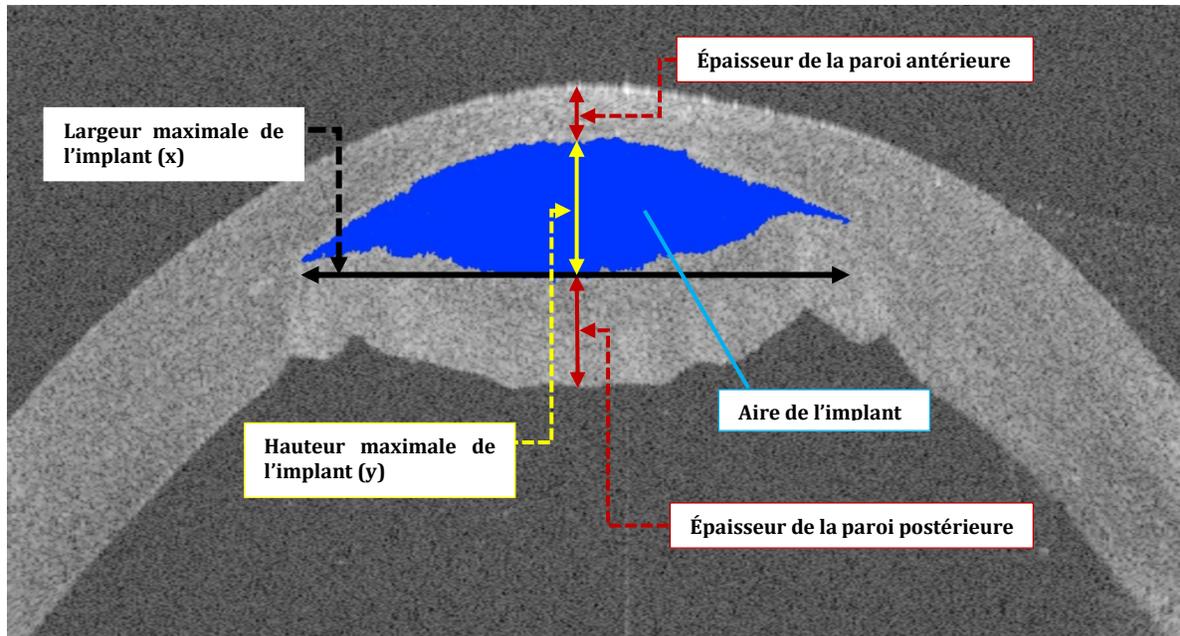


Figure 14. Mesures de la coupe axiale de la cornée *ex vivo* avec l'implant injectable

L'OCT à angle étroit (930 SR) permettait quant à lui d'observer la zone injectée avec une plus haute résolution (2000 x 512 pixels; 6000 x 1300 µm), d'apprécier la finesse de la coupe au laser ou manuelle et de confirmer certaines mesures (telle la hauteur de l'implant), au besoin, quoique l'implant sortait parfois du cadre de l'image. Enfin, l'examen à la lampe à fente permettait d'avoir un aperçu global de la cornée, telle que perçue lors d'un examen en clinique standard, et de documenter des fuites, la présence d'infection ou des changements de couleur de l'implant, le cas échéant.

Durant la période d'un mois de suivi des cornées *ex vivo*, ces dernières étaient gardées à l'abri de la lumière et submergées dans de l'Optisol-GS. De plus, après les six premières heures d'observation, elles étaient maintenues à pression interne fixe (16 mmHg) et dans leur forme convexe originelle grâce à un système de perfusion utilisant une pompe à seringues (Model 44; Harvard Apparatus, Holliston, États-Unis) qui faisait circuler de l'Optisol-GS dans la chambre artificielle (**Figure 15**). Lors de la prise de photos, les tubes étaient clampés avant de les débrancher du système afin de préserver la pression dans la chambre artificielle.



Figure 15. Système de perfusion des chambres antérieures grâce à une pompe à seringues.

L'image de gauche montre les seringues remplies d'Optisol-GS montées sur le système de pompe automatisé. L'Optisol-GS voyage le long de tubulure pour finalement circuler à l'intérieur des chambres antérieures artificielles (image de droite) afin de maintenir les cornées opérées en vie et en forme convexe (grâce à la pression exercée sur l'endothélium). *N.B.* la chambre antérieure a été mise dessus sont couvert opaque pour la photo uniquement. Les tubes sont également clampés sur cette photo.

3.3 Analyses et statistiques

3.3.1 Biocompatibilité et performance

Un matériau est jugé biocompatible s'il est capable de fonctionner sans produire de réaction indésirable locale ou systémique chez l'hôte.²⁴³ L'évaluation de la biocompatibilité est assez limitée dans des tissus *ex vivo* (implants injectables), mais les signes de toxicité chimiques ou de choc osmotique étaient surveillés durant la période de suivi de 1 mois : la fonte, l'opacification et la turgescence cornéenne. Pour les implants solides installés dans la cornée animale *in vivo*, ils étaient jugés biocompatibles si leur implantation produisait une réaction inflammatoire minimale dans la cornée hôte (réaction attendue) avec un retour à la normale avant la fin de la période de suivi de 1 an :

- Néovascularisation (une légère néovascularisation au niveau de la plaie chirurgicale au limbe est attendue);
- Transparence cornéenne (une diminution transitoire est attendue);
- Sensibilité cornéenne centrale (une diminution transitoire est attendue);
- Protéines et cellules dans la chambre antérieure (se résorbe normalement en < 1 semaine);
- Guérison épithéliale (retour à la normale en < 1 semaine);
- Maintien de la densité et morphologie endothéliale, ainsi que de la pression intraoculaire.

La performance des implants, quant à elle, est définie dans notre étude par tout ce qui est nécessaire au bon fonctionnement des implants, sans lien avec leur biocompatibilité. À cette fin, les implants liquides devaient être facilement injectables, se solidifier dans la cornée, demeurer en place, conserver un volume stable, ainsi que rester transparents et incolores. Chez l'animal, les implants solides devaient demeurer en place, rester transparents et incolores, et être biointégrés à la cornée hôte avec présence de remodelage, repopulation par des kératocytes et réinnervation. Pour les deux types d'implants, la performance était également influencée par la technique chirurgicale en soi. À cet égard, différents éléments étaient évalués aux fins de contrôle de qualité : la profondeur de coupe, la stérilité, l'anesthésie, la sécheresse oculaire peropératoire et le temps opératoire. Mon projet n'avait cependant pas pour but d'évaluer ces techniques chirurgicales; ces dernières ne feront donc pas l'objet d'une discussion approfondie.

3.3.2 Mesures et statistiques

Les épaisseurs des implants solides et liquides et des cornées *ex* et *in vivo* ont été calculées à partir des images d'OCT avec le logiciel de traitement d'image ImageJ (version 1.52k, National Institutes of Health, Bethesda, États-Unis). Les statistiques pour les implants solides ont été réalisées avec le logiciel JASP (Version 0.11), utilisant un test apparié en fonction de l'analyse de normalité avec le test de Shapiro-Wilk. Toutes les valeurs dans la section des résultats sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

4 – Résultats et analyses

Cette partie présente les résultats de deux études préliminaires réalisées avec des bio-implants cornéens sur le modèle animal *in vivo* ainsi que sur les cornées humaines *ex vivo*.

4.1 Substituts solides dans la cornée animale *in vivo*

4.1.1 Résultats généraux

4.1.1.1 Transparence des implants

Dans l'ensemble, les implants et la cornée centrale sont demeurés transparents. Sur une échelle de 0 (cornée blanche sans détail irien visible) à 4 (détails iriens parfaitement visibles), la transparence cornéenne en regard des implants était en moyenne à $3,4 \pm 0,49$ (Figure 16).

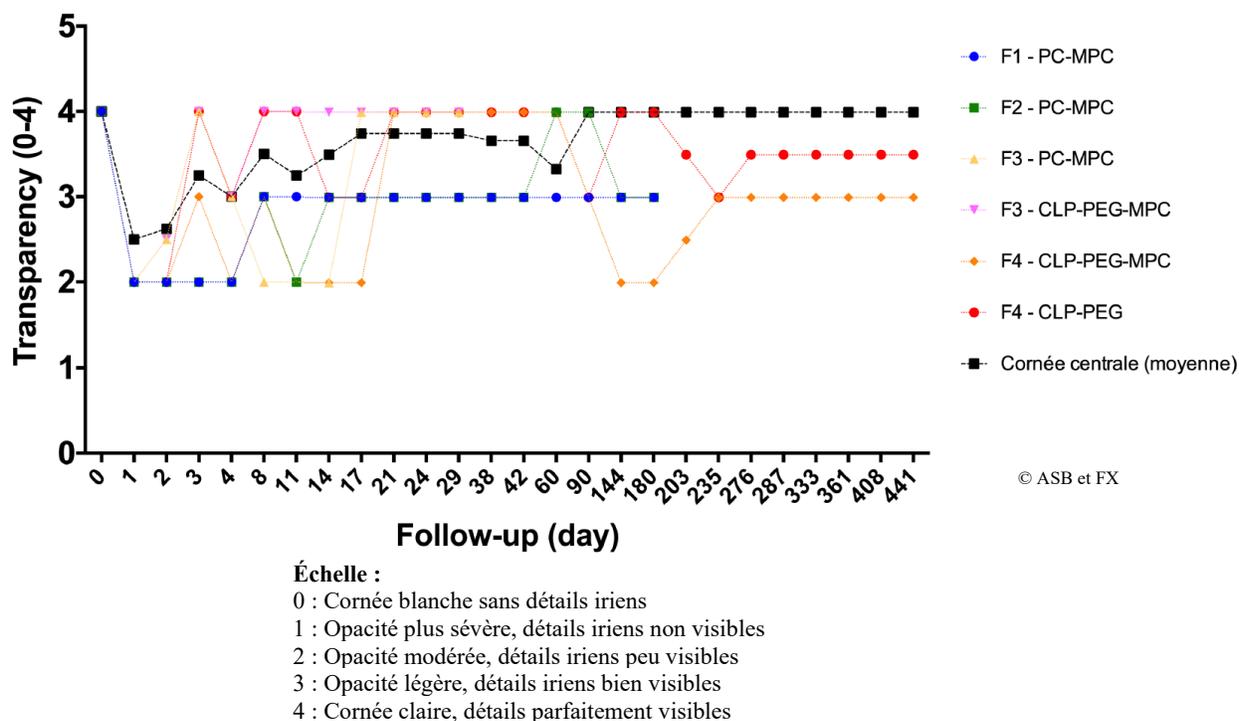


Figure 16. F1-4 : Évolution de la transparence de la cornée en regard des implants et centrale.

La figure montre l'évolution de la transparence en regard des implants. La moyenne de la transparence centrale des cornées opérées a été ajoutée au graphique afin d'apprécier l'effet de l'œdème cornéen postopératoire sur la transparence cornéenne globale.

4.1.1.2 Inflammation de la chambre antérieure

On notait une inflammation postopératoire minime (1+) sur les yeux opérés 1 jour après l'opération qui régressait au cours de la première semaine (**Figure 17**). Aucun précipité sur l'endothélium, hypopion ou fibrine en chambre antérieure n'a été noté durant la période de suivi. Les incisions n'ont présenté aucune complication, aucune déhiscence de plaie. Aucune modification n'a été remarquée au niveau de l'iris ou du cristallin.

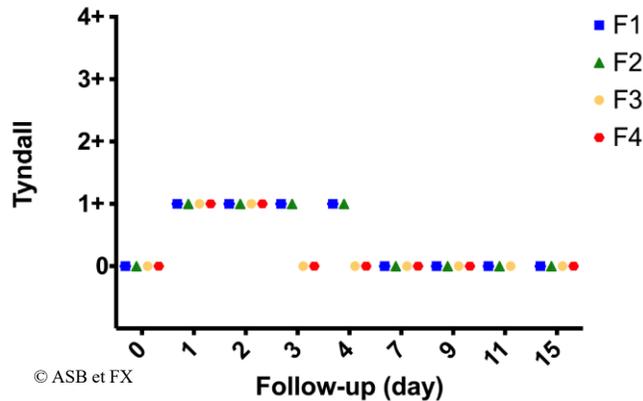


Figure 17. F1-4 : Évolution de l'inflammation de la chambre antérieure selon le Tyndall.

4.1.1.3 Pression intraoculaire

Aucune hypertonie ou hypotonie oculaire n'a été mise en évidence durant l'étude. La PIO moyenne était de $20,5 \pm 2,7$ mmHg dans le groupe expérimental (médiane des yeux opérés = 20 mmHg), contre $21,5 \pm 2,9$ mmHg dans le groupe contrôle (médiane des yeux non opérés = 21 mmHg) (**Figure 18**). Aucune différence notable n'a été observée entre le groupe expérimental et le groupe contrôle (Wilcoxon : $p = 0,236$).

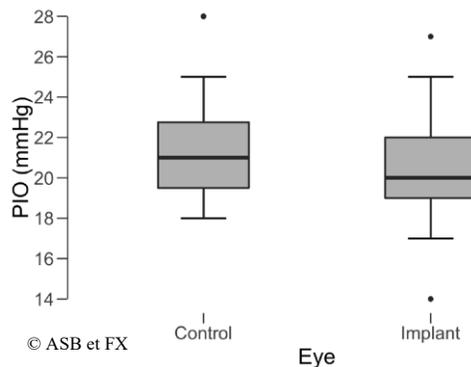


Figure 18. F1-4 : Distribution de toutes les pressions intraoculaires.

4.1.1.4 Guérison épithéliale

La guérison épithéliale est dépendante du type de chirurgie, l'épithélium n'étant enlevé manuellement en regard de l'implant que dans la kératoplastie lamellaire antérieure. Or, dans tous les groupes, on notait une dégradation épithéliale dans les premières 48h avec apparition d'un ulcère d'aire maximale variable (de 30% à 80% de la surface cornéenne). L'épithélium s'est renouvelé complètement en 2 semaines, à l'exception de F3. En effet, chez ce dernier animal, on a noté une zone d'épithélium lâche en temporo-supérieur, entre les 2 implants, qui n'a jamais réussi à se cicatriser, ce qui nous a obligés à réduire la durée de suivi pour éviter d'autres complications. Ce cas est développé plus loin dans sa propre section.

4.1.1.5 Sensibilité cornéenne centrale

Compte tenu de la période de suivi très courte, la sensibilité cornéenne n'a pas pu être colligée sur F3. Le seuil de sensibilité cornéenne au centre de la cornée était initialement à $1,4 \pm 0 \text{ g/mm}^2$ dans le groupe expérimental contre $1,6 \pm 0,283 \text{ g/mm}^2$ dans le groupe contrôle. À 3 mois postopératoires, il était à $1,9 \pm 0,902$ chez les sujets étudiés, versus $1,5 \pm 0,231 \text{ g/mm}^2$ chez les contrôles. Pour le sujet F4, qui présente la période de suivi la plus longue, la sensibilité cornéenne centrale resta à 1,4, 1,8 et $1,8 \text{ g/mm}^2$ à 6 mois, 9 mois et 12 mois postopératoires respectivement (contre 0,8, 1,8 et $1,4 \text{ g/mm}^2$ respectivement dans l'œil contrôle).

4.1.1.6 Endothélium

La densité endothéliale initiale était similaire pour les 2 groupes (t-test : $p = 0,163$, *Cohen's d* = 1,250), avec une densité endothéliale moyenne à $2885 \pm 12 \text{ cellules/mm}^2$ dans le groupe d'étude contre $2718 \pm 145 \text{ cellules/mm}^2$ dans le groupe contrôle. On n'a pas noté de différence significative entre les 2 groupes durant l'étude ($p = 0,664$, *d* = 0,292) avec une densité cellulaire moyenne de $2832 \pm 85 \text{ cellules/mm}^2$ à 4 mois dans le groupe d'étude. Pour le reste de l'étude, la densité cellulaire dans l'œil étudié de F4 est restée stable à 2841 ± 122 , 3003 ± 80 et $3106 \pm 98 \text{ cellules/mm}^2$ à 6, 9 et 12 mois postopératoires respectivement. Comme dit précédemment, ces données n'ont pas pu être recueillies sur le sujet F3 à cause de la période de suivi écourtée.

4.1.1.7 Microscopie confocale

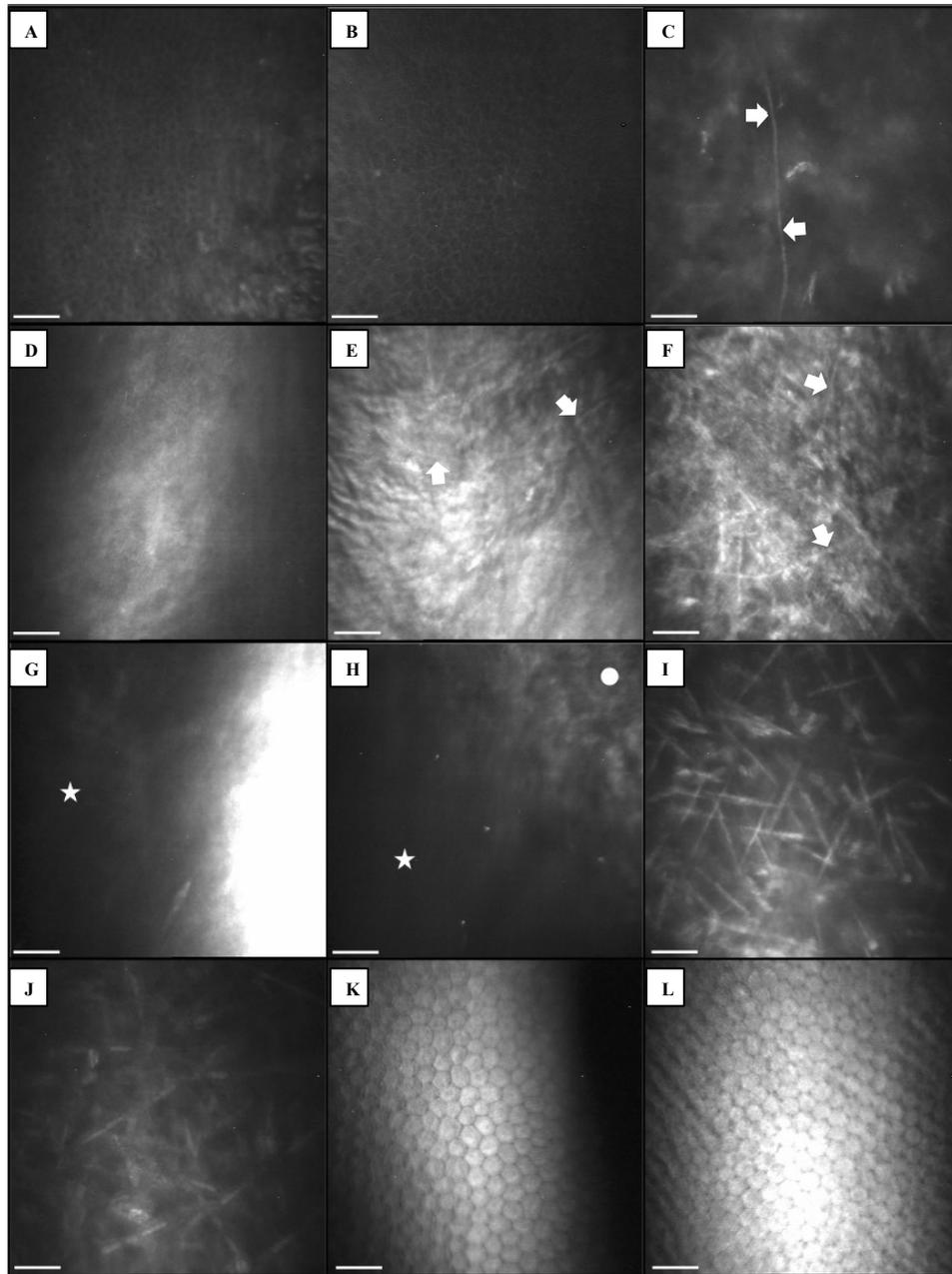
L'épithélium est intègre chez tous les sujets au cours du suivi, avec présence d'une couche basale continue (A, B, **Figure 19**).

Pour F1 et F2, on montre à 3 mois et 6 mois l'apparition et épaissement d'une trame néosynthétisée en avant de l'implant (D, **Figure 19**). Nous ne mettons pas en évidence de réinnervation de cette nouvelle matrice chez F1 et F2.

Pour F4, le stroma sous-épithélial apparaît normal et on peut facilement y distinguer les fibres de collagènes et les nerfs (C, **Figure 19**). L'examen montre également l'apparition d'une trame collagène néosynthétisée en avant et arrière de l'implant. Juste derrière l'implant, on note à partir du 9^e mois postopératoire une modification de la trame collagène avec des fibrilles plus réfringentes et plus denses. Des nerfs cornéens sont visibles dans la matrice néosynthétisée en avant des implants CLP-PEG et CLP-PEG-MPC à partir du 9^e mois postopératoire (E, F, **Figure 19**). Plus profondément, derrière les deux implants, on retrouve un stroma postérieur d'aspect normal (I, J, **Figure 19**).

Chez tous les sujets, l'implant comme tel apparaît particulièrement transparent au ConfoScan 3TM, mais de nombreux artéfacts à l'interface entre le stroma et l'implant limitaient l'interprétation des données (G, H, **Figure 19**).

Enfin, l'endothélium chez tous les sujets au cours du suivi présente une mosaïque uniforme, avec une densité préservée durant toute la période du suivi (K, L, **Figure 19**).



© ASB et FX

Figure 19. F1-4 : Microscopie confocale au regard des implants biosynthétiques.

- A** (F2, M6), **B** (F4, M12, CLP-PEG) : intégrité de l'épithélium et de la couche basale.
C (F4, M12, CLP-PEG) : aspect du stroma antérieur avec présence d'un nerf cornéen (flèche).
D (F1, M6) : aspect du tissu néosynthétisé en avant de l'implant.
E (F4, M12, CLP-PEG), **F** (F4, M8, CLP-PEG-MPC) : aspect du tissu néosynthétisé en avant de l'implant, avec présence de nerfs cornéens (flèches) et de nombreuses fibres de collagène.
G (F2, M6), **H** (F4, CLP-PEG-MPC) : Implant très transparent (étoile) et continuité avec le tissu néosynthétisé (rond), présence d'artéfacts lumineux à l'interface entre les deux.
I (F4, M8, CLP-PEG-MPC) : Trame collagène en arrière de l'implant, plus réfringent et plus dense.
J (F4, M8, CLP-PEG) : Aspect normal du stroma postérieur.
K (F2, M6), **L** (F4, M12, CLP-PEG) : Aspect normal de la mosaïque endothéliale (forme et densité).
Barres d'échelle : 50 μ m.

4.1.1.8 Topographie et densitométrie cornéenne

Le Pentacam HR™ utilise une lampe à fente pour la capture de ses images et permet ainsi d'obtenir d'autres images en coupe, de haute résolution, de la cornée entière ou presque (**Figure 20**). Sur ce modèle chirurgical (ALK ou ILK en périphérie), l'appareil permet d'obtenir des cartes de courbures et de pachymétrie qui sont représentatives (**Figure 21**). Toutefois, des erreurs de segmentation liées à des artefacts de l'implant sont notables, diminuant la qualité de la topographie postérieure de la cornée. Enfin, les cartes de densitométrie permettent d'apprécier la transparence cornéenne moyenne dans l'ensemble de sa surface et l'on voit que les infiltrats périphériques augmentent grandement la densitométrie mesurée au pourtour des implants (**Figure 22**).

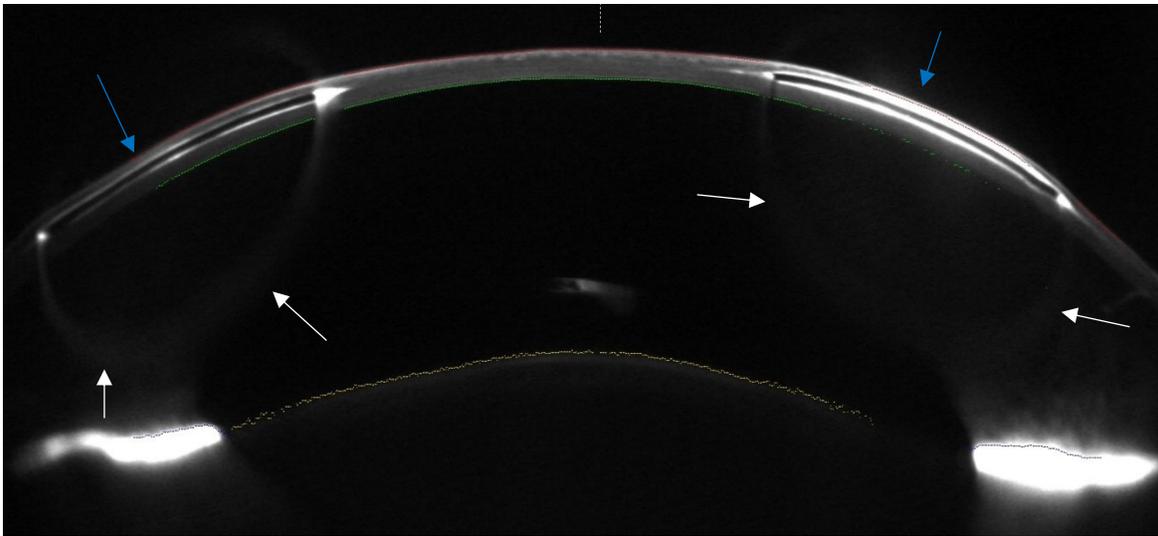


Figure 20. F4 : Cliché scheidpflug des implants intrastromaux par le Pentacam.

L'image du *haut* montre une segmentation cornéenne de F4 obtenue par le Pentacam HR™ où l'on perçoit le pourtour des implants intrastromaux (flèches blanches) et leur transsection dans la cornée (flèches bleues). Les traits rouges, verts et jaunes sont générés automatiquement par l'appareil et représentent respectivement la surface cornéenne antérieure, la surface cornéenne postérieure et la surface antérieure du cristallin.

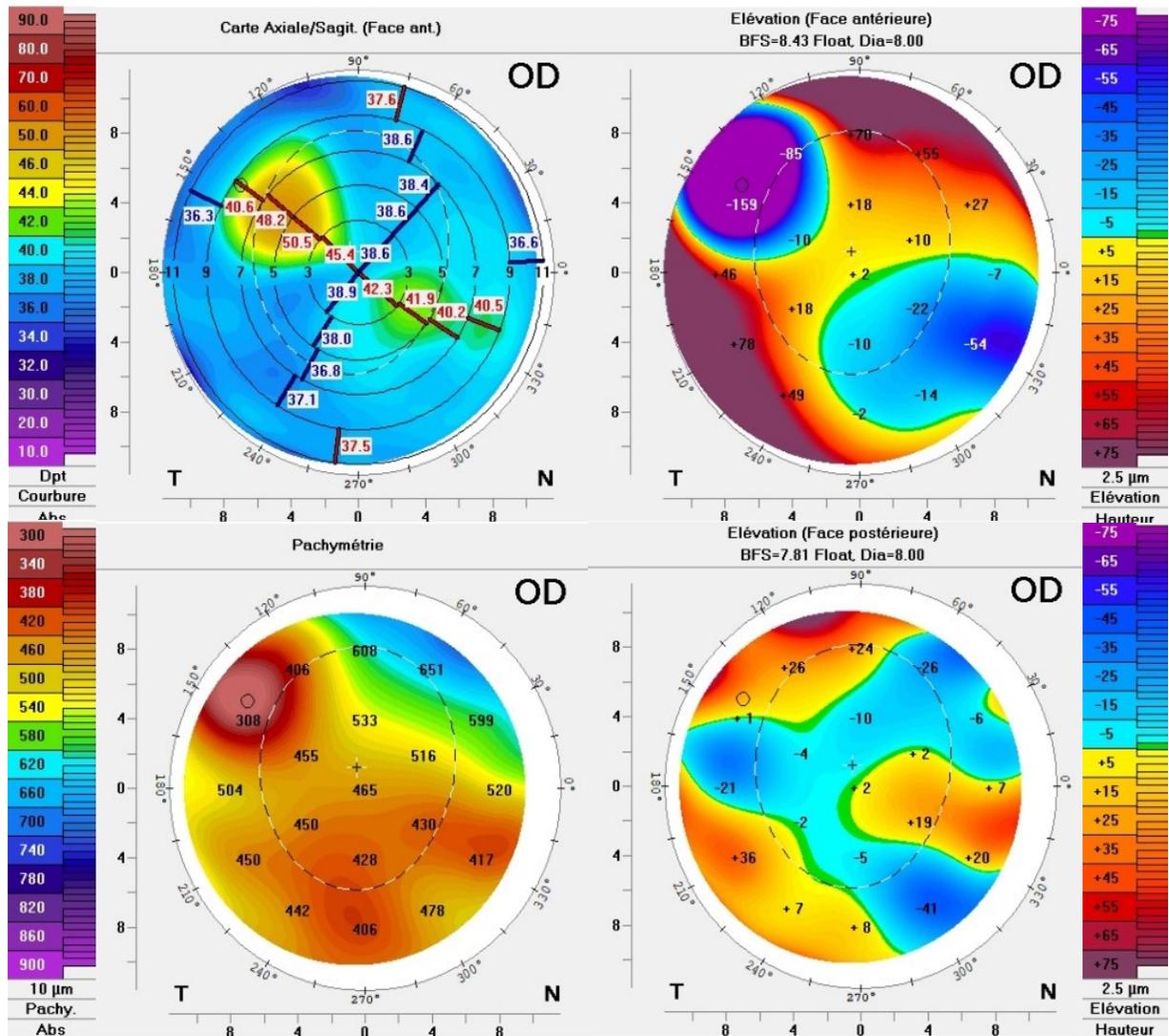


Figure 21. F2 : Cartes de courbure, d'élévation et de pachymétrie.

Sur un des rares clichés sans trop d'erreurs artéfactuelles ou de positionnement, on peut apprécier chez F2, à 6 mois de suivi, l'accentuation de la courbure antérieure (carte en haut à gauche), ainsi que la diminution de l'élévation antérieure (en haut à droite) et de la pachymétrie (en bas à gauche) de la cornée au niveau de l'implant. La carte d'élévation postérieure (en bas à droite) demeure cependant difficile d'interprétation.

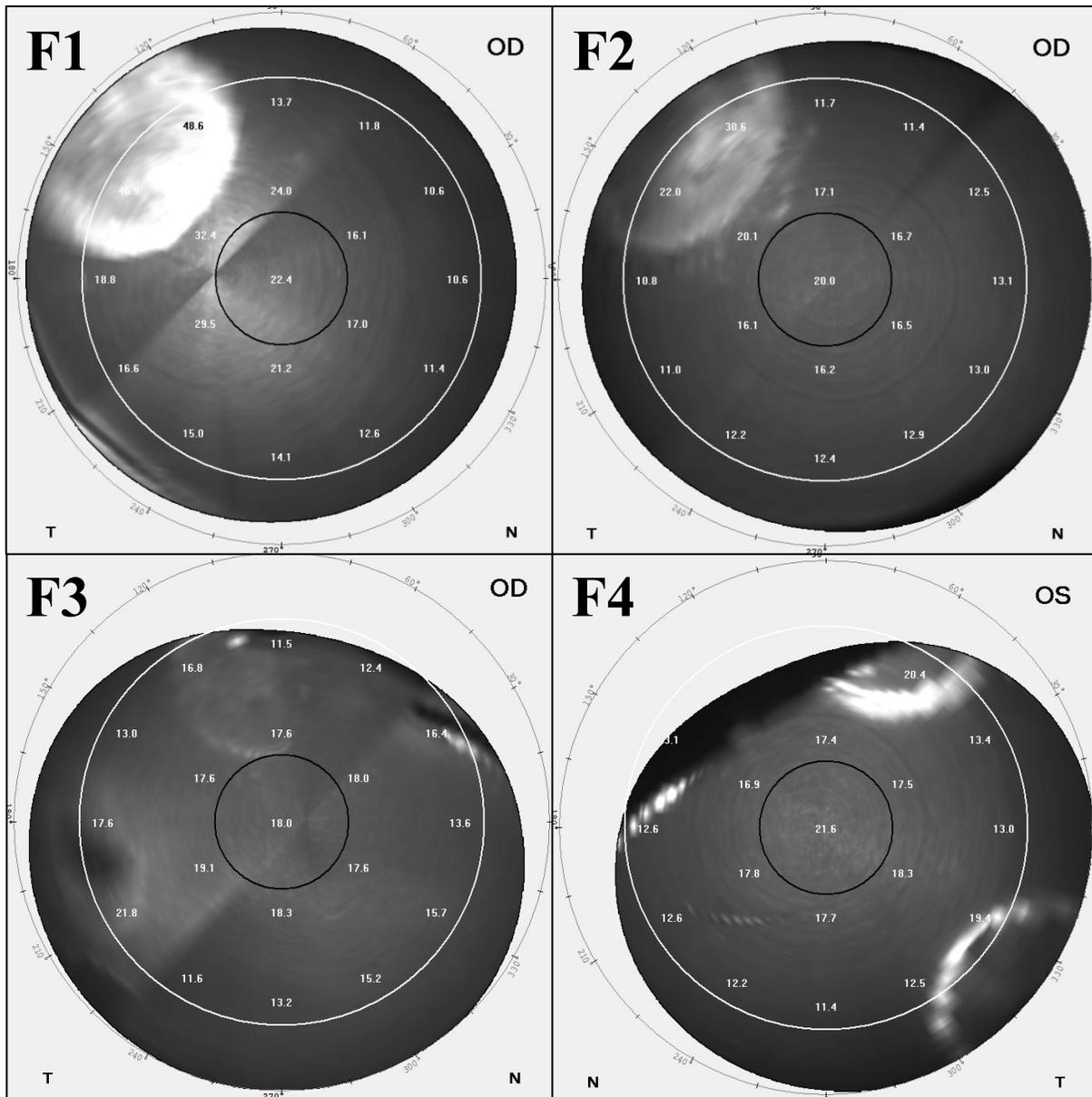


Figure 22. F1-4 : Cartes de densitométrie moyenne en fin de suivi.

Alors que la valeur de la densitométrie environne « 20 » au centre de la cornée de tous les sujets, on voit rapidement que les implants par ALK (F1>F2) semblent généralement plus opaques (ou réfringents) que les implants ILK de F3 et F4. En se fiant au niveau de l'échelle de gris, on voit que ces derniers ont une valeur centrale soit égale ou plus petite que celle de la cornée centrale.

4.1.1.9 Pachymétrie centrale par ultrasons

Initialement, les pachymétries du centre de la cornée sont similaires dans les 2 groupes (Student's t-test : $p = 0,743$, $d = 0,180$), avec une pachymétrie centrale à $587 \pm 13 \mu\text{m}$ dans le groupe expérimental contre $585 \pm 22 \mu\text{m}$ dans le groupe contrôle (**Figure 23**). Dans la première semaine

postopératoire, l'épaisseur centrale augmente de façon majeure (jusqu'à plus de 2 fois la normale) et se rétablit rapidement dès la fin de la première semaine. Toutefois, après cette période, les cornées greffées présentent un amincissement cornéen central significatif (Wilcoxon : $p < 0,001$) avec une pachymétrie centrale moyenne à $554 \pm 58 \mu\text{m}$ contre $587 \pm 46 \mu\text{m}$ dans le groupe contrôle.

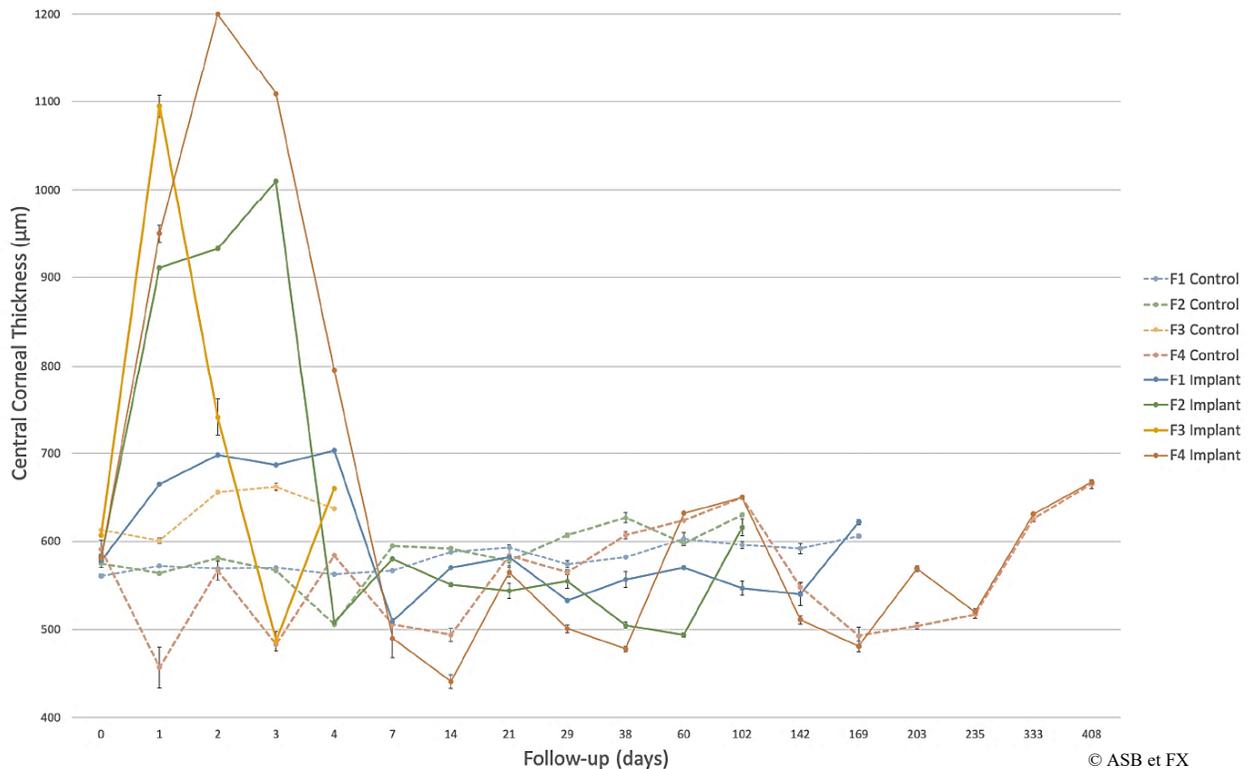


Figure 23. F1-4 : Évolution de la pachymétrie centrale.

Les barres d'erreur correspondent à la déviation standard entre les 5 mesures prises dans le même œil, au même endroit, lors de la même observation. La valeur de $1200 \mu\text{m}$ correspond à la limite de détection de l'appareil.

4.1.2 F1 & F2 : PC-MPC par ALK

4.1.2.1 Évolution générale

4.1.2.1.1 Œdème initial

F1 et F2 ont reçu les implants de PC-MPC par ALK. Ces derniers étaient maintenus par 3 points séparés en monofilament 10-0, passant en pont au-dessus de l'implant. L'évolution postopératoire dans la 1^{re} semaine a été marquée par un œdème cornéen diffus, diminuant la visualisation de tous

les détails iriens au niveau de l'implant comme au centre de la cornée. Cet œdème a été moins marqué chez F1, mais les deux sujets ont retrouvé en l'espace d'une semaine leur pachymétrie originelle, grâce, entre autres, à la propriété hypertonique du Muro 128™.

4.1.2.1.2 Réépithélisation

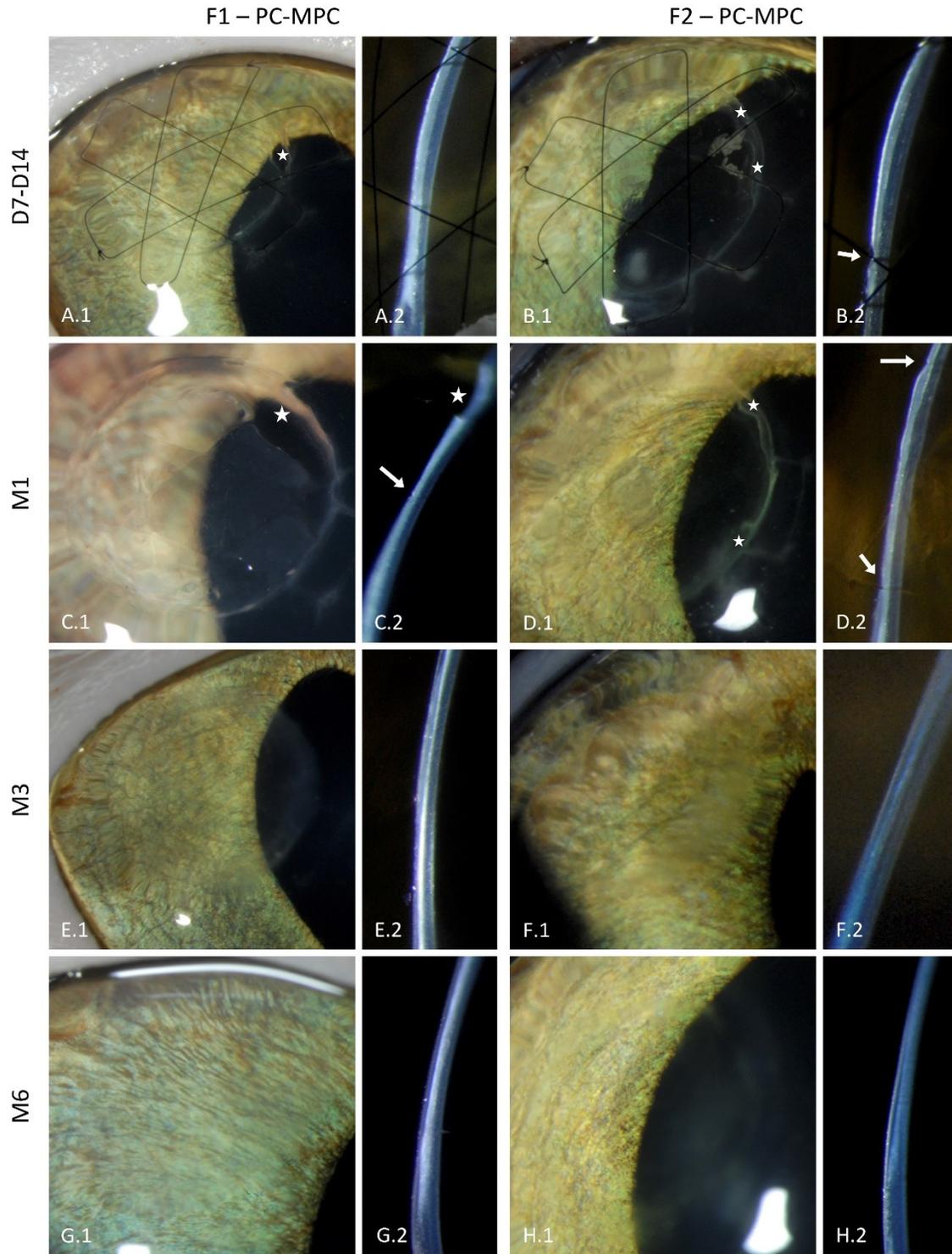
La réépithélisation de la cornée durant la première semaine postopératoire a permis de recouvrir tous les implants (première rangée, **Figure 24**), sauf au passage des fils de sutures où la cicatrisation ne se compléta qu'après 1 mois postopératoire (**Figure 25**). En fait, jusqu'à cette date, on remarquait des indentations dans les implants à l'endroit du passage des fils et de leur croisement, ainsi que la perte d'une partie antérieure de l'implant de F1 (A.1, C.1, C.2, **Figure 24**) et d'une minime partie en périphérie de F2 (B.1, D.1, **Figure 24**).

4.1.2.1.3 Transparence, infiltrats et néovascularisation

Les implants apparaissaient alors déjà bien transparents, avec une légère opacification de l'interface en périphérie. Les opacités étaient des infiltrats bien limités, arrondis, multifocaux sur toute la périphérie de l'implant (**Figure 25**). Progressivement et jusqu'à 6 mois postopératoires, les implants et l'interface périphérique sont devenus presque imperceptibles (**Figure 26**). Autrement, on a noté l'apparition d'un néovaisseau limbique millimétrique limité à l'incision de F2 à partir de la 3^e semaine, qui a complètement régressé à 2 mois postopératoires.

4.1.2.2 **Taille et remodelage des implants**

Au niveau de l'épaisseur des implants mesurée par l'OCT Thorlabs™, au 8^e jour postopératoire, celle-ci était en moyenne de $93 \pm 40 \mu\text{m}$ pour une épaisseur stromale postérieure de $151 \pm 14 \mu\text{m}$. Son épaisseur a diminué progressivement à 15 jours et jusqu'à la fin de la période de suivi (**Figure 27**). Au 6^e mois, on a noté une matrice néosynthétisée d'une épaisseur d'environ $109 \pm 28 \mu\text{m}$, un implant de $67 \pm 38 \mu\text{m}$ et un stroma postérieur mesuré à $140 \pm 11 \mu\text{m}$. L'épaisseur cornéenne totale au niveau des implants a augmenté significativement de $244 \pm 48 \mu\text{m}$ à 8 jours à $317 \pm 34 \mu\text{m}$ à 6 mois (t-test : $p < 0,001$, $d = -1,827$). À 6 mois postopératoires, le tissu néosynthétisé, l'implant résiduel et le stroma postérieur formaient 3 couches bien délimitées par l'OCT Visante™ (**Figure 28**).



© ASB et FX

Figure 24. F1 et F2 : Suivi à la lampe à fente des cornées opérées.

A et B : Aspect de l'implant, et maintien par points en pont de monofilament, avec une perte de fragments de l'implant (étoiles).

C et D : Aspect de l'implant à 1 mois postopératoire, avec une perte de fragments de l'implant (étoiles).

D.2 : Aspect à J21, lors du retrait des points sur F2 (PC-MPC).

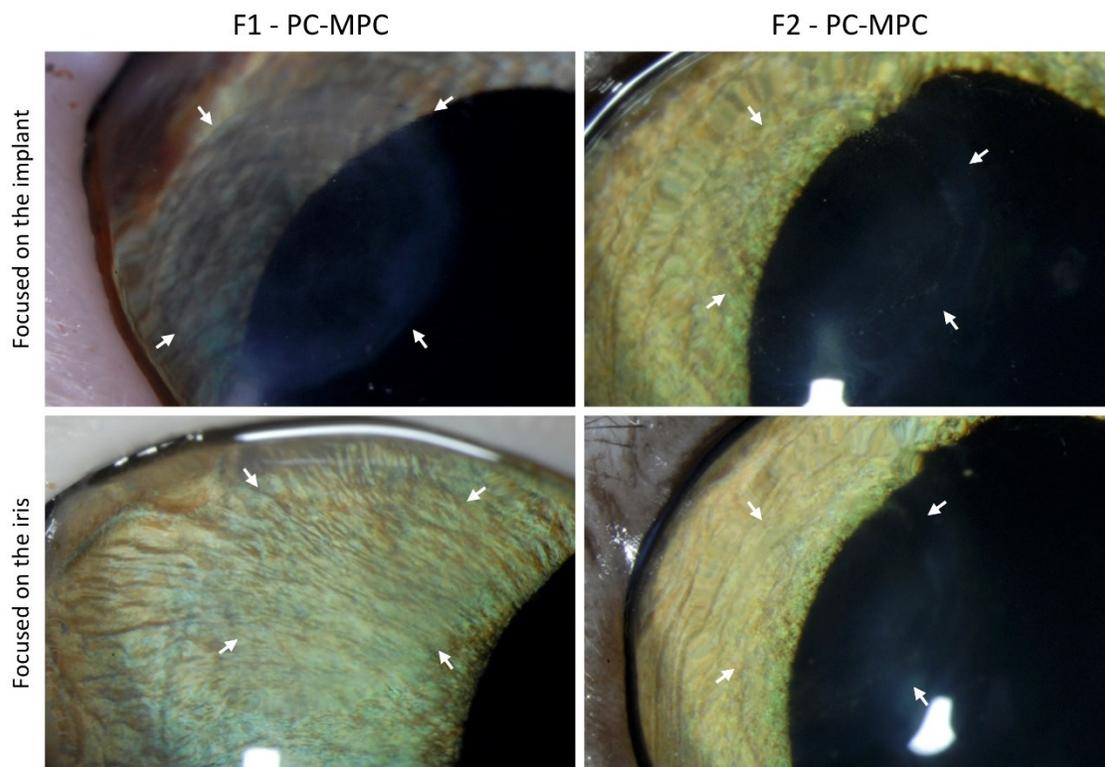
E à H : Éclaircissement progressif de l'implant (très peu visible en G.1) et épaissement de la matrice néosynthétisée.

Les flèches blanches mettent en évidence l'effet de cisaillement (indentation) sur la cornée par le monofilament.



Figure 25. F1 : Infiltrat périphérique de l'implant et cicatrisation épithéliale à 1 mois.

Les flèches rouges délimitent le trait de cicatrisation épithéliale sous l'ancien trajet des fils de suture. Le cercle blanc met en évidence le type d'infiltrat légèrement opaque qui ne se présente qu'en périphérie de l'implant.



© ASB et FX

Figure 26. F1 et F2 : Transparence des implants et de la cornée à 6 mois de suivi.

Les flèches blanches délimitent le pourtour des implants.

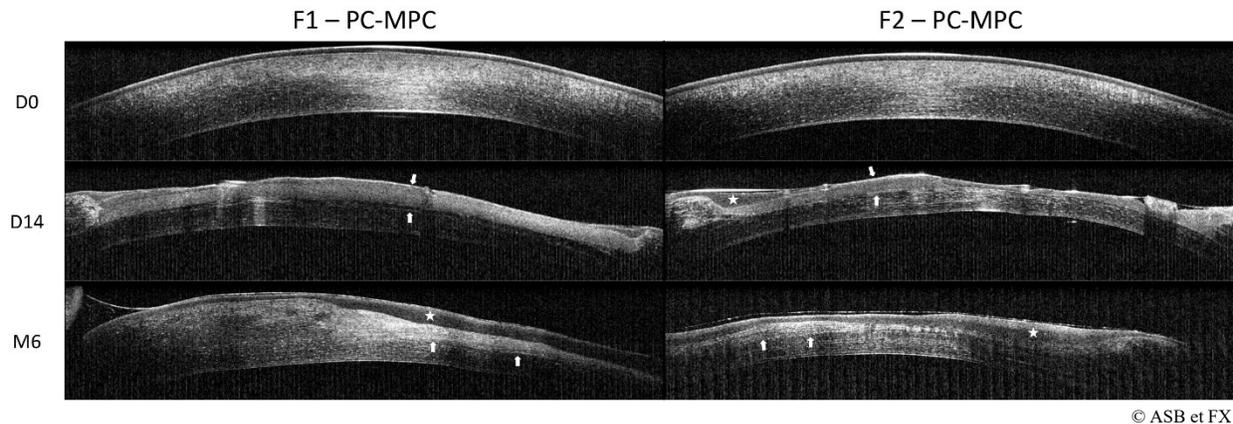


Figure 27. F1 et F2 : Suivi à l'OCT Thorlabs™ des cornées opérées.

On note à 14 jours l'impact des points de suture par la perte d'une lamelle de l'implant de F2. Les implants sont délimités par les flèches blanches et le tissu néosynthétisé est identifié par l'étoile blanche.

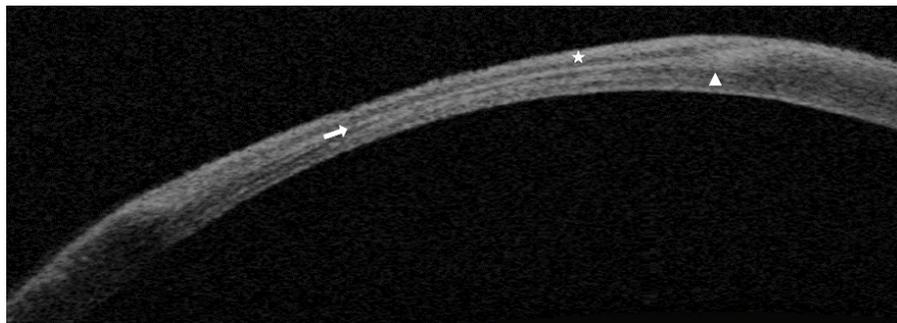


Figure 28. F2 : Coupe de l'OCT Visante™ de l'implant à 6 mois de suivi.

Cornée claire avec tissu néosynthétisé (étoile), implant résiduel (flèche) et stroma postérieur (triangle).

4.1.3 F3 : CLP-PEG-MPC et PC-MPC par ILK

4.1.3.1 Évolution générale

Le sujet F3 a reçu 2 implants par ILK : CLP-PEG-MPC (en temporo-inférieur) et PC-MPC (en naso-supérieur), avec seulement des points de suture limbiques. Les implants sont demeurés transparents, avec quelques opacités périphériques à partir du 14^e jour postopératoire qui sont restées stables jusqu'à la fin du suivi (**Figure 29**). Aucune particularité visible au niveau des implants ou de la cornée centrale n'a été notée durant la période de suivi (**Figure 30**).

4.1.3.2 Complications : séquestre cornéen

À la fin de la première semaine, l'évolution postopératoire est perturbée par la persistance d'un micro-ulcère épithélial en temporal supérieur, entre les deux implants. Cet ulcère n'a pas évolué

favorablement et seul un épithélium lâche a réussi à se former sur la lésion. Pour essayer stimuler la guérison épithéliale, un grattage épithélial a été effectué à J24. Devant la persistance du micro-ulcère dans la semaine suivante, une tarsorrhaphie temporaire a été réalisée à 4 semaines postopératoires, afin d'optimiser la protection de la surface cornéenne. À 7 semaines postopératoires, l'ulcère n'avait toujours pas cicatrisé et avait fait place à un début de séquestre avec un appel néovasculaire (**Figure 31**) trop important pour permettre un traitement conservateur. Cette suite d'évènements n'était jamais survenue au sein du laboratoire et il a été décidé de mettre l'animal à bat avant la déhiscence probable des implants et pour mieux étudier ce qui avait mené la cornée de l'animal à ce point.

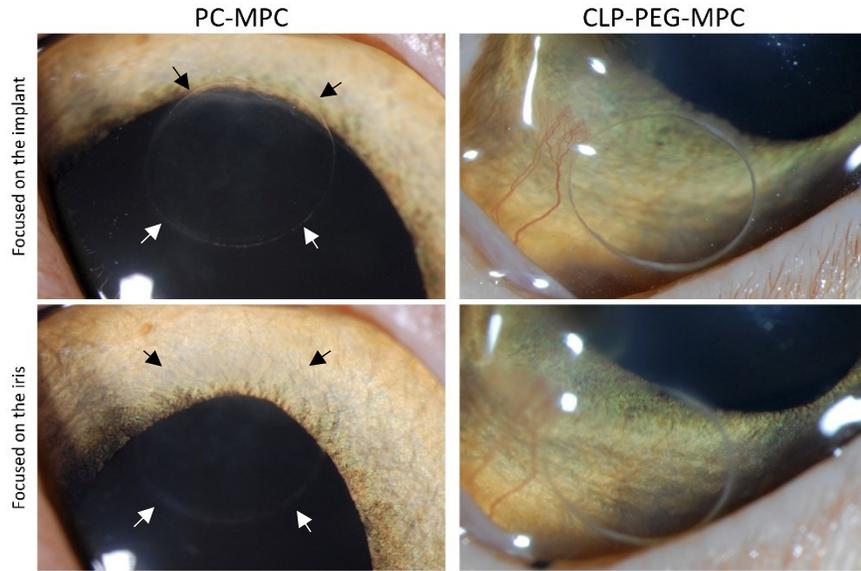
4.1.3.3 Taille et remodelage des implants

4.1.3.3.1 CLP-PEG-MPC

L'épaisseur de l'implant CLP-PEG-MPC n'a pas été mesurée en préopératoire. L'épaisseur était stable la première semaine de suivi et était de $184 \pm 3 \mu\text{m}$ au 1^{er} et 7^e jour postopératoire. À J7, un œdème de cornée était alors noté avec une épaisseur respective des stromas antérieur et postérieur de 419 ± 11 et $364 \pm 7 \mu\text{m}$. Par la suite, l'épaisseur de l'implant a diminué significativement et mesurait $172 \pm 5 \mu\text{m}$ à 1 mois postopératoire (t-test : $p = 0,003$, $d = 2,403$). L'épaisseur de l'implant est restée stable sans modification significative jusqu'à la 7^e semaine postopératoire, soit à $174 \pm 2 \mu\text{m}$ ($p = 0,268$, $d = -0,575$).

4.1.3.3.2 PC-MPC

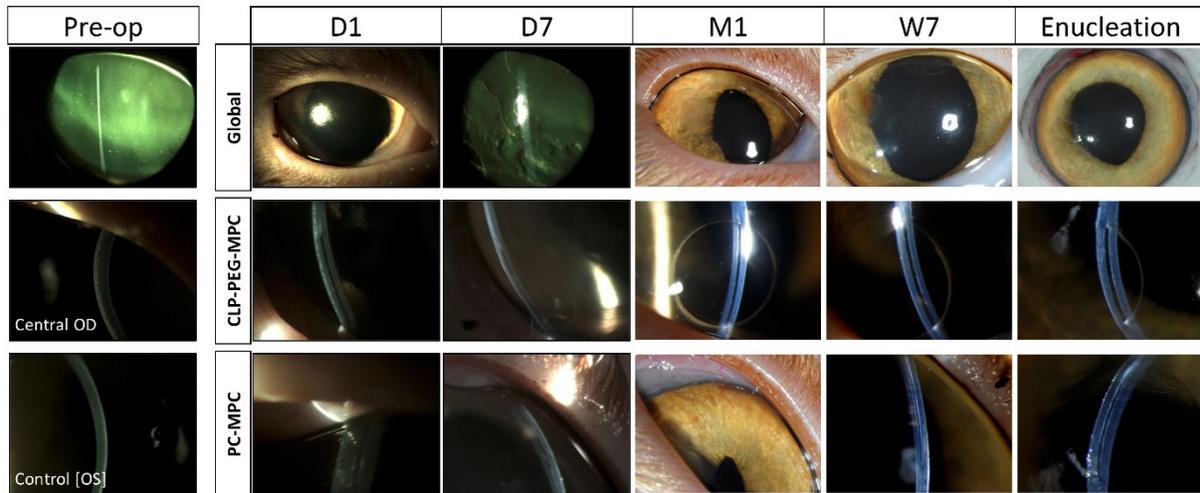
L'épaisseur de l'implant PC-MPC n'a pas été mesurée en préopératoire. L'épaisseur était stable la première semaine de suivi et était de $164 \pm 8 \mu\text{m}$ au 1^{er} et 7^e jour postopératoire. À J7, un œdème de cornée était alors noté avec une épaisseur respective des stromas antérieur et postérieur de 382 ± 7 et $280 \pm 4 \mu\text{m}$. Par la suite, l'épaisseur de l'implant a diminué significativement et mesurait $84 \pm 8 \mu\text{m}$ à 1 mois postopératoire ($p < 0,001$, $d = 11,981$). L'épaisseur est restée stable avec une légère augmentation à la 7^e semaine postopératoire à $101 \pm 2 \mu\text{m}$ ($p = 0,12$, $d = -1,589$).



© ASB et FX

Figure 29. F3 : Transparence des implants et de la cornée à 6 mois de suivi.

Les flèches délimitent le pourtour des implants.



© ASB et FX

Figure 30. F3 : Suivi à la lampe à fente de la cornée opérée.



© ASB et FX

Figure 31. F3 : Séquestre et néovascularisation de la cornée opérée.

Aspect brunâtre du séquestre (flèches bleues) avec un appel néovasculaire important (flèches rouges).

4.1.4 F4 : CLP-PEG-MPC et CLP-PEG par ILK

4.1.4.1 Évolution générale

Le sujet F4 a reçu 2 implants par ILK : CLP-PEG (en temporo-inférieur) et CLP-PEG-MPC (en naso-supérieur), avec seulement des points de suture limbiques. Contrairement à F3, il n'y a pas eu de problème de cicatrisation épithéliale. L'évolution a surtout été marquée par des opacités arrondies bien limitées apparaissant à partir de 2 semaines postopératoires en périphérie de l'implant qui ont perduré toute la durée de suivi jusqu'à 1 an (**Figure 32, Figure 33**). Des opacités similaires sont apparues également à l'interface antérieure et postérieure des implants à 3 mois postopératoires (C.1, D.1, **Figure 34**). Ces opacités devant et derrière l'implant de CLP-PEG sont disparues à partir 5 mois postopératoires (F.1, **Figure 34**). Concernant l'autre implant, on a noté un néovaisseau millimétrique sur l'incision limbique naso-supérieure à partir de 2 semaines postopératoires. Au 3^e mois postopératoire, ce dernier a progressé en direction de l'implant (C.1, **Figure 34**). Il a évolué jusqu'à pénétrer l'interface superficielle et profonde de l'implant, et son extension était maximale à 5 mois postopératoires (E.1, G.2, **Figure 34**). Devant l'aspect important de la néovascularisation, on a introduit un traitement de tobramycine 0,3% et de dexaméthasone 0,1% BID dans l'œil opéré (Tobradex onguent, Alcon). Le traitement a été interrompu au bout de 2 mois, à la suite de la régression de la néovascularisation (G.1, **Figure 34**). Progressivement, de 6 mois à 12 mois postopératoires, l'implant CLP-PEG-MPC est devenu plus transparent et l'on a vu la régression des opacités antérieures et postérieures, ainsi que de la néovascularisation, mais cette dernière a toutefois laissé des lignes d'opacification stromale le long de son ancien trajet (I.1, K.1, **Figure 34**).

4.1.4.2 Taille et remodelage des implants

La taille des implants a été évaluée tout au long du suivi de 1 an grâce aux coupes OCT Thorlabs™ (**Figure 35**). D'après un modèle de régression linéaire, il n'y a pas eu de changement statistiquement significatif de l'épaisseur des implants au cours de l'année de suivi, aussi bien pour l'implant CLP-PEG que CLP-PEG-MPC (CLP-PEG : $p = 0,860$, $R^2 = 0,00$, Durbin-Watson = 2,272 ; CLP-PEG-MPC : $p = 0,936$, $R^2 = 0,00$, Durbin-Watson = 2,226). L'épaisseur moyenne de l'implant CLP-PEG était de $156 \pm 10 \mu\text{m}$ au cours du suivi, contre $137 \pm 16 \mu\text{m}$ pour l'implant CLP-PEG-MPC.

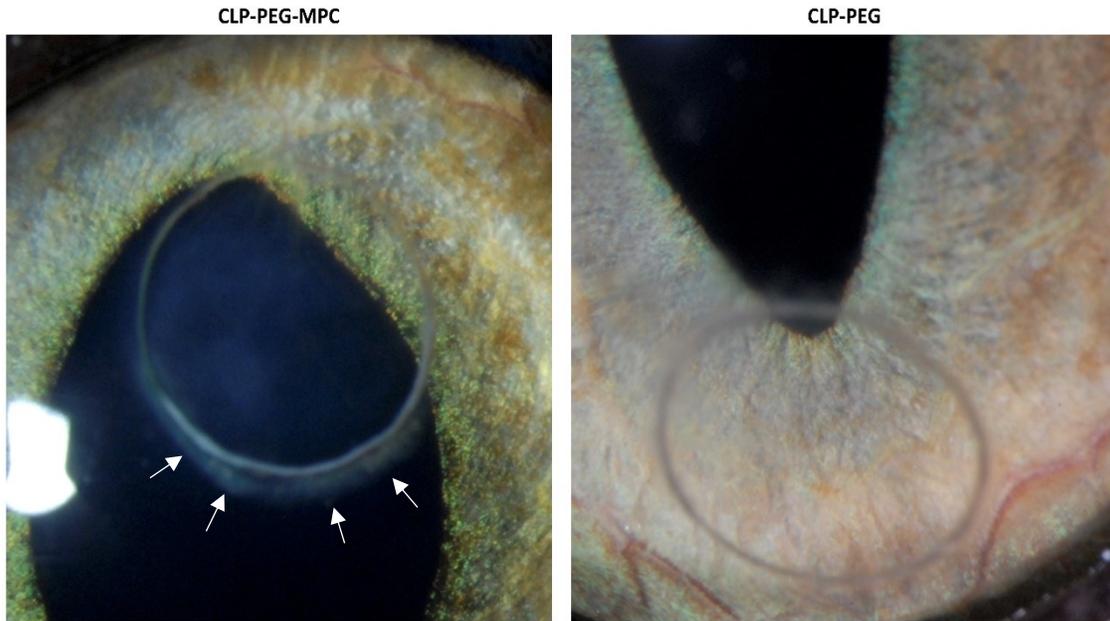


Figure 32. F4 : Transparence des implants et de la cornée après 12 mois de suivi.

Bien que les implants eux-mêmes soient demeurés transparents jusqu'à la fin du suivi, l'opacification de l'interface implant-cornée par l'infiltrat blanchâtre (flèches) n'est jamais disparue.

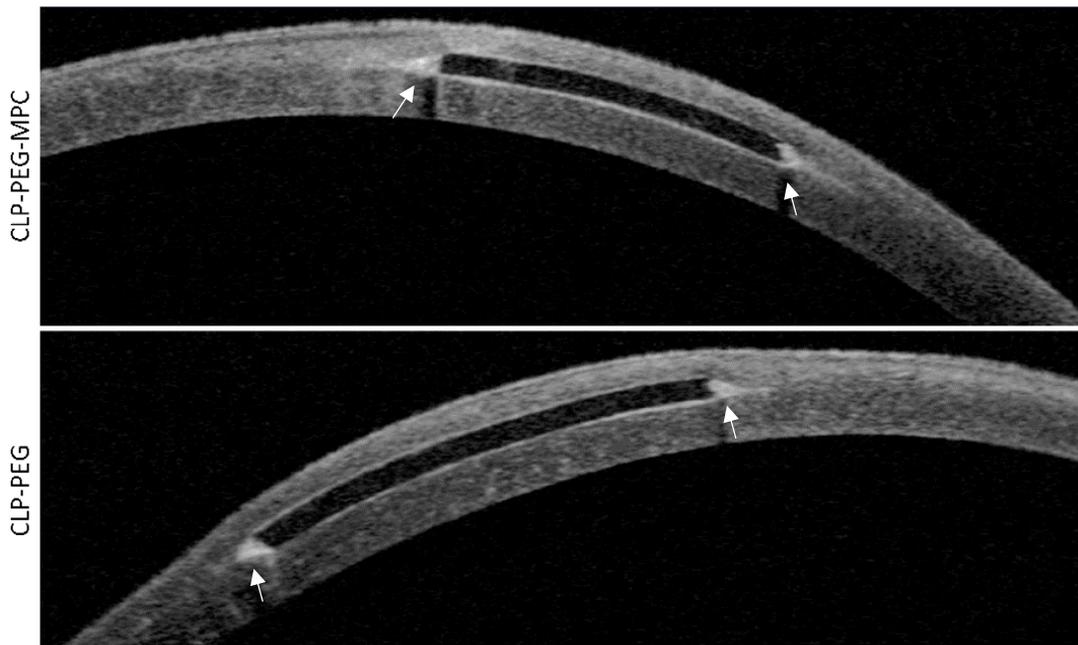
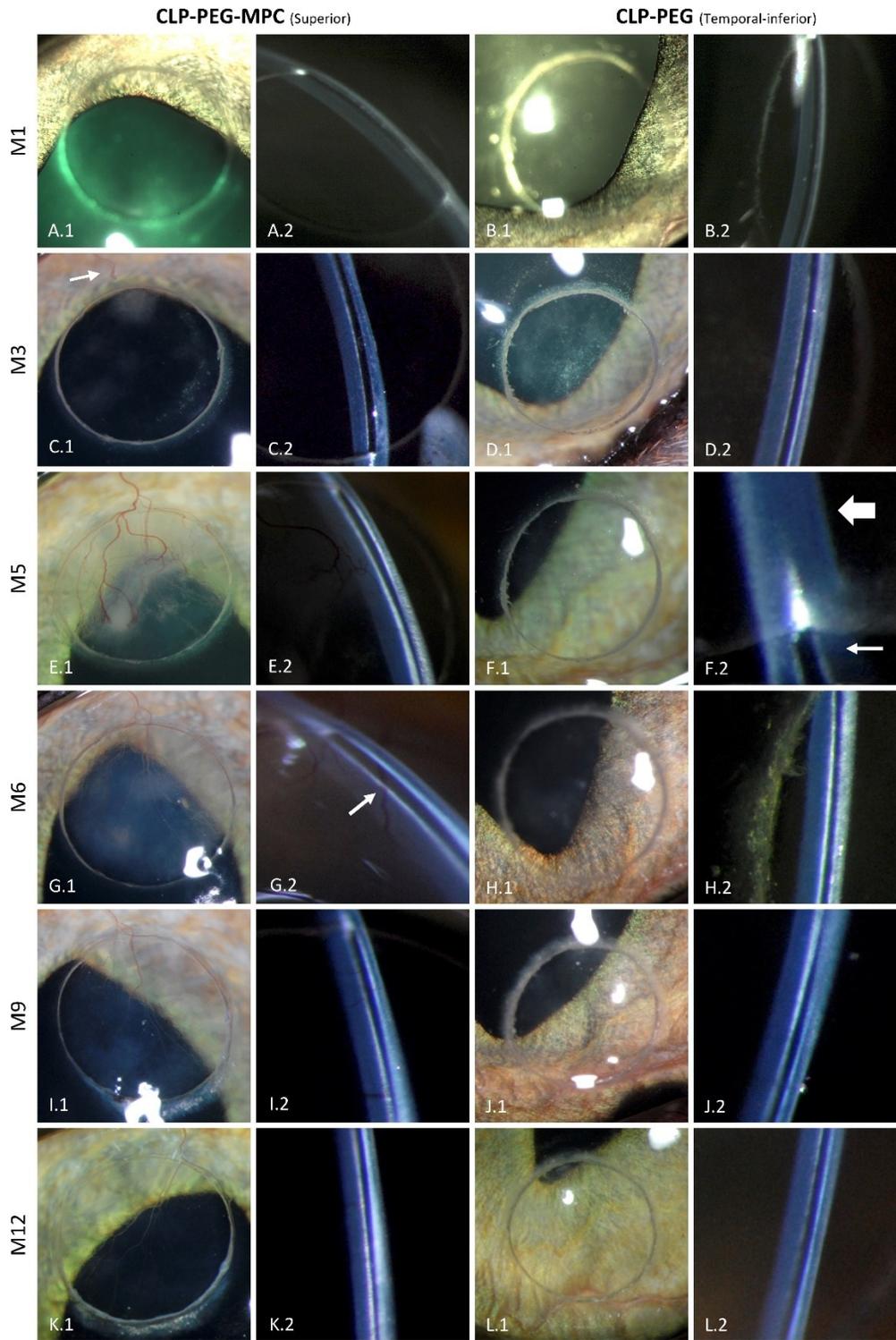


Figure 33. F4 : Coupe OCT Visante™ des implants après 12 mois de suivi.

Cette coupe montre la transparence des implants et offre un autre point de vue des infiltrats blanchâtres (flèches) qui semblent vouloir combler l'espace stromal induit par la présence de l'implant.



© ASB et FX

Figure 34. F4 : Suivi à la lampe à fente de la cornée opérée.

A et B : Implants bien transparents à 1 mois postopératoire.

C et D : Apparition d'opacités arrondies bien limitées multifocales en périphérie de l'implant. C.1 : Apparition d'un appel néovasculaire (flèche).

E et F : Néovascularisation (active) de l'implant CLP-PEG-MPC, tandis que CLP-PEG reste bien transparent.

G : Régression de la néovascularisation, avec opacification de l'interface.

I à L : Régression progressive des opacités et de la néovascularisation, avec amélioration progressive de la transparence.

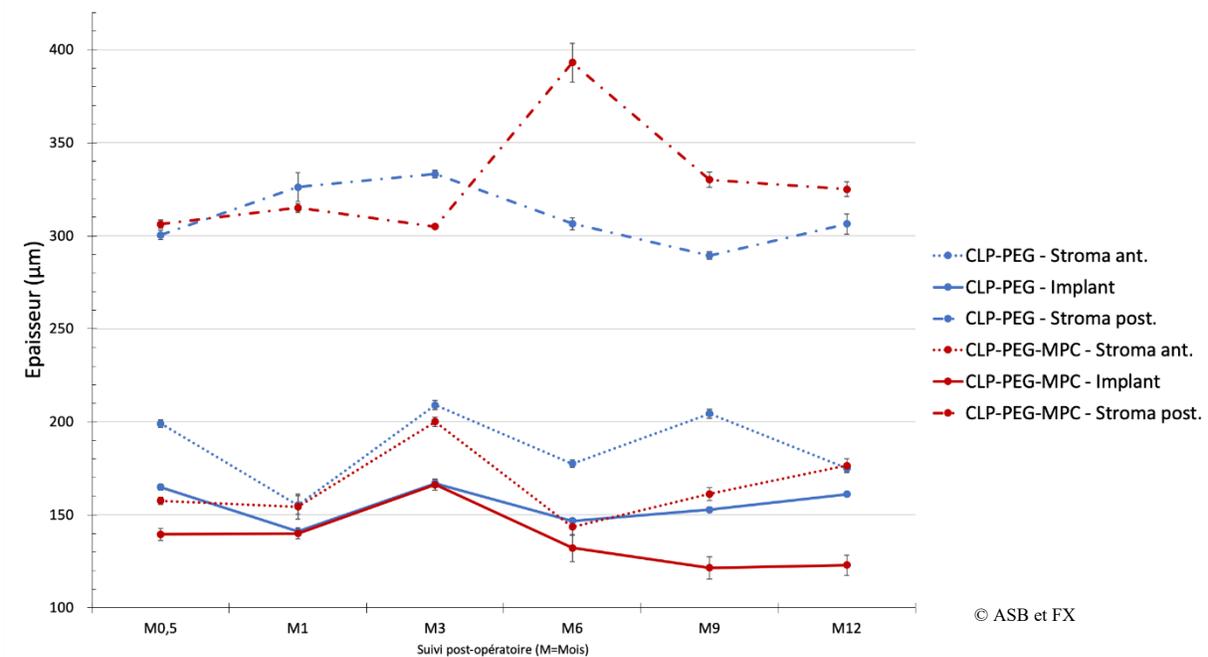


Figure 35. F4 : Évolution de l'épaisseur de la cornée et des implants sur 12 mois.

4.1.5 Discussion

4.1.5.1 Biocompatibilité, régénération et transparence

Les implants cornéens biosynthétiques formés de collagène ou de peptides mimétiques du collagène présentent une solution potentielle pour les patients à haut risque de rejet de greffe. Avant d'utiliser ces implants chez les patients humains, il est nécessaire de bien évaluer leur biocompatibilité et leur fonctionnalité chez un modèle animal représentatif au préalable. Pour que ce modèle soit représentatif, il faut non seulement que l'anatomie et la physiologie de sa cornée soient similaires à l'humain, mais que l'évaluation qu'on en fait soit comparable à ce qui sera fait lors du suivi clinique des patients opérés. Notre étude évalue donc, pour la première fois, la biocompatibilité et la fonctionnalité de certains de ces bio-implants sur le modèle animal.

4.1.5.1.1 Biocompatibilité

Le félin est un animal auquel notre laboratoire est habitué et comme la dernière étude de notre laboratoire sur le sujet des implants cornéens chez cet animal,¹⁰⁸ nous rapportons une bonne tolérance des implants chez le modèle félin avec très peu d'inflammation initiale et sans

complication intraoculaire. Dès la première semaine postopératoire, on note une migration épithéliale avec, dès 1 mois, la formation d'un épithélium intègre.

4.1.5.1.2 Remodelage

À 3 mois, on note la génération d'une nouvelle matrice stromale extracellulaire. Islam et coll. ont démontré dans leur étude sur le cochon la présence après un an de suivi d'un remodelage au niveau des mêmes implants CLP-PEG par la présence de collagène I et V, ce collagène étant initialement exempt des implants.¹⁶¹ Cette régénération matricielle *de novo* n'était cependant pas encore complète après un an et il restait des traces de CLP-PEG. Dans notre étude, les implants du F4, suivi sur plus d'un an, montrent en fait un aspect relativement inchangé aux coupes OCT et une taille demeurant sensiblement la même tout au long de l'étude, indiquant que la résistance du CLP-PEG-MPC aux collagénases nuit peut-être à son remodelage. Cependant, nos cornées montraient un remodelage bien visible à l'OCT (**Figure 27**, **Figure 28**) et la présence au microscope confocal de collagène néosynthétisé et de nerfs régénérés (F, **Figure 19**). Pour connaître la nature exacte des modifications cellulaires ayant eu lieu dans nos implants, des analyses du contenu cellulaire (kératocytes et nerfs) et moléculaire (collagènes I et V) des cornées opérées sont prévues lors de leur étude immunohistologique.

4.1.5.1.3 Réinnervation

Rafat et coll.²⁴⁴ rapportent chez le modèle de cochon nain une réinnervation des implants de PC I installés par ALK qui apparaît entre 2 et 6 mois postopératoires. L'étude de McLaughlin et coll.¹⁸⁸ décrit la réinnervation d'implants PC-PEG-MPC installés par ALK sur 20 cochons d'Inde. À l'aide d'une électrode directement montée sur le nerf optique, les auteurs démontrent que la réinnervation des implants débute dès le 3^e mois postopératoire, grâce à la reconstitution d'un plexus sous-épithélial, et qu'elle permet une activité fonctionnelle et comparable aux yeux contrôle à 8 mois postopératoires. Jangamreddy et coll.¹⁸⁷ rapportent pour les implants CLP-PEG installés par ALK la présence à 12 mois d'une réinnervation des implants biosynthétiques, avec un seuil sensibilité cornéen qui revient progressivement à la normale : aucune sensation à 5 semaines, avec retour à une sensibilité normale à 6 mois. À 3 mois, ils notent également que les implants CLP-PEG offrent une meilleure sensibilité cornéenne que les implants RHCIII. À notre connaissance, notre étude est la première qui montre la réinnervation d'un implant de CLP-PEG-MPC et la première qui montre la réinnervation d'un implant biosynthétique installé par ILK. Toutefois, bien que les yeux opérés

sont généralement moins sensibles dans notre étude, l'évaluation fonctionnelle de cette réinnervation est limitée, car la sensibilité cornéenne n'a été prise qu'au centre de la cornée, plutôt qu'au regard des implants. Pankert et coll. avait cependant montré une bonne corrélation entre la présence de nerfs dans les implants et le regain de sensibilité à cet endroit.¹⁰⁸

4.1.5.1.4 Transparence et infiltrats

Tous les implants étaient transparents au terme de l'étude et ces données se rapprochent de celles rapportées dans la littérature sur les implants biosynthétiques de la cornée implantés chez les animaux (**Tableau 3**). À l'appréciation générale de la densitométrie mesurée par le Pentacam, on voit que la mesure évaluée par l'appareil corrèle mieux avec ce qui est observé à la fente fine de la LAF qu'à l'examen en vue de face des implants. En effet, bien que la transparence au regard des implants soit très bonne en fin de suivi (**Figure 16**), on voit que l'implant de F1 semble plus dense sur la carte générée par le Pentacam que F2 (**Figure 22**). Cette affirmation est également vraie lorsqu'on compare la transparence en fente fine de F1 et F2 à l'examen de la LAF (G2, H2, **Figure 24**), où F1 paraît plus réfringent que F2. En se rappelant que le Pentacam utilise une fente fine et le principe de Scheimpflug pour générer ses mesures, on peut comprendre pourquoi ces examens sont comparables. Similairement, F4 paraît très transparent à la fois sur la carte de densitométrie du Pentacam (**Figure 22**), sur les coupes OCT (**Figure 33**) et sur la fente fine de la LAF (K2, L2, **Figure 34**), mais un peu moins à l'examen de face à la LAF (**Figure 16**).

Le résultat optique ou esthétique n'était cependant pas parfait, des opacités persistantes étant venues s'installer très rapidement en périphéries des implants ; des implants installés au centre de la cornée ne nuiraient ainsi pas à la qualité de la vision. Or, les implants ont également transitoirement été opacifiés en leur centre et dans le cas de F4, on a pu observer une corrélation entre la persistance des opacités au niveau de l'interface cornée-implant antérieure et postérieure et la présence de néovaisseaux. McLaughlin et coll.²⁴⁵ émettent en ce sens l'hypothèse que l'opacification transitoire et l'appel néovasculaire seraient liés à la migration et à la différenciation des kératocytes qu'ils ont dénotés au sein des implants. Cependant, plus d'études sont nécessaires pour élucider les causes exactes de ces opacifications et de l'appel néovasculaire ; les analyses histologiques des implants de F1 à F4 permettront de vérifier la nature des infiltrats en périphérie des implants.

4.1.5.2 Inflammation et néovascularisation

4.1.5.2.1 Humain versus animal

Dans les études similaires à la nôtre (**Tableau 3**), la néovascularisation des implants est un évènement récurrent, quel que soit le modèle animal choisi. Et cet appel néovasculaire en soi est problématique. En effet, même si la néovascularisation est transitoire, les vaisseaux perturbent l'organisation stromale sur leur passage et provoquent des dommages permanents, comme cela a été le cas de l'implant CLP-PEG-MPC de F4. En contrepartie, on sait que l'inflammation oculaire est souvent plus prononcée chez le modèle animal que chez l'humain²⁴⁶ et, dans les études animales, il y a soit pas ou peu de traitement anti-inflammatoire postopératoire, afin évaluer la progression naturelle des cornées opérées sans facteurs de confusion. En comparaison, les greffes humaines nécessitent généralement un traitement anti-inflammatoire durant plus de 6 mois.²⁴⁷

4.1.5.2.2 Toxicité des implants et traitement antiinflammatoire

Bien que les sutures soient connues pour induire un appel néovasculaire dans les greffes cornéennes,²⁴⁸ la néovascularisation des implants biosynthétiques survient généralement bien après le retrait des sutures, et ce peu importe le type d'implantation. Ceci semble donc pointer au fait que ce sont les implants qui sont responsables de l'inflammation cornéenne et de l'appel néovasculaire subséquent dans ces études. Jangamreddy et coll.¹⁸⁷ rapporte dans leur étude que le début de la néovascularisation survient 3 mois après l'opération, accompagné d'une opacification temporaire des implants. Bien que notre étude soit d'un petit volume, la néovascularisation ne progressa que vers un seul implant (F4, CLP-PEG-MPC). Elle débuta en effet vers 3 mois postopératoires avec summum au 5^e mois, puis une régression progressive des néovaisseaux sous traitements anti-inflammatoires. En fait, en plus du traitement anti-inflammatoire usuel pendant un mois postopératoire (jusqu'au retrait des sutures), il a été jugé nécessaire d'intervenir de façon conservatrice en réitérant ce traitement pendant les 2 mois durant lesquelles la croissance néovasculaire était à son maximum (de 4 à 6 mois) chez le F4. Ceci a probablement joué un rôle dans la régression de la néovascularisation, mais aucun néovaisseau n'était visible dans la cornée même 6 mois après la cessation du traitement anti-inflammatoire (c.-à-d. après un an de suivi total), suggérant soit qu'il faut réussir à avoir dessus sur l'inflammation pour en venir à bout de façon durable, soit que la néovascularisation ne perdure pas après 6 mois postopératoires tout simplement.

4.1.5.2.3 Rôle du MPC dans l'inflammation

Rappelons-nous que le MPC est connu pour ses propriétés anti-inflammatoires¹⁵⁵⁻¹⁵⁸ et que c'est la raison pour laquelle il a été testé chez des patients à haut risque de rejets dans une étude clinique, dont les cornées sont demeurées exemptes de néovascularisation durant les 9 à 12 mois de suivi.¹⁵² Les deux implants ALK avec PC-MPC n'ont pas eu de réaction inflammatoire cornéenne importante, mais les animaux avec ILK sont ceux qui en ont le plus souffert, alors que le but de l'ILK était de s'éviter l'appel néovasculaire induit par les sutures sur l'implant. F3, qui avait deux implants fabriqués avec du MPC a eu un ulcère cornéen intraitable et beaucoup de néovaisseaux. F4 a vu son seul implant avec du MPC couvert de néovaisseaux durant plus de 2 mois.

4.1.5.2.4 Techniques chirurgicales : avantages, limites et nouvelles approches

4.1.5.2.4.1 *Rôle de l'ILK dans l'inflammation*

On pourrait donc croire, malgré le faible échantillon, que les ILK mettent la cornée à plus haut risque d'inflammation et d'appel néovasculaire. Une explication pourrait être que les points de suture au limbe (ILK) sont plus propices à créer un appel néovasculaire que ceux sur la cornée (ALK), car le limbe ne possède pas le privilège immunologique de la cornée,⁹⁴⁻⁹⁶ et ceci pourrait être ce qui déclenche la réaction inflammatoire qui se propage à l'implant. De plus, la kératotomie intrastromale effectuée lors de l'ILK pourrait faciliter la croissance des néovaisseaux qui semblent en effet se propager de l'incision limbique suturée et suivre le trajet de la coupe intrastromale chez F4.

4.1.5.2.4.2 *Problèmes liés à l'ALK*

Il faut donc se demander si, finalement, l'ALK représente un avantage par rapport à l'ILK en ce qui a attiré à l'inflammation cornéenne. Toutefois, les implants PC-MPC des sujets F1 et F2 installés par ALK ont eu une réépithélisation plus longue et ont perdu quelques parties de leur matrice lors des premières semaines postopératoires. Cet événement n'a pas été rapporté dans les études utilisant une ALK avec des sutures en pont par-dessus l'implant chez l'animal,^{157, 185, 244} mais Fagerholm et coll.¹⁷² décrivent dans leur étude clinique de phase 1 que certains patients avec ce type de sutures ont souffert sensiblement des mêmes problèmes : réépithélisation retardée, ainsi qu'amincissement et fibrose des implants. Nous pensons que ceci est principalement lié à la technique de suture, où les fils indentent l'implant grâce à un effet de cisaillement. En ce sens,

Ljunggren et coll.¹⁵⁴ ont comparé les résultats postopératoires après 12 mois d'implantation de substituts cornéens RHCIII maintenus en place par des sutures sus-jacentes ou des sutures individuelles. La seule différence notée a été que les sutures individuelles induisaient plus de néovascularisation de la cornée. Est donc venue l'idée de concevoir une chirurgie avec un résultat similaire à l'ALK, mais en utilisant l'approche initiale de l'ILK.

4.1.5.2.4.3 Approche mixte ALK et ILK

Cette méthode est présentée dans l'étude de Pasychnikova et coll.²⁴⁹ : les implants de 6 mm de diamètre sont tout d'abord insérés par ILK, puis le stroma antérieur est retiré par-dessus l'implant, mais avec un rayon de coupe de 5 mm, ce qui évite à l'implant de sortir. Dans cette étude sur le lapin, aucune réaction inflammatoire importante n'a été notée et la seule néovascularisation qui a été observée était restreinte aux points de sutures limbiques et s'est résorbée après le retrait des points.

4.1.5.2.4.4 Utilisation de la colle de fibrine

Une autre technique pour l'implantation de substituts cornéens solides pourrait être d'utiliser de la colle de fibrine comme ceci se fait déjà dans certaines chirurgies conjonctivales,²⁵⁰ ou a été tenté dans différents types de chirurgies cornéennes : transplantation de membrane amniotique²⁵¹ ou de cellules souches limbiques,²⁵² épikératophaquie,²⁵³ stabilisation de kératoprothèse²⁵⁴ et greffe de cornée.²⁵⁵⁻²⁶⁰ La colle de fibrine permet de lier solidement, rapidement et aisément un corps étranger à la cornée même si elle est humide, et elle est bien tolérée par les patients, n'est pas toxique et a même certaines propriétés antimicrobiennes.²⁶⁰

4.1.5.2.4.5 Épouser la forme de l'implant avec celle de la cornée

Une autre solution serait de découper l'implant et le stroma receveur de sorte que leurs formes s'épousent et maintiennent l'implant en place, ce qui est actuellement réalisable grâce à des lasers, comme dans la méthode FLISK utilisée par Koulikovska et coll.¹¹⁵ Ces derniers utilisent une découpe au laser femtoseconde lors de leur étude sur les implants à base de PC-MPC et ils réussissent ainsi à maintenir en place 15 implants lenticulaires intrastomax de 3 mm x 100 µm dans les cornées de lapin, sans utilisation de suture et sans inflammation. Toutefois, compte tenu du prix d'achat et d'entretien des lasers femtosecondes, l'application à des fins uniquement précliniques reste limitée. Or, pour éviter les complications secondaires à l'utilisation des points

de suture sur les implants solides, il est, comme on le sait maintenant, également possible de profiter des effets de la réticulation du collagène grâce à l'irradiation des implants imbus de riboflavine,¹⁷⁵ ou encore, comme cela a été l'objectif du présent projet, de mettre au point un implant qui, de par sa composition, s'intègre et se lie dès la chirurgie à la cornée hôte.

Tableau 3. Revue de la littérature sur les implants cornéens biosynthétiques en recherche translationnelle.

Auteurs	Année	Description des implants		Animaux	Protocole chirurgical	Suivi		Résultats	Commentaires
		Composition	Taille (∅)			Durée	Modalités		
Liu et coll. ¹⁸⁵	2006	- PCI - EDC/NHS 0,5:1	350 µm/5 mm (L) 500 µm/6 mm (C)	16 lapins blancs (L) 8 cochons nains de Göttingen (C)	ALK Suture en pont retirée à S3 0 anti-infl.	6 mois	LAF, Schirmer Fluorescéine Esthésiométrie Topographie M. confocale	- Ré-Épithélisation dans la 1re semaine - Présence de cellules stromales à M3 - Nerfs présents dès M3	- Évolution similaire entre les 2 groupes - Photos en N&B
Rafat et coll. ²⁴⁴	2008	- PCI 10% - Chitosan 3% - PEG-DBA - EDC/NHS	500 µm/6 mm	2x4 cochons nains du Yucatan	ALK Suture en pont retirée à S4	12 mois	LAF M. confocale	- Euthanasie d'un groupe devant néovascularisation avancée et haze - Épithélisation normale à M2 - 60% de kératinocytes à M8-12 - Nerfs présents à M8-12 - Diminution de la densité endothéliale	- Moins de haze à M2 que Liu et coll. ¹⁶⁰ - Pas de photos
Liu et coll. ¹⁶⁰	2009	<u>Implants PC-MPC :</u> - PCI 20% - PEG:MPC- PEG 3:1 - MPC - EDC/NHS <u>Implants RHCIII :</u> - RHCIII - PEG, MPC - EDC/NHS	350 µm/5,25 mm (L) 500 µm/6,25 mm (C)	4 lapins blancs de la Nouvelle- Zélande 4 cochons nains du Yucatan (C)	ALK Suture en pont retirée à S3 Stéroïdes si néovascularisation	12 mois	LAF Esthésiométrie Microscopie confocale	- Néovascularisation de tous les implants (cochon et lapins), résolu par administration de stéroïdes - Régénération complète épithéliale, kératocytes et nerfs à 12 mois - Absence de macrophages	- Implants RHCIII-MPC plus résistants et moins biodégradable théoriquement que les implants PC- MPC
McLaughlin et coll. ¹⁸⁸	2010	- PCI 20% - PEG:MPC- PEG 3:1 - MPC 4:1, 2:1, 1:1 - EDC/NHS	150 µm/3,5 mm	20 cochons d'Inde	KT de 3 mm Surjet 10-0	8 mois	LAF Esthésiométrie Activité neurale M3, M8	- Néovascularisation de tous les implants, résolu par 2 semaines de stéroïdes - Haze modéré à S3, résolu à M2 - Implants transparents à M6 - Innervation débutante à M3, complète avec plexus subépithélial et activité à M8 - Colonisation stromale et épithéliale normale à M8	- 1re étude montrant la régénération neuronale <i>in vivo</i> dans les bio- implants - Bonne tolérance de la greffe transfixiante
Hackett et coll. ¹⁵⁷	2011	- RHC III 13,7% - EDC/NHS - 575 mw- PEG - ± MPC	350 µm/6,25 mm	Lapins blancs de la Nouvelle- Zélande : 4 Brulure + Allogreffe 4 Brulure + RHCIII 4 Brulure + RHCIII-MPC	M-2 Brulure NaOH ALK de 350 µm x 6 mm Surjet en pont retiré à M1 0 anti-infl.	9 mois	LAF M. confocale M9	- Néovascularisation à M1 : 75% RHCIII, 50% Allogreffes, 25% RHCIII-MPC - Réduction du haze et néovascularisation à M6 et M9 - Transparence identique à M9 - Cellules épithéliales et stromales dans tous les implants à M9	- Intérêt de l'ajout du MPC dans les implants
Pasychnikova et coll. ²⁴⁹	2012	- PCI 12% - EDC/NHS	500 µm/7 mm	8 lapins blancs de la Nouvelle- Zélande	ILK de 7 mm, puis ALK de 5mm 0 suture 0 anti-infl.	12 mois	LAF	- Cicatrisation épithéliale en 5 jours - Résorption de l'implant à M12 - Problème d'élimination des bulles d'air lors de la conception de l'implant	- Analyse pachymétrique et structurelle? Résorption par remplacement, ou amincissement séquentiel?

Suite à la page suivante

Auteurs	Année	Description des implants		Animaux	Protocole chirurgical	Suivi		Résultats	Commentaires
		Composition	Taille (Ø/↑)			Durée	Modalités		
Pankert et coll. ¹⁰⁸	2014	Reconstitution par culture de cellules stromales Absence de matériel exogène	61 ± 15 µm/4 mm	4 félins : allogreffe 4 félins : implant de génie tissulaire	ILK à 272 µm de profondeur 0 suture	4 mois	LAF Esthésiométrie OCT M4 : M. Confocale, TEM, IF	- Bonne intégration des greffons : Pas de tissu cicatriciel, pas de néovascularisation - Cellules stromales plus nombreuses dans le greffon que cornée - Réinnervation à M4 : plus denses, mais plus courts - Sensibilité préservée	
Rafat et coll. ²⁶¹	2016	Cœur : <u>Standard :</u> - PCI 18% - EDC/NHS <u>Hybride :</u> - PCI 18% - EDC/NHS - MPC - PEG diacrylate - TEMED - APS Enveloppe : - PCI 1% - DMEM	150 µm/3 mm	25 lapins de la Nouvelle-Zélande 5 auto-greffe 5 standard avec enveloppe fine (50 µm) 5 standard avec enveloppe épaisse (100 µm) 5 hybride sans enveloppe 5 hybride avec enveloppe épaisse (100 µm)	FemtoLASER (Intralase iFS) Profondeur : 125 µm 0 suture Stéroïdes : selon le cas	3 mois	LAF OCT M. confocale	- 2 décès pendant le suivi (1 cas d'abcès, 1 lors examen M1) - 2/24 cas de néovascularisation à M1, régression partielle à M3 - Dégénération de l'enveloppe en 1 mois environ. - Cornée plus fine dans les groupes avec enveloppe que cornée native et implant seul. - Toutes les cornées avec implant sans enveloppe > 90% de leur épaisseur. - Transparence identique à M1 et M3 - Pas de différence au niveau de l'innervation entre cornée native et autres groupes - Présence de macrophages à l'interface	- 1re étude utilisant le FemtoLASER dans la création d'une 'poche' cornéenne, mais absence d'étude topographique - Approche d'un implant pouvant contenir une composante thérapeutique (comme un médicament), avec dégradation progressive de l'enveloppe
Islam et coll. ¹⁶¹	2016	- CLP - PEG 8-arm - EDC/NHS	500 µm/7 mm	4 cochons nains de Göttingen	ALK	12 mois	LAF	- Innervation M12 avec plexus subépithélial - Haze à l'interface greffon-cornée postérieure - Régénération cornéenne avec production de collagène I et V	- Peu d'informations sur le protocole chirurgical et suivi photo
Syed-Picard et coll. ²⁶²	2018	Matrice à partir d'une culture de cellules stromales	Simple couche/2 mm	30 souris C57BL-6	ILK	5 semaines	LAF OCT	- Poursuite de la différenciation des kératocytes humains dans la cornée murine - Présence de collagène I, V & kératan humain (régénération) - Distinction Greffon-Hôte impossible à l'OCT à W5 - Perte transitoire de la transparence cornéenne	- Très petit modèle (souris), permettant de mettre en évidence à biocompatibilité et régénération tissulaire - Peu représentatif pour la tolérance de l'implant
Jangamreddy et coll. ¹⁸⁷	2018	<u>Implants CLP-PEG:</u> - CLP - PEG 8-arm - EDC-NHS <u>Implants RHCIII:</u> - RHCIII 18% - MPC - APC, EDC/NHS	500 µm/6,75 mm	2 x 4 cochon nain de Göttingen	ALK + GMA Stéroïdes durant 5 semaines	12 mois	LAF, PIO Schirmer Pachymétrie Esthésiométrie M. confocale	- Léger haze dans les 2 groupes jusque 3 mois, puis transparent - A 12 mois, régénération cornéenne complète (épithélium, kératocytes, nerfs cornéens) - Anesthésie cornéenne à W5, retour à la normale à M6	

M : nombre de mois postopératoires, S : nombre de semaines postopératoires

↑ : épaisseur de l'implant ; Ø : diamètre de l'implant ; Anti-infl. : Traitement anti-inflammatoire

ALK : kératoplastie lamellaire antérieure ; ILK : kératoplastie lenticulaire intrastromale ; KT : kératoplastie transfixiante ; GMA : greffe de membrane amniotique

LAF : lampe à fente ; M. confocale : microscopie confocale ; TEM : microscopie électronique en transmission ; IF : immunofluorescence ; OCT : tomographie par cohérence optique

APS : Ammonium persulfate ; CLP : peptides mimétiques du collagène ; EDC : 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide ; DBA : dibutylaldehyde ; NHS : N-hydroxysuccinimide ; PCI : collagène porcine I ; PEG : Polyéthylène glycol ; RHCIII : collagène humain recombinant III ; TEMED : N,N,N,N-tetraméthylethylènediamine

© ASB et FX

4.1.5.3 Guérison épithéliale et examens sous sédation

4.1.5.3.1 Examens sous sédation

Afin de limiter l'exposition cornéenne à l'air ambiant lors des examens des animaux (ce qui retarde la guérison épithéliale ou peut mener à des kératites d'exposition), il a été décidé de limiter le nombre d'examens, de les faire le plus rapidement possible et d'essayer le plus possible de les réaliser sans avoir recours à la sédation (ce qui empêche les animaux de cligner des yeux et qui nécessite l'instillation de larmes artificielles aux 5 minutes, qui peuvent elles aussi être dommageable à la longue pour l'épithélium, car elles contiennent des agents de conservations). Ainsi, plus de 40% des examens ont pu être réalisés sans aucune sédation, possibles par l'attitude calme et collaborative propre au félin, montrant ici un autre avantage d'utiliser ce modèle animal. Cependant, malgré l'optimisation des examens cliniques, un ulcère s'est formé et s'est chronicisé dans la cornée de F3, ce qui a évolué vers un séquestre.

4.1.5.3.2 Le séquestre cornéen de F3

Le séquestre cornéen, bien que ce soit le premier cas rapporté par notre laboratoire, est une pathologie bien connue et décrite – quoique rare – chez le félin, mais quelques rapports la mentionnent également chez le chien²⁶³ et le cheval.^{264, 265} La coloration brunâtre des séquestres serait due à la présence de mélanine²⁶⁶ et se traite généralement par ALK,²⁶⁷ avec de bons résultats optiques et fonctionnels.²⁶⁸ Bien que la pathophysiologie ne soit pas encore bien comprise, elle serait due à diverses insultes cornéennes, dont la kératite ulcéreuse, l'herpès félin (FHV-1)^{236, 269, 270} et la lagophtalmie (incapacité d'occlure complètement les paupières – induit ici notamment par la sédation).²⁷¹ Elle est également plus répandue chez les chats brachycéphales (à petite tête : Perses, Himalayen, et Burmese),^{268, 272} qui ne font cependant pas partie des félins de la présente étude. De plus, les prélèvements réalisés chez les sujets d'étude n'ont pas relevé la présence de l'infection au FHV-1. Dans une future, étude, il sera donc important d'éviter chats brachycéphales et d'assurer la cicatrisation épithéliale la plus rapide possible.

4.1.5.4 Imagerie clinique *in vivo*

4.1.5.4.1 Lampe à fente

Avec un animal endormi ou collaborant, l'examen à la lampe à fente s'avère extrêmement utile pour le suivi clinique des implants et l'appréciation globale de la cornée. Avant le début de ce projet, ces examens étaient réalisés à l'aide d'une lampe à fente standard (BQ 900, Haag-Streit, Bern, Suisse) sur laquelle était montée une caméra Sony (DXC-390, Sony, Park Ridge, NJ, États-Unis). Les images obtenues étaient des instantanées de la capture vidéo de la caméra et, en l'absence d'un flash pour augmenter l'illumination de la scène et diminuer le temps d'exposition, il fallait être chanceux pour avoir une image nette (les images étaient souvent floues due à la respiration de l'animal qui faisait bouger sa tête). Sans flash, il était également impossible de garder une lumière ambiante pour apprécier les détails du reste de la cornée lorsqu'une fente fine était utilisée (**Figure 36**). Les images étaient de faible résolution (768 x 576 pixels) et il fallait souvent en corriger la luminosité et le contraste pour pouvoir en discerner les détails et relever ce qui avait été aperçu avec nos yeux lors de l'examen.



Figure 36. Exemple d'image prise sur la lampe à fente avec la caméra DXC-390.

Pour tenter de palier à ces limitations, la caméra DXC-390 a été temporairement remplacée par une caméra vidéo haute résolution (5MP Color CMOS Camera : BCE-C050-U, Mightex Systems, Toronto, Canada). Les premières semaines de suivi de F3 ont ainsi été capturées par cette caméra (Pre-op, D1, D7, **Figure 30**). Bien que la résolution des images fût nettement meilleure (2560 x 1920 pixels), toutes les autres limitations étaient encore présentes et la plupart des images devaient être éliminées à cause du flou cinétique induit par la respiration de l'animal (**Figure 37**). Beaucoup de tentatives d'obtenir une image de qualité étaient alors nécessaires, ce qui rallongeait la durée de l'examen et a pu jouer un rôle important dans l'ulcération cornéenne de F3.



Figure 37. Exemple d'image prise sur la lampe à fente avec la caméra BCE-C050-U.

Afin de pouvoir prendre des photos représentatives de ce qui était observé à l'œil et pour être à niveau avec ce qui se faisait déjà depuis des années dans d'autres laboratoires, il a été possible de se munir d'une fente munie d'un flash (BX 900, Haag-Streit, Bern, Suisse) sur laquelle était montée d'un appareil photographique reflex numérique semi-professionnel (D200, NIKON corp., Tokyo, Japon). En plus d'offrir une qualité d'image nettement supérieure (résolution : 3872 x 2592 pixels), les examens des yeux étaient beaucoup plus rapides, car il n'était pas nécessaire de reprendre des

dizaines de fois la même prise de vue, ce qui permettait de réduire les risques épithéliaux décrits plus haut. Les images étaient toutes très nettes (**Figure 38**) et l'appareil était très facile d'utilisation.

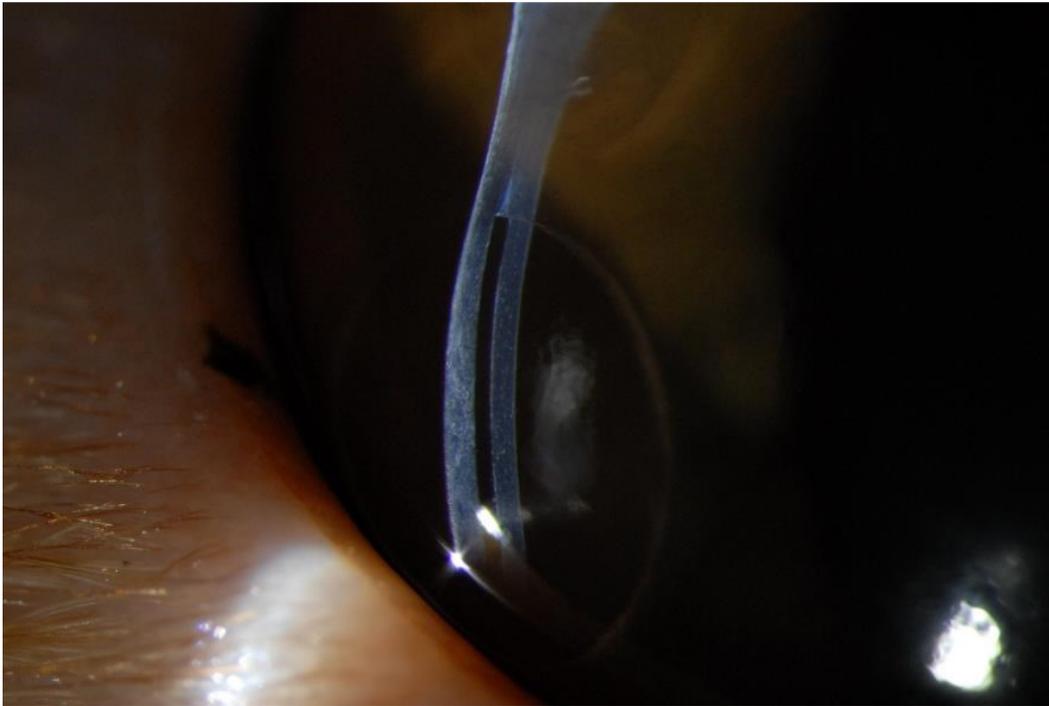


Figure 38. Exemple d'image prise sur la lampe à fente munie d'un flash et d'une D200.

4.1.5.4.2 Tomographie en cohérence optique

Deux appareils OCT ont été utilisés durant le suivi des animaux, soit le Thorlabs™ et le Visante™. Ces deux appareils ont plus d'une dizaine d'années, mais permettaient tout de même d'obtenir des informations cruciales et objectives (les dimensions) sur les implants. Le Thorlabs™ étant l'appareil qui offrait la meilleure résolution spatiale (bien que l'image sortît parfois du cadre), c'est celui-ci qui a été utilisé le plus souvent et pour prendre les mesures des cornées et des implants.

Peu importe l'appareil, la principale limite de leur utilisation était l'alignement de l'œil de l'animal. Bien que ces examens étaient généralement réalisés avec une sédation, ce qui permettait d'orienter à notre guise la tête de l'animal, il était difficile de s'assurer être tout le temps dans le même angle, n'ayant aucun moyen de vérifier l'axe optique des yeux de l'animal. De nouveaux appareils de meilleures résolutions et avec une utilisation plus facile sont maintenant disponibles et peuvent être muni d'un système de poursuite oculaire permettrait de réaliser des coupes OCT (et les mesures en découlant) de façon reproductible, et ce même sur un animal éveillé. Malheureusement, puisque

les appareils cliniques de la sorte ne peuvent t'être utilisés soit avec les humains ou les animaux, le coût de ces dispositifs demeure le principal frein à leur acquisition en recherche préclinique.

4.1.5.4.3 Microscopie confocale

Le microscope confocal Consfocan 3™ est un appareil qui a lui aussi été conçu pour l'utilisation chez les patients humains, mais principalement à des fins de recherche. Son utilisation demande un contact presque indirect avec la cornée via un gel optique et, à nouveau, le mouvement respiratoire et l'orientation de la tête (et donc des yeux) de l'animal restent un défi majeur à l'obtention d'images claires et reproductibles. Cependant, malgré ces limitations importantes, son utilisation *in vivo* est ce qui rend l'utilisation de cet appareil si utile et permet de suivre en temps réel la régénération cornéenne au sein des implants.

4.1.5.4.4 Topographie et densitométrie cornéenne

La topographie cornéenne avec le Pentacam HR™ a été réalisée dans le cadre de l'étude actuelle surtout par preuve de concept. C'est un examen qui est somme toute important, car, comme le rapportent Ong et coll., les premiers implants biosynthétiques installés par ALK avec des sutures en surjet provoquaient un astigmatisme irrégulier et une accentuation de la courbure antérieure, ce qui nuit au pronostic visuel des patients.¹⁷³

Comme décrit dans l'introduction, son utilisation pour quantifier automatiquement et objectivement la transparence cornéenne centrale (facteur important dans la fonctionnalité cornéenne et la qualité de la vision) pourrait être utile pour le suivi des implants installés au centre de la cornée, pour les premières semaines de suivi lorsque la transparence de la cornée varie beaucoup ou pour mesurer et comparer de petites différences de densité optique qui serait imperceptible à l'examen de la lampe à fente, actuellement utilisée pour quantifier cette transparence.

Il s'agit toutefois d'un examen plus difficile à réaliser chez l'animal endormi et nécessite de placer la tête à la bonne distance et dans la bonne orientation d'être centré sur le centre pupillaire ou centre géométrique de la cornée. De plus, puisque l'appareil utilise la réfraction lumineuse pour construire son modèle 3D et faire ses mesures, les artéfacts lumineux dus à la différence d'indice de réfraction entre la cornée et les implants peuvent nuire à la précision des mesures de pachymétrie et de courbure postérieure.

4.2 Substituts injectables dans la cornée humaine ex vivo

Les implants présentés dans cette section ont été développés à l'UOHI. Plus spécifiquement, la conception et la préparation des implants sont le fruit des travaux de Dr Marcelo Muñoz, PhD.

4.2.1 Expérience A : Essai préliminaire avec SMILE

❖ **But :**

- Tester la confection d'un implant, son injection et son suivi

❖ **Hypothèse :**

- Un implant qui a été réticulé avec succès perdurera dans la cornée hôte et demeurera transparent.

❖ **Nombre de cornées opérées :** 1 (Cornée 1 = C1)

❖ **Type de chirurgie :** SMILE

❖ **Durée du suivi post-op :** 24 heures

❖ **Résultats :**

- C1 : Implant trop liquide, fuite immédiatement notée à l'endroit de l'incision après le retrait de l'aiguille et lors du suivi de 24 heures (**Figure 39**).

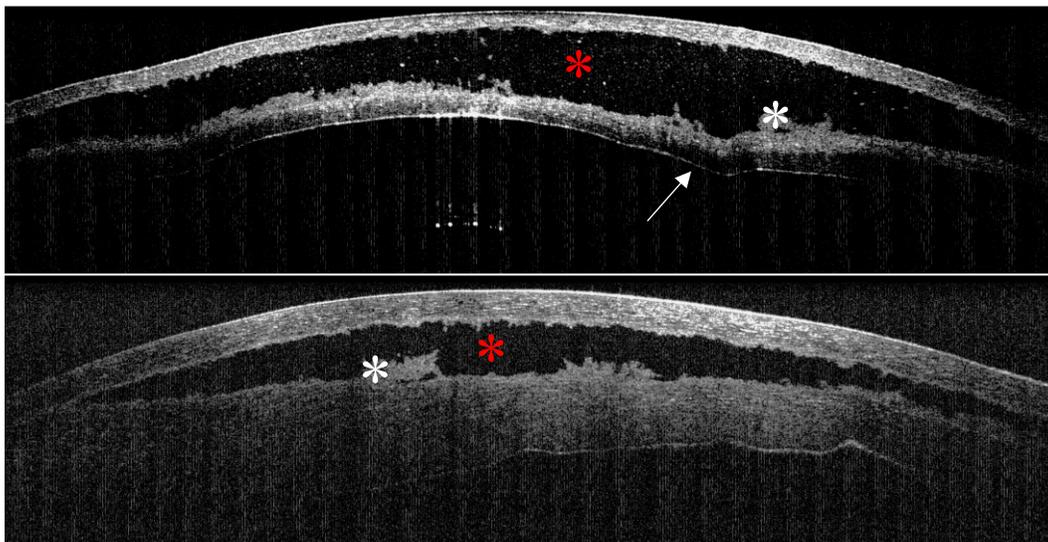


Figure 39. C1 : Coupe OCT de la cornée opérée par SMILE puis injectée avec l'implant.

L'image d'en haut montre une coupe OCT au centre de la cornée quelques minutes après la réticulation de l'implant. L'image d'en bas montre la même coupe, à 24 heures post-réticulation. Une perte évidente de volume de l'implant liquide (étoiles rouges) et un épaissement de la paroi postérieure de la cornée sont notés entre les deux prises de vue. La flèche blanche montre un pli dans l'endothélium. Les étoiles blanches montrent les irrégularités de la surface de la poche stromale dues au passage de la lame après le laser.

4.2.1.1 Analyse

Cette première expérience était une opportunité de voir où les problèmes allaient apparaître et ainsi de déterminer quelles informations seraient pertinentes à colliger pour améliorer le résultat final.

4.2.1.1.1 Perte de l'implant

La consistance trop liquide de l'implant était un problème important lors de cette expérience, mais une certaine quantité d'implant a été maintenue dans la cornée et ce dernier a pu être réticulé à la lumière bleue. La coupe OCT montre cependant que la pression dans la chambre antérieure était possiblement trop basse, ce qui cause le pli dans la membrane endothéliale. La perte de volume de l'implant après seulement 24 heures semble montrer que la réticulation de l'implant ne s'est pas faite complètement et qu'une partie, encore liquide, a pu fuir vraisemblablement par l'ouverture de la plaie lorsque la pression dans la chambre antérieure a été rétablie à la hausse lors de sa mise en place sur le système de perfusion automatique. Une autre explication pour la perte de volume de l'implant, et qui pourrait permettre de comprendre que la paroi postérieure de l'implant ait autant épaissi en 24 heures, est que l'implant était hypoosmolaire et que son volume d'eau a été en partie absorbé par la cornée hôte.²⁷³ Enfin, on pourrait penser que la nécrose tissulaire du stroma, provoquant la libération d'enzymes telles les collagénases,^{274, 275} pourrait mener à la fonte de l'implant.²⁷⁶ Cependant, il a déjà été démontré que le CLP-PEG a une très grande résistance à court et à long terme aux collagénases sécrétées par la cornée.¹⁶¹

4.2.1.1.2 Irrégularités de surface dans la SMILE

Bien qu'aucune étude n'ait été faite spécifiquement à ce sujet, on sait que les irrégularités de surface de la poche stromale peuvent être expliquées par la dissection manuelle du lenticule. Lors de la découpe au laser, bien qu'une grande portion du lenticule se détache du reste du stroma, il peut perdurer quelques ponts tissulaires entre ces deux dernières structures, phénomène qui est accentué si le passage du laser est perturbé par des débris ou des bulles d'air à la surface cornéenne.²⁷⁷ Lors de l'extraction du lenticule, ces ponts sont déchirés, ce qui donne cet aspect irrégulier observé aux images de l'OCT et peut mener à la formation de petits débris flottant dans la poche stromale.

4.2.1.2 Discussion

L'imagerie à l'OCT fournit de nombreuses informations précieuses pour l'analyse de la performance des implants injectables : transparence (qui est, sur les clichés, inversement proportionnelle à la réfringence), volume, profondeur de la coupe et certains détails microscopiques telles les irrégularités observées dans cette expérience.

4.2.2 Expérience B : Nouvelle recette et impact de la PIO

❖ Buts:

- Tester une nouvelle formulation d'implant plus solide et avec une composition finale isoosmolaire à la cornée hôte.
- Tester l'impact de la pression dans la chambre antérieure (PIO) sur la fuite de l'implant.

❖ Hypothèses :

- Un implant de consistance moins liquide devrait prévenir la fuite immédiate de l'implant après l'injection.
- Si la réticulation des implants s'effectue avec succès, l'augmentation subséquente de la PIO ne devrait pas provoquer la fuite des implants par la plaie stromale.

❖ Modifications au protocole:

- Colliger plus rigoureusement les informations sur la confection des implants (poids et volume de chaque composé) et leur corrélation sur leur évolution postopératoire (LAF et OCT) à 0, 2, 3, 4 et 24h post réticulation (plutôt que juste 0 et 24h).

❖ Nombre de cornées opérées : 2 (C2 et C3)

❖ Type de chirurgie : kératotomie manuelle

❖ Durée du suivi post-op : 24 heures

❖ Résultats :

- Perte d'une partie du matériel injectable (\$\$\$) lors du transfert de l'implant de l'Eppendorf à la seringue pour l'injection.
- C2 : implant trop consistant et impossible à faire sortir de la seringue à moins d'utiliser une grande force (**Figure 40**).
- C3 : fuite de l'implant immédiatement après avoir augmenté la PIO dans la chambre artificielle (**Figure 41**) et opacification légère et progressive de la cornée centrale dans les 24 heures suivant l'irradiation par la lumière bleue (**Figure 42**).

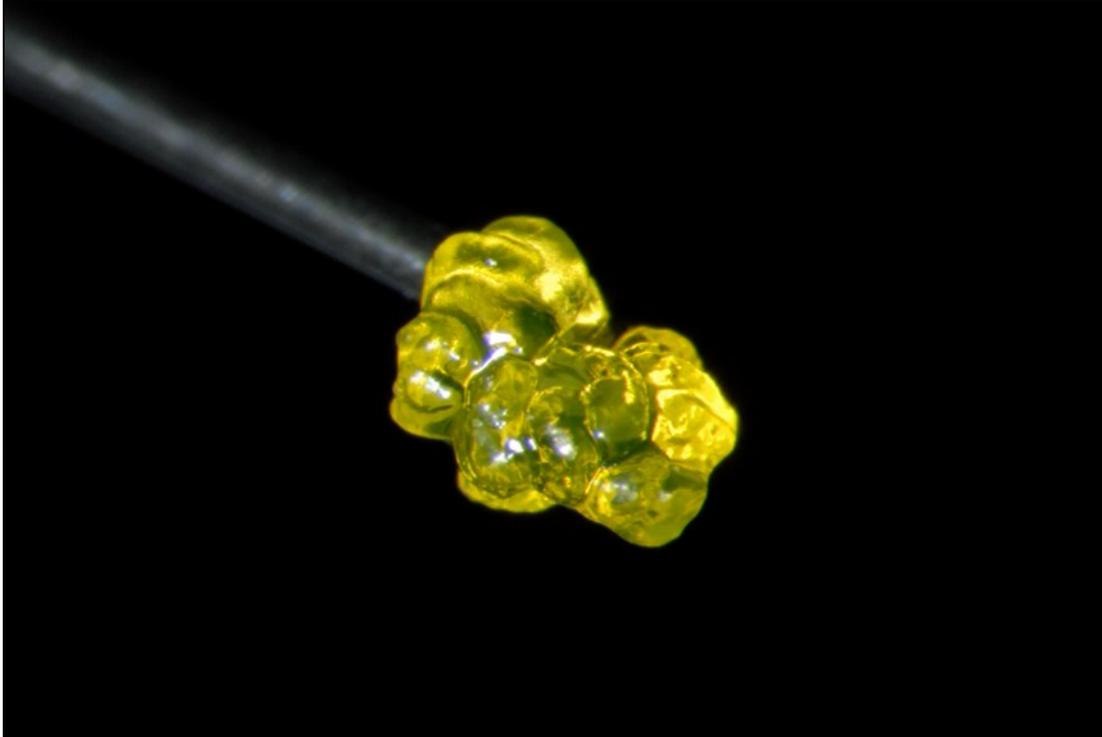


Figure 40. L'implant injectable se solidifiant à l'air ambiant au bout d'une canule 27 G.
On peut apprécier sur ce cliché la consistance gélatineuse de l'implant injectable.

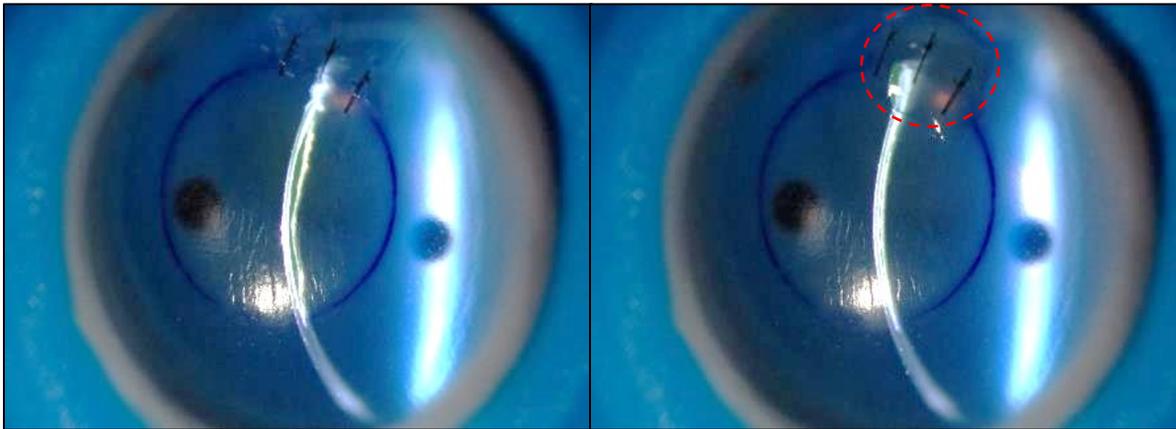


Figure 41. C2 : Photo à la LAF montrant la fuite de l'implant après une hausse de la PIO.

L'image de gauche, prise quelques instants après la réticulation de la C3, montre une ondulation de la paroi postérieure, témoignant d'une PIO trop faible (la paroi antérieure étant moins déformable). L'implant injectable est visible en jaune translucide dans la poche intrastromale. L'image de droite a été prise juste après avoir augmenté légèrement la PIO (en injectant du BSS dans la chambre antérieure) et montre une fuite immédiate de l'implant par la plaie suturée (cercle rouge pointillé), ainsi que la diminution conséquente du volume de l'implant dans la poche intrastromale.

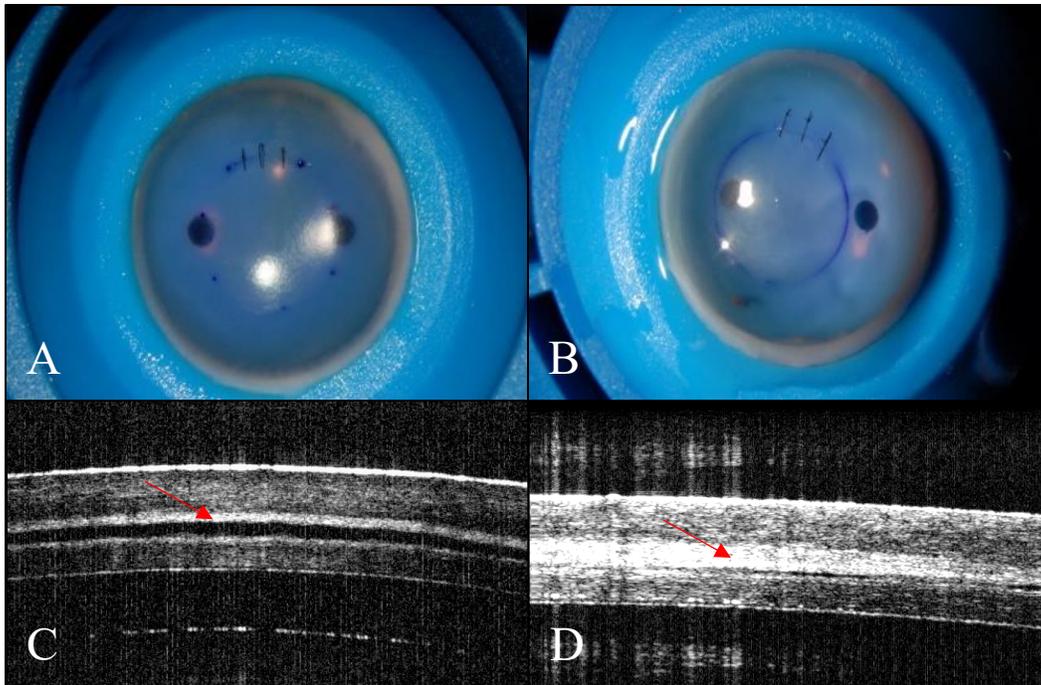


Figure 42. C3 : Opacification blanchâtre après l'irradiation par la lumière bleue.

(A) L'image a été prise quelques instants après la réticulation et la hausse de la PIO. L'implant injectable est discrètement visible en jaune translucide dans la poche intrastromale, délimitée sur la cornée par un trait bleu. (B) L'image a été prise 4 heures après la réticulation de l'implant montre un changement de couleur blanchâtre et une légère perte subséquente de la transparence cornéenne vis-à-vis la poche stromale. (C) La coupe OCT au centre de la cornée prise au même moment que l'image A montre une zone hyperréfléctive en antérieure de la poche stromale (flèche rouge) qui est plus épaisse que la zone hyperréfléctive en postérieure de la poche. (D) La coupe OCT au centre de la cornée prise au même moment que l'image B montre un épaississement de la zone hyperréfléctive en antérieur principalement (flèche rouge).

4.2.2.1 Analyse

D'une part, cette seconde expérience a permis de confirmer que la PIO jouait en effet un rôle important dans la fuite immédiate de l'implant et que cette fuite était due au fait que la réticulation ne se réalisait pas complètement. Parallèlement, quelques heures seulement après l'irradiation à la lumière bleue, on note que la cornée s'opacifie et blanchit en regard de la poche stromale.

4.2.2.1.1 Opacification et hyperréfléctivité

En regardant les coupes à l'OCT, on réalise que la zone d'opacification correspond en fait majoritairement à l'interface entre la poche stromale antérieure et l'implant liquide (apparaissant en noir). Cette zone hyperréfléctive perdure au cours des heures suivantes et s'épaissit pour combler toute la largeur de la poche stromale. Ce qui est particulièrement intéressant est que l'opacification se produit majoritairement à la portion antérieure de la poche stromale (région qui

reçoit le plus de rayons de lumière) et qu'elle semble s'épaissir et devenir plus intense dans les heures suivantes. Cette zone hyperréfléctive pourrait correspondre à l'implant qui a été réticulé avec succès en antérieur, et dont la solidification se poursuit passivement et antérieurement durant les heures suivantes. Cette zone hyperréfléctive pourrait également être expliquée par une destruction cellulaire et à une désorganisation secondaire des fibres de collagène de la paroi antérieure de la poche stromale. Cette réaction tissulaire pourrait être due au traumatisme de la kératotomie seule, à l'irradiation par la lumière bleue (moins probable vu que l'opacification semble épargner le stroma antérieur de la cornée) ou par la réticulation de la riboflavine elle-même qui provoque la libération de radicaux libre d'oxygène. Une réaction toxique du stroma au contenu de l'implant, à la lumière bleue ou aux radicaux libres pourrait provoquer la libération d'enzymes telles les collagénases,^{274, 275} qui, par réaction en chaîne, viendrait progressivement perturber l'organisation stromale et provoquer l'opacification et l'hyperréfléctivité perçue à la LAF et l'OCT. Cette opacification était évidemment un problème important à comprendre et à résoudre (Expérience C, **Annexe 16**), car un implant opaque n'est pas fonctionnel pour le patient humain. Il pourrait ainsi être utile de prolonger la durée d'irradiation pour voir si ceci induit une réaction cornéenne toxique ou permet de mieux réticuler et solidifier les implants.

4.2.2.1.2 Impact possible de la température sur la consistance des implants

Les deux implants ayant été confectionnés en usant de la même formulation, mais avec une consistance peropératoire diamétralement opposée, remettent en question l'impact seul de la formulation sur la solidité de l'implant. La température de l'implant lors de l'injection semble en effet être un facteur important, car plusieurs de ses ingrédients sont maintenus à 4°C dans leur transport, mais l'implant est injecté à la température de la salle d'opération (autour de 20°C).

4.2.2.2 Discussion

La LAF étant l'examen le plus utilisé en clinique, il est primordial d'être en mesure de bien décrire les signes de réussite ou d'échec de la chirurgie des implants liquides avec cet appareil. On note donc ici l'importance de chercher à la LAF, dès les premiers examens postop, les signes d'écoulement de l'implant, telle une bulle de liquide qui se forme au niveau des sutures périphériques, indiquant une fuite sévère et un échec de la réticulation de l'implant dans son entièreté. De plus, la LAF permet rapidement d'objectiver la coloration ou la perte de transparence

de l'implant, un facteur déterminant de l'acuité visuelle des futurs patients qui recevraient cet implant. L'OCT, utile en soit, permet également de corroborer microscopiquement ce qui est aperçu à la LAF. Toutefois, pour s'assurer de bien évaluer la progression de l'implant dans la poche stromale, il est pertinent d'imager la cornée dans toute sa largeur à l'aide d'un OCT à grand angle.

4.2.3 Expérience D : Contrôle des paramètres de production et d'irradiation

❖ Buts:

- Comparer la maniabilité de l'implant s'il est centrifugé à 10000 RPM puis transvidé dans la seringue (C7), ou transvidé dans la seringue, puis centrifugé à 4000 RPM (C8).
- Tester si le prolongement de l'irradiation à la lumière 30 minutes au lieu de 20 permet de mieux solidifier les implants.

❖ Hypothèses :

- Préparer l'implant directement dans la seringue devrait limiter les pertes de matériel secondaires au transfert entre contenants.
- Une irradiation de 30 au lieu de 20 minutes devrait permettre de mieux solidifier les implants et empêcher leur fuite totale de la poche stromale.

❖ Modifications au protocole:

- Suivre dorénavant les cornées sur une période d'une semaine.
- Tester l'utilisation de l'OCT à grand angle Visante™ pour être capable de voir l'ensemble de la poche stromale et la cornée périphérique. Commencer par une prise de vue plus précoce à 24h postopératoire.
- Après une semaine de suivi, envoyer au besoin les cornées à Ottawa pour que le laboratoire d'EA analyse le contenu des poches stromales afin de confirmer ou d'infirmer la présence d'implant réticulé.

❖ Nombre de cornées opérées : 2 (C7 et C8)

❖ Type de chirurgie : kératotomie manuelle

❖ Durée du suivi post-op : 1 semaine

❖ Résultats:

- C7 : le transfert du premier implant de l'Eppendorf à la seringue nécessite de nombreuses suctions par pipetage et résulte en la perte du matériel injectable qui reste collé à la paroi de l'Eppendorf.

- C8 : transvider l'implant dans la seringue au préalable rend plus difficile le mélange des ingrédients (qui doit se faire à l'aide d'une longue aiguille), mais aucun matériel n'est ainsi perdu. La viscosité des deux préparations était adéquate et similaire. Pas de fuite immédiate notée en salle d'opération.
- C7 : perte progressive de l'implant lors des 24 premières heures, puis une perte totale à la suite de la normalisation de la PIO à 24h (**Figure 43**), à l'instar de la C3.
- C8 : la poche stromale a été ouverte trop près de l'endothélium, mesuré à 550 μm de profondeur plutôt que le 350 μm désiré, sans bris visualisé à la paroi postérieure de la poche stromale (**Figure 46**). Perte partielle de l'implant au cours de la semaine de suivi (**Figure 44**).
- C7 et C8 : Disparition de la couleur jaunâtre de l'implant pour ne laisser qu'une cornée parfaitement transparente à partir de 4h postopératoire (**Figure 43** et **Figure 45**).
- L'utilisation de l'OCT Visante™ permet de voir la cornée dans son ensemble, quoiqu'à une moindre résolution qu'avec l'OCT 930 SR de Thorlabs (**Figure 44** et **Figure 46**).
- Les deux cornées ont été envoyées au laboratoire d'EA, qui n'ont pas pu confirmer la présence d'implant réticulé dans les poches stromales.

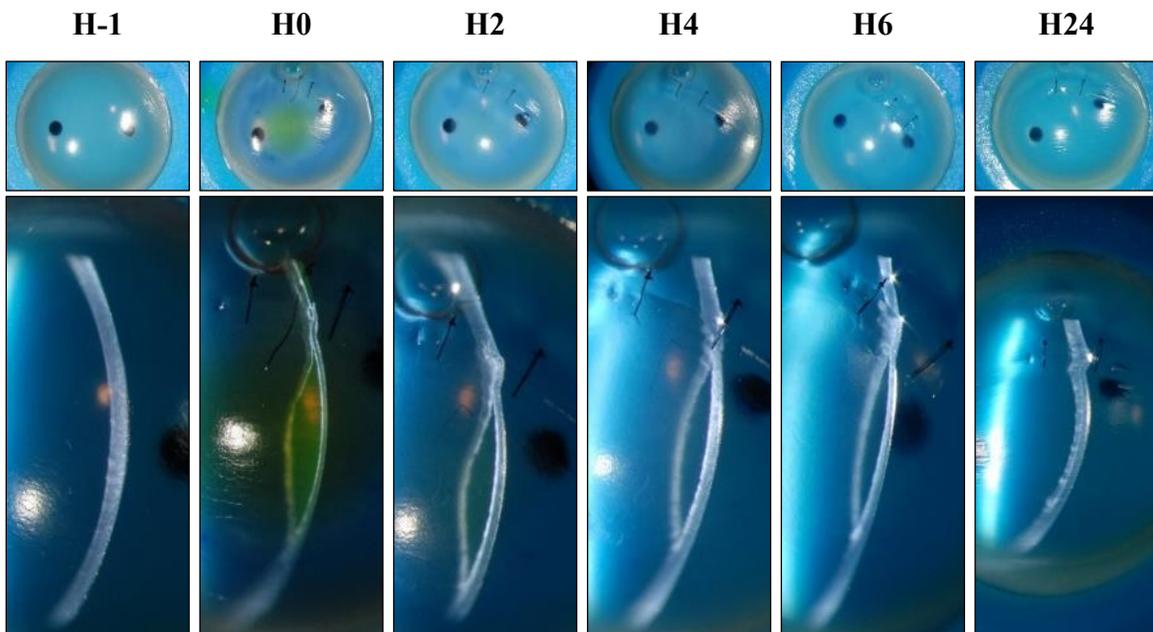


Figure 43. C7 : Perte progressive de l'implant et fuite totale post hausse de la PIO à 24h.

Décoloration en 4 heures de l'implant pour ne laisser qu'une cornée transparente. Un point de suture avait lâché peu de temps après l'opération (H0) et a été retiré.

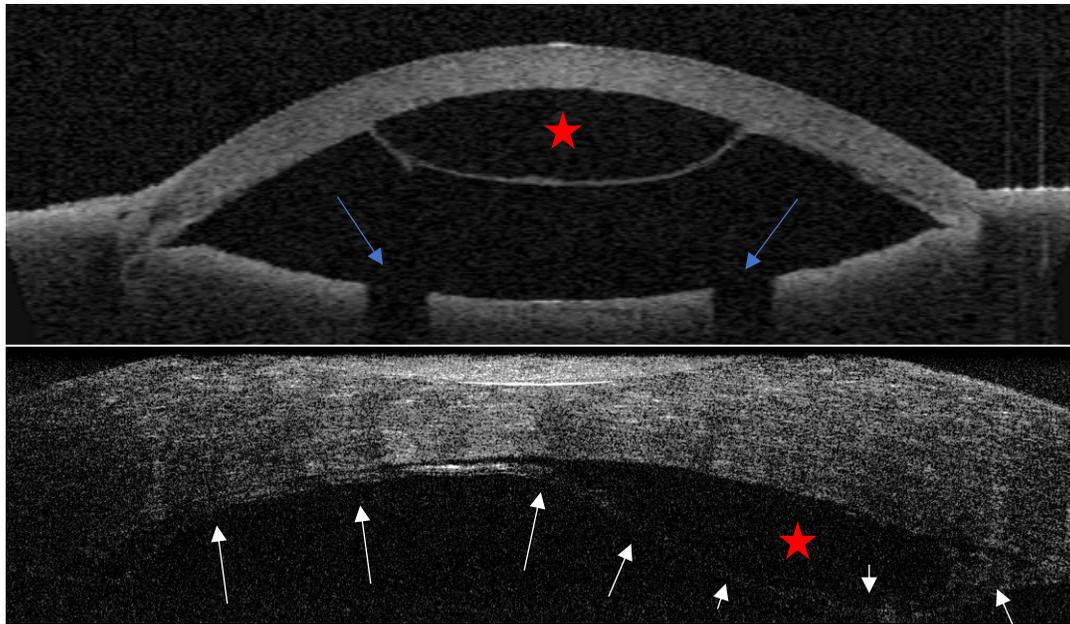


Figure 44. C8 : Poche stromale très postérieure et perte partielle de l'implant.

L'image du haut, prise avec l'OCT Visante™ à 24h post-injection, montre une poche stromale bien remplie par l'implant (étoile rouge), mais mince et fragile (profondeur = 550 μm). L'image du bas, prise avec l'OCT de Thorlabs à 1 semaine post-injection, montre un collapsus partiel de la poche stromale (flèches blanches), avec un implant résiduel (étoile rouge). Ces deux images nous permettent également d'apprécier la capacité de l'OCT Visante™ d'illustrer l'entièreté de la chambre antérieure, mais à une résolution moindre. Les deux flèches bleues montrent les ouvertures de la canalisation de la chambre antérieure artificielle qui permet au milieu de culture de circuler derrière la cornée. Leur visualisation et leur taille égale permettent en fait à celui qui prend la coupe de savoir qu'il est bien orienté à l'horizontale par rapport à la chambre artificielle.

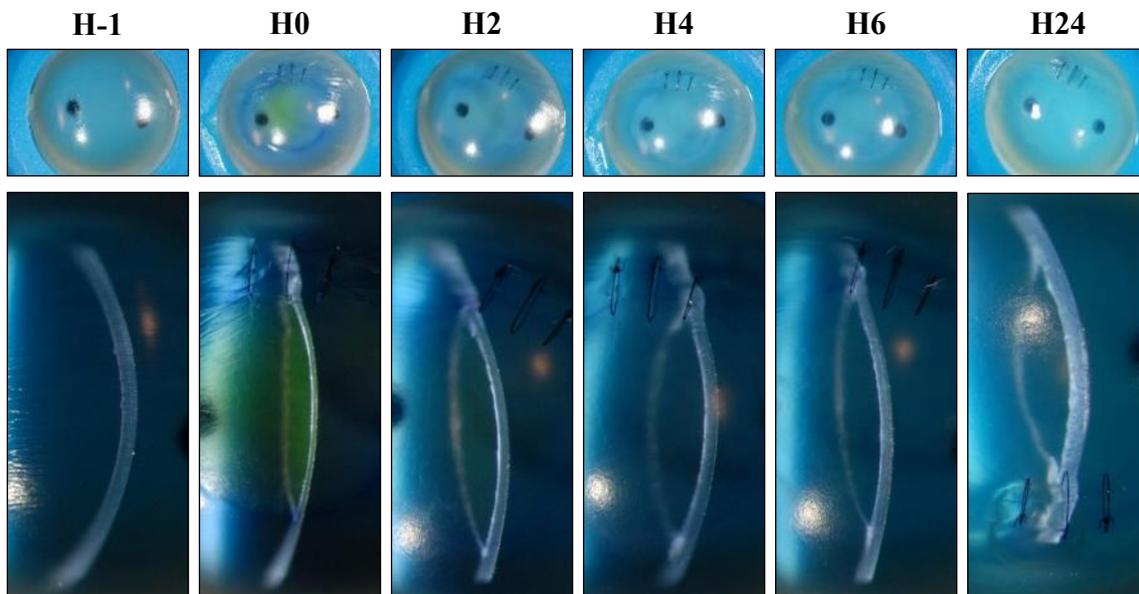


Figure 45. C8 : Décoloration progressive de l'implant et cornée claire à partir de 4h postop.

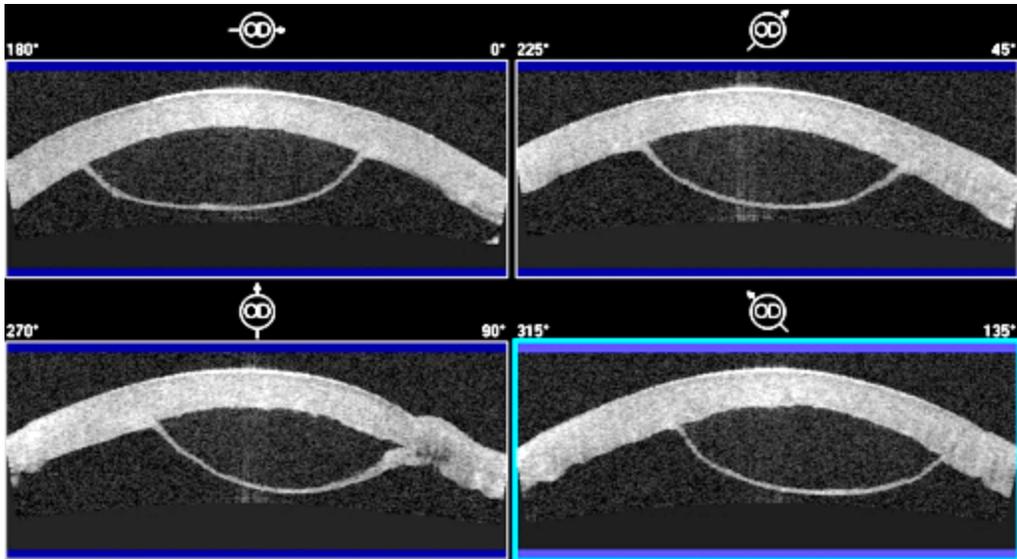


Figure 46. C8 : Coupes OCT prises avec le Visante™ à intervalle de 45° sur la C8 à 24h.

Le Visante™ a une fonction qui capture automatiquement la cornée dans 4 angles différents à intervalle de 45°. Cela permet d'avoir rapidement un aperçu global de la cornée dans tous ses axes. La figure ci-haut ne permet pas d'observer un bris de la paroi postérieure de la poche stromale malgré sa grande minceur.

4.2.3.1 Analyse

4.2.3.1.1 Perte de l'implant

Malgré l'allongement de la période d'irradiation par la lumière bleue, il ne semble pas y avoir eu réticulation des implants. La coupe manuelle très postérieure de la C8 n'aura certainement pas aidé la lumière bleue qui devait traverser beaucoup plus de tissu pour se rendre à l'implant.

4.2.3.1.2 Décoloration et transparence de l'implant

La décoloration progressive des implants pour ne laisser place qu'à un implant parfaitement transparent est le résultat souhaité pour les futurs patients et c'est ce qui a été obtenu dans cette expérience. En effet, aucune opacification blanchâtre de la poche stromale n'a été mise en évidence durant cette expérience et la coloration jaunâtre observée s'est estompée en l'espace de quelques heures. Cette perte progressive de la couleur jaune de la riboflavine est un effet connu de son irradiation anaérobie qui provoque une photoréduction intramoléculaire du cycle de l'isoalloxazine.²⁷⁸ Dans le contexte de notre expérience, où une réticulation ne semble pas avoir réellement lieu suite à l'irradiation de la lumière bleue, ce changement de teinte pourrait être

également dû à l'exposition à la lumière ambiante et aux flashes des photos lors des examens périodiques.

4.2.3.1.3 Limites de la kératotomie manuelle

Cette expérience nous a démontré que la coupe manuelle est en effet une source de variabilité dans l'étude, ce qui mérite d'être étudié davantage (Expérience E, **Annexe 16**). La coupe très postérieure de la C8 pourrait être expliquée par une hausse transitoire de la PIO lors de la coupe à la lame en diamant qui l'a fait s'enfoncer trop profondément dans le stroma qui se trouverait anormalement bombé antérieurement. La SMILE, bien que coûteuse, est une technique beaucoup plus précise et reproductible.²⁷⁷

4.2.3.2 Discussion

Le Visante™ permet de facilement visualiser l'ensemble de la poche stromale. La perte du volume de l'implant était le principal défi auquel il fallait faire face et il devenait important de bien pouvoir la mesurer. L'aire de la coupe de l'implant (**Figure 14**) ne peut être mesurée que sur les images du Visante™ et devrait permettre d'obtenir une mesure plus précise du volume de l'implant.

4.2.4 Expérience F : Évolution des implants avec et sans irradiation

❖ Buts:

- Comparer la progression de l'aire de coupe, de la hauteur et de la largeur des implants dans une cornée non irradiée (C15) versus une cornée irradiée durant 1 heure (C16).
- Évaluer quel paramètre entre l'aire de coupe (**Figure 14**), la hauteur ou la largeur des implants est le plus représentatif de leur volume (estimé).
- Comparer la progression de l'épaisseur du mur antérieur et du mur postérieur de la poche stromale chez ces deux mêmes cornées.

❖ Hypothèses :

- L'irradiation prolongée de C16 devrait permettre de réticuler et solidifier l'implant, ce qui devrait se traduire par une absence de perte de volume ou, du moins, par une perte de l'implant irradié (C16) après plus de jours d'observation que l'implant contrôle (C15). L'implant de C15 devrait s'amincir progressivement à l'instar de C7.
- Les résultats précédents montrent que les implants perdent en hauteur (et non en largeur), avant de disparaître complètement. La largeur des implants étant un paramètre assez stable,

la mesure à tout instant de l'aire de coupe et de la hauteur des implants devraient être fortement corrélées, peu importe l'implant étudié.

- Si un œdème cornéen est présent, il sera surtout postérieur. En l'absence de toxicité cornéenne, la lumière bleue et la riboflavine ne devraient agir qu'au niveau de la poche stromale et les murs antérieurs et postérieurs devraient être de taille équivalente, sans différence significative dans leur progression en cours de suivi.

❖ **Modifications au protocole:**

- Rajouter l'aire de coupe OCT (Visante™) comme paramètre d'évolution de la taille des implants (**Figure 14**).
- Suivre dorénavant toutes les cornées sur une période de 2 semaines (s'il reste toujours un implant visible après 1 semaine).
- S'assurer de la profondeur de la kératotomie manuelle avant l'injection grâce à l'OCT.

❖ **Nombre de cornées opérées : 2 (C15 et C16)**

❖ **Type de chirurgie : kératotomie manuelle**

❖ **Durée du suivi post-op : 2 semaines**

❖ **Résultats :**

- L'utilisation d'une seringue de 5 ml pour l'injection d'un volume en deçà de 1 ml rend le contrôle peropératoire du volume injecté pratiquement impossible.
- Puisqu'il faut prendre de multiples images de chaque cornée opérée avec différents appareils et dans des intervalles rapprochés, les cornées ne sont pas toujours hydratées antérieurement aux 5 minutes.
- Puisque les chambres antérieures artificielles doivent être débranchées, puis rebranchées au système de perfusion automatique à chaque fois que l'on prend des images à la LAF ou à l'OCT (qui sont dans une autre salle), cela provoque des variations transitoires de pression.
- L'aire de coupe et la hauteur des implants ont une très forte corrélation ($R^2 = 0,99$ pour C15 et $R^2 = 0,97$ pour C17) (**Figure 47**).
- On observe d'emblée une différence de volume entre les deux implants immédiatement après l'injection et la réticulation. L'implant sans réticulation (CXL) avait un volume initial plus élevé qu'il a perdu progressivement pour disparaître après 8 jours. Quant à lui, l'implant réticulé voit son volume (aire de coupe) tripler en 24 heures, pour diminuer

progressivement en 14 jours et ne laisser qu'un mince liséré à la fin du suivi (**Figure 48** et **Figure 49**).

- La largeur des implants tend à rester stable jusqu'au collapsus complet de la poche stromale, comme c'est le cas pour la C15 au 8^e jour (**Figure 51**).
- Les deux cornées voient leurs murs antérieurs et postérieurs diminuer initialement d'épaisseur après l'injection, pour par la suite augmenter pendant la période d'observation de 14 jours, avec une hausse initialement plus rapide de la C15 (sans CXL). Les deux cornées suivent cependant la même tendance, leurs épaisseurs initiales et finales préservant le même ratio (**Figure 52** et **Figure 53**). Ce ratio est de (C15 : C16) 1,5:1 pour la paroi antérieure et de 1:1 pour la paroi postérieure.

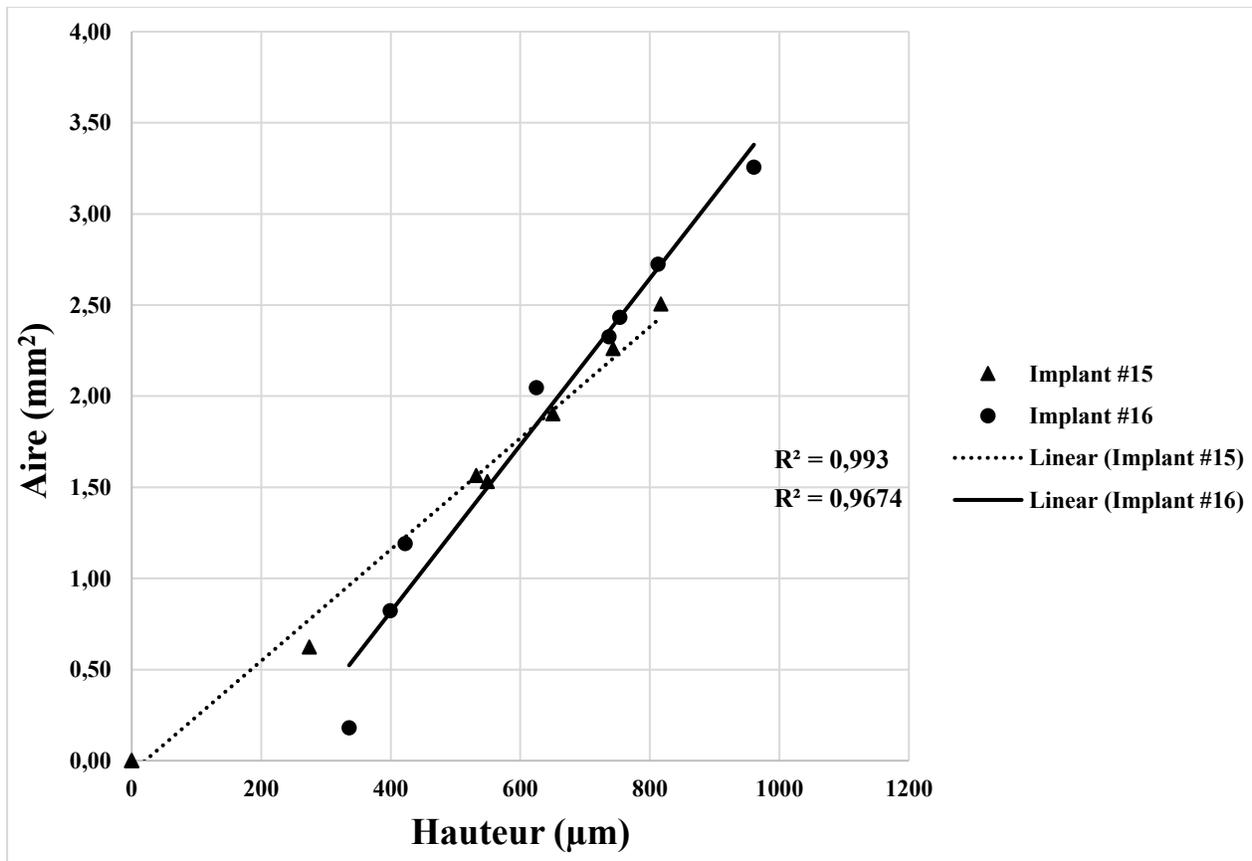


Figure 47. Corrélation entre l'aire de coupe et la hauteur des implants.

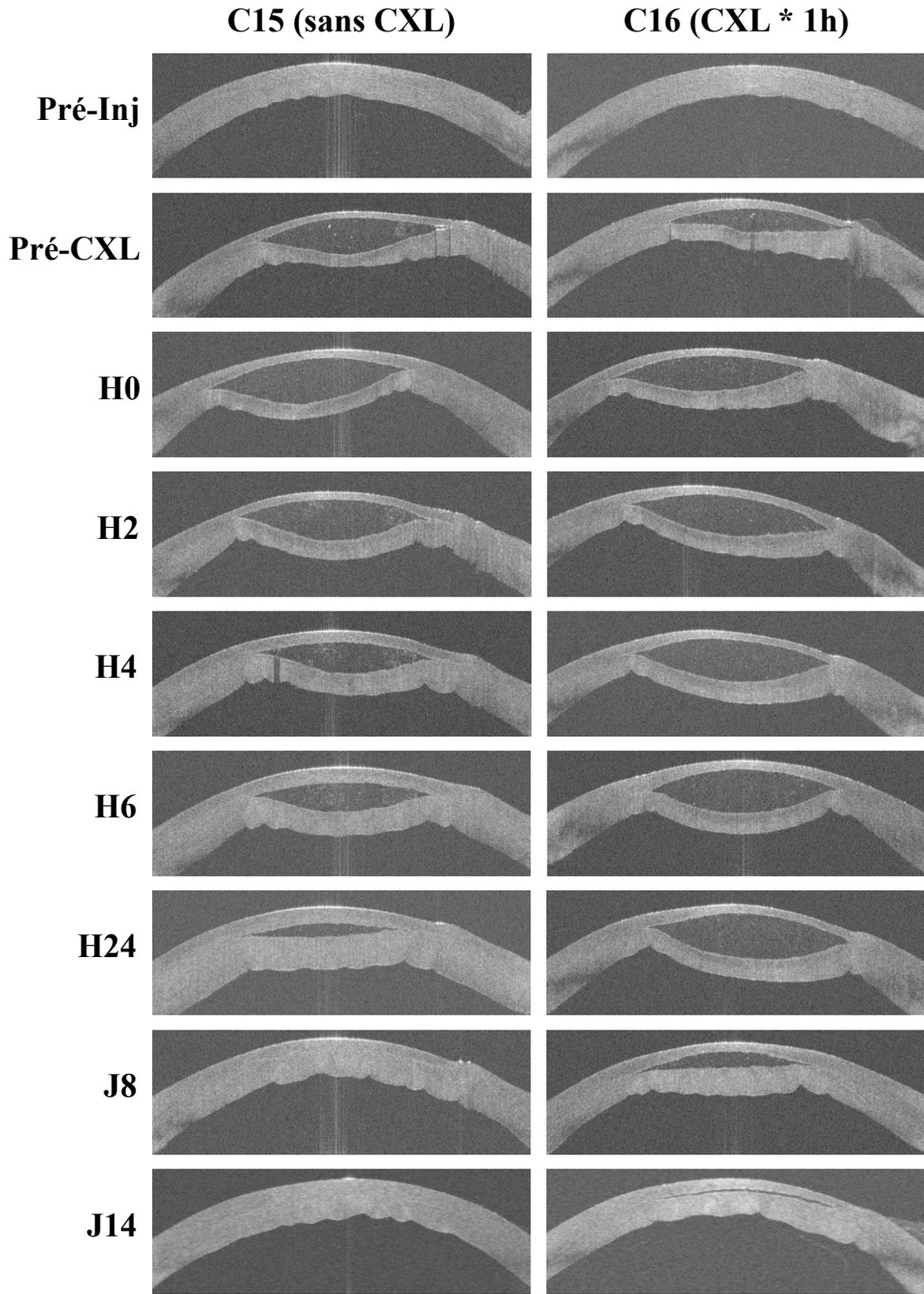


Figure 48. C15 et C16 : Coupes OCT durant 14 jours de suivi.

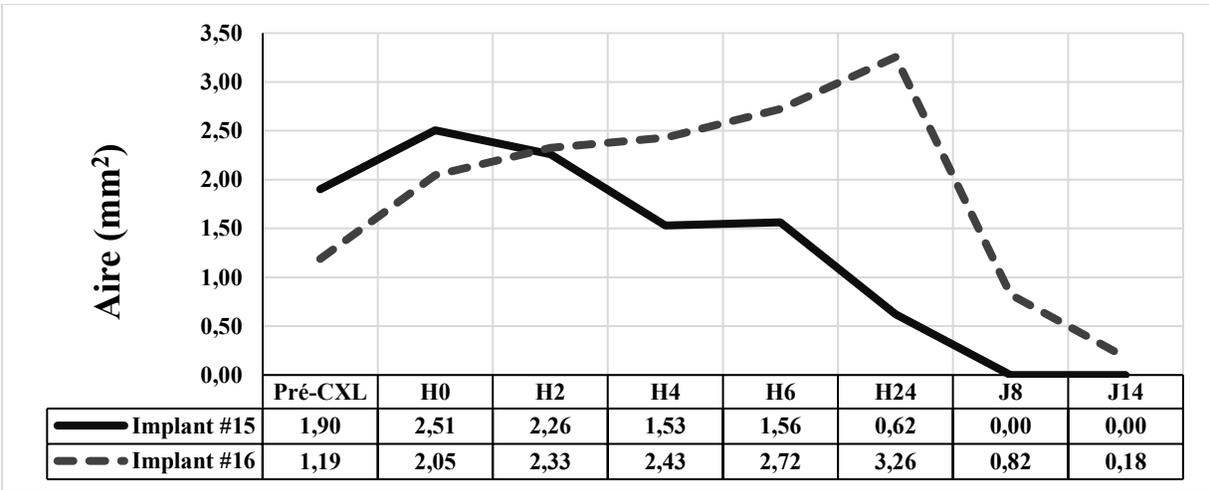


Figure 49. C15 et C16 : Aire de coupe OCT des implants avec ou sans CXL durant 14J.

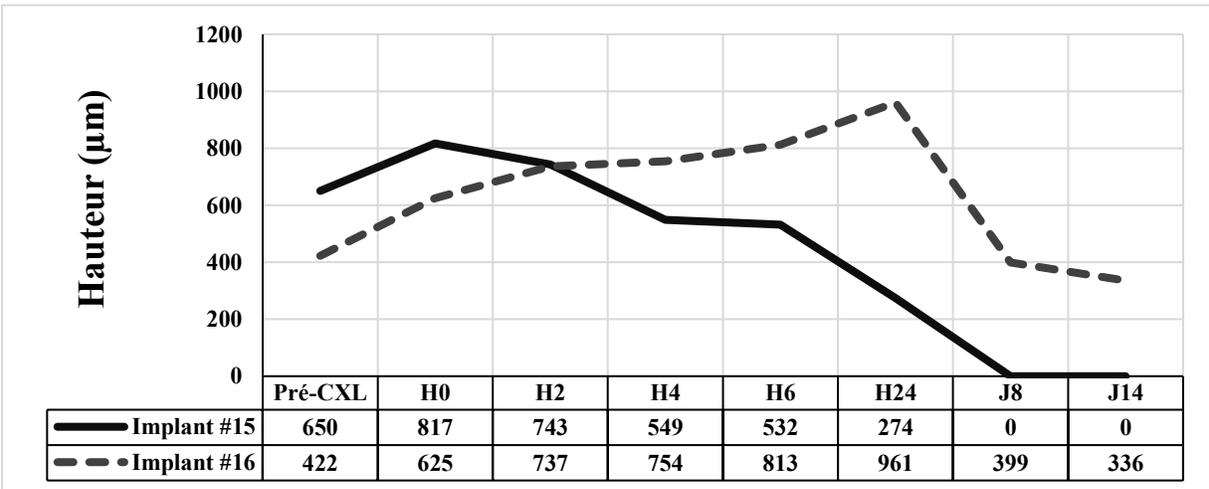


Figure 50. C15 et C16 : Hauteur de coupe OCT des implants avec ou sans CXL durant 14J.

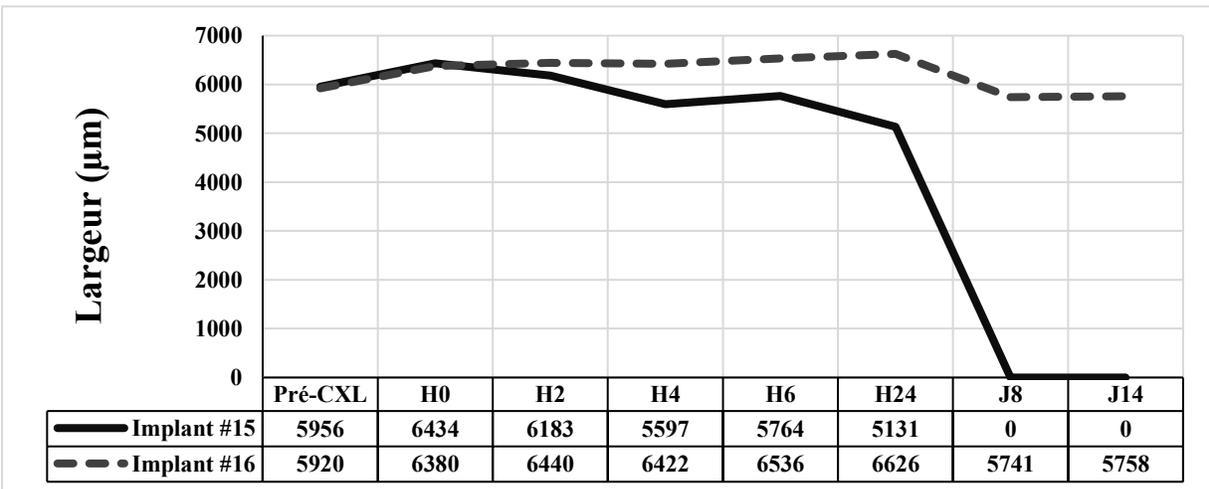


Figure 51. C15 et C16 : Largeur de coupe OCT des implants avec ou sans CXL durant 14J.

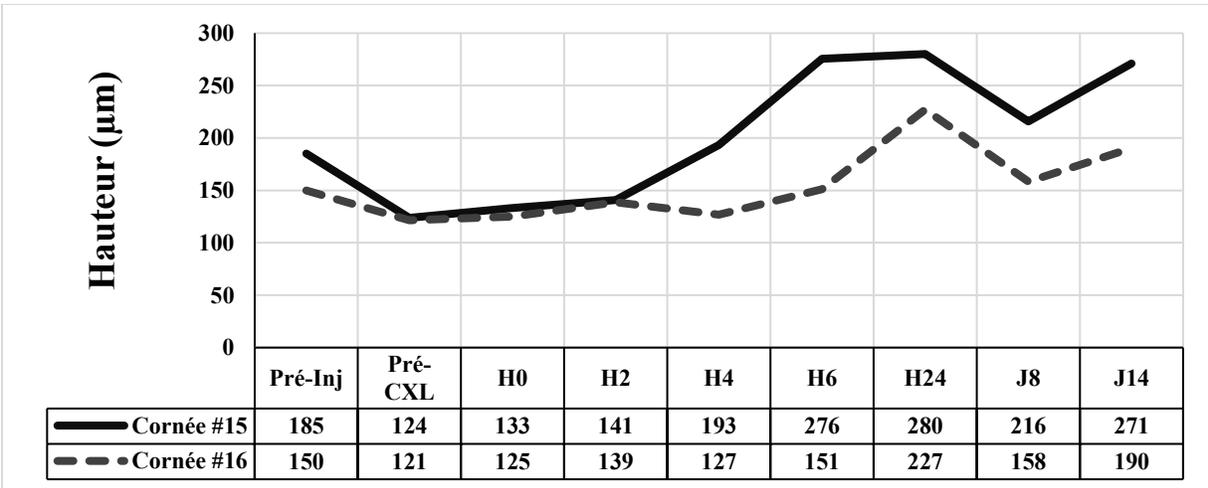


Figure 52. C15 et C16 : Épaisseur de la paroi antérieure avec ou sans CXL durant 14J.

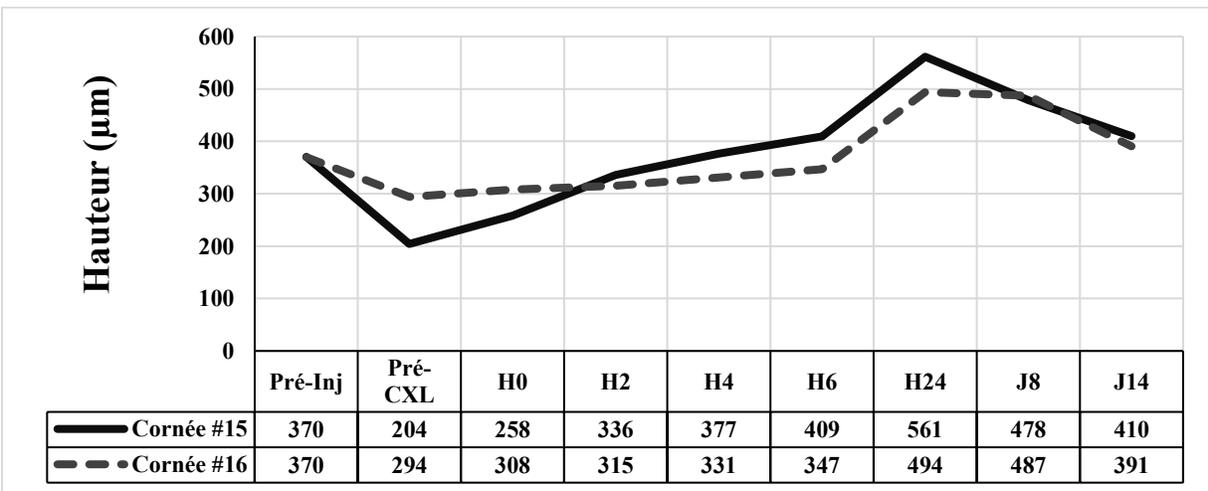


Figure 53. C15 et C16 : Épaisseur de la paroi postérieure avec ou sans CXL durant 14J.

4.2.4.1 Analyse

4.2.4.1.1 Difficulté de réticulation et de solidification des implants

Avec cet échantillon restreint (1 cornée irradiée, 1 cornée contrôle), il est évidemment difficile de tirer de fortes conclusions. La conclusion la plus évidente, et qui commence à accumuler des preuves, est le fait que, avec le modèle utilisé jusqu'à ce point, la réticulation ne semble pas se produire de façon efficace. Les données de cette expérience semblent montrer que l'implant qui a reçu une heure d'irradiation perdure plus longtemps dans sa poche stromale, mais le résultat final est le même : l'implant finit par disparaître et ceci n'est évidemment pas un résultat acceptable pour une greffe chez un patient humain. Puisqu'une bonne partie de la consistance des implants

tient à leur concentration en CLP et au temps de repos qu'il leur est laissé après le mélange et la centrifugation (ce qui permet aux implants de se gélifier à la température de la pièce), il s'agit de paramètres qu'il faut étudier. Rappelons que le CLP originellement décrit par O'Leary et coll.¹⁶⁹ s'autoassemblait sous la forme d'un hydrogel liquide et c'est par l'ajout d'un espaceur de glycine et une cystéine qu'il peut se solidifier avec le PEG.¹⁶⁶ En fait, selon des tests menés par le laboratoire d'EA, plus la concentration en CLP est faible dans l'implant, plus ce dernier est solide, et plus il prend du temps à se gélifier à la température de la pièce suite au mélange avec les autres ingrédients ; diminuer la concentration en CLP et l'irradier au plus vite pourrait donc potentiellement permettre à l'implant d'être plus solide dans la cornée.

4.2.4.1.2 Mesure du volume des implants et ses limites

Dans cette expérience, l'implant irradié (C16) augmente progressivement en volume sur les 24 premières heures. Cette hausse en volume durant la première journée d'évolution est en fait associée également à une hausse de sa hauteur, à une hausse de sa largeur, ainsi qu'à une hausse de la paroi antérieure et de la paroi postérieure de la cornée hôte (C16). Ce gain de volume de l'implant peut être réel et on pourrait alors observer un gain en hauteur et un certain gain en largeur, ce qui est le cas. Or, ces gains en 2 dimensions pourraient également être expliqués par le fait que la cornée ne soit pas positionnée en plein centre de la caméra lors des premières captures et qu'on se trouve de plus en plus vers le centre de la poche stromale, ce qui explique le gain de volume (aire de coupe) perçu, étant donnée la forme lenticulaire de la poche. Cette seconde option est cependant moins probable, car on observe une hausse de la hauteur des parois antérieures et postérieures à l'implant durant la même période et l'on se rappelle que la cornée s'amincit plus on s'approche de son centre.⁵⁴ En fait, ce gain en hauteur des parois antérieures et postérieures est en fait observé dans la cornée non irradiée (C15) également. De plus, un facteur de confusion potentiel est la variation de la pression dans la chambre artificielle entre les prises de photos qui, comme on l'a déjà vu dans les premières cornées, peut mener à un abaissement du mur postérieur et donner l'impression que la poche stromale a un volume plus grand. Effectivement, en l'absence d'une pression adéquate dans la chambre antérieure artificielle, si l'implant est toujours sous forme liquide, ce dernier pourrait se collectionner par gravité au centre de la poche stromale et augmenter artificiellement la taille de l'implant dans l'image en coupe au centre de la cornée.

4.2.4.1.3 Explications potentielles pour les variations de volume observées

4.2.4.1.3.1 *Rôle de l'osmose*

Si cette hausse de volume est réelle, pourquoi l'implant irradié gagnerait-il donc en volume dans les premières 24h? Rappelons-nous que lorsque tenté sur des yeux *ex vivo* de porc et de lapins, la réticulation d'implants solides RHCIII par UV-A grâce à la riboflavine avait pour effet immédiat de réduire significativement le volume des implants (supposément par rapprochement des fibres de collagène réticulées),¹⁷⁵ ce qui n'a pas été reproduit dans nos expériences et semble montrer que la réticulation ne se produit pas de façon efficace. De plus, puisque ce gain en volume de l'implant est également associé à un gain proportionnel en épaisseur des parois antérieures et postérieures de la cornée par rapport à leurs valeurs initiales, il est plus probable que toutes ces modifications soient dues à un œdème local. Lors de la kératotomie et la mise en place des sutures, du BSS est injecté dans la chambre antérieure et des gouttes de BSS sont instillées fréquemment sur la surface de la cornée, ce qui permet de garder cette dernière relativement bien hydratée. Cependant, entre la fin de cette opération et le début de l'injection (prise des images, attente de la fin de la préparation de l'implant), il peut s'écouler plus d'une trentaine de minutes où les cornées sont moins bien hydratées. Lorsque les cornées sont subséquentement submergées dans de l'Optisol-GS, il se produirait donc un appel d'eau important dans la cornée, ce qui induit la turgescence observée.²⁷⁹

De plus, le PEG des implants, par ses propriétés hautement hydrophiles, peut absorber, lui aussi, une partie de l'eau qui pénètre dans la cornée.²⁸⁰ Cependant, malgré la hausse transitoire du volume de l'implant, ce dernier n'ayant pas été solidifié par la réticulation a tout de même fini par s'écouler en-dehors de la cornée. Pour optimiser le suivi postopératoire des cornées, il serait donc utile de déterminer à quel moment l'implant et la cornée atteignent leur volume maximal pour pouvoir les examiner à ce moment et mieux comprendre la dynamique des mouvements hydriques dans les cornées opérées. Toutefois, peu importe la raison de ces variations volumiques de la cornée, elle ne devrait pas avoir un impact significatif sur la réticulation initiale des implants : s'il y a un impact, ce devrait être de faciliter le passage de la lumière bleue qui doit traverser une cornée déshydratée et plus mince pour se rendre à l'implant.

4.2.4.1.3.2 Rôle de la dysfonction endothéliale

Il se peut que cet œdème provienne également en partie d'une dysfonction endothéliale chez ces cornées rejetées pour la greffe humaine qui sont souvent longuement préservées dans l'Optisol (au-delà de leur date de péremption, soit 2 semaines après leur prélèvement).²⁸¹ Elles sont donc moins fraîches en partant, en plus d'être suivies durant 2 semaines supplémentaires dans le même type de milieu qui n'a pas toutes les composantes trophiques des larmes et de l'humeur aqueuse. Il serait donc pertinent d'essayer d'obtenir des cornées plus récemment prélevées.

4.2.4.1.3.3 Rôle de la toxicité ; pachymétrie périphérique

Une façon de confirmer que cet œdème est en effet généré par un phénomène cornéen généralisé (plutôt que localisé vis-à-vis la poche stromale) serait de mesurer la pachymétrie en périphérie de la cornée. En effet, un phénomène toxique qui induirait la relâche d'enzymes devrait produire un œdème localisé à la poche stromale, alors qu'une turgescence induite par une dysfonction endothéliale ou un phénomène osmotique devrait s'étendre à l'ensemble de la cornée. Cependant, l'OCT Thorlabs™ ne permet pas de visualiser la cornée périphérique sur les images prises au centre de la cornée et les OCT Visante™ et Thorlabs™ souffrent des distorsions spatiales (géométriques) et optiques (réfractives) induites par les mesures en balayage axial non linéaire et latéral non télécentrique propre aux appareils OCT.²⁸² L'OCT Visante™ corrige en fait lui-même ces erreurs de distorsions, mais par un facteur qui est inconnu et souvent fautif en périphérie.²⁸³ Cette erreur de correction, atteignant jusqu'à 0,8 D, rend donc hasardeuse la prise de mesures en périphérie de la cornée.

Dans l'étude actuelle, afin d'éliminer le facteur de confusion induit par la correction automatique des images par l'OCT Visante™ par un facteur inconnu, toutes les mesures ont été réalisées le plus près possible du centre de l'image (et du centre cornéen) à l'aide des données brutes capturées par l'appareil. Cependant, le balayage axial (antéro-postérieur) sur lequel toutes les mesures au centre cornéen sont réalisées dans cette étude perd grandement de sa précision en périphérie et des mesures axiales d'épaisseur périphériques pourraient être grandement sur ou sous-estimées selon l'orientation de la cornée imagée. Par appréciation grossière, on peut tout de même remarquer que les deux cornées, entre H0 et H24, voient leur volume cornéen augmenter de façon symétrique et généralisée. De plus, à la suite de la disparition des implants, les cornées ont toutes deux une forme à convexité antérieure assez lisse et uniforme, tant au centre qu'en périphérie, qui est similaire à

leur état pré-injection. Cela semble donc indiqué, à priori, que l'implant et son irradiation n'induisent pas de toxicité locale dans la cornée.

4.2.4.1.4 Turgescence différente entre les parois antérieures et postérieures

Alors que le stroma antérieur finit sa course sensiblement aux alentours de son épaisseur de base, le stroma postérieur semble vouloir continuer de grossir. Rappelons qu'antérieurement, le stroma est surtout composé par des couches courtes et étroites fortement imbriquées et entrelacées, tandis que le collagène postérieur forme de longues, larges et épaisses lamelles, allant d'un limbe à l'autre, sans connexion interlamellaire significative.⁴² Cette différence dans la distribution antéro-postérieure des composantes stromales, ainsi que la restriction structurale imposée par le limbe, explique la plus grande susceptibilité à l'œdème de la partie postérieure du stroma.⁶⁴

4.2.4.1.5 Facteurs de confusion induits par la technique chirurgicale

Ce que cette expérience a su démontrer c'est que deux importants facteurs de confusion persistent : la profondeur de la poche stromale et le volume d'implant injecté. Sans contrôle précis de ces deux paramètres, on ne peut comparer adéquatement les cornées irradiées entre elles, car la lumière bleue doit passer à travers plus de tissus et d'implant pour provoquer la réticulation de la riboflavine.^{284, 285} Dans l'expérience actuellement analysée, la cornée irradiée avait en fait une paroi antérieure et un implant initialement plus mince. Malgré ceci, l'implant n'a perduré qu'un peu plus de 14 jours, ce qui montre à nouveau que la réticulation n'a pas l'effet voulu.

4.2.4.2 Discussion

L'OCT Visante™ permet de mesurer avec grande précision l'aire de coupe de l'implant, ainsi que sa largeur et son épaisseur, en plus de l'épaisseur de la paroi antérieure et de la paroi postérieure. Ces mesures sont très précieuses, car elles permettent d'analyser en détail la réaction cornéenne face à l'implant et l'évolution dans le temps du volume de ce dernier. On voit cependant que l'aire de coupe des implants et leur hauteur sont fortement corrélées, ce qui montre que seule la hauteur pourrait suffire lors du suivi et que l'OCT 930 SR ou Visante™ pourrait être utilisé à cette fin.

La mesure de la pachymétrie cornéenne périphérique serait pertinente pour distinguer l'effet local d'une atteinte toxique d'un effet plus généralisé d'œdème cornéen. Une solution potentielle qui pourrait être utilisée dans une future étude serait l'utilisation de la pachymétrie aux ultrasons à des

zones périphériques prédéterminées ou la réalisation de clichés OCT avec la cornée pointant vers une direction prédéterminée (ex. à 30° en latéral droit) pour qu'un segment de sa périphérie (plutôt que son centre) soit parallèle à l'objectif de l'appareil.

4.2.5 Expérience G : SMILE, riboflavine, [CLP] et délai pré-CXL

❖ Buts :

- Tester la reproductibilité de la technique SMILE en évaluant la profondeur de la poche stromale.
- Comparer la progression du volume des implants selon leur composition en CLP et selon le délai entre l'ajout de riboflavine et le début de l'irradiation.

❖ Hypothèses :

- Les coupes SMILE devraient avoir une profondeur moyenne de $120 \mu\text{m} \pm 2,5 \mu\text{m}$ (incertitude absolue de l'OCT 930 SR).
- Un implant dont la concentration en CLP est moindre et qui est irradié plus rapidement devrait se solidifier plus aisément. La C17 devrait donc être la cornée qui conserve son volume le plus longtemps (voir plus loin).

❖ Modifications au protocole:

- Utilisation d'une seringue de 1 ml pour l'injection.
- Suivi maintenant comme suit : préinjection (post-kératotomie), +0h, +2h, +4h, +6h, +1J, +2J (puis aux 2 jours, sauf les fins de semaine).

❖ Nombre de cornées opérées : 4 (C17-20)

❖ Type de chirurgie : SMILE

❖ Formulation et réticulation des implants :

Formule de base avec A : Moins de CLP : prend 10-12 minutes pour se gélifier

B : Plus de CLP : prend 6-7 minutes pour se gélifier

- C17 : formulation A, CXL immédiatement après injection dans la cornée
- C18 : formulation A, CXL après 20 min
- C19 : formulation B, CXL immédiatement
- C20 : formulation B, CXL après 20 min

❖ Résultats :

- C17-20 : Profondeur des coupes (épaisseur du mur antérieur) = $120 \pm 2 \mu\text{m}$

- C17-20 : Les injections ont été un succès et le volume injecté a été plus facile à contrôler grâce à l'utilisation d'une seringue de 1 ml.
- C17-20 : Tous les implants avaient complètement ou presque disparu des cornées opérées après 48 heures. Après l'injection de l'implant et son irradiation, on note un amincissement important des murs antérieur et postérieur des cornées, qui revient à la normale après 24 heures. Il n'y a pas de différence notable entre les 4 implants (**Figure 54**).
- C17 : La dissection du lenticule intrastromal a été plus difficile, à cause de plis cornéens dus à la succion qui ont empêché le laser de bien découper le lenticule. Ceci a mené à la formation de ponts tissulaires dans la poche stromale qui n'ont pas pu être retirés entièrement (**Figure 55**).
- C20 : Le suivi des implants a été arrêté lorsque la C20 montra des signes de contamination fongique au jour 9 postopératoire (**Figure 56**).

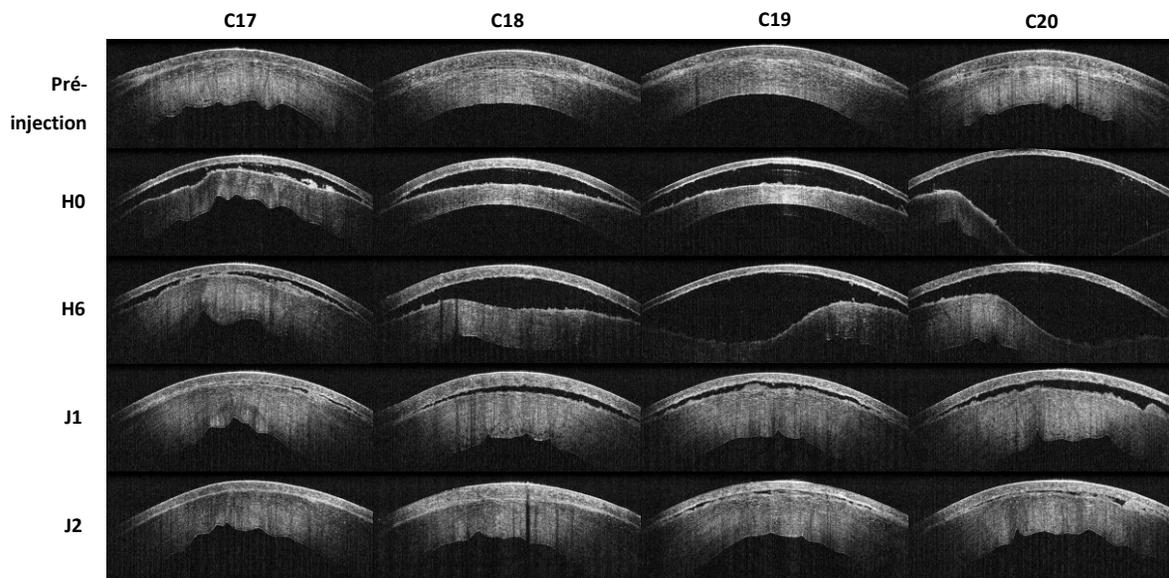


Figure 54. C17-20 : Disparition des implants en 48h.

La faible pression dans la chambre artificielle induit la perte de la convexité antérieure de la paroi postérieure de la cornée et provoque la collection de l'implant près de son centre dans les C18-20 lors du suivi des six premières heures postopératoires (avant l'installation des cornées sur le système de perfusion automatique). Dans les C18 et C19C, cet effet pourrait également être secondaire à la pression positive qui se crée au niveau de la paroi postérieure par leur implant qui semble prendre de l'expansion, et qui est faiblement contré par la PIO. De plus, on voit l'amincissement important des murs antérieurs et postérieurs des cornées à la suite de l'injection et irradiation des implants, puis son rapide retour à la normale dans les 24 premières heures postopératoires.

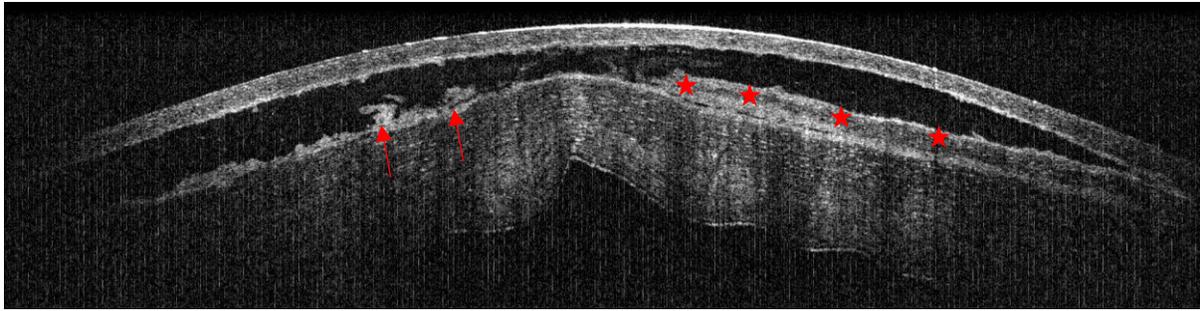


Figure 55. C17 : Dissection incomplète du lenticule intrastromal.

Malgré un mur antérieur très lisse, on peut voir quelques irrégularités de surface (flèches rouges), ainsi qu'une lamelle stromale partiellement disséquée (étoiles rouges).



Figure 56. C20 : Infection d'allure fongique au 9^e jour postopératoire.

4.2.5.1 Analyse

4.2.5.1.1 Bénéfices et limites de la technique SMILE

Malgré les difficultés chirurgicales rencontrées avec la C17, on voit d'emblée que la technique SMILE permet d'avoir une profondeur de coupe qui est de loin plus précise et reproductible que la kératotomie manuelle, en plus de son avantage qui est de retirer du tissu lors de l'opération ce qui minimise la perturbation de la forme de la cornée lors de l'injection de l'implant. Cependant, pour éviter de faire une dissection incomplète, il faut faire attention à avoir une surface qui adhère bien – sans plis – à la succion de l'appareil avant de débiter la découpe au laser, comme ceci a été le cas pour les 3 autres cornées de l'expérience analysée ici.

4.2.5.1.2 Injection de l'implant et sa distribution dans la poche stromale

Maintenant que le volume injecté est plus facilement contrôlable, il est possible d'injecter de plus petites quantités et ainsi d'éviter la fuite immédiate de l'implant par la plaie suturée. Toutefois, sans moyen objectif pour mesurer la PIO dans la chambre artificielle, l'injection de l'implant (et

sa subséquente expansion) continue, malgré le plus faible volume injecté, de perturber l'architecture stromale postérieure, ce qui est évidemment à éviter à tout prix chez un patient humain.

4.2.5.1.3 Infection fongique

Bien qu'initialement l'idée de multiplier le nombre de photos était censée permettre de déterminer le moment où l'implant atteint son volume maximal – volume qui ici n'a jamais réellement augmenté – le fait de manipuler fréquemment les chambres artificielles et de devoir les placer dans un milieu non stérile pour prendre les images a probablement mené à l'infection fongique que l'on a vue au 9^e jour postopératoire sur la C20. Il serait donc mieux de limiter le nombre d'exams et de veiller à ne pas entrer en contact direct avec la cornée ou son milieu de préservation.

4.2.5.1.4 Niveau d'énergie nécessaire à la réaction photochimique

Comme dans l'expérience précédente, on voit que la cornée s'amincit initialement entre la kératotomie et la première prise de vue après la réticulation de la lumière bleue, pour reprendre progressivement son volume de départ par la suite. Cependant, à nouveau, aucun des implants n'a tenu le coup plus bien longtemps et les 4 poches stromales se sont vidées pratiquement au même rythme. Jusqu'à ce point, seule une hausse du temps d'exposition à la lumière bleue a été tentée. Il est donc possible que le niveau d'énergie dégagée (5 mW/cm^2) par la lumière bleue ne soit pas suffisant. En fait, si le niveau d'énergie est insuffisant pour permettre la réaction de la riboflavine, il devient évident que d'allonger le temps d'exposition n'aura aucun effet. La loi de réciprocity de Bunsen et Roscoe stipule que l'effet d'une réaction photochimique (ou photobiologique) est directement proportionnel à la dose totale d'irradiation, quel que soit le laps de temps pendant lequel la dose est administrée.²⁸⁶ Des protocoles de réticulation utilisant de la lumière UV-A jusqu'à 45 mW/cm^2 (aucun effet significatif n'était noté au-dessus de cette dose) ont été utilisés avec succès pour traiter des kératocônes et permettaient de réduire le temps d'exposition par rapport au protocole standard utilisant 3 mW/cm^2 durant 30 minutes.^{287, 288}

4.2.5.1.5 Utilisation simultanée de deux agents de réticulation

Une autre modalité de formulation d'implant qui n'a pas encore été tentée est d'ajouter à la toute fin de la préparation un agent de réticulation tel l'EDC, un carbodiimide soluble dans l'eau qui offre une méthode simple et sécuritaire pour stabiliser le collagène.²⁸⁹ L'EDC et autres

carbodiimides appartiennent à la catégorie des *zero-length crosslinkers*, ayant pour propriété de réagir avec les acides carboxyliques pour former des espèces hautement réactives qui réagissent avec les groupes amine des chaînes polypeptidiques adjacentes pour former des liaisons amides covalentes.^{290, 291} En plus du NHS, un co-réactif souvent utilisé pour améliorer l'efficacité de la réticulation, les carbodiimides ne sont pas eux-mêmes incorporés dans le produit final réticulé et offrent donc l'avantage théorique de ne pas provoquer de réaction toxique chez l'hôte.²⁹²⁻²⁹⁴ Un autre avantage est qu'il agit à l'intérieur de quelques minutes et qu'il a donc le potentiel de permettre une solidification rapide des implants après leur injection dans la cornée hôte.²⁹⁵ Le ratio EDC:NHS qui montre le meilleur niveau de réticulation est de 2:1 à un pH de 5,5,²⁹⁶ mais un ratio de 1:1 (qui est presque aussi efficace) pourrait permettre de ralentir légèrement la vitesse de la réaction et éviter que l'implant ne soit pas capable de sortir de la seringue. La riboflavine et l'EDC pourraient donc ainsi avoir un effet synergique et permettre une réticulation plus efficace des implants.

4.2.5.2 Discussion

La PIO est un facteur qui semble jouer un rôle important dans la fuite des implants. Il est évident que des implants qui se solidifient davantage ne devraient pas s'écouler à des PIO normales, mais il serait pertinent, tout de même, de surveiller ce paramètre. Dans un futur projet, il pourrait être pertinent de se fournir d'un appareil électronique permettant de mesurer la pression à la sortie de la chambre artificielle. Cela permettrait de fixer la pression à une valeur humaine physiologique et permettrait de déterminer si les changements de volumes des implants observés sont bel et bien secondaires à leur expansion plutôt qu'à une variation de la PIO.

4.2.6 Expérience H : Pré-réticulation avec EDC/NHS et intensité de l'irradiation

❖ But :

- Comparer la progression des implants selon leur ration EDC:NHS (2:1 ou 1:1) et leur irradiation à la lumière bleue (10 ou 20 mW/cm²)

❖ **Hypothèses :**

- Les implants avec un ratio EDC:NHS de 2:1 ne devraient pas montrer une réticulation significativement supérieure aux implants avec un ratio EDC:NHS de 1:1.
- Les implants irradiés par 20 mW/cm² devraient montrer une réticulation significativement supérieure aux implants irradiés par 10 mW/cm². Tous les implants devraient montrer une réticulation significativement supérieure aux implants irradiés des expériences précédentes.

❖ **Modifications au protocole:**

- Cesser le suivi dès la stabilité volumique de tous les implants ou après 1 mois d'observation.
- S'assurer de continuer à instiller du BSS à toutes les 5 minutes sur les cornées lors de toutes les manipulations. Ne pas prendre plus de 5 min pour faire les photos sur chaque appareil.
 - Une hydratation adéquate de la cornée devrait permettre d'éviter les variations rapides et rebondissantes du stroma cornéen.

❖ **Nombre de cornées opérées : 4 (C21-24)**

❖ **Type de chirurgie : SMILE**

❖ **Formulation et réticulation des implants :**

Formule de base avec 0.213X (en µl) de EDC:NHS 1.04M (de chaque) dans H₂O

- C21 : 10 mW/cm² (1,25 cm de la source lumineuse) – EDC:NHS = 2:1
- C22 : 20 mW/cm² (0,8 cm de la source lumineuse) – EDC:NHS = 2:1
- C23 : 10 mW/cm² – EDC:NHS = 1:1
- C24 : 20 mW/cm² – EDC:NHS = 1:1

❖ **Résultats :**

- C21-24 : Profondeur des coupes (épaisseur du mur antérieur) = 120 ± 2 µm
- C21-24 : Perte de tous les implants après 24 heures postopératoires, sans différence notable entre les 4 implants. Cette fois-ci, on ne note pas d'amincissement de la cornée ni de turgescence rebond dans la période d'observation (**Figure 57**).

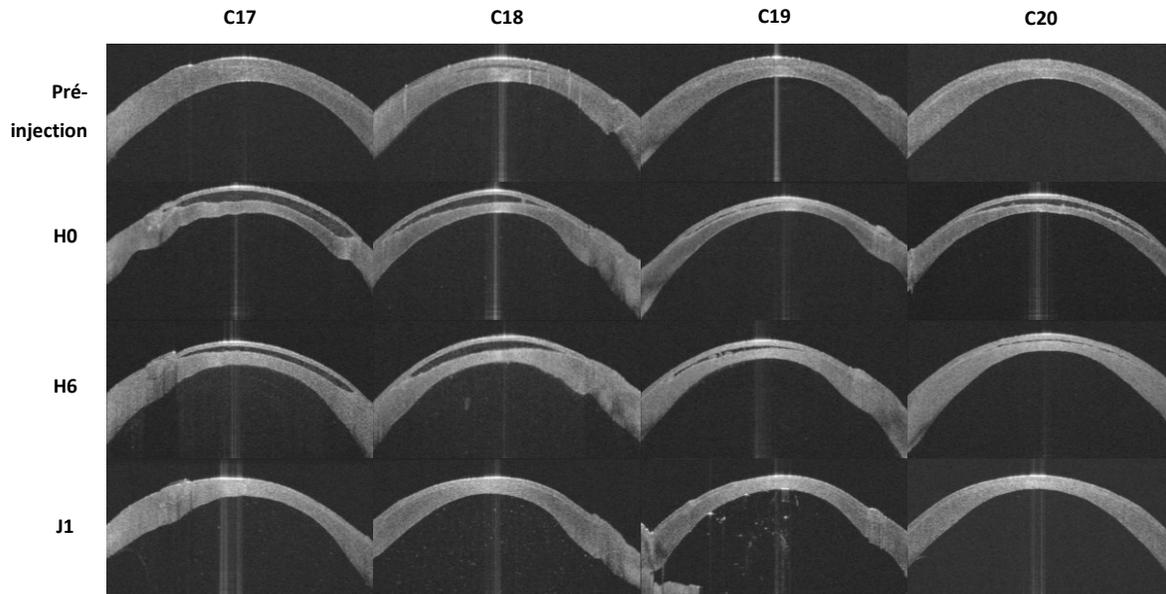


Figure 57. C21-24 : Disparition des implants en 24h.

4.2.6.1 Analyse

La technique SMILE montre encore une fois sa supériorité par rapport à la kératotomie manuelle. Cependant, le résultat final demeure le même : malgré la préservation des dimensions cornéenne (ce qui montre que l'hydratation cornéenne a probablement eu le résultat escompté), la présence d'un agent de réticulation supplémentaire et l'augmentation de l'énergie d'irradiation, les implants ne réussissent pas à demeurer présents dans leur poche stromale. Deux hypothèses peuvent être formulées pour tenter d'expliquer ce phénomène. Le raisonnement derrière ces deux hypothèses est ce qui a permis la création des implants présentés à l'expérience suivante par Dr Marcelo Muñoz, PhD.

4.2.6.1.1 Température lors de la réticulation

Premièrement, puisque la réaction de réticulation du collagène grâce à l'EDC se produit en l'espace de quelques minutes dans un bain d'eau glacée (et encore plus vite à la température de la pièce),²⁹⁵ un simple petit délai de quelques minutes entre la fin de l'injection et le début de l'irradiation par la lumière bleue peut permettre à du liquide interstitiel de perfuser vers l'implant (le PEG, rappelons-le, est très hydrophile) et venir ainsi perturber le cours normal de la réticulation. Ceci pourrait mener à la formation d'une multitude de micro-ilots polymérisés qui ne sont pas rattachés entre eux et qui ne permettent donc pas de donner à l'implant une consistance globalement solide.

Pour éviter ceci, il faudrait donc irradier l'implant tout de suite après son injection, ce qui est un défi important, car il faut passer de la table d'opération où l'implant est injecté sous le microscope à la table d'irradiation où la source lumineuse est installée en quelques instants tout en préservant au mieux les conditions de stérilité autour de la cornée opérée.

4.2.6.1.2 Concentration d'oxygène lors de la réticulation

Deuxièmement, il se pourrait que depuis le début des expériences, le principal facteur limitant de la réticulation de la riboflavine soit son besoin en oxygène dans la cornée. En présence de lumière, la riboflavine peut réagir avec un large éventail de substrats donneurs d'électrons (par exemple, des amines ou des acides aminés) par le biais de mécanismes photochimiques mixtes de types I et II.²⁹⁷ Dans la réaction photochimique de type I, qui est prédominante lorsque l'oxygène se fait rare, le substrat donneurs d'électrons réagit avec la riboflavine excitée par la lumière pour générer des radicaux ou des ions radicaux, respectivement, par transfert d'atome d'hydrogène ou d'électrons. Dans la réaction photochimique de type II, la riboflavine excitée réagit avec l'oxygène pour former de l'oxygène moléculaire singulet.²⁹⁸ Plus précisément, dans la cornée, la réticulation s'explique par l'interférence de la riboflavine par les mécanismes I et II avec les acides aminés du collagène ce qui conduit à des liaisons covalentes intrafibrillaires et interfibrillaires.¹⁷⁵ Kamaev et coll.²⁹⁸ ont démontré dans une étude de cinétique chimique que sous un volet stromal étanche de 130 μm , l'oxygène s'épuisait en l'espace d'une dizaine de secondes lorsque la cornée imbue de riboflavine 0,1% était soumise à des rayons UV-A à raison de 3 mW/cm^2 à 25 °C, en 10 secondes à 35°C et en 5 secondes à 30 mW/cm^2 à 25 °C. Après cette réaction de type II initiale, l'oxygène prenait près de 30 minutes pour revenir à son niveau de base lorsque la lumière était de 3 mW/cm^2 à 25 °C, ce qui montrerait qu'une réaction de type I prenait place pendant cet intervalle, pour devenir progressivement une réaction mixte de types I et II. Ceci semblerait indiquer que la réaction prédominante (en terme temporel) est la réaction de type I, qui ne nécessite que peu d'oxygène.²⁹⁸ Cependant, Richoz et coll.²⁹⁹ ont démontré que les cornées réticulées à des taux normaux d'oxygènes (21%) montraient une stabilité biomécanique significativement supérieure aux cornées réticulées dans un milieu faible en oxygène (<0,1%), ce qui supporte l'idée que la cornée – et donc les implants étudiés ici – nécessite effectivement la présence d'oxygène pour être réticulée efficacement, ce qui était une théorie supportée de longue date.³⁰⁰ De plus, Kamaev et coll.²⁹⁸ ont montré qu'en retirant subitement la lumière, l'oxygène remontait à son niveau originel en l'espace

de 3 à 4 minutes, avec un taux initial très rapide (**Figure 58**). Il devient donc nécessaire pour les implants de mettre à l'essai la réticulation selon différents niveaux d'oxygène pour voir si la déplétion de l'oxygène dans la cornée lors de l'irradiation est effectivement le facteur limitant à la formation d'un implant solide dans la poche stromale.

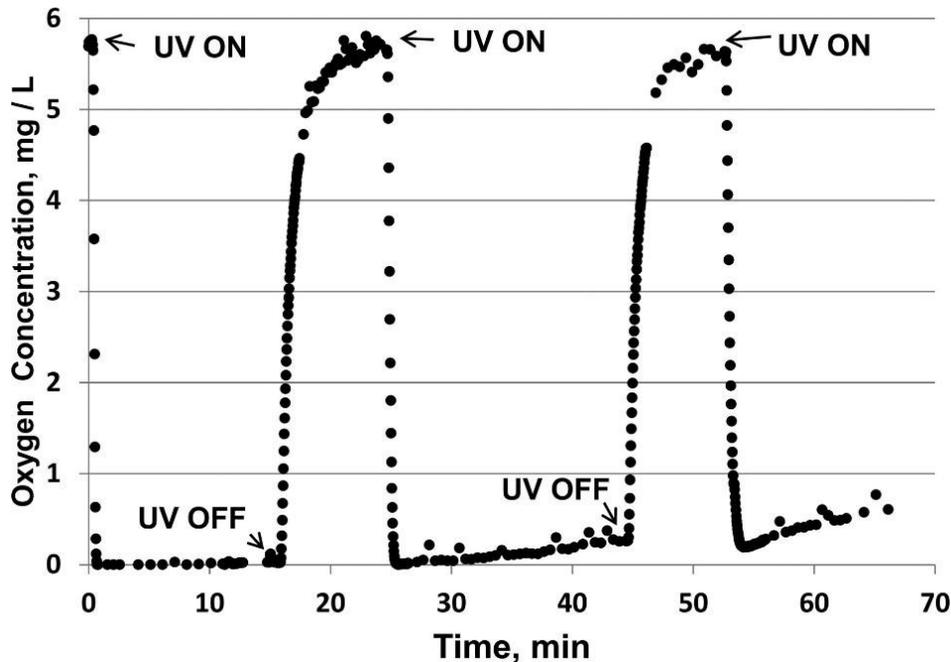


Figure 58. Concentration en oxygène du stroma saturé en riboflavine et soumis à des UV.

La figure montre le rapide épuisement en oxygène qui se produit dans un volet (*flap*) cornéen de 130 μm , imbibé de riboflavine 0,1% sous l'irradiation d'UV-A à 3 mW/cm^2 à 25 $^{\circ}\text{C}$, avec un retour légèrement moins rapide de l'oxygène à son niveau de base quand la lumière est éteinte. Tiré de Kamaev et coll.²⁹⁸

4.2.6.2 Discussion

La température est vraisemblablement un facteur central à la réticulation des implants. Pour mieux comprendre ce phénomène, il serait pertinent dans une future étude de monitor la température à la surface de la cornée (point de la plus haute absorption d'énergie) avec un thermomètre contact ou infrarouge. Cette mesure pourrait être faite en continu avec une caméra infrarouge ou à intervalles réguliers à l'aide d'un thermomètre contact.

Un autre paramètre important qui mériterait d'être étudié, mais avec un défi technique beaucoup plus important, est la concentration intracornéenne d'oxygène lors de la réticulation, à l'instar de Kamaev et coll.

4.2.7 Expérience J : EDC/NHS, irradiation pulsative et implant solide

❖ Buts :

- Tester une technique d'irradiation à la lumière pulsée (2,5 secondes allumée pour 2,5 secondes éteinte) sur une durée de 40 minutes, pour un total de 20 minutes d'irradiation totale.
- Évaluer l'évolution d'un implant préformé *in vitro* pour voir si, une fois la réticulation effectuée, l'environnement cornéen a un impact sur la dimension (ou la fonte) de l'implant.

❖ Hypothèses :

- Si l'apport en oxygène est réellement le facteur limitant principal à la réticulation des implants, et puisque la déplétion et la réplétion de l'oxygène se produisent en quelques secondes, la lumière pulsée devrait permettre un niveau d'oxygène adéquat tout au long de la réaction et l'implant devrait se solidifier et demeurer dans la poche stromale.
- *Proof of concept* : un implant bien réticulé (d'avance) devrait garder sa forme et sa solidité dans la cornée pour une grande période (> 2 semaines).

❖ Modifications au protocole:

- Injecter et irradier l'implant dès la fin de sa confection *in vitro*.
- Pour cette fois-ci seulement, évaluer les cornées tous les jours afin de noter toute modification de la taille des implants.

❖ Nombre de cornées opérées : 3 (C25-27)

❖ Type de chirurgie : SMILE (C25 et C26), kératotomie manuelle (C27)

❖ Formulation des implants :

- Formule de base avec 0.213X (en μ l) de EDC:NHS 1.04M (de chaque) dans H₂O

❖ Résultats :

- C25-27 : La progression de la hauteur des implants suit la même tendance que celle de l'aire de coupe (**Figure 59** et **Figure 60**).
- C25 et C26 : On observe une différence de volume entre les implants des C25 et C26 immédiatement après l'injection et la réticulation, l'implant de C26 ayant un volume initial plus élevé. Les implants augmentent proportionnellement en taille sur les 6 premières heures de suivi. L'aire de coupe de l'implant solide demeure quant à lui très stable durant toute la période de suivi à partir de J1. (**Figure 59**).
- Rapport aire H6/H0 = 2,41 et 1,94 pour les implants de C25 et C26, respectivement

➤ C25 et C26 : Malgré l'hydratation continue des cornées durant la chirurgie et la prise d'images, les deux cornées opérées par implant liquide ont subi un important et similaire amincissement de leurs parois antérieures et postérieures lors de l'injection et la réticulation des implants. L'épaisseur des parois est cependant restée stable chez les trois cornées durant la période de suivi. (**Figure 61** et **Figure 62**).

- Rapport hauteur paroi antérieure Pré-inj/H0 = 1,36 et 1,87 pour les implants de C25 et C26, respectivement
- Rapport hauteur paroi postérieure Pré-inj/H0 = 1,63 et 1,73 pour les implants de C25 et C26, respectivement

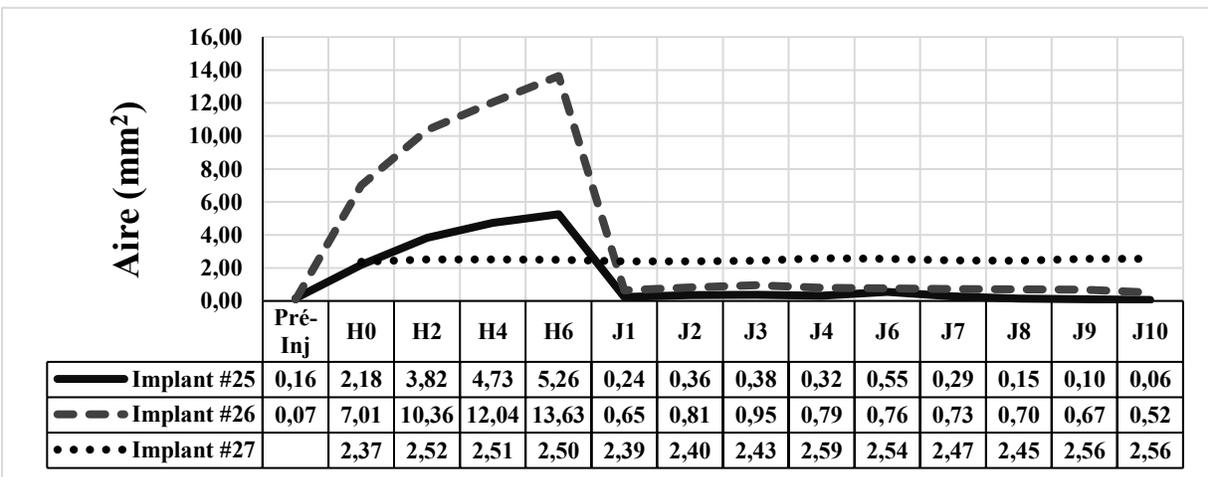


Figure 59. C25-27 : Aire de coupe OCT des implants durant 10J.

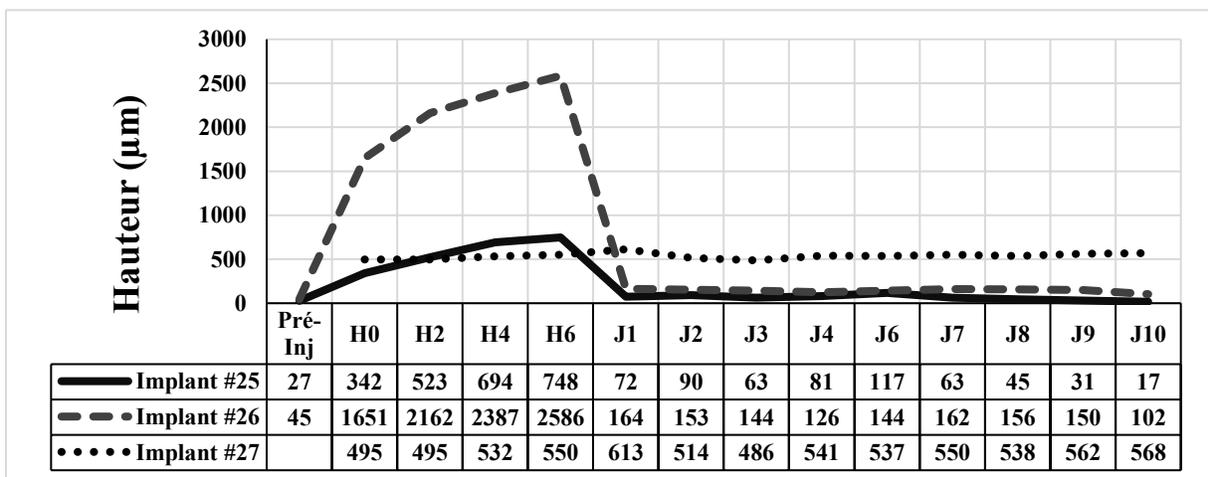


Figure 60. C25-27 : Hauteur de coupe OCT des implants durant 10J.

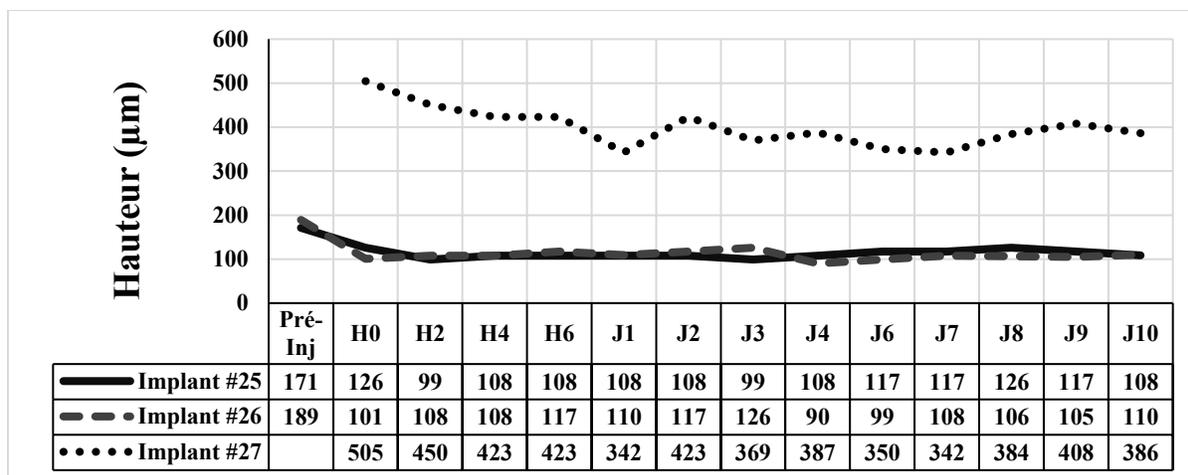


Figure 61. C25-27 : Épaisseur de la paroi antérieure durant 10J.

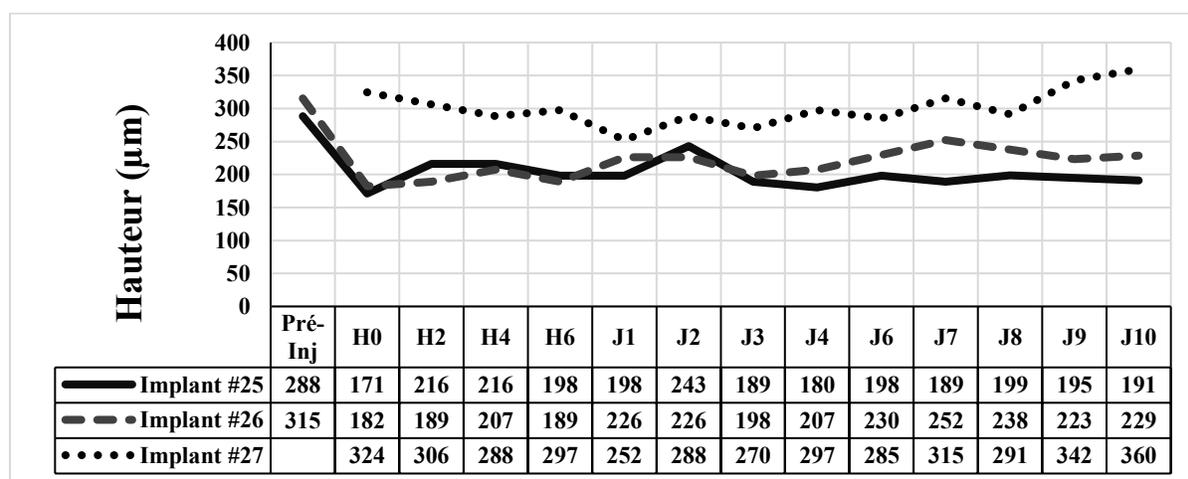


Figure 62. C25-27 : Épaisseur de la paroi postérieure durant 10J.

4.2.7.1 Analyse

4.2.7.1.1 Aire de coupe versus hauteur des implants

À nouveau, on voit que l'aire de coupe des implants suit la même tendance que leur hauteur. Puisque la mesure de l'aire de coupe nécessite de faire plus d'opérations sur les images, il pourrait être jugé plus simple de ne prendre que la hauteur des implants comme modalité de suivi.

4.2.7.1.2 Limites de l'injection manuelle des implants

Malgré l'utilisation d'une seringue plus petite, on voit qu'il persiste encore de la variabilité dans le volume injecté ou, du moins, dans le volume résiduel dans la poche stromale immédiatement après

la réticulation. Ceci est une limite importante à l'interprétation des résultats, car on sait que la lumière perd de sa capacité de réticulation en profondeur.¹⁷⁵

4.2.7.1.3 Évolution du volume des implants

On voit à nouveau que, malgré l'hydratation continue des cornées, les implants gagnent en volume et la cornée s'amincit. Bien que l'échantillon soit de faible taille, il est intéressant de noter que l'implant qui a subi relativement le plus grand gain en volume est celui dont la cornée s'est le plus amincie. Tout ceci porte en faveur de l'hypothèse qui stipule que les implants sont hydrophiles et qu'ils contribuent à l'amincissement cornéen après leur implantation. La préservation des implants durant la période de suivi peut également expliquer pourquoi ces dernières cornées sont demeurées minces, alors que les C15 et C16 ont accusé un gain en épaisseur après la fuite des implants. En fait, pour la première fois depuis le début des expériences, on note que les implants, malgré une perte importante en volume le premier jour, préservent leur volume et demeurent relativement stables dès J1. En regardant l'aire de coupe de plus près, on se rend cependant compte que les implants perdent lentement en volume durant les 10 jours de suivi, ce qui pourrait partiellement être dû à la perte de leur contenu accumulé en eau. En fait, cette expérience sur l'implant solide confirme qu'une fois l'implant réticulé avec succès, sa taille demeure la même dans la cornée et permet d'éviter l'amincissement important des parois cornéennes. La perte de volume des implants injectés puis réticulés dans la cornée ne semble pas être palliée par l'utilisation d'une lumière pulsée et demeure donc un problème important : ceci pourrait être lié à la température à laquelle les expériences sont réalisées.

4.2.7.1.4 Réticulation à la température de la pièce

Une solution pourrait être de changer l'EDC/NHS pour un autre agent de réticulation. L'EDC/NHS avait déjà causé quelques problèmes dans la confection des implants de PC (impossibilité de faire des implants plus minces que 300 μm)¹⁸⁵ et de RHCIII (seulement 13 des 50 implants confectionnés pour l'étude clinique de phase 1 étaient suffisamment homogènes et transparents).²⁹⁵ Un facteur limitant qui est apparu dans ces études est le besoin de faire la réaction de réticulation de l'EDC/NHS dans un environnement refroidi pour être capable d'avoir une réaction uniforme, organisée et homogène.²⁹⁵ Comme mentionné précédemment, une réticulation incomplète ou non uniforme (micro-ilots polymérisés non liés entre eux) ne permettra pas à l'implant de garder sa forme et de demeurer en place dans la poche stromale. Une option alternative

le *N-Cyclohexyl-N0-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-p-toluenesulfonate* (CMC) faisant lui aussi partie de la famille des carbodiimides, mais comprenant deux groupes volumineux, le cyclohexyle et le 2-morpholinoéthyle.²⁹⁵ Ahn et coll. ont comparé la réticulation du collagène entre l'EDC/NHS et le CMC/NHS et ont démontré que ce dernier permettait une réticulation beaucoup plus contrôlée à la température de la pièce en plus de permettre la formation d'un hydrogel plus rigide.²⁹⁵ Une autre option serait l'agent de réticulation *4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride* (DMTMM), lui aussi un *zero-length crosslinkers*, sans être un carbodiimide. À l'instar du CMC, il permet une réticulation plus contrôlée que l'EDC, à température pièce, sans même nécessiter un contrôle du pH ou provoquer sa variation, assurant potentiellement une meilleure biocompatibilité.^{301, 302}

4.2.7.2 Discussion et bilan

Les expériences A à J ont démontré que la cornée et l'implant subissent tous deux des changements importants dans les premières heures suivant l'opération. L'imagerie OCT est essentielle à la visualisation de ces changements au fil du temps et donne des informations cruciales à la bonne compréhension des facteurs qui influence le succès des chirurgies.

Il est cependant évident que chaque nouvelle formulation d'implants posera ses défis et qu'il faudra probablement ajuster encore et encore la méthodologie afin de suivre les cornées de façon optimale. Les techniques développées jusqu'à présent à la LAF et à l'OCT représentent toutefois des assises solides sur lesquelles les futures études de ce genre pourront se baser. Ces expériences à venir pourraient également profiter de l'usage d'un pachymètre aux ultrasons pour mesurer l'épaisseur cornéenne périphérique, ainsi que d'un thermomètre et d'un oxymètre cornéen pour mieux comprendre le phénomène de la réticulation de l'implant intrastromal.

5 – Conclusion

La cécité cornéenne est la 4^e cause de cécité dans le monde et la greffe de cornée demeure le seul traitement accepté. Dans un contexte de pénurie mondiale de cornées humaines et de patients à haut risque de rejet et d'échec de greffe, il devient nécessaire de développer des implants capables de dépasser les importantes limites des greffons natifs humains. Les substituts cornéens biosynthétiques promettent de répondre adéquatement à ce besoin grandissant, mais avant d'envisager leur utilisation chez le patient humain, il est primordial d'en démontrer la performance et la sécurité.

Différentes formulations d'implants injectables de CLP-PEG-MPC ont été testées sur des cornées humaines *ex vivo* et beaucoup de progrès a été réalisé sur la formulation des implants. Cela s'est fait grâce notamment à la qualité du suivi postopératoire qui permet d'obtenir des résultats objectifs de l'évolution des cornées opérées : transparence, volume et caractéristiques macroscopique et microscopique des implants. Il reste cependant encore du travail pour trouver une recette idéale pour l'implant injectable, dont la réticulation semble être limitée, entre autres, par l'apport d'oxygène à travers la cornée. Durant la rédaction de ce mémoire, d'autres tests ont été effectués par notre équipe avec des agents de réticulations différents au EDC/NHS et de très bons résultats postopératoires ont été obtenus grâce aux techniques mises au point dans ce projet. Cette formulation d'implants sera prochainement étudiée dans les yeux d'animaux *in vivo*, en utilisant les procédures perfectionnées et mises à l'épreuve dans le cadre du projet sur les implants solides.

Durant ce projet, nous avons également évalué pour la première fois chez le félin la biocompatibilité et la performance de certains implants solides qui avaient déjà fait leurs preuves sur d'autres modèles animaux et même chez quelques patients humains. Au terme du suivi, les greffons étaient transparents, bien tolérés, sans signe de rejet immunitaire. Nous avons pu mettre en évidence un remodelage actif des implants biosynthétiques pour la première fois chez le félin, et ce dès le 3^e mois postopératoire. Comme chez les autres modèles animaux, l'évolution des implants a été marquée par une opacification transitoire et un appel néovasculaire qui n'a cependant pas nécessité de corticothérapie à long terme. Bien que l'évaluation des implants solides fût limitée à leur suivi clinique *in vivo*, ceci correspond au suivi qui sera ultimement effectué chez l'humain et a permis de bien préparer le terrain pour l'analyse des implants liquides qui seront prochainement étudiés chez l'animal. De plus, malgré la rarissime séquestration cornéenne d'un des animaux à

l'étude et leur infection endémique à l'herpès, la qualité de nos résultats montre que le félin est un modèle animal qui est facilement examinable et qui, grâce à son anatomie et physiologie cornéenne similaire à l'humain, permet d'obtenir des résultats représentatifs de la biocompatibilité et de la performance des implants, sans les limites anatomiques, d'accessibilité ou de suivi des autres modèles animaux. De plus, grâce aux modalités très diverses de suivi qui ont été adaptées et optimisées pour l'utilisation *in vivo* chez l'animal, un maximum d'information pertinente peut maintenant être recueilli sur les sujets d'étude. Ceci permet un raffinement et une réduction du nombre total de sujets nécessaires en vue d'études ultérieures qui auront besoin d'autres sujets animaux ou de patients humains.

Bref, notre programme d'évaluation clinique et translationnelle de la biocompatibilité et de la performance de substituts cornéens biosynthétiques, de leur confection en laboratoire à leur implantation chez l'animal, pose les fondations pour les prochaines avancées en matière d'implants cornéens en vue de leur utilisation chez l'humain, avec la promesse – pas si lointaine – de venir enfin à bout de la cécité cornéenne dans le monde.

6 – Bibliographie

1. Meek KM, Dennis S, Khan S. Changes in the refractive index of the stroma and its extrafibrillar matrix when the cornea swells. *Biophysical journal*. 2003;85(4):2205-12.
2. Oliva MS, Schottman T, Gulati M. Turning the tide of corneal blindness. *Indian J Ophthalmol*. 2012;60(5):423-7. Epub 2012/09/05.
3. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, et coll. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ*. 2004;82(11):844-51. Epub 2005/01/11.
4. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, et coll. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*. 2017;5(12):e1221-e34.
5. Dandona L, Dandona R, Naduvilath TJ, McCarty CA, Nanda A, Srinivas M, et coll. Is current eye-care-policy focus almost exclusively on cataract adequate to deal with blindness in India? *Lancet (London, England)*. 1998;351(9112):1312-6. Epub 1998/06/27.
6. Dandona R, Dandona L. Corneal blindness in a southern Indian population: need for health promotion strategies. *Br J Ophthalmol*. 2003;87(2):133-41. Epub 2003/01/25.
7. Lewallen S, Courtright P. Blindness in Africa: present situation and future needs. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(8):897-903. Epub 2001/07/24.
8. Faal H. Preventing corneal blindness: working with communities. *Community eye health*. 2009;22(71):36-7. Epub 2010/03/10.
9. Mack RJ, Mason P, Mathers WD. Obstacles to Donor Eye Procurement and Their Solutions at the University of Iowa. *Cornea*. 1995;14(3):249-52.
10. Poinard C, Tuppin P, Loty B, Delbosc B. [The French national waiting list for keratoplasty created in 1999: patient registration, indications, characteristics, and turnover]. *Journal francais d'ophtalmologie*. 2003;26(9):911-9. Epub 2003/11/25. Bilan de la liste nationale d'attente de greffe de cornee francaise creee en 1999: taux d'inscription, flux, indications et caracteristiques des malades.
11. Rasouli M, Caraiscos VB, Slomovic AR. Efficacy of Routine Notification and Request on reducing corneal transplantation wait times in Canada. *Canadian Journal of Ophthalmology / Journal Canadien d'Ophtalmologie*. 2009;44(1):31-5.
12. Reinhard T, Böhringer D, Bogen A, Sundmacher R. The transplantation law: a chance to overcome the shortage of corneal grafts in germany? *Transplantation Proceedings*. 2002;34(4):1322-4.
13. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(5):614-8. Epub 2011/12/03.
14. Garg P, Krishna PV, Stratis AK, Gopinathan U. The value of corneal transplantation in reducing blindness. *Eye*. 2005;19(10):1106-14. Epub 2005/11/24.
15. Han DC, Mehta JS, Por YM, Htoon HM, Tan DT. Comparison of outcomes of lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty in keratoconus. *American journal of ophthalmology*. 2009;148(5):744-51.e1. Epub 2009/07/11.
16. Sharma N, Agarwal P, Titiyal JS, Kumar C, Sinha R, Vajpayee RB. Optimal use of donor corneal tissue: one cornea for two recipients. *Cornea*. 2011;30(10):1140-4. Epub 2011/08/03.

17. Feilmeier MR, Tabin GC, Williams L, Oliva M. The use of glycerol-preserved corneas in the developing world. *Middle East African journal of ophthalmology*. 2010;17(1):38-43. Epub 2010/06/15.
18. Guilbert E, Bullet J, Sandali O, Basli E, Laroche L, Borderie VM. Long-term Rejection Incidence and Reversibility After Penetrating and Lamellar Keratoplasty. *American journal of ophthalmology*. 2013;155(3):560-9.e2.
19. Weisbrod DJ, Sit M, Naor J, Slomovic AR. Outcomes of Repeat Penetrating Keratoplasty and Risk Factors for Graft Failure. *Cornea*. 2003;22(5):429-34.
20. Yu AL, Kaiser M, Schaumberger M, Messmer E, Kook D, Welge-Lussen U. Donor-Related Risk Factors and Preoperative Recipient-Related Risk Factors for Graft Failure. *Cornea*. 2014;33(11):1149-56.
21. Guilbert E, Laroche L, Borderie VJFFdO. Le rejet d'allogreffe de cornée. 2011;34(5):331-48.
22. Ament JD, Todani A, Pineda R, 2nd, Shen TT, Aldave AJ, Dohlman CH, et coll. Global corneal blindness and the Boston keratoprosthesis type I. *American journal of ophthalmology*. 2010;149(4):537-9. Epub 2010/03/30.
23. Avadhanam VS, Liu CSC. A brief review of Boston type-1 and osteo-odonto keratoprostheses. *British Journal of Ophthalmology*. 2014;99(7):878-87.
24. Navaratnam J, Utheim TP, Rajasekhar VK, Shahdadfar A. Substrates for Expansion of Corneal Endothelial Cells towards Bioengineering of Human Corneal Endothelium. *Journal of functional biomaterials*. 2015;6(3):917-45.
25. Rufer F, Schroder A, Erb C. White-to-white corneal diameter: normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea*. 2005;24(3):259-61. Epub 2005/03/22.
26. Sanchis-Gimeno JA, Sanchez-Zuriaga D, Martinez-Soriano F. White-to-white corneal diameter, pupil diameter, central corneal thickness and thinnest corneal thickness values of emmetropic subjects. *Surgical and radiologic anatomy : SRA*. 2012;34(2):167-70. Epub 2011/10/25.
27. Klein SA, rédacteur. *Corneal Topography: A review, new ANSI standards and problems to solve*. Vision Science and its Applications; 2000; : Optical Society of America.
28. Doughty MJ, Zaman ML. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach. *Surv Ophthalmol*. 2000;44(5):367-408. Epub 2000/03/29.
29. Freegard TJ. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye*. 1997;11 (Pt 4):465-71. Epub 1997/01/01.
30. Fares U, Otri AM, Al-Aqaba MA, Dua HS. Correlation of central and peripheral corneal thickness in healthy corneas. *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association*. 2012;35(1):39-45. Epub 2011/09/03.
31. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of cataract and refractive surgery*. 2011;37(3):588-98. Epub 2011/02/22.
32. Kohlhaas M, Boehm AG, Spoerl E, Pursten A, Grein HJ, Pillunat LE. Effect of central corneal thickness, corneal curvature, and axial length on applanation tonometry. *Archives of ophthalmology*. 2006;124(4):471-6. Epub 2006/04/12.
33. Vojnikovic B, Gabric N, Dekaris I, Juric B. Curvature analyses of the corneal front and back surface. *Collegium antropologicum*. 2013;37 Suppl 1:93-6. Epub 2013/07/11.

34. Golan O, Hwang ES, Lang P, Santhiago MR, Abulafia A, Touboul D, et coll. Differences in Posterior Corneal Features Between Normal Corneas and Subclinical Keratoconus. *Journal of refractive surgery*. 2018;34(10):664-70. Epub 2018/10/09.
35. Patel S, Tutchenko L. The refractive index of the human cornea: A review. *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association*. 2019;42(5):575-80. Epub 2019/05/09.
36. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian journal of ophthalmology*. 2018;66(2):190-4.
37. Jonas JB, Nangia V, Sinha A, Gupta R. Corneal refractive power and its associations with ocular and general parameters: the Central India Eye and Medical Study. *Ophthalmology*. 2011;118(9):1805-11. Epub 2011/06/15.
38. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*. 2013;120(9):1778-85. Epub 2013/05/30.
39. Farjo A, McDermott M, Soong HKJO. Corneal anatomy, physiology, and wound healing. 2009;44(2):203-8.
40. Gipson IK, Yankauckas M, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Rinehart W. Characteristics of a glycoprotein in the ocular surface glycocalyx. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33(1):218-27. Epub 1992/01/01.
41. Gipson IK. The Ocular Surface: The Challenge to Enable and Protect Vision: The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(10):4391-8.
42. Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Progress in molecular biology and translational science*. 2015;134:7-23. Epub 2015/08/28.
43. Davidson HJ, Kuonen VJ. The tear film and ocular mucins. *Veterinary ophthalmology*. 2004;7(2):71-7. Epub 2004/02/26.
44. Beuerman RW, Pedroza L. Ultrastructure of the human cornea. *Microscopy research and technique*. 1996;33(4):320-35. Epub 1996/03/01.
45. Wiley L, SundarRaj N, Sun TT, Thoft RA. Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(3):594-602. Epub 1991/03/01.
46. Chi C, Trinkaus-Randall V. New insights in wound response and repair of epithelium. *Journal of cellular physiology*. 2013;228(5):925-9. Epub 2012/11/07.
47. Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, Campbell KP, Durbeej M, Ghohestani RF, et coll. Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(11):4989-99.
48. Filenius S, Hormia M, Rissanen J, Burgeson RE, Yamada Y, Araki-Sasaki K, et coll. Laminin synthesis and the adhesion characteristics of immortalized human corneal epithelial cells to laminin isoforms. *Experimental eye research*. 2001;72(1):93-103. Epub 2001/01/03.
49. Suzuki K, Saito J, Yanai R, Yamada N, Chikama T, Seki K, et coll. Cell-matrix and cell-cell interactions during corneal epithelial wound healing. *Progress in retinal and eye research*. 2003;22(2):113-33. Epub 2003/02/27.
50. Yoon JJ, Ismail S, Sherwin T. Limbal stem cells: Central concepts of corneal epithelial homeostasis. *World journal of stem cells*. 2014;6(4):391-403. Epub 2014/09/27.

51. Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, et coll. Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Progress in retinal and eye research*. 2001;20(5):639-73. Epub 2001/07/27.
52. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983;24(10):1442-3. Epub 1983/10/01.
53. Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Experimental eye research*. 2004;78(3):503-12. Epub 2004/04/27.
54. Boote C, Dennis S, Newton RH, Puri H, Meek KM. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(7):2941-8. Epub 2003/06/26.
55. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. *Progress in retinal and eye research*. 2015;49:1-16.
56. Karimi A-H, Wong A, Bizheva K. Automated detection and cell density assessment of keratocytes in the human corneal stroma from ultrahigh resolution optical coherence tomograms. *Biomedical optics express*. 2011;2(10):2905-16.
57. McLaren JW, Bourne WM, Patel SV. Automated assessment of keratocyte density in stromal images from the ConfoScan 4 confocal microscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(4):1918-26. Epub 2009/11/07.
58. Patel SV, McLaren JW, Camp JJ, Nelson LR, Bourne WM. Automated quantification of keratocyte density by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(2):320-6. Epub 1999/02/09.
59. Jester JV. Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Seminars in cell & developmental biology*. 2008;19(2):82-93. Epub 2007/10/02.
60. Fini ME, Stramer BM. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea*. 2005;24(8 Suppl):S2-s11. Epub 2005/10/18.
61. Birk DE. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron*. 2001;32(3):223-37. Epub 2000/09/28.
62. Edelhauser HF. The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(5):1754-67. Epub 2006/04/28.
63. Kao WW, Liu CY. Roles of lumican and keratocan on corneal transparency. *Glycoconjugate journal*. 2002;19(4-5):275-85. Epub 2003/09/17.
64. Muller LJ, Pels E, Vrensen GF. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(4):437-43. Epub 2001/03/27.
65. Murphy C, Alvarado J, Juster R. Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984;25(12):1402-15. Epub 1984/12/01.
66. Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye*. 2003;17(8):912-8. Epub 2003/11/25.
67. Joyce NC. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Experimental eye research*. 2012;95(1):16-23. Epub 2011/09/13.
68. Gambato C, Longhin E, Catania AG, Lazzarini D, Parrozzani R, Midena E. Aging and corneal layers: an in vivo corneal confocal microscopy study. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2015;253(2):267-75. Epub 2014/10/15.
69. Polse KA, Brand RJ, Cohen SR, Guillon M. Hypoxic effects on corneal morphology and function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990;31(8):1542-54. Epub 1990/08/01.

70. Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Experimental eye research*. 2012;95(1):2-7. Epub 2011/06/15.
71. Madduri S, Papaloizos M, Gander B. Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation in vitro. *Neurosci Res*. 2009;65(1):88-97. Epub 2009/06/16.
72. Shaheen BS, Bakir M, Jain S. Corneal nerves in health and disease. *Surv Ophthalmol*. 2014;59(3):263-85. Epub 2014/01/28.
73. Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorscak L. Anatomy of the human corneal innervation. *Experimental eye research*. 2010;90(4):478-92. Epub 2009/12/29.
74. Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *The Journal of physiology*. 1957;136(2):263-86.
75. O'Donnell C, Wolffsohn JS. Grading of corneal transparency. *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association*. 2004;27(4):161-70.
76. Fini ME. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Progress in retinal and eye research*. 1999;18(4):529-51.
77. Daxer A, Misof K, Grabner B, Ettl A, Fratzl P. Collagen fibrils in the human corneal stroma: structure and aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(3):644-8.
78. Ni Dhubhghaill S, Rozema JJ, Jongenelen S, Ruiz Hidalgo I, Zakaria N, Tassignon MJ. Normative values for corneal densitometry analysis by Scheimpflug optical assessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(1):162-8.
79. Otri AM, Fares U, Al-Aqaba MA, Dua HS. Corneal densitometry as an indicator of corneal health. *Ophthalmology*. 2012;119(3):501-8. Epub 2011/12/03.
80. Eslani M, Baradaran-Rafii A, Movahedan A, Djalilian AR. The ocular surface chemical burns. *J Ophthalmol*. 2014;2014:196827.
81. Vemuganti GK, Reddy K, Iftexhar G, Garg P, Sharma S. Keratocyte loss in corneal infection through apoptosis: a histologic study of 59 cases. *BMC ophthalmology*. 2004;4:16.
82. Moller-Pedersen T. Keratocyte reflectivity and corneal haze. *Experimental eye research*. 2004;78(3):553-60. Epub 2004/04/27.
83. Cannon CJ, Marshall J, Patmore AL, Brahma A, Meek KM. Persistent haze and disorganization of anterior stromal collagen appear unrelated following phototherapeutic keratectomy. *Journal of refractive surgery*. 2003;19(3):323-32. Epub 2003/06/05.
84. SundarRaj N, Geiss MJ, 3rd, Fantes F, Hanna K, Anderson SC, Thompson KP, et coll. Healing of excimer laser ablated monkey corneas. An immunohistochemical evaluation. *Archives of ophthalmology*. 1990;108(11):1604-10.
85. Anderson JA, Binder PS, Rock ME, Vrabcic MP. Human excimer laser keratectomy. Immunohistochemical analysis of healing. *Archives of ophthalmology*. 1996;114(1):54-60.
86. Boote C, Dooley EP, Gardner SJ, Kamma-Lorger CS, Hayes S, Nielsen K, et coll. Quantification of collagen ultrastructure after penetrating keratoplasty - implications for corneal biomechanics. *PLoS One*. 2013;8(7):e68166. Epub 2013/07/19.
87. Casadessus O, Georges G, Lamoine LS, Deumie C, Hoffart L. Light scattering from edematous human corneal grafts' microstructure: experimental study and electromagnetic modelization. *Biomed Opt Express*. 2012;3(8):1793-810. Epub 2012/08/10.
88. Bourges JL. Corneal dystrophies. *Journal francais d'ophtalmologie*. 2017;40(6):e177-e92. Epub 2017/06/07.
89. Spadea L, Maraone G, Verboschi F, Vingolo EM, Tognetto D. Effect of corneal light scatter on vision: a review of the literature. *Int J Ophthalmol*. 2016;9(3):459-64. Epub 2016/05/10.

90. Park CY, Lee JK, Gore PK, Lim CY, Chuck RS. Keratoplasty in the United States: A 10-Year Review from 2005 through 2014. *Ophthalmology*. 2015;122(12):2432-42. Epub 2015/09/21.
91. Darlington JK, Adrean SD, Schwab IR. Trends of penetrating keratoplasty in the United States from 1980 to 2004. *Ophthalmology*. 2006;113(12):2171-5. Epub 2006/09/26.
92. Tan DT, Dart JK, Holland EJ, Kinoshita S. Corneal transplantation. *Lancet (London, England)*. 2012;379(9827):1749-61. Epub 2012/05/09.
93. Thompson RW, Jr., Price MO, Bowers PJ, Price FW, Jr. Long-term graft survival after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology*. 2003;110(7):1396-402. Epub 2003/07/18.
94. Niederkorn JY. Corneal transplantation and immune privilege. *International reviews of immunology*. 2013;32(1):57-67.
95. Lam H, Dana MR. Corneal graft rejection. *Int Ophthalmol Clin*. 2009;49(1):31-41. Epub 2009/01/07.
96. Amouzegar A, Chauhan SK, Dana R. Alloimmunity and Tolerance in Corneal Transplantation. *J Immunol*. 2016;196(10):3983-91. Epub 2016/05/18.
97. Williams KA, Lowe M, Bartlett C, Kelly TL, Coster DJ. Risk factors for human corneal graft failure within the Australian corneal graft registry. *Transplantation*. 2008;86(12):1720-4. Epub 2008/12/24.
98. Armitage WJ, Dick AD, Bourne WM. Predicting endothelial cell loss and long-term corneal graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(8):3326-31. Epub 2003/07/29.
99. Kelly TL, Williams KA, Coster DJ. Corneal transplantation for keratoconus: a registry study. *Archives of ophthalmology*. 2011;129(6):691-7. Epub 2011/02/16.
100. Patel SV, Hodge DO, Bourne WM. Corneal endothelium and postoperative outcomes 15 years after penetrating keratoplasty. *American journal of ophthalmology*. 2005;139(2):311-9. Epub 2005/03/01.
101. Ple-Plakon PA, Shtein RM. Trends in corneal transplantation: indications and techniques. *Current opinion in ophthalmology*. 2014;25(4):300-5. Epub 2014/05/29.
102. 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(1):209-18. Epub 2011/01/05.
103. Pramanik S, Musch DC, Sutphin JE, Farjo AA. Extended long-term outcomes of penetrating keratoplasty for keratoconus. *Ophthalmology*. 2006;113(9):1633-8. Epub 2006/07/11.
104. 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(1):209-18.
105. Pang K, Du L, Wu X. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. *Biomaterials*. 2010;31(28):7257-65.
106. Yoeruek E, Bayyoud T, Maurus C, Hofmann J, Spitzer MS, Bartz-Schmidt KU, et coll. Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts. *Acta ophthalmologica*. 2012;90(2):e125-e31.
107. Zhou Y, Wu Z, Ge J, Wan P, Li N, Xiang P, et coll. Development and characterization of acellular porcine corneal matrix using sodium dodecylsulfate. *Cornea*. 2011;30(1):73-82.
108. Pankert MB, Goyer B, Zaguia F, Bareille M, Perron M-C, Liu X, et coll. Biocompatibility and functionality of a tissue-engineered living corneal stroma transplanted in the feline eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(10):6908-20.

109. Kaushal S, Jhanji V, Sharma N, Tandon R, Titiyal JS, Vajpayee RB. "Tuck In" Lamellar Keratoplasty (TILK) for corneal ectasias involving corneal periphery. *Br J Ophthalmol*. 2008;92(2):286-90. Epub 2008/01/30.
110. Vajpayee RB, Jhanji V, Beltz J, Moorthy S. "Tuck in" lamellar keratoplasty for tectonic management of postkeratoplasty corneal ectasia with peripheral corneal involvement. *Cornea*. 2011;30(2):171-4. Epub 2010/11/04.
111. Ganesh S, Brar S, Rao PA. Cryopreservation of extracted corneal lenticles after small incision lenticule extraction for potential use in human subjects. *Cornea*. 2014;33(12):1355-62. Epub 2014/10/25.
112. Pradhan KR, Reinstein DZ, Carp GI, Archer TJ, Gobbe M, Gurung R. Femtosecond laser-assisted keyhole endokeratophakia: correction of hyperopia by implantation of an allogeneic lenticule obtained by SMILE from a myopic donor. *Journal of refractive surgery*. 2013;29(11):777-82. Epub 2013/11/10.
113. Jiang Y, Li Y, Liu XW, Xu J. A Novel Tectonic Keratoplasty with Femtosecond Laser Intrastromal Lenticule for Corneal Ulcer and Perforation. *Chin Med J (Engl)*. 2016;129(15):1817-21. Epub 2016/07/28.
114. Jiang Y, Li Y, Yang S, Lu TC. Tuck-in Lamellar keratoplasty with an lenticule obtained by small incision lenticule extraction for treatment of Post- LASIK Ectasia. *Scientific reports*. 2017;7(1):17806-.
115. Koulikovska M, Rafat M, Petrovski G, Vereb Z, Akhtar S, Fagerholm P, et coll. Enhanced regeneration of corneal tissue via a bioengineered collagen construct implanted by a nondisruptive surgical technique. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(5-6):1116-30. Epub 2014/11/21.
116. Dua HS, Said DG, Messmer EM, Rolando M, Benitez-Del-Castillo JM, Hossain PN, et coll. Neurotrophic keratopathy. *Progress in retinal and eye research*. 2018;66:107-31. Epub 2018/04/27.
117. Soong HK. Vinculin in focal cell-to-substrate attachments of spreading corneal epithelial cells. *Archives of ophthalmology*. 1987;105(8):1129-32. Epub 1987/08/01.
118. Matsuda M, Ubels JL, Edelhauser HF. A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985;26(6):897-900. Epub 1985/06/01.
119. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Current opinion in ophthalmology*. 2001;12(4):242-9.
120. Benayoun Y, Rosenberg R, Casse G, Dallaudiere B, Robert PY. [Imaging and quantification of corneal neovascularization]. *Journal francais d'ophtalmologie*. 2013;36(8):693-703. Epub 2013/08/24. Imagerie et quantification de la neovascularisation corneenne.
121. Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 2006;104:264-302.
122. Ellenberg D, Azar DT, Hallak JA, Tobaigy F, Han KY, Jain S, et coll. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Progress in retinal and eye research*. 2010;29(3):208-48.
123. Cursiefen C, Colin J, Dana R, Diaz-Llopis M, Faraj LA, Garcia-Delpech S, et coll. Consensus statement on indications for anti-angiogenic therapy in the management of corneal diseases associated with neovascularisation: outcome of an expert roundtable. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(1):3-9.

124. Qazi Y, Hamrah P. Corneal Allograft Rejection: Immunopathogenesis to Therapeutics. *J Clin Cell Immunol*. 2013;2013(Suppl 9). Epub 2014/03/19.
125. Panda A, Vanathi M, Kumar A, Dash Y, Priya S. Corneal graft rejection. *Surv Ophthalmol*. 2007;52(4):375-96. Epub 2007/06/19.
126. Dana MR, Qian Y, Hamrah P. Twenty-five-year panorama of corneal immunology: emerging concepts in the immunopathogenesis of microbial keratitis, peripheral ulcerative keratitis, and corneal transplant rejection. *Cornea*. 2000;19(5):625-43. Epub 2000/09/29.
127. Di Zazzo A, Kheirkhah A, Abud TB, Goyal S, Dana R. Management of high-risk corneal transplantation. *Surv Ophthalmol*. 2017;62(6):816-27. Epub 2016/12/26.
128. Yu T, Rajendran V, Griffith M, Forrester JV, Kuffová L. High-risk corneal allografts: A therapeutic challenge. *World journal of transplantation*. 2016;6(1):10-27.
129. Ti S-E, Scott JA, Janardhanan P, Tan DT. Therapeutic keratoplasty for advanced suppurative keratitis. *American journal of ophthalmology*. 2007;143(5):755-62. e2.
130. Reed JW, Joyner SJ, Knauer WJ, 3rd. Penetrating keratoplasty for herpes zoster keratopathy. *American journal of ophthalmology*. 1989;107(3):257-61. Epub 1989/03/15.
131. Kosker M, Duman F, Suri K, Hammersmith KM, Nagra PK, Rapuano CJ. Long-term results of keratoplasty in patients with herpes zoster ophthalmicus. *Cornea*. 2013;32(7):982-6. Epub 2013/03/30.
132. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Survey of ophthalmology*. 1997;41(4):275-313.
133. Raj A, Dhasmana R, Bahadur H. Factors associated with surface epithelial keratopathy after optical penetrating keratoplasty. *Journal of current ophthalmology*. 2017;29(2):108-15.
134. Roozbahani M, Hammersmith KM, Rapuano CJ, Nagra PK, Zhang Q. Therapeutic penetrating keratoplasty for acanthamoeba keratitis: a review of cases, complications and predictive factors. *Int Ophthalmol*. 2019. Epub 2019/06/20.
135. Cai SB, Sun M, Li S, Xu LJ, Wang W, Wang J, et coll. [Keratoplasty classification and primary disease spectrum analysis of 315 cases]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2017;53(6):460-3. Epub 2017/06/14.
136. Zerbe BL, Belin MW, Ciolino JB, Group BTKS. Results from the multicenter Boston type 1 keratoprosthesis study. *Ophthalmology*. 2006;113(10):1779-84. e1.
137. Harissi-Dagher M, Slim E. [Boston keratoprosthesis type 1]. *Journal francais d'ophtalmologie*. 2019;42(3):295-302. Epub 2019/03/13. La keratoprothese de Boston type 1.
138. Saeed HN, Shanbhag S, Chodosh J. The Boston keratoprosthesis. *Current opinion in ophthalmology*. 2017;28(4):390-6. Epub 2017/04/07.
139. Colby KA, Koo EB. Expanding indications for the Boston keratoprosthesis. *Current opinion in ophthalmology*. 2011;22(4):267-73.
140. Rudnisky CJ, Belin MW, Guo R, Ciolino JB, Dohlman CH, Aquavella J, et coll. Visual acuity outcomes of the Boston keratoprosthesis type 1: multicenter study results. *American journal of ophthalmology*. 2016;162:89-98. e1.
141. Aldave AJ, Sangwan VS, Basu S, Basak SK, Hovakimyan A, Gevorgyan O, et coll. International results with the Boston type I keratoprosthesis. *Ophthalmology*. 2012;119(8):1530-8.
142. Cruzat A, Tauber A, Shukla A, Paschalis EI, Pineda R, Dohlman CH. Low-cost and readily available tissue carriers for the Boston keratoprosthesis: a review of possibilities. *Journal of ophthalmology*. 2013;2013:686587-. Epub 2013/11/24.

143. Saini JS. Postoperative management of corneal graft. *Indian J Ophthalmol.* 1994;42(4):215-7. Epub 1994/12/01.
144. Ngakeng V, Price M, Price Jr F. Steroid Management of Penetrating Keratoplasty What Is Standard? *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(13):2343-.
145. Fadous R, Levallois-Gignac S, Vaillancourt L, Robert M-C, Harissi-Dagher M. The Boston Keratoprosthesis type 1 as primary penetrating corneal procedure. *British Journal of Ophthalmology.* 2015;99(12):1664-8.
146. Phillips DL, Goins KM, Greiner MA, Alward WL, Kwon YH, Wagoner MD. Boston type 1 keratoprosthesis for iridocorneal endothelial syndromes. *Cornea.* 2015;34(11):1383-6.
147. Ahmad S, Mathews PM, Srikumaran D, Aldave AJ, Lenis T, Aquavella JV, et coll. Outcomes of repeat Boston type 1 keratoprosthesis implantation. *American journal of ophthalmology.* 2016;161:181-7. e1.
148. Hager JL, Phillips DL, Goins KM, Kitzmann AS, Greiner MA, Cohen AW, et coll. Boston type 1 keratoprosthesis for failed keratoplasty. *International ophthalmology.* 2016;36(1):73-8.
149. Moffatt SL, Cartwright VA, Stumpf TH. Centennial review of corneal transplantation. *Clinical & experimental ophthalmology.* 2005;33(6):642-57.
150. Atala A, Irvine DJ, Moses M, Shaunak S. Wound healing versus regeneration: role of the tissue environment in regenerative medicine. *MRS bulletin.* 2010;35(8):597-606.
151. Jabbari E, Leijten J, Xu Q, Khademhosseini A. The matrix reloaded: the evolution of regenerative hydrogels. *Materials today.* 2016;19(4):190-6.
152. Buznyk O, Pasyechnikova N, Islam MM, Iakymenko S, Fagerholm P, Griffith M. Bioengineered Corneas Grafted as Alternatives to Human Donor Corneas in Three High-Risk Patients. *Clinical and translational science.* 2015;8(5):558-62. Epub 2015/05/23.
153. Fagerholm P, Lagali NS, Ong JA, Merrett K, Jackson WB, Polarek JW, et coll. Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold. *Biomaterials.* 2014;35(8):2420-7. Epub 2014/01/01.
154. Ljunggren MK, Elizondo RA, Edin J, Olsen D, Merrett K, Lee CJ, et coll. Effect of Surgical Technique on Corneal Implant Performance. *Translational vision science & technology.* 2014;3(2):6. Epub 2014/04/22.
155. Ehashi T, Takemura T, Hanagata N, Minowa T, Kobayashi H, Ishihara K, et coll. Comprehensive genetic analysis of early host body reactions to the bioactive and bio-inert porous scaffolds. *PloS one.* 2014;9(1):e85132.
156. Yumoto H, Hirota K, Hirao K, Miyazaki T, Yamamoto N, Miyamoto K, et coll. Anti-inflammatory and protective effects of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer on oral epithelial cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2015;103(2):555-63.
157. Hackett JM, Lagali N, Merrett K, Edelhauser H, Sun Y, Gan L, et coll. Biosynthetic corneal implants for replacement of pathologic corneal tissue: performance in a controlled rabbit alkali burn model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(2):651-7. Epub 2010/09/18.
158. Mirazul Islam M, Cepla V, He C, Edin J, Rakickas T, Kobuch K, et coll. Functional fabrication of recombinant human collagen-phosphorylcholine hydrogels for regenerative medicine applications. *Acta Biomater.* 2015;12:70-80. Epub 2014/12/03.
159. Islam MM, Buznyk O, Reddy JC, Pasyechnikova N, Alarcon EI, Hayes S, et coll. Biomaterials-enabled cornea regeneration in patients at high risk for rejection of donor tissue transplantation. *NPJ Regen Med.* 2018;3:2. Epub 2018/02/10.

160. Liu W, Deng C, McLaughlin CR, Fagerholm P, Lagali NS, Heyne B, et coll. Collagen-phosphorylcholine interpenetrating network hydrogels as corneal substitutes. *Biomaterials*. 2009;30(8):1551-9. Epub 2008/12/23.
161. Islam MM, Ravichandran R, Olsen D, Ljunggren M, Fagerholm P, Lee C-J, et coll. Self-assembled collagen-like-peptide implants as alternatives to human donor corneal transplantation. *RSC Advances*. 2016;6(61):55745-9.
162. Ravichandran R, Griffith M, Phopase J. Applications of self-assembling peptide scaffolds in regenerative medicine: the way to the clinic. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014;2(48):8466-78.
163. Mo X, An Y, Yun CS, Yu SM. Nanoparticle-Assisted Visualization of Binding Interactions between Collagen Mimetic Peptide and Collagen Fibers. *Angewandte Chemie International Edition*. 2006;45(14):2267-70.
164. Parmar PA, Chow LW, St-Pierre J-P, Horejs C-M, Peng YY, Werkmeister JA, et coll. Collagen-mimetic peptide-modifiable hydrogels for articular cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2015;54:213-25.
165. Wang AY, Leong S, Liang Y-C, Huang RCC, Chen CS, Yu SM. Immobilization of growth factors on collagen scaffolds mediated by polyanionic collagen mimetic peptides and its effect on endothelial cell morphogenesis. *Biomacromolecules*. 2008;9(10):2929-36.
166. Pérez CMR, Rank LA, Chmielewski J. Tuning the thermosensitive properties of hybrid collagen peptide–polymer hydrogels. *Chemical Communications*. 2014;50(60):8174-6.
167. Rubert Pérez CM, Panitch A, Chmielewski J. A Collagen Peptide-Based Physical Hydrogel for Cell Encapsulation. *Macromolecular bioscience*. 2011;11(10):1426-31.
168. Stahl PJ, Romano NH, Wirtz D, Yu SM. PEG-based hydrogels with collagen mimetic peptide-mediated and tunable physical cross-links. *Biomacromolecules*. 2010;11(9):2336-44.
169. O'leary LE, Fallas JA, Bakota EL, Kang MK, Hartgerink JD. Multi-hierarchical self-assembly of a collagen mimetic peptide from triple helix to nanofibre and hydrogel. *Nature chemistry*. 2011;3(10):821.
170. Yu SM, Li Y, Kim D. Collagen mimetic peptides: progress towards functional applications. *Soft Matter*. 2011;7(18):7927-38.
171. Luo T, Kiick KL. Collagen-like peptides and peptide–polymer conjugates in the design of assembled materials. *European polymer journal*. 2013;49(10):2998-3009.
172. Fagerholm P, Lagali NS, Merrett K, Jackson WB, Munger R, Liu Y, et coll. A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study. *Science translational medicine*. 2010;2(46):46ra61. Epub 2010/08/27.
173. Ong JA, Auvinet E, Forget KJ, Lagali N, Fagerholm P, Griffith M, et coll. 3D Corneal Shape After Implantation of a Biosynthetic Corneal Stromal Substitute. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(6):2355-65. Epub 2016/05/03.
174. McLaughlin CR, Fagerholm P, Muzakare L, Lagali N, Forrester JV, Kuffova L, et coll. Regeneration of corneal cells and nerves in an implanted collagen corneal substitute. *Cornea*. 2008;27(5):580-9. Epub 2008/06/04.
175. Wand K, Neuhann R, Ullmann A, Plank K, Baumann M, Ritter R, et coll. Riboflavin-UV-a crosslinking for fixation of biosynthetic corneal collagen implants. *Cornea*. 2015;34(5):544-9. Epub 2015/03/15.
176. Wollensak G, Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking. *Acta ophthalmologica*. 2009;87(1):48-51.

177. Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Current eye research*. 2004;29(1):35-40.
178. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin–ultraviolet-A-induced cross-linking. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2003;29(9):1780-5.
179. Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea*. 2004;23(5):503-7.
180. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea*. 2007;26(4):385-9.
181. Wollensak G, Spoerl E, Wilsch M, Seiler T. Endothelial cell damage after riboflavin–ultraviolet-A treatment in the rabbit. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2003;29(9):1786-90.
182. Wollensak G, Spörl E, Reber F, Pillunat L, Funk R. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. *Ophthalmic research*. 2003;35(6):324-8.
183. Brunette I, Roberts CJ, Vidal F, Harissi-Dagher M, Lachaine J, Sheardown H, et coll. Alternatives to eye bank native tissue for corneal stromal replacement. *Progress in retinal and eye research*. 2017;59:97-130. Epub 2017/04/30.
184. Liu L, Kuffova L, Griffith M, Dang Z, Muckersie E, Liu Y, et coll. Immunological responses in mice to full-thickness corneal grafts engineered from porcine collagen. *Biomaterials*. 2007;28(26):3807-14. Epub 2007/06/01.
185. Liu Y, Gan L, Carlsson DJ, Fagerholm P, Lagali N, Watsky MA, et coll. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(5):1869-75. Epub 2006/04/28.
186. Liu W, Merrett K, Griffith M, Fagerholm P, Dravida S, Heyne B, et coll. Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. *Biomaterials*. 2008;29(9):1147-58. Epub 2007/12/14.
187. Jangamreddy JR, Haagdoorens MKC, Mirazul Islam M, Lewis P, Samanta A, Fagerholm P, et coll. Short peptide analogs as alternatives to collagen in pro-regenerative corneal implants. *Acta Biomater*. 2018. Epub 2018/01/23.
188. McLaughlin CR, Acosta MC, Luna C, Liu W, Belmonte C, Griffith M, et coll. Regeneration of functional nerves within full thickness collagen-phosphorylcholine corneal substitute implants in guinea pigs. *Biomaterials*. 2010;31(10):2770-8. Epub 2010/01/01.
189. Trull FL, Rich BA. More regulation of rodents. : American Association for the Advancement of Science; 1999.
190. Lozano DC, Twa MD. Development of a rat schematic eye from in vivo biometry and the correction of lateral magnification in SD-OCT imaging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(9):6446-55.
191. Gwon A. *The Rabbit in Cataract/IOL Surgery in Animal Models in Eye Research*, Tsonis, PA, ed. : Elsevier; 2008.
192. Gwon A. *The rabbit in cataract/IOL surgery. Animal models in eye research: Elsevier; 2008. p. 184-204.*
193. Yuksel H, Turkcü FM, Ari S, Cinar Y, Cingu AK, Sahin M, et coll. Anterior segment parameters of rabbits with rotating Scheimpflug camera. *Veterinary ophthalmology*. 2015;18(3):210-3. Epub 2014/02/11.
194. Gelatt KN, Gilger BC, Kern TJ. *Veterinary ophthalmology: John Wiley & Sons; 2012.*
195. Tuft SJ, Williams KA, Coster DJ. Endothelial repair in the rat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986;27(8):1199-204. Epub 1986/08/01.

196. Gwon A. The Primate in Cataract/IOL Surgery. *Animal Models in Eye Research*: Academic Press; 2008. p. 205-8.
197. Proulx S, Brunette I. Methods being developed for preparation, delivery and transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium. *Experimental eye research*. 2012;95(1):68-75.
198. Brunette I, Rosolen SG, Carrier M, Abderrahman M, Nada O, Germain L, et coll. Comparison of the pig and feline models for full thickness corneal transplantation. *Veterinary ophthalmology*. 2011;14(6):365-77.
199. Sweatt AJ, Ford JG, Davis RM. Wound healing following anterior keratectomy and lamellar keratoplasty in the pig. *Journal of refractive surgery*. 1999;15(6):636-47.
200. Hwang H, Kim M. Endothelial damage of a donor cornea depending on the donor insertion method during Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty in porcine eyes. *Japanese journal of ophthalmology*. 2009;53(5):523-30.
201. Asano-Kato N, Toda I, Hori-Komai Y, Takano Y, Tsubota K. Epithelial ingrowth after laser in situ keratomileusis: clinical features and possible mechanisms. *American journal of ophthalmology*. 2002;134(6):801-7.
202. Sanchez I, Martin R, Ussa F, Fernandez-Bueno I. The parameters of the porcine eyeball. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2011;249(4):475-82.
203. Faber C, Scherfig E, Prause JU, Sørensen KE. Corneal thickness in pigs measured by ultrasound pachymetry in vivo. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences*. 2008;35(1):39-43.
204. Bahn CF, Meyer RF, MacCallum DK, Lillie JH, Lovett EJ, Sugar A, et coll. Penetrating keratoplasty in the cat: a clinically applicable model. *Ophthalmology*. 1982;89(6):687-99.
205. Laguna F, Leiva M, Costa D, Lacerda R, Peña Gimenez T. Corneal grafting for the treatment of feline corneal sequestrum: a retrospective study of 18 eyes (13 cats). *Veterinary ophthalmology*. 2015;18(4):291-6.
206. Townsend WM, Rankin AJ, Stiles J, Krohne SG. Heterologous penetrating keratoplasty for treatment of a corneal sequestrum in a cat. *Veterinary ophthalmology*. 2008;11(4):273-8.
207. Tripoli NK, Cohen KL, Proia AD. Cat keratoplasty wound healing and corneal astigmatism. *Journal of refractive surgery*. 1992;8(3):196-203.
208. Boulze Pankert M, Goyer B, Zaguia F, Bareille M, Perron MC, Liu X, et coll. Biocompatibility and functionality of a tissue-engineered living corneal stroma transplanted in the feline eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(10):6908-20. Epub 2014/10/04.
209. Proulx Sp, Bensaoula T, Nada O, Audet C, Uwamaliya JdA, Devaux Al, et coll. Transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium reconstructed on a devitalized carrier in the feline model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(6):2686-94.
210. Carrington SD, Woodward EG. Corneal thickness and diameter in the domestic cat. *Ophthalmic and Physiological Optics*. 1986;6(4):385-9.
211. Gilger B, Wright J, Whitley R, McLaughlin S. Corneal thickness measured by ultrasonic pachymetry in cats. *American journal of veterinary research*. 1993;54(2):228-30.
212. Moodie K, Hashizume N, Houston D, Hoopes P, Demidenko E, Trembly B, et coll. Postnatal development of corneal curvature and thickness in the cat. *Veterinary ophthalmology*. 2001;4(4):267-72.
213. Alario AF, Pirie CG. Intra and inter-user reliability of central corneal thickness measurements obtained in healthy feline eyes using a portable spectral-domain optical coherence tomography device. *Veterinary ophthalmology*. 2013;16(6):446-50.

214. Bourne WM, Nelson L, Buller CR, Huang PT, Geroski DH, Edelhauser H. Long-term observation of morphologic and functional features of cat corneal endothelium after wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35(3):891-9.
215. Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, Bucu PJ. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977;16(7):597-613.
216. Ling T, Vannas A, Holden B. Long-term changes in corneal endothelial morphology following wounding in the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29(9):1407-12.
217. Reichard M, Hovakimyan M, Wree A, Meyer-Lindenberg A, Nolte I, Junghans C, et coll. Comparative in vivo confocal microscopical study of the cornea anatomy of different laboratory animals. *Current eye research.* 2010;35(12):1072-80.
218. Mirzajan A, Khezri F, Jafarzadehpur E, Karimian F, Khabazkhoob M. Normal corneal sensitivity and its changes with age in Tehran, Iran. *Clinical and Experimental Optometry.* 2015;98(1):54-7.
219. Pircher N, Pachala M, Prager F, Pieh S, Schmidinger G. Changes in straylight and densitometry values after corneal collagen crosslinking. *Journal of cataract and refractive surgery.* 2015.
220. van Dijk K, Droutsas K, Hou J, Sangsari S, Liarakos VS, Melles GR. Optical quality of the cornea after Descemet membrane endothelial keratoplasty. *American journal of ophthalmology.* 2014;158(1):71-9 e1.
221. Elflein HM, Hofherr T, Berisha-Ramadani F, Weyer V, Lampe C, Beck M, et coll. Measuring corneal clouding in patients suffering from mucopolysaccharidosis with the Pentacam densitometry programme. *Br J Ophthalmol.* 2013;97(7):829-33.
222. 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(12):2105-14.
223. Smith GT, Brown NA, Shun-Shin GA. Light scatter from the central human cornea. *Eye.* 1990;4 (Pt 4):584-8.
224. Wegener A, Laser-Junga H. Photography of the anterior eye segment according to Scheimpflug's principle: options and limitations - a review. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2009;37(1):144-54.
225. Takacs AI, Mihaltz K, Nagy ZZ. Corneal density with the Pentacam after photorefractive keratectomy. *Journal of refractive surgery.* 2011;27(4):269-77.
226. Matsuda J, Hieda O, Kinoshita S. [Quantification of corneal opacity after refractive corneal surgery using the anterior segment analyzer]. *Nippon Ganka Gakkai zasshi.* 2007;111(6):447-53.
227. Ivarsen A, Hjortdal J. Recipient corneal thickness and visual outcome after Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty. *Br J Ophthalmol.* 2014;98(1):30-4.
228. Koh S, Maeda N, Nakagawa T, Nishida K. Quality of vision in eyes after selective lamellar keratoplasty. *Cornea.* 2012;31 Suppl 1:S45-9.
229. Fercher AF, Mengedoht K, Werner W. Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light. *Opt Lett.* 1988;13(3):186-8. Epub 1988/03/01.
230. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et coll. Optical coherence tomography. *Science (New York, NY).* 1991;254(5035):1178-81. Epub 1991/11/22.
231. Hurmeric V, Yoo SH, Mutlu FMJERoO. Optical coherence tomography in cornea and refractive surgery. 2012;7(3):241-50.

232. Anijeet DR, Zheng Y, Tey A, Hodson M, Sueke H, Kaye SB. Imaging and evaluation of corneal vascularization using fluorescein and indocyanine green angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(2):650-8. Epub 2011/12/30.
233. Brunner M, Romano V, Steger B, Vinciguerra R, Lawman S, Williams B, et coll. Imaging of Corneal Neovascularization: Optical Coherence Tomography Angiography and Fluorescence Angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59(3):1263-9.
234. Jalbert I, Stapleton F, Papas E, Sweeney DF, Coroneo M. In vivo confocal microscopy of the human cornea. *The British Journal of Ophthalmology.* 2003;87(2):225-36.
235. Messmer EM. Confocal microscopy: when is it helpful to diagnose corneal and conjunctival disease? *Expert Review of Ophthalmology.* 2008;3(2):177-92.
236. Stiles J, McDermott M, Bigsby D, Willis M, Martin C, Roberts W, et coll. Use of nested polymerase chain reaction to identify feline herpesvirus in ocular tissue from clinically normal cats and cats with corneal sequestra or conjunctivitis. *American journal of veterinary research.* 1997;58(4):338-42.
237. Altmann S, Emanuel A, Toomey M, McIntyre K, Covert J, Dubielzig RR, et coll. A quantitative rabbit model of vaccinia keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(9):4531-40.
238. Group SoUNW. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *American journal of ophthalmology.* 2005;140(3):509-16.
239. Chan-Ling T. Sensitivity and neural organization of the cat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30(6):1075-82.
240. Basu PK. A review of methods for storage of corneas for keratoplasty. *Indian journal of ophthalmology.* 1995;43(2):55.
241. Roberts JE. Ocular phototoxicity. *J Photochem Photobiol B.* 2001;64(2-3):136-43. Epub 2001/12/18.
242. Zhang X, Tao X-C, Zhang J, Li Z-W, Xu Y-Y, Wang Y-M, et coll. A review of collagen cross-linking in cornea and sclera. *Journal of ophthalmology.* 2015;2015:289467-. Epub 2015/04/02.
243. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008;29(20):2941-53. Epub 2008/04/29.
244. Rafat M, Li F, Fagerholm P, Lagali NS, Watsky MA, Munger R, et coll. PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. *Biomaterials.* 2008;29(29):3960-72. Epub 2008/07/22.
245. McLaughlin CR, Acosta MC, Luna C, Liu W, Belmonte C, Griffith M, et coll. Regeneration of functional nerves within full thickness collagen-phosphorylcholine corneal substitute implants in guinea pigs. *Biomaterials.* 2010;31(10):2770-8.
246. Short BG. Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations. *Toxicologic pathology.* 2008;36(1):49-62.
247. Randleman JB, Stulting RD. Prevention and treatment of corneal graft rejection: current practice patterns (2004). *Cornea.* 2006;25(3):286-90. Epub 2006/04/25.
248. Paque J, Poirier RH. Corneal allograft reaction and its relationship to suture site neovascularization. *Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging Retina.* 1977;8(4):71-4.
249. Pasychnikova N, Vit V, Leus M, Iakymenko S, Buznyk O, Kolomiichuk S, et coll. Collagen-based bioengineered substitutes of donor corneal allograft implantation: assessment and hypotheses. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol.* 2012;1(1):10-3. Epub 2012/04/01.

250. Romano V, Cruciani M, Conti L, Fontana L. Fibrin glue versus sutures for conjunctival autografting in primary pterygium surgery. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;12(12):CD011308-CD.
251. Kheirkhah A, Casas V, Raju VK, Tseng SC. Sutureless amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *American journal of ophthalmology.* 2008;145(5):787-94.
252. Pfister RR, Sommers CI. Fibrin sealant in corneal stem cell transplantation. *Cornea.* 2005;24(5):593-8.
253. Brittain GP, Rostron CK, Morton DB, Rees JE. The use of a biological adhesive to achieve sutureless epikeratophakia. *Eye.* 1989;3 (Pt 1):56-63. Epub 1989/01/01.
254. Uhlig CE, Gerding H. Fibrin sealing improves stability of corneal prostheses during vitreoretinal procedures. *Retina.* 2003;23(2):209-14. Epub 2003/04/23.
255. Panda A, Kumar S. Can we overcome the challenges of sutures in lamellar keratoplasty? *Indian journal of ophthalmology.* 2011;59(4):308-10.
256. Duarte MC, Kim T. Sutureless lamellar keratoplasty: a modified approach for fibrin glue application. *Cornea.* 2007;26(9):1127-8. Epub 2007/09/26.
257. Bahar I, Kaiserman I, Slomovic A, McAllum P, Rootman D. Fibrin glue for opposing wound edges in "Top Hat" penetrating keratoplasty: a laboratory study. *Cornea.* 2007;26(10):1235-8. Epub 2007/11/29.
258. Narendran N, Mohamed S, Shah S. No sutures corneal grafting--a novel use of overlay sutures and fibrin glue in Deep Anterior Lamellar Keratoplasty. *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association.* 2007;30(3):207-9. Epub 2007/03/24.
259. Rosenthal AR, Harbury C, Egbert PR, Rubenstein E. Use of a platelet-fibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: experiments with sutureless lamellar keratoplasty in the rabbit. *Invest Ophthalmol.* 1975;14(11):872-5. Epub 1975/11/01.
260. Kaufman HE, Insler MS, Ibrahim-Elzembely HA, Kaufman SC. Human fibrin tissue adhesive for sutureless lamellar keratoplasty and scleral patch adhesion: a pilot study. *Ophthalmology.* 2003;110(11):2168-72. Epub 2003/11/05.
261. Rafat M, Xeroudaki M, Koulikovska M, Sherrell P, Groth F, Fagerholm P, et coll. Composite core-and-skirt collagen hydrogels with differential degradation for corneal therapeutic applications. *Biomaterials.* 2016;83:142-55.
262. Syed-Picard FN, Du Y, Hertszenberg AJ, Palchesko R, Funderburgh ML, Feinberg AW, et coll. Scaffold-free tissue engineering of functional corneal stromal tissue. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine.* 2018;12(1):59-69.
263. Bouhanna L, Liscoet LB, Raymond-Letron I. Corneal stromal sequestration in a dog. *Veterinary ophthalmology.* 2008;11(4):211-4. Epub 2008/07/22.
264. Hakanson N, Dubielzig R. Chronic superficial corneal erosions with anterior stromal sequestration in three horses. *Ophthalmic Literature.* 1995;1(48):60.
265. McLellan GL, Archer FJ. Corneal stromal sequestration and keratoconjunctivitis sicca in a horse. *Veterinary ophthalmology.* 2000;3(2-3):207-12. Epub 2001/06/09.
266. Featherstone HJ, Franklin VJ, Sansom J. Feline corneal sequestrum: laboratory analysis of ocular samples from 12 cats. *Veterinary ophthalmology.* 2004;7(4):229-38. Epub 2004/06/18.
267. Pena Gimenez MT, Farina IM. Lamellar keratoplasty for the treatment of feline corneal sequestrum. *Veterinary ophthalmology.* 1998;1(2-3):163-1. Epub 2001/06/09.

268. Laguna F, Leiva M, Costa D, Lacerda R, Pena Gimenez T. Corneal grafting for the treatment of feline corneal sequestrum: a retrospective study of 18 eyes (13 cats). *Veterinary ophthalmology*. 2015;18(4):291-6. Epub 2014/10/24.
269. Nasisse MP. Feline herpesvirus ocular disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 1990;20(3):667-80.
270. Nasisse M, Glover T, Moore C, Weigler B. Detection of feline herpesvirus 1 DNA in corneas of cats with eosinophilic keratitis or corneal sequestration. *American journal of veterinary research*. 1998;59(7):856-8.
271. Featherstone HJ, Sansom J. Feline corneal sequestra: a review of 64 cases (80 eyes) from 1993 to 2000. *Veterinary ophthalmology*. 2004;7(4):213-27. Epub 2004/06/18.
272. Graham KL, White JD, Billson FM. Feline corneal sequestra: outcome of corneconjunctival transposition in 97 cats (109 eyes). *J Feline Med Surg*. 2017;19(6):710-6. Epub 2016/04/24.
273. Fry K, Shah D, Hersh P. Corneal Swelling Characteristics With Hypotonic Riboflavin During Corneal Collagen Crosslinking. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(13):5489-.
274. Tuli SS, Schultz GS, Downer DM. Science and strategy for preventing and managing corneal ulceration. *The ocular surface*. 2007;5(1):23-39. Epub 2007/01/26.
275. Tayapad JB, Viguilla AQ, Reyes JM. Collagen cross-linking and corneal infections. *Current opinion in ophthalmology*. 2013;24(4):288-90. Epub 2013/05/25.
276. Jin B, Zhu X. The pathogenesis and prevention of corneal graft melting after keratoplasty. *J Clin Ophthalmol*. 2017;1(1):10.
277. Titiyal JS, Kaur M, Shaikh F, Gagrani M, Brar AS, Rathi A. Small incision lenticule extraction (SMILE) techniques: patient selection and perspectives. *Clin Ophthalmol*. 2018;12:1685-99. Epub 2018/09/21.
278. Sheraz MA, Kazi SH, Ahmed S, Anwar Z, Ahmad I. Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein J Org Chem*. 2014;10:1999-2012.
279. Dias J, Ziebarth NM. Impact of Hydration Media on Ex Vivo Corneal Elasticity Measurements. *Eye Contact Lens*. 2015;41(5):281-6. Epub 2015/01/21.
280. Lie JT, Monnereau C, Groeneveld-van Beek EA, van der Wees J, Frank J, Bruinsma M, et coll. Dehydration of corneal anterior donor tissue with polyethylene glycol (PEG)-enriched media. *Cell Tissue Bank*. 2015;16(3):399-409. Epub 2014/11/30.
281. Lindstrom RL, Kaufman HE, Skelnik DL, Laing RA, Lass JH, Musch DC, et coll. Optisol corneal storage medium. *American journal of ophthalmology*. 1992;114(3):345-56.
282. Dunne MC, Davies LN, Wolffsohn J. Accuracy of cornea and lens biometry using anterior segment optical coherence tomography. *Journal of biomedical optics*. 2007;12(6):064023.
283. Ramasubramanian V, Glasser A. Distortion Correction of Visante Optical Coherence Tomography Cornea Images. *Optom Vis Sci*. 2015;92(12):1170-81. Epub 2015/11/06.
284. Zhang Y, Wang KC, Chang CK, Lin JT. Analysis of the effective dose of ultraviolet light in corneal cross-linking. *Int J Ophthalmol*. 2016;9(8):1089-93. Epub 2016/09/03.
285. Douth JJ, Quantock AJ, Joyce NC, Meek KM. Ultraviolet light transmission through the human corneal stroma is reduced in the periphery. *Biophysical journal*. 2012;102(6):1258-64. Epub 2012/03/20.
286. Bunsen RW, Roscoe HE. III. Photochemical researches.—Part V. On the measurement of the chemical action of direct and diffuse sunlight. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1863(12):306-12.
287. Sachdev GS, Sachdev M. Recent advances in corneal collagen cross-linking. *Indian journal of ophthalmology*. 2017;65(9):787-96.

288. 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(2):1176-80. Epub 2013/01/10.
289. Van Wachem P, Plantinga J, Wissink M, Beernink R, Poot A, Engbers G, et coll. In vivo biocompatibility of carbodiimide-crosslinked collagen matrices: Effects of crosslink density, heparin immobilization, and bFGF loading. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* 2001;55(3):368-78.
290. Petite H, Rault I, Huc A, Menasche P, Herbage D. Use of the acyl azide method for cross-linking collagen-rich tissues such as pericardium. *Journal of biomedical materials research.* 1990;24(2):179-87.
291. Zeeman R, Dijkstra PJ, van Wachem PB, van Luyn MJ, Hendriks M, Cahalan PT, et coll. Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. *Biomaterials.* 1999;20(10):921-31.
292. Grabarek Z, Gergely J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Analytical biochemistry.* 1990;185(1):131-5.
293. Khor E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. *Biomaterials.* 1997;18(2):95-105.
294. Wong SS. *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*: CRC press; 1991.
295. Ahn JI, Kuffova L, Merrett K, Mitra D, Forrester JV, Li F, et coll. Crosslinked collagen hydrogels as corneal implants: effects of sterically bulky vs. non-bulky carbodiimides as crosslinkers. *Acta Biomater.* 2013;9(8):7796-805. Epub 2013/04/27.
296. Gratzner PF, Lee JM. Control of pH alters the type of cross-linking produced by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) treatment of acellular matrix vascular grafts. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* 2001;58(2):172-9.
297. Silva E, Edwards AM. *Flavins: photochemistry and photobiology*: Royal Society of Chemistry; 2006.
298. Kamaev P, Friedman MD, Sherr E, Muller D. Photochemical kinetics of corneal cross-linking with riboflavin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(4):2360-7.
299. 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-.
300. Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Experimental eye research.* 1998;66(1):97-103. Epub 1998/06/17.
301. D'Este M, Eglin D, Alini M. A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to hyaluronan in water. *Carbohydr Polym.* 2014;108:239-46. Epub 2014/04/23.
302. Haagdorens M, Cepla V, Melsbach E, Koivusalo L, Skottman H, Griffith M, et coll. In Vitro Cultivation of Limbal Epithelial Stem Cells on Surface-Modified Crosslinked Collagen Scaffolds. *Stem Cells Int.* 2019;2019:7867613. Epub 2019/05/09.

Annexe 1 : Kardex des coupes *in vivo* manuelles

Kardex – Chirurgie GLPX

Matériel chirurgical

- Lampe de surplus dans le microscope de chirurgie.
- Appareils fonctionnels en salle de chirurgie

Instrumentes & paquets stérilisés :

- 1 Boîte d'instruments GREFFE
- 1 Boîte BADIGEON & POIGNÉES MICROSCOPE
- 1 Boîte COUTEAU A DIAMANT
- 1 petite boîte avec des Crescents émoussés (servira de spatule)
- 2x blocs de téflon troués stérilisés individuellement (double emballage)
- Étiquettes stériles
- 1 paquet de 6 poupones 3 paquets de compresses 4x4
- Ciseau stérile pour couper le Tegaderm
- 4 Petits pots en stainless stériles emballés séparément

Lingerie, gants et habillement :

- 1 Paquet de lingerie pour greffe de cornée

Boîtes de fournitures :

- 1 boîte « Injection peropératoire »
- 1 boîte « Fourniture pour la chirurgie » → Cf. II.

Solutés :

- 1 BSS 500ml Proviodyne 0.5%
- 1 NaCl 500ml 1 bouteille eau stérile (sous l'évier)

Gouttes ophtalmiques

- 1 Minims Tétracaine 0.5% 1 Minims Atropine 1%
- 1 Minims Tropicamide 1% Gouttes artificielles (nouveau contenant)
- Teargel (pour l'œil fermé)

Fourniture pour la chirurgie

- 1 Acupunch (Punch cutané) (taille à confirmer)
- 1 Crescent (neuf)
- 1 couteau 20G
- 1 lame couteau 30 (Micro sharp blade 377530)
- 1 lame couteau 57 (Beaver 375700)
- 1 Lame de scalpel 15 et une mini-15 (Beaver 376700)
- 3 aiguilles 18
- 2 canules 27G 2 canules 19G
- 1 seringue 60 ml 1 seringue 20 ml
- 4 seringues 10 ml 1 seringue 5 ml
- 3 seringues 3 ml 4 seringues 1 ml
- 2 crayons marqueurs stériles : un fin et un régulier
- 2 tegaderms (œil contrôle)
- 10 Swab d'alcool
- 3 Meroce
- 10 paquets d'éponges sapin
- Q tips
- 1 suture : faire choisir par chirurgien avant d'ouvrir → nylon 10-0 CU1 30cm / Alcon (sclère) ; soie 4-0 C-3 (maintenir les paupières en place; en prn) ; Pour une canthotomie

Matériel anesthésique

Médicaments

- Saline 0.9% sac de 500ml
- Buprénorphine : ≥3 doses
- Kétamine
- Xylocaïne en spray (pour l'intubation)
- Lubrifiant (pour le tube endotrachéal et le thermomètre anal)
- Gel à échographie (pour le Doppler)
- Alcool et/ou Chlorex
- Glycopyrrolate
- Curare : Bromure de rocuronium (frigo)
- Isoflurane

Accessoires

- Extension avec 1 ou 2 points d'injection
- Aiguilles 26G
- PRN (capuchon pour le cathéter)
- Tube endotrachéal (avoir un tube de grandeur 3.0 à 5.5mm)
- Diachylon (4 languettes de tape)
- Tegaderm (pour la pose du cathéter)
- Compresses 4x4
- Oreiller à bille avec pompe
- Couverture d'aluminium
- Pad avec des feuilles
- Seringues 1, 3 et 5 ml
- Cathéter IV 22G
- Kling
- Pince homéostatique
- Crayon
- Feuilles rose carbone

Instruments

- Rasoir
- Balayeuse portative (pour ramasser les poils après le rasage)
- Tapis chauffant
- Appareil d'anesthésie avec circuit Bain, masque et ballonnet non troué.
- Respirateur
- Sphygmomanomètre
- Batteries de rechange
- Laryngoscope
- Doppler avec sonde
- Vet-Ox avec sonde
- Stéthoscope
- Coupe-griffe

Autre matériel

A l'entrée de salle de chirurgie

- Savon
- Masques
- Jaquettes jaunes
- Charlotte / Chapeau
- Gants non stériles

Matériel complémentaire (optionnel / à confirmer pour chirurgie)

Pour la brûlure chimique

- Papier buvard grand 10x6mm 10x4mm pour éponger
- Tubulure pour irrigation durant la lumière
- Filtre blanc
- Tubulure soluté pour irrigation
- Chronomètre

Pour le reste du donneur (à confirmer)

- 1 Eppendorf avec formol 10%
- 1 Eppendorf avec glutaraldéhyde 2.5% (prn; Protocole Fuchs)
- 1 lame de rasoir stérile (prn)

Annexe 2 : Préparation des médicaments injectables

Préparation des médicaments injectables

Les trois produits suivants seront injectés à la fin de chaque chirurgie.
Il est important de préparer la solution de CEFAZOLIN **avant** le début de la chirurgie.

Les trois bouteilles doivent être prêtes pour que la personne en stérile prélève les quantités requises comme indiqué. Ainsi, la personne en externe devra tenir la bouteille et confirmer les volumes à prélever de chaque bouteille. Des étiquettes stériles seront mises sur les seringues par la personne stérile afin de les différencier.

1- CÉFAZOLIN

Injection juxtabulbaire de **50 mg/0,25 ml**

Stabilité après ouverture: 96 heures au frigidaire; 24 heures à température de la pièce

Préparation : 1- Présentation: 1 fiole contient 1g de céfazolin
2- **Diluer avec 4,5 ml d'eau stérile** (et non du BSS)
3- Laisser dans la fiole originale
4- **Prendre 0,25 ml de solution**
5- Écrire la date et l'heure d'ouverture sur la fiole.

2- TOBRAMYCINE

Injection juxtabulbaire de **10 mg/0,25 ml**

Stabilité : 28 jours une fois piqué, sinon se référer à la date de péremption de la compagnie

Préparation : 1- Présentation: 1 fiole contient 40mg dans 1ml
2- Ne rien diluer
3- Laisser dans la fiole originale
4- **Prendre 0,25 ml de solution**
5- Écrire la date d'ouverture sur la fiole.

3- DEXAMETHASONE

Injection juxtabulbaire de **1,2mg / 0,3 ml**

Stabilité : 28 jours une fois piqué, sinon se référer à la date de péremption de la compagnie

Préparation : 1- Présentation: 1 fiole contient 20mg (fiole de 5ml; concentration: 0,4mg/0,1ml)
2- Ne rien diluer
3- Laisser dans la fiole originale
4- **Prendre 0,30 ml de solution**
5- Écrire la date d'ouverture sur la fiole.

Une fois les prélèvements effectués, la personne en externe écrit sur la bouteille le jour d'ouverture du produit, les place dans un sac ziploc au réfrigérateur à 4°C.

***** Les produits suivants seront préparés seulement lorsque demandé par IB *****

BETAJECT/CELESTONE SOLUPAN (betamethasone sodium phosphate & betamethasone acetate)

Injection juxtabulbaire de **3 mg/0,5ml**

Stabilité : 28 jours une fois piqué, sinon se référer à la date de péremption de la compagnie

- Préparation :
- 1- Présentation: 1 fiole contient 6 mg dans 1 ml
 - 2- Ne rien diluer
 - 3- Laisser dans la fiole originale
 - 4- Prendre 0,5 ml de solution
 - 5- Écrire la date d'ouverture sur la fiole.

KENALOG (triamcinolone)

Injection juxtabulbaire de **20mg/0,5ml**

Stabilité : 28 jours une fois piqué, sinon se référer à la date de péremption de la compagnie

- Préparation :
- 1- Présentation: 1 fiole contient 40 mg dans 1 ml
 - 2- Ne rien diluer
 - 3- Laisser dans la fiole originale
 - 4- Prendre 0,5 ml de solution
 - 5- Écrire la date d'ouverture sur la fiole.

ALTEPLASE (Cathflo)

Injection intra-camérale de **150 µm/0,3 ml**

Stabilité une fois ouvert : 8 heures à la température de la pièce ou 24 heures au frigidaire
6 mois au congélateur -80°C; 14 jours à -24°C

Préparation :

- 1- Présentation: 1 fiole contient 2 mg.
- 2- Préparer sous hotte en conditions stériles.
- 3- Diluer *sans agiter* 1 fiole de 2 mg avec 2.2 ml d'eau stérile + 2 ml de BSS (donne 4 ml d'une préparation à 50 µg/0,1ml).
- 4- Préparer des doses de 0,30 ml jusqu'à vider la fiole (environ 13,3 doses).
Laisser un peu d'air pour l'expansion lors de la congélation.
Utiliser des seringues de tuberculine. Laisser l'aiguille et le capuchon.
Placer dans un double emballage stérile. .
Plier le premier sac et l'introduire en sens inverse dans le deuxième sac.
Plier le deuxième sac et taper.
- 5- Laisser au congélateur -80°C dans un contenant protégé dûment identifié.
- 6- Ne pas agiter la boîte.
- 7- Sortir du congélateur 15 minutes avant l'injection.
- 8- Réchauffer doucement à température du corps.
- 9- Injecter la solution totale de 0,30 ml.

*Concentration non toxique pour l'endothélium cornéen:

= 100 µg / ml d'humeur aqueuse = 70 µg / 0.7ml (CA E2 ~ 0.7 ml humeur aqueuse)

Boîte : INJECTIONS SOUS-CONJONCTIVALES PEROPÉRATOIRES

Cette boîte doit contenir en tout temps (produits non expirés) :

- 2x Cefazolin, non ouverts
- 1x Tobramycin, non ouvert
- 1x Dexaméthasone, non ouvert
- 2x Fioles d'eau stérile, non ouvertes
- 2x Seringues 5cc (pour dilution)
- 2x Aiguilles 20G (pour dilution)
- 5x Tampons d'alcool
- 1x Crayon marqueur indélébile pour marquer la date d'ouverture des fioles
- 1x Sac Z-Ploc pour mettre au frigo les bouteilles une fois ouvertes
- Une copie de ce document

Annexe 3 : Compte-rendu opératoire *in vivo*

PROTOCOLE IMPLANT CORNÉEN

Date : _____ **GLPX:** _____ **OD:** ___ **OS:** ___
Intervention: début (ouverture) _____:_____ fin (retrait du spéculum) _____:_____ durée: _____
Anesthésie: début (intubation) _____:_____ fin (extubation) _____:_____ durée: _____
Commentaires concernant l'anesthésie :

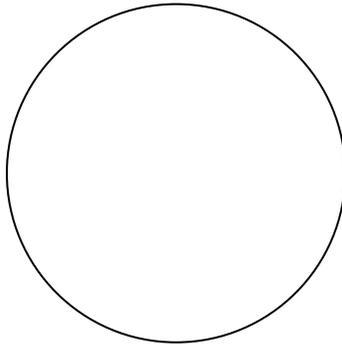
Équipe chirurgicale: _____
Équipe de l'animalerie: _____
Équipe des implants: _____
 Chronométrage salle d'op: _____
 Chronométrage préparation de l'implant: _____
 Ouverture du matériel stérile : _____
 Prise de notes : _____
 Soluté en externe: _____
 Microscope et photos/vidéos per-op : _____
 Microscope et photos/vidéos post-op : _____

Protocole opératoire :

Badigeon Bétadine 0.5% & quelques gouttes dans les culs-de-sac Fait par: _____
 Œil gauche fermé avec Lacrilube & ruban adhésif long et bien collé Fait par: _____
 Mise en place des champs et de l'écarteur à paupières.
 Injections sous conjonctivales :
 ___ Tobramycine (10 mg / 0.25 ml) Préparé par: _____ Injecté ss.conj. par: _____
 ___ Cefazolin (55 mg / 0.25 ml) Préparé par: _____ Injecté ss.conj. par: _____
 ___ Dexaméthasone (1.2 mg / 0.3 ml) Préparé par: _____ Injecté ss.conj. par: _____

Nombre de greffons :	NASAL SUPÉRIEUR	TEMPORAL INFÉRIEUR
Type de greffon <ul style="list-style-type: none"> • Natif Allo - Auto - Xéno • Reconstitué par génie tissulaire • Biomatérial Rigide - Visqueux • Transfixiant - Lamellaire • Antérieur - Stromal - Postérieur 		
Diamètre donneur (mm)		
Diamètre lit receveur (mm)		
Épaisseur donneur (µm)		
Profondeur d'implantation (µm)		
Localisation		
Distance limbe clair (mm)		

Vue externe (de face) :



___ **Technique d'implantation par greffe lamellaire antérieure (implant/greffon rigide)**

- Marquage de la zone d'implantation
- Découpe du donneur: punch: _____
- Trépanation du lit receveur
 - o Trépan: _____; diamètre: _____ mm; profondeur: _____ μ m
 - o Insertion de l'implant/greffon
 - o _____ N10.0 _____ points séparés _____ surjet continu & noeuds enfouis.

___ **Technique d'implantation intrastromale (implant/greffon rigide)**

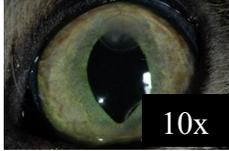
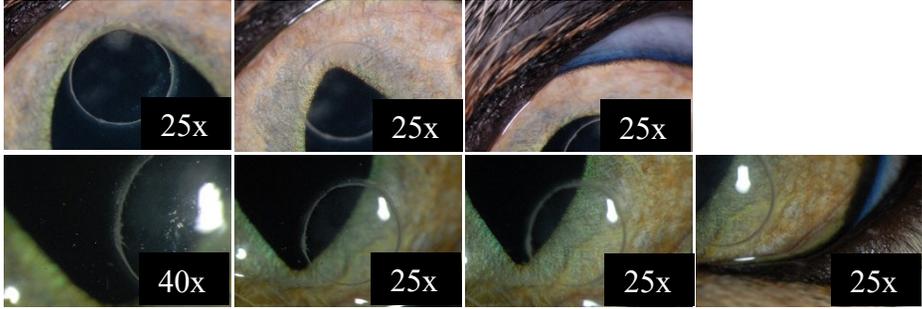
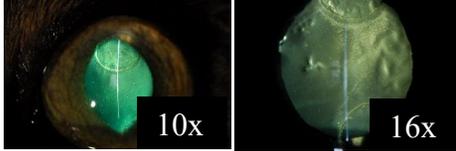
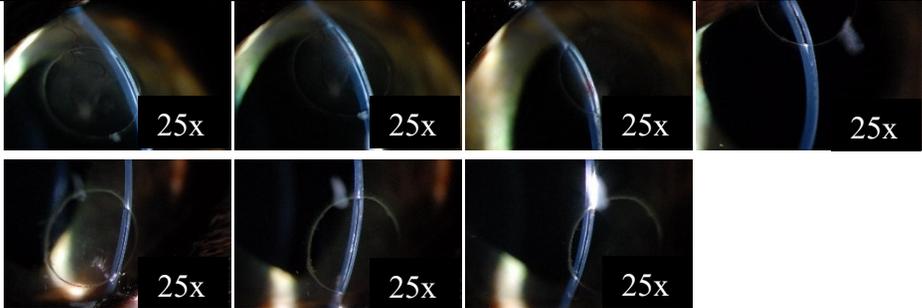
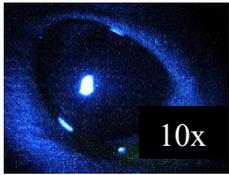
- Marquage de la zone d'implantation
- Découpe du donneur: punch: _____
- Dissection intralamellaire:
 - o Incision limbique au couteau à diamant: profondeur: _____ μ m; longueur: _____ mm
 - o Dissection au couteau croissant jusqu'à 1 mm au pourtour de la zone à implanter
 - o Insertion de l'implant/greffon
 - o Fermeture de la plaie limbique N10.0: _____ points séparés & noeuds enfouis.

Fin de l'opération :

___ Vigamox gouttes et Maxidex gouttes PAS d'onguent: ___

___ Collier élisabéthain

Annexe 4 : Protocole d'examen à la lampe à fente

Objectif	Nb photos RÉUSSIES	Gross.	Diaphragme	Flash	Lumière	Exemples types	
<ul style="list-style-type: none"> ● Vue globale: En face, diffuseur à 30° avec fente ouverture maximale, <u>myosis réactif</u> <ul style="list-style-type: none"> - Focus sur l'iris 	2	10x	5	16/16	Diffuseur, Filtre #1	 <div style="border: 2px solid red; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p>Précisions : L'appareil réflex est déjà paramétré et ne doit pas être modifié : Mode : Automatique Temps d'exposition : 1/80 ISO : 500 Balance des blancs : Automatique. La lampe est toujours placée en temporal de l'œil.</p> </div>	
<ul style="list-style-type: none"> ● Implants: Vue de face, diffuseur à 30°, fente maximale; myosis réactif (→ transparence) <ul style="list-style-type: none"> ○ Implant supérieur: <ul style="list-style-type: none"> - Focus sur l'implant - Focus sur l'iris (détails iris) - Périphérie de l'implant & limbe (néovaisseaux; plaie; sutures; infiltrats) - Infiltrats sur l'implant ○ Implant inférieur : <ul style="list-style-type: none"> - Focus sur l'implant - Focus sur l'iris - Périphérie & limbe - Infiltrats sur l'implant 	2 2 2 2 2 2 2 2	25x 25x 25x 40x 25x 25x 40x	5	16/16	Diffuseur, Filtre #1		
<ul style="list-style-type: none"> ● Rétro-illumination (M0, M1, M6): Vue de face pupille dilatée avec beau reflet, fente fine 8 mm. <ul style="list-style-type: none"> - Focus sur les implants (localisation & transparence) - PRN : Infiltrats centraux 	2 2	10x 16x	4	1/16	Filtre #1		
<ul style="list-style-type: none"> ● Fente fine: fente de 8mm à 45° et perpendiculaire au centre de l'implant <ul style="list-style-type: none"> ○ Implant supérieur : <ul style="list-style-type: none"> - zone temporale - zone centrale - zone nasale - PRN : Infiltrats sur l'implant ○ Cornée centrale ○ Implant inférieur: <ul style="list-style-type: none"> - zone temporale - zone centrale - zone nasale - PRN : Infiltrats sur l'implant 	2 2 2 2 2 2 2 2	25x	2	1/16	Filtre #1		
<ul style="list-style-type: none"> ● Fluorescéine: En face, fente maximale à 30°, ouverture maximale. <i>*** En dernier uniquement si nécessaire (problème de réépithélialisation). Très peu de fluorescéine, utiliser le papier fluo, car colore l'implant longtemps. Ne plus répéter une fois réépithélialisé. Ne jamais faire le jour de l'énucléation.</i> 	2	10x 16x prn détail	4	B	Filtre bleu	 <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"> <p>≥ 32 photos ; soit ~ 250 MO *** Dans tous les cas, documenter toute anomalie ou signe suspect.</p> </div>	

Annexe 5 : Feuillet clinique pour 1 implant

GLPX: Examen par : Date: Heure: Postop #:

CORNÉE	Œil opéré <input type="checkbox"/> OD <input type="checkbox"/> OS
Pachymétrie Centre: (SP3000; µm)	OD : OS :
<ul style="list-style-type: none"> • Plaie (0-3) • Sutures (0-2) • Sécrétions oculaires (0-2) 	0 - 1 - 2 - 3 0 - 1 - 2 0 - 1 - 2
Épithélium : <ul style="list-style-type: none"> • Malade, blanchâtre, irrégulier; œdème microkystique • Déficit (% cornée désépithélialisée) 	
Biointégration de l'implant : <ul style="list-style-type: none"> • Résorption; Amincissement; Épaississement • Dellen; Plis stroma; K striée • Ulcération; Nécrose; Extrusion 	
Transparence de l'implant (détails iris 0-4)	0 - 1 - 2 - 3 - 4
Description implant : œdème; type d'infiltrat; fibrose; couleur; homogénéité. Régularité	
Epithelium +/- Stroma antérieur	
Stroma postérieur – Endothelium	
Interface implant- antérieur	
Interface implant- stroma postérieur	
En périphérie de l'implant	
Cornée : œdème; type d'infiltrat; fibrose; couleur; homogénéité. Régularité	
Transparence pleine épaisseur (détails iris 0-4)	0 - 1 - 2 - 3 - 4
Vaisseaux nb quadrants (S-N-I-T) / nb total hres / mm max / mm moy; Superficiels (S); Profonds (P); Débit	S: / / / P: / / /
Endothélium & Descemet <ul style="list-style-type: none"> • Plis (Oui/Non) • KPs (Oui/Non) et si oui: Mutton-fat; Fins; Pigmentés (0-2); Limités à la greffe 	
CHAMBRE ANTÉRIEURE	
<ul style="list-style-type: none"> • Cellules (0-4) • Tyndall (0-4) • Fibrine (non/oui; voir échelle) • Hypopion (non/oui; si oui mm) 	0 - 1 - 2 - 3 - 4 0 - 1 - 2 - 3 - 4 <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui mm

LEXIQUE DES CLASSIFICATIONS

Pachymétrie

Prendre la mesure centrale du greffon si opéré, sinon, de la cornée. Si la machine indique "out of range", l'inscrire. S'il est impossible de prendre la mesure pour une autre raison, inscrire imprenable et la raison. Si la mesure n'a pas été effectuée, inscrire non fait.

Échelle de description de la plaie

0: déhiscence de plaie
1: absence de cicatrices
2: cicatrices légères
3: cicatrices sévères

Échelle de description des sutures

0: bien en place
1: lâches (au moins un point lâche)
2: cassées (au moins un point cassé)

Sécrétions oculaires

0: absentes
1: discrètes
2: modérées

Extrusion de l'implant

0: non
1: oui

Meilleure transparence (zone greffée)

4/4: Cornée claire, détails iriens visibles
3/4: Opacité légère, détails iriens visibles
2/4: Opacité modérée, détails iriens moins visibles, contour iridien visible
1/4: Opacité plus sévère, détails iriens non visibles, mais contour iridien visible
0/4: Cornée blanche, aucun détail irien, contour iridien non visible

Vascularisation cornéenne superficielle ou profonde

0: absence
1: ≤1 quadrant (c.-à-d. vascularisation dans un seul quadrant. Un quadrant = 90 degrés; S-N-I-T)
2: ≤2 quadrants
3: ≤3 quadrants
4: ≤4 quadrants

S'il y a lieu, inscrire le débit (vitesse de perfusion)

0: fantôme (non perfusé)
1: actif à bas débit (on peut voir les globules rouges passer)
2: actif à haut débit (vaisseau gonflé et rouge)

Échelle de gradation de la fibrose endothéliale

0: absente
1: légère
2: sévère

Description de la fibrine dans la CA

Forme: fil, fin filet comme une toile d'araignée, caillot, séclusion pupillaire

Dimension

Localisation dans la CA

Contact / proximité de l'endothélium

Grade	<u>Cells (Schlaegel)</u>	<u>Flare (Schlaegel)</u>
0	0	Empty
1	Occasional cells	Very Slight
2	8-15 cells	Mild to moderate (iris/lens clear)
3	Too many to count	Moderate (iris/lens hazy)
4	Most ever seen	Severe (fibrin, plastic aqueous)

Iris

- Atrophie des cryptes:
 - 0: normal
 - 1: atrophie légère à modérée
 - 2: atrophie sévère (lisse)
- Estimé du % de la surface atteinte
- Synéchies antérieures (total en hres)
- Synéchies postérieures (total en hres)

Cristallin: Vacuoles (réversibles; transitoires) et opacité corticale

0: absence
1: léger
2: important

SIGNES DE COMPLICATIONS À RECHERCHER EN POSTOPÉRATOIRE

- En cas de complication ou au moindre doute: **AVISER Dre Brunette sans délai.**
- C'est elle qui décidera du traitement ou de la conduite à tenir.
- Dans les très rares cas où Dr Brunette ne serait pas disponible, un responsable désigné pourra intervenir à sa place.

Post-op immédiat de toute chirurgie intraoculaire:

- Léthargie, inappétence, anxiété (manifestation de malaise / douleur oculaire)
- Blépharospasme, photophobie

Post-op immédiat de toute chirurgie intraoculaire: documenter les paramètres suivants:

Guérison des plaies:

- Étanchéité des plaies (Seidel fluo)

Réaction inflammatoire: signes d'endophtalmie

- Cellules, Tyndall, fibrine, hypopion
- Myosis, déformation de la pupille

Suivi long terme d'une greffe de cornée:

Transparence du greffon (cf grille de gradation)

Pachymétrie centrale du greffon

Signes de rejet:

- Non spécifiques: cellules CA
- A/n du greffon seulement: KPs, ligne de rejet endothélial
- **DATE & TYPE** de rejet: endothélial, stromal, épithélial et sous épithélial ne s'appliqueront généralement pas, car seulement cellules endothéliales sont transplantées)
- Traiter sans délai (*cf protocole*)

Facteurs de risques

- État des sutures (serrées, glissement, lâches, exposées, cassées, fluo +/-) (tx: exérèse)
- État de la plaie (déhiscence, gap) (tx: révision de plaie sans délai, selon le cas)
- Infection (culture AVANT d'initier le ttx antibiotique, puis traiter sans délai)
- Perte d'intégrité de la surface épithéliale (identifier la cause et y remédier)
- Décollement de l'endothélium (tx: injection d'air pour le recoller)
- Vascularisation: superficielle, profonde, jusqu'au greffon, nombre de quadrants (identifier la cause, y remédier et couvrir contre l'inflammation et l'infection)
- TIO (tx: selon protocole)

Échec

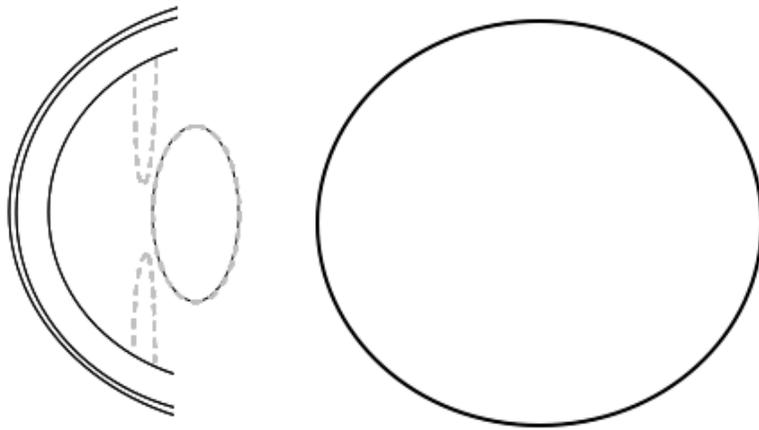
- **DATE** de l'échec
- Échec = opacification irréversible du greffon (perte de la visibilité des détails de l'iris). Pour une greffe de petit diamètre: vise > 2/3 du greffon. Pour une greffe de grand diamètre centrée: vise l'aire pupillaire centrale
- Échec primaire = greffon qui ne s'est jamais éclairci
- En cas d'échec: AVISER Dr Brunette sans délai. C'est elle qui décidera de l'indication ou non d'interrompre l'étude.

Annexe 6 : Feuillet clinique pour 2 implants

GLPX: _____ Examen par: _____ Date: _____ Heure: _____ Postop #:

CORNÉE	IMPLANT OD Nasal Supérieur	IMPLANT OD Temporal Inférieur	Oeil contrôle
Pachymétrie OD Centre: (SP3000; µm)			
<ul style="list-style-type: none"> • Plaie (0-3) • Sutures (0-2) • Sécrétions oculaires (0-2) 	0 - 1 - 2 - 3 0 - 1 - 2 0 - 1 - 2	0 - 1 - 2 - 3 0 - 1 - 2 0 - 1 - 2	
Épithélium <ul style="list-style-type: none"> • Malade, blanchâtre, irrégulier; œdème microkystique • Déficit (% cornée désépithérialisée) 			
Biointégration de l'implant <ul style="list-style-type: none"> • Résorption; Amincissement; Épaississement • Dellen; Plis stroma; K striée • Ulcération; Nécrose; Extrusion 			
Transparence: œdème; type d'infiltrat; fibrose; couleur; homogénéité. Régularité			
• Pleine épaisseur (détails iris 0-4)			
• Implant			
• Stroma antérieur			
• Stroma postérieur			
• Interface implant- stroma antérieur			
• Interface implant- stroma postérieur			
• En périphérie de l'implant			
Vaisseaux nb quadrants (S-N-I-T) / nb total hres / mm max / mm moy; Superficiels (P); Profonds (P); Débit	S: ___ / ___ / ___ / ___ P: ___ / ___ / ___ / ___	S: ___ / ___ / ___ / ___ P: ___ / ___ / ___ / ___	
Endothélium & Descemet <ul style="list-style-type: none"> • Plis (Oui/Non) • KPs (Oui/Non) et si oui: Mutton-fat; Fins; Pigmentés (0-2); Limités à la greffe 			
CHAMBRE ANTÉRIEURE			
<ul style="list-style-type: none"> • Cellules (0-4) • Tyndall (0-4) • Fibrine (non/oui; voir échelle) • Hypopion (non/oui; si oui mm) 	0 - 1 - 2 - 3 - 4 0 - 1 - 2 - 3 - 4 non oui non oui ___mm	Description:	

IRIS			
<ul style="list-style-type: none"> • Atrophie des cryptes (0 – 2) • Estimé du % de la surface atteinte • Synéchies antérieures (total en hres) • Gonioscopie: oui non • Synéchies postérieures (total en hres) 	0 - 1 - 2 _____% ____h ____h	Description:	
CRISTALLIN			
<ul style="list-style-type: none"> • Vacuoles (0-2) • Opacité corticale (0-2) 	0 - 1 - 2 0 - 1 - 2		
TIO (TonoVet; mmHg)	OD: _____	OS: _____	



Sédation: Aucune
 Médétomidine (Dexdomitor ou Cepetor): Dose _____ mL IM
 Atipamézole (Antisedan ou Revertor): Dose _____ mL IM

Pupille: Aucune gtte Pilocarpine 0.5%
 Mydriacyl 1% Cyclogyl 1% Phényl 2.5%

CONCLUSIONS / CONDUITE: (cf définitions page 4)

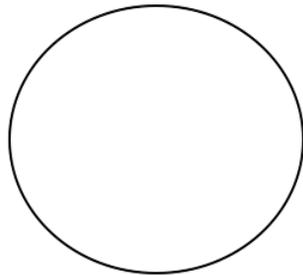
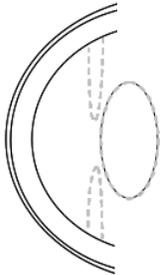
Implant toléré non: ___ oui: ___ probable: ___ _____ NS _____ TS
Réaction inflammatoire non: ___ oui: ___ probable: ___ _____ NS _____ TS
Trauma mécanique non: ___ oui: ___ probable: ___ _____ NS _____ TS
Rejet actif non: ___ oui: ___ probable: ___ _____ NS _____ TS
Échec de la greffe non: ___ oui: ___ probable: ___ _____ NS _____ TS
Complications non: ___ oui: ___ probable: ___ _____ NS _____ TS
Dre Brunette avisée non: ___ oui: ___

Signature: _____

Annexe 7 : Feuillet clinique pour examens hors protocole

Examens hors protocoles – GLPX

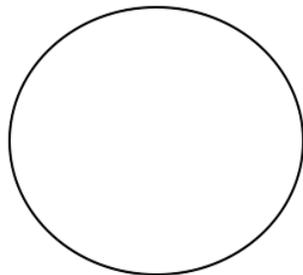
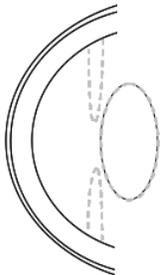
Post-op # : Date : Heure : Examineur :



Examen :

.....
.....
.....
.....
.....

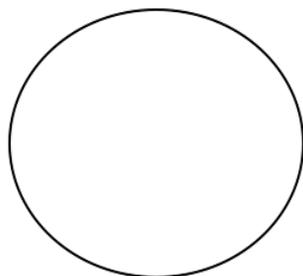
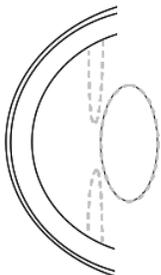
Post-op # : Date : Heure : Examineur :



Examen :

.....
.....
.....
.....
.....

Post-op # : Date : Heure : Examineur :



Examen :

.....
.....
.....
.....
.....

Annexe 8 : Utilisation de l'OCT Thorlabs

Purpose of the Instrument

To perform in-depth analysis of ocular coherence tomography (OCT) by high resolution cross sectional examination of the cornea without direct contact. The Thorlab Spectral Radar OCT utilizes a focused beam of high-penetrating IR light (930 nm) to visualize the tissue of interest with a resolution of 4.4 μm . The corneal thickness (pre-op and post-op) can be measured with the use of **ImageJ** software (NIH, Bethesda, MD, USA).

System Start-Up

1. The instrument coupled to the computer should be paced on the bench at examination room (refer to **Figure 1**).
NOTE: This instrument is **VERY FRAGILE**. Please move and operate this instrument with great care.
2. Please ensure all the plugs between the computer-to-Thorlab unit and Thorlab probe-to-Thorlab unit are properly connected.
NOTE: The plugs and the fibre-optic cable should usually be connected. If they are not connected, please contact the designated person in charge of this Thorlab unit (Has from the BFV group or Javier from the Costantino Lab) to ensure the connections are made accordingly.

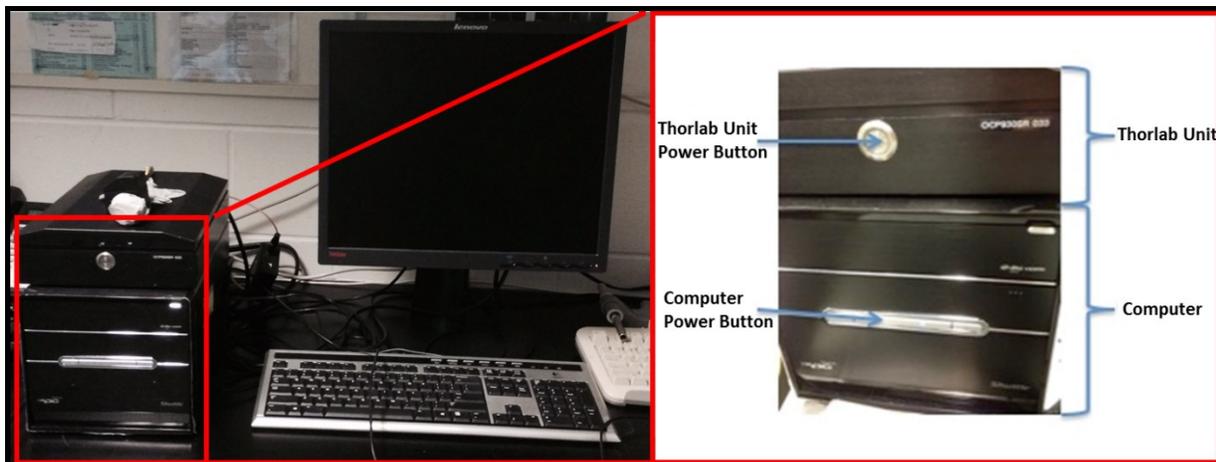


Figure 1: Overview of the ThorlabOCT Image at the BFV examination room. Both the Thorlab computer and the Thorlab unit must be turned sequentially.

3. Turn on the Computer and the Thorlab unit. Log in the computer.
Username: SROCT
Password: sroct
4. Start the software by clicking on the Desktop icon SRScan. You should see a window corresponding to the software pop up (refer to **Figure 2**). It will automatically perform an initial warm up and calibration procedure (~ 10 s).

5. Click **START** and adjust the mirror knob until the reference intensity is within the accepted range (refer to **Figure 2B** – top right corner).
 - Rotate the small knob at the back of the probe until the reference intensity (on-screen) is either orange or green (refer to **Figure 3** for the probe configurations). No pre-calibration is required during the start-up if these two colours appear on screen.
6. Click **STOP** and place the sample to be analyzed near the probe.

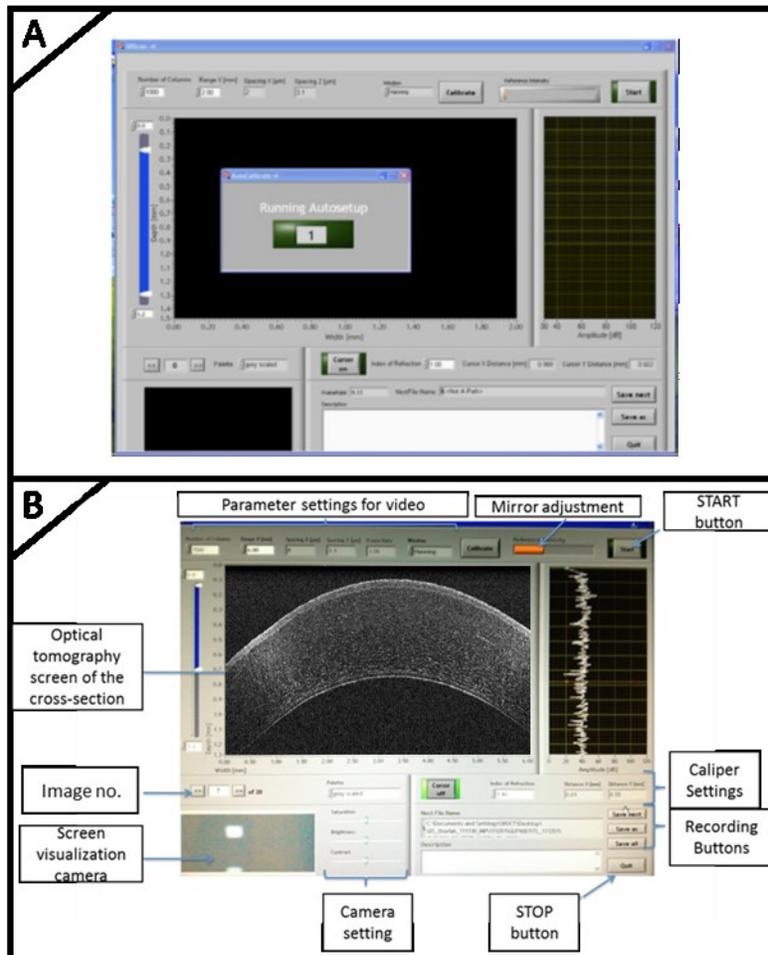


Figure 2: Overview of the SRScan software during the start-up. A: The initial auto setup calibration of the SRScan software and the B: SRScan essential components in the main software screen.

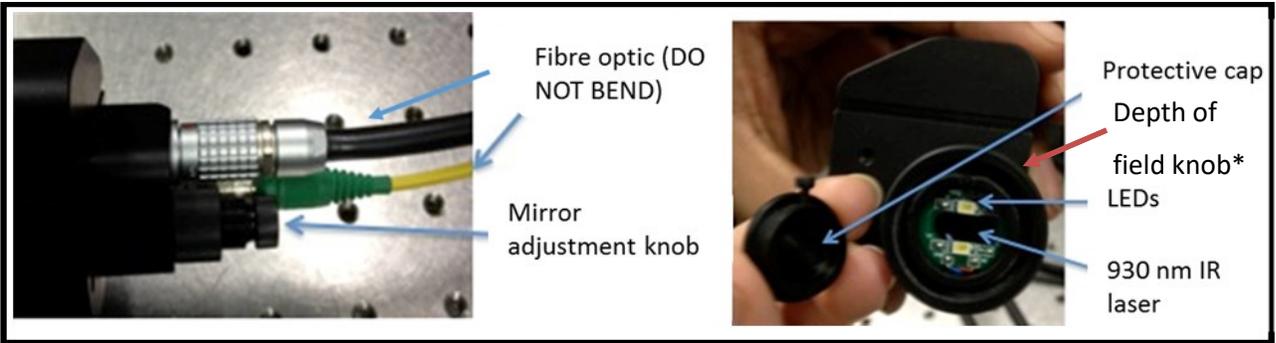


Figure 3: Instrumental setup of the Thorlabs OCT probe.

Image Acquisition

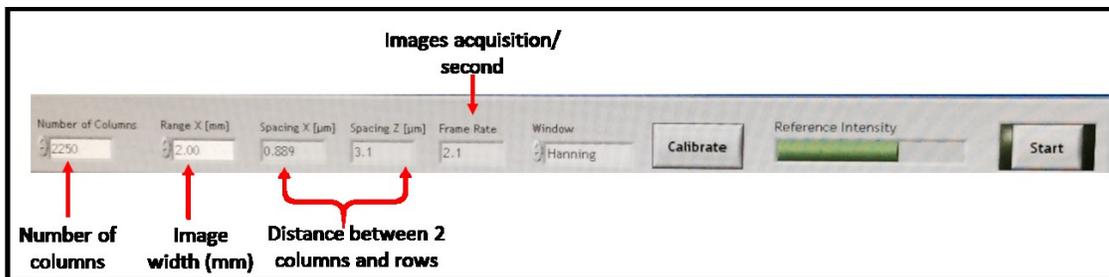


Figure 4: Screenshot of the measurement bar on the Thorlab OCT. The number of columns, Range X and Window can be adjusted based on the sample and measurements required.

- **Number of Columns:** Corresponds to the resolution. Higher number of columns will result in a longer acquisition time (min: 50 and max: 2500).
 - **Range X (mm):** Width selection of the image (min: 0.05 mm and max: 6 mm).
 - **Spacing X (μm):** Dependent variable based on the chosen column number and range.
 - **Spacing Z (μm):** Measured value of the width of a row of the image (cannot be changed).
 - **Window:** Mathematical window of function. Four available functions ranging from Hanning, Blackman, 4 Term and Tapered Cosine.
1. Set the parameters on the measurement bar for recording purposes (Pre):
 - **Select** a lower resolution in order to locate the region of interest (start with 500-1000).
 - For the purpose of corneal analysis, select the widest option (6 mm) and narrow down the ROI as desired.
 - In **the** windows box choose the **Hanning** mathematical function.
 2. Place the subject (E2 or E4) or the sample (ex vivo eyes) on the Mayo table in such a way that the cornea of the eye is perpendicular to the probe (refer to **Figure 5 left**).
 - You can adjust the height of the table until an optimal position between the subject and the probe is discovered. A towel can be used to adjust the subjects' head orientation and height.
 3. Place the probe around 1 – 2 cm from the subject's eye (refer to **Figure 5**).

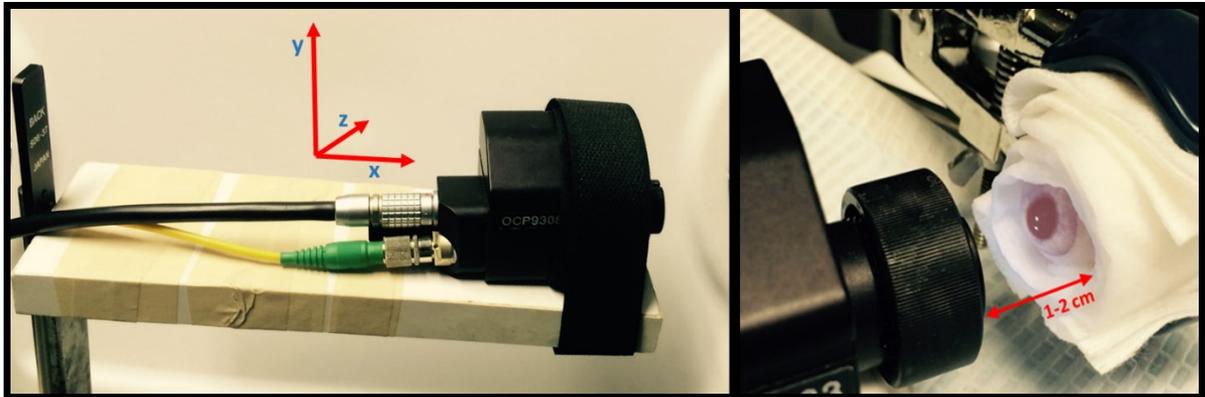


Figure 5: The Thorlab probe setup in the BFV examination room (left) and the initial placement of the probe 1-2 cm away and perpendicular to an ex vivo rabbit eye (right). The probe holder can be moved multi directionally (all x, y and z axis) until probe is placement is optimal to acquire quality images of the specimen.

4. Click **START**.
5. Centre the region of interest (ROI) with the help of the visualization screen (refer to **Figure 2B** bottom left), prior to moving the probe forward.
6. Move the probe forward until the desired region of interest appears on the screen (~0.5-1 cm).
 - Do not hesitate to decrease the resolution further to locate the area of interest (lower frame rate will yield faster image acquisition)
 - **If the image seems inverted or out of focus, adjust the depth of field knob (see Figure 3). Usually, it is preferable for it to be almost completely screwed in.**
7. When the image is centered click **STOP** and then adjust the resolution to 1000-2250.
 - Note that when acquiring *in vivo* images, 1000-1750 are optimally used. The higher resolutions might not be optimal as there animal's breathing can interrupt the image quality.
8. Click **START**. The number of pictures taken by the Thorlab OCT varies by the resolution chosen.
 - Higher resolution → longer image acquisition time → less images.
 - Lower resolution → faster image capturing → more images captured.
9. If the cornea is too thick for it to have it to be in a single image frame, make a series of images of the anterior and the posterior. Name the files accordingly (ANT/POST/FULL).
 - When the probe is too close, a reflection image of the cornea is created. Back it up a bit to regain the normal image.
10. If one sees the horizontal white or gray lines in the image of the cut, because there is interference between the probe and the specimen of study. Just keep them away from each other.
11. Once you have the desired image click **STOP** immediately as the images are kept temporarily in a limited numbered memory.

Analysis and Fine-tuning of the Captured Image (Thorlab OCT Software)

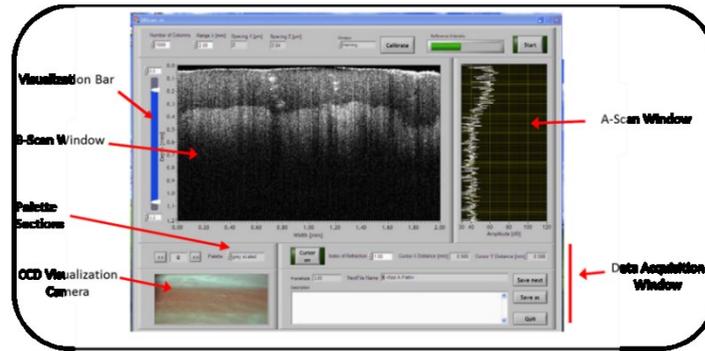


Figure 6: A screenshot of the software interface during an operational mode.

1. Visualization Bar (refer to **Figure 6** and **Figure 7**)

The visualization bar is used to optimize and set the display borders of the image (range 20 – 70). You can work on this after the image is being captured (refer to the examples shown below).

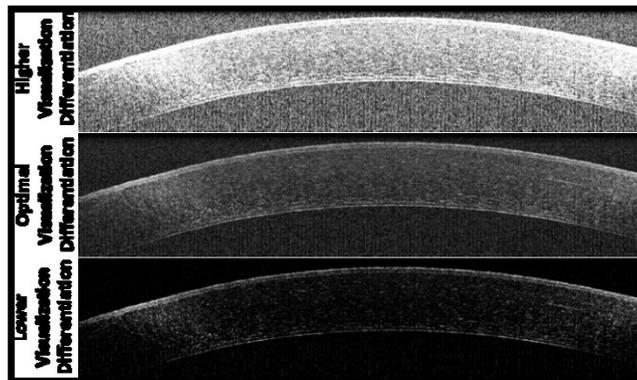


Figure 7: Different image contrasts that can be adjusted by varying the visualization bar.

2. Palette Sections (refer to **Figure 6** and **Figure 8**)

The scanned images can be displayed in gray scale or false color. Use the up and down arrows on the Palette Section Button (**Figure 6**) to make a selection of image display. **Figure 8** below shows the same image of a scan of a human thumb in either gray scale or the false color-coded palette.

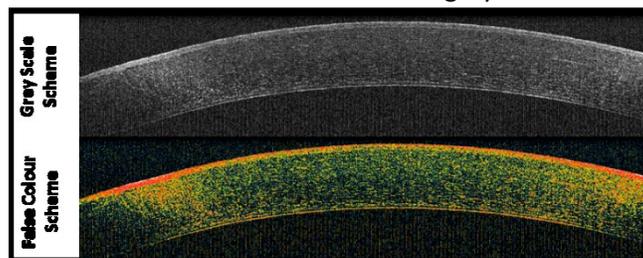


Figure 8: Two palette selections: Grey scaled and False colour coding of the same OCT image.

Saving and Exporting the Acquired Images

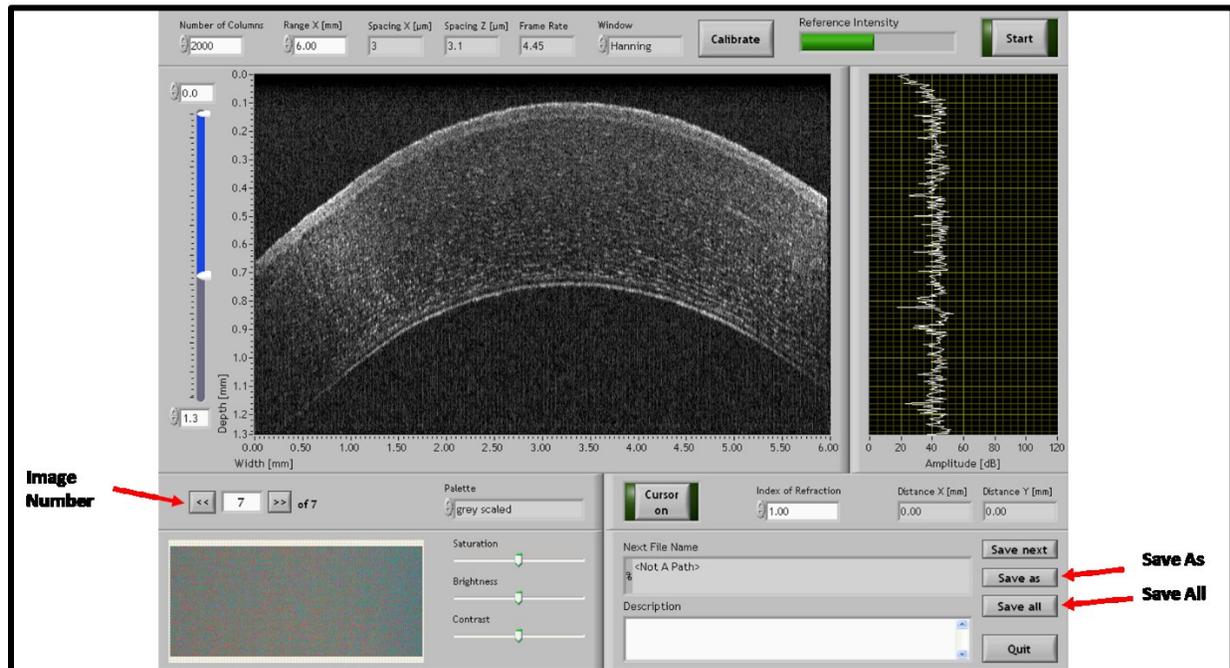


Figure 9: SRScan interface depicting the image transition and image saving options.

1. Once you have captured your desired image (few images will be captured and temporally saved in a numbered memory system), view the images by simply going through the image frame arrows.
2. To save the images, the options are located at the bottom right of the screen:
 - a) To save the currently displayed image, click **Save As**.
 - b) To save the complete series of images, click **Save As** to choose the appropriate folder for the current image first, create a backup model and then click on **Save All**.
3. Please utilize the appropriate nomenclature when saving the images. Refer to **Nomenclature_IdentificationDossiers_160629_MP.docx** on the Kardex.

Image Analysis Using ImageJ

For precise analysis the images can be analyzed utilizing the ImageJ software.

1. Open the desired image using the the ImageJ software.
2. Refer to the dimension used when the image was initially acquired (eg: 6 mm (width) x 1.3 mm (depth)). At the top left corner of the image (opened with ImageJ), the pixel dimensions should also be noted.

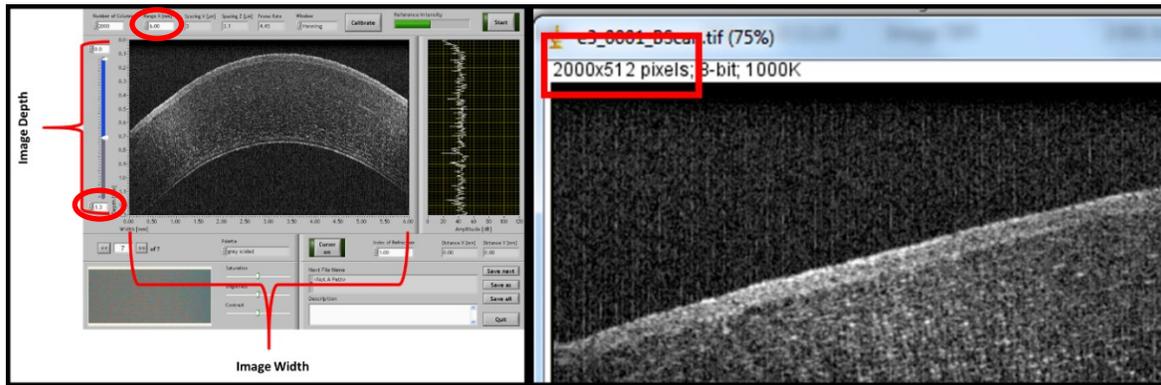


Figure 10: SRScan real-time image dimensions (left) and the pixel composition of the acquired image on ImageJ (right).

3. Press **Ctrl + Shift + P** or navigate to Image > Properties. A window will appear (refer to **Figure 11**). Check “Global” and fill the pixel width and height with the following spreadsheet:

Input		Output (to write in the pop up window in ImageJ)	
Image height (pixels) :	512	Pixel width :	3,0000
Image width (pixels) :	2000	Pixel height :	1,8452
Image height (µm) :	1300		
Image width (µm) :	6000		
Object refractive index :	1,376		

- a. For feline corneal analysis, the refractive index is 1.376.
 - b. For CLP-PEG and hydrogel-based implant analysis, the refractive index is 1.334.

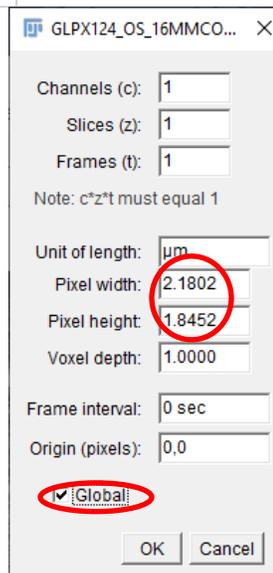


Figure 11: Screenshot of the ImageJ software portraying the process of converting the pixelated dimensions to the real-time dimensions of the tissue of interest.

4. Once the scale is set, the real-time dimensions should pop up on the top left side of the ImageJ window.
5. Click on the **line** option on the ImageJ window and draw the line on the ROI that needs to be measured. **Press Shift while drawing to draw a straight vertical line.** Afterwards, press **Ctrl + M** and a new window (shown in **Figure 12**) should pop up with the scaled length of the ROI. You can make measurements on multiple pictures and copy paste the generated result table in an Excel spreadsheet or manually enter the generated measurements.

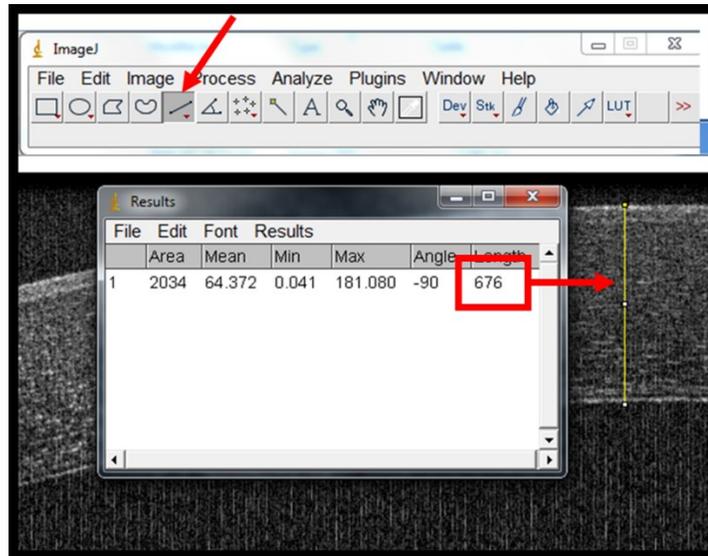
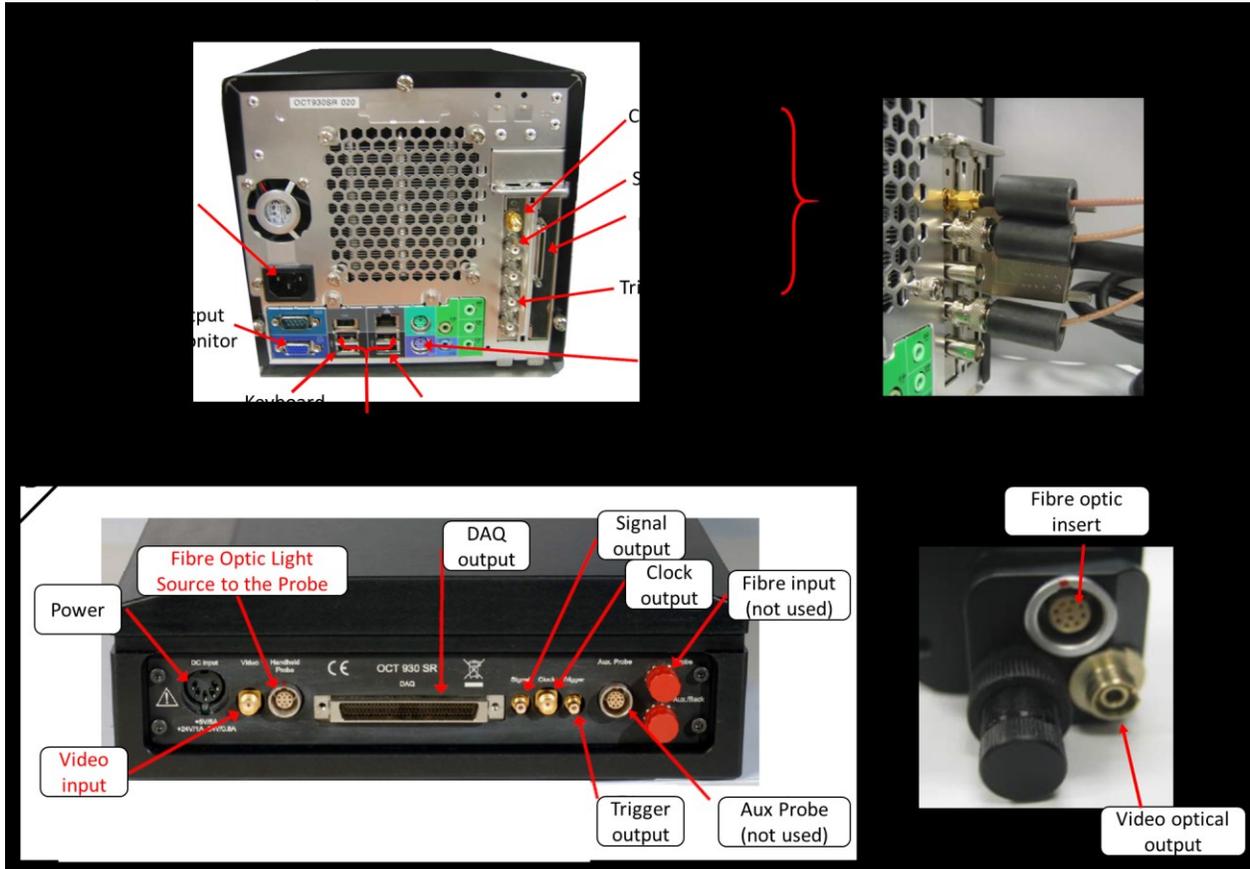


Figure 12: Screenshot of the ImageJ Software interface depicting the process of image analysis. An ex vivo rabbit cornea is shown above and the corneal length is shown by the yellow line (676 μm).

6. In order to determine the real length of the ROI, divide the value obtained utilizing the refractive index (rf) of the material being studied.
 - a. **NOTE:** The image acquired assumes that the rf of the material studied to be 1.000.

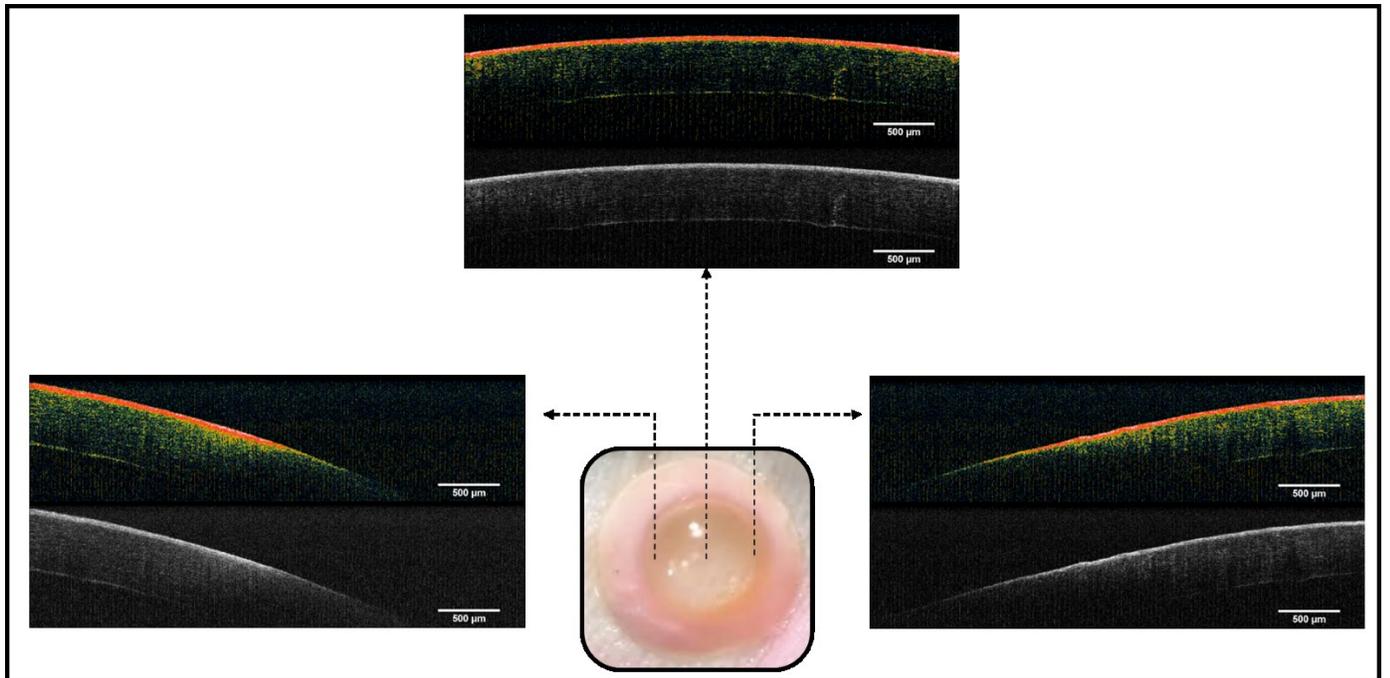
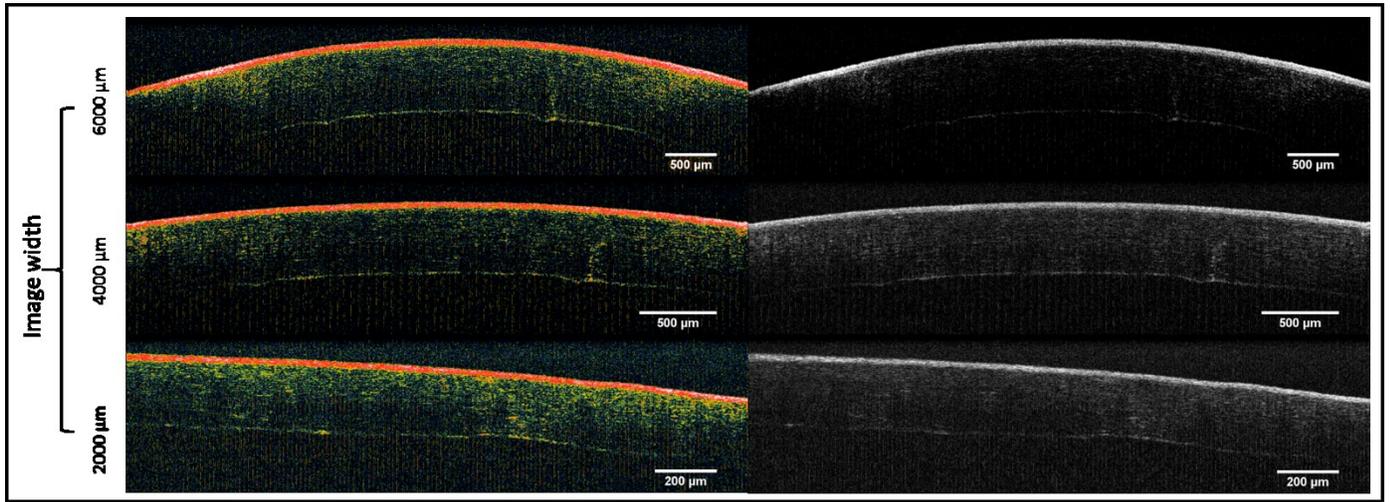
APPENDIX

1. Instrumental Setup

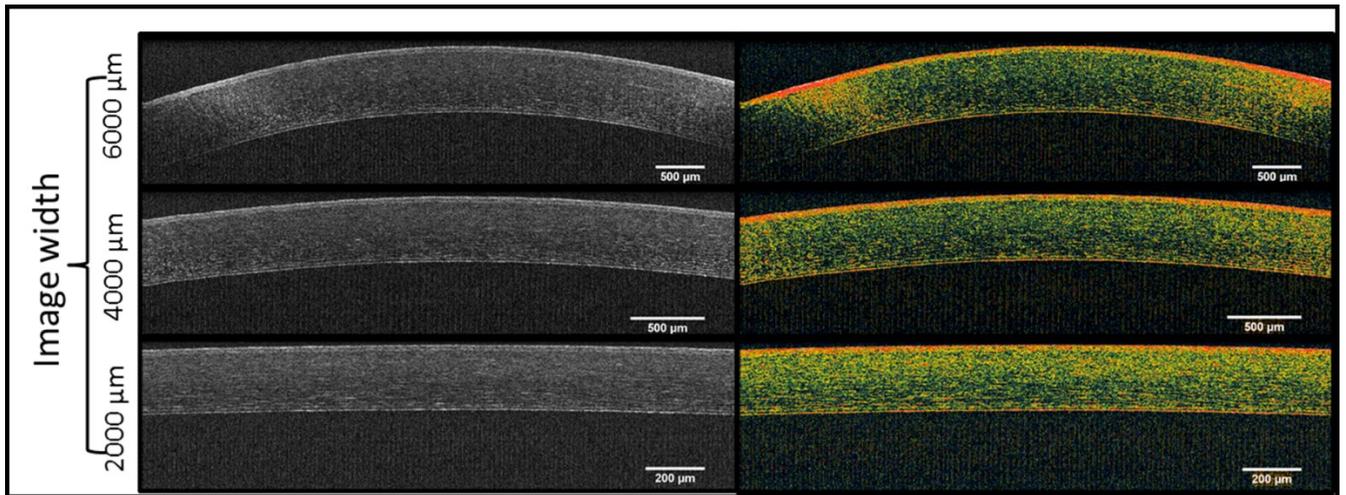


2. Sample Images (*ex vivo* E1, E3 and Human Cornea)

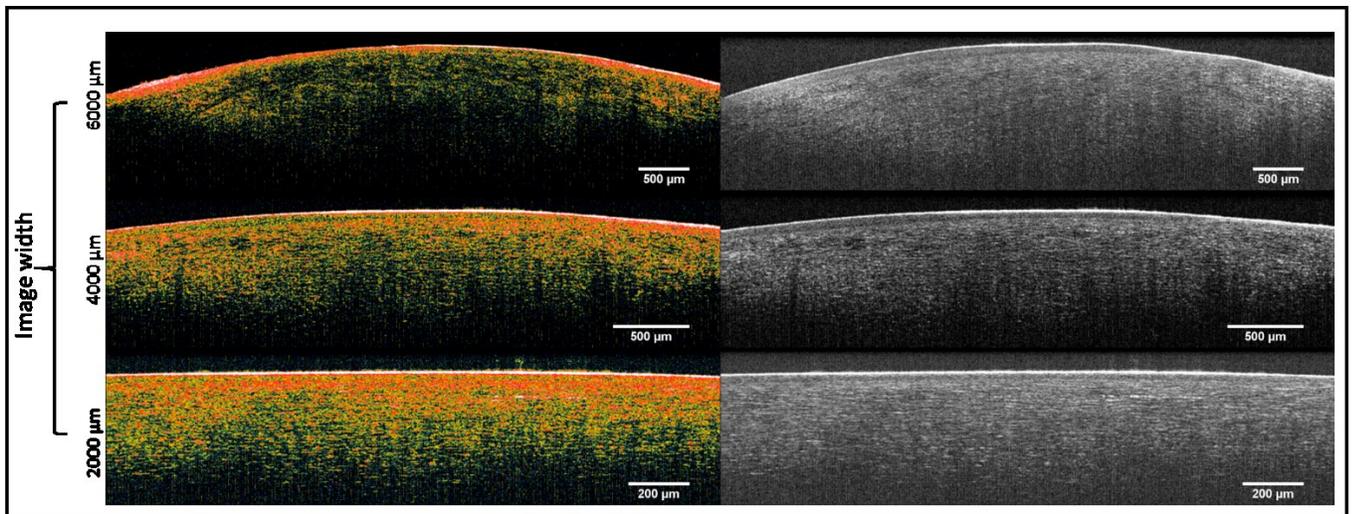
a. Human Cornea (160427, 1 day post-mortem, Source: Québec Eye Bank)



b. *Ex Vivo* E3 (160509, 3 days post-mortem, Montréal Heart Institute)



c. *Ex Vivo* E1 (160422 and 160427, 4 days post-mortem, CHUM)

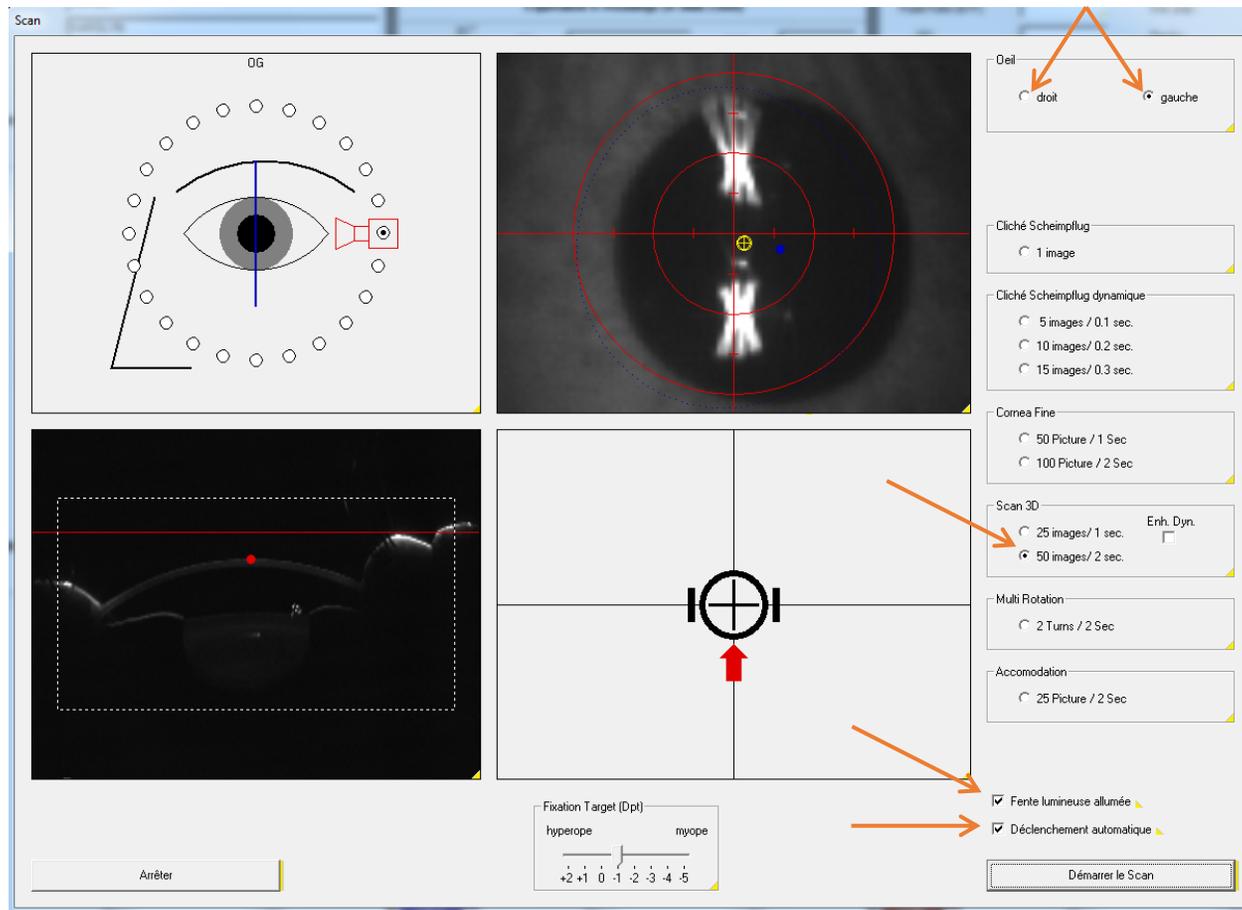


Annexe 9 : Utilisation du topographe Pentacam HR

Acquisition des images (voir figure page suivante)

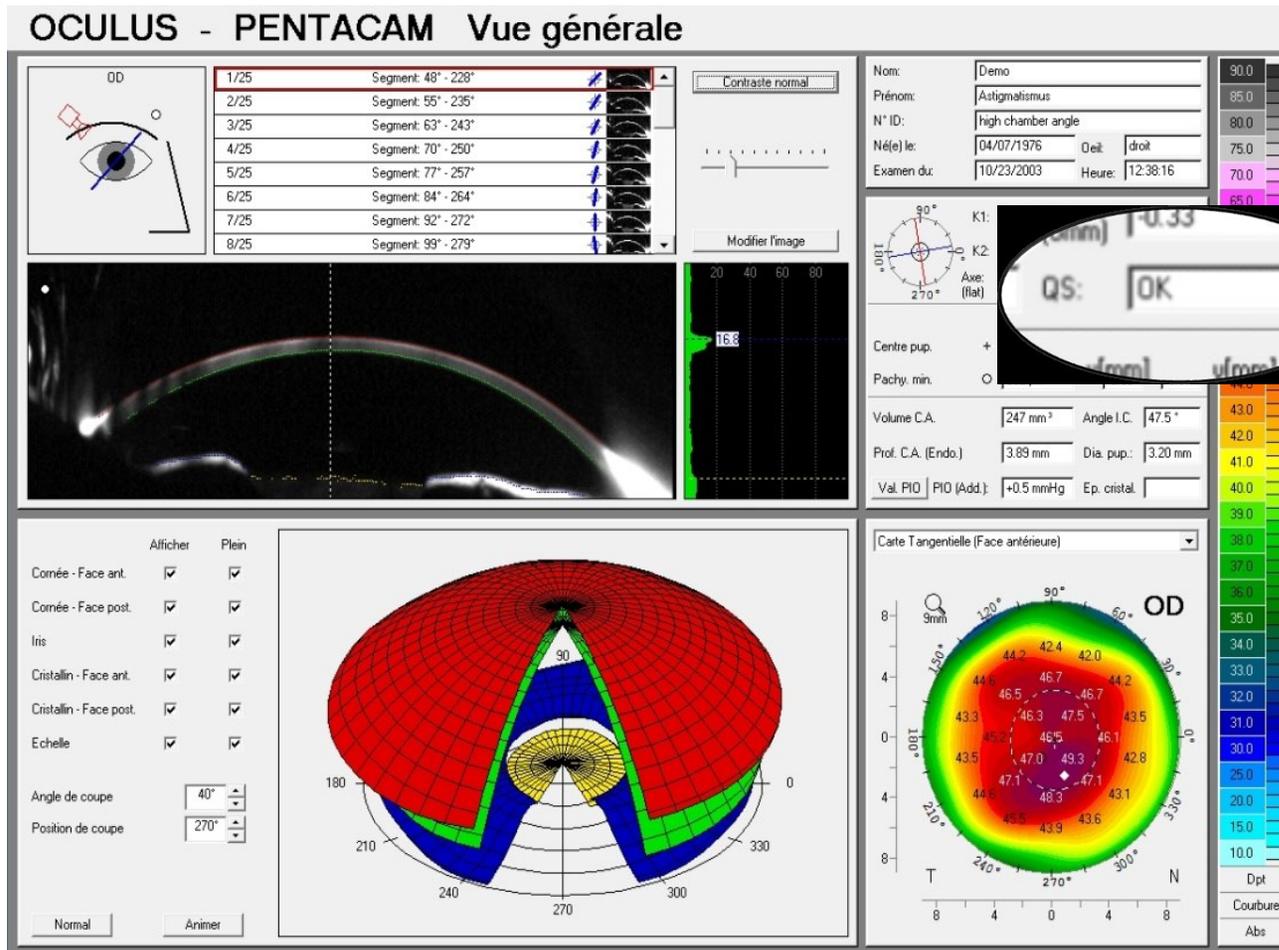
- Dans la section « Patient », cliquer sur « Nouveau ».
- Entrer les informations suivantes :
 - Nom : GLPX
 - Prénom : #
 - Né(e) le : JJ/MM/AAAA (Si connue)
 - N° ID : GLPX#
- Cliquer sur « Valider », puis sur « Pentacam ».
- Aller dans Examen > Scan.
- Dans la section « Œil », cocher « Droit » ou « Gauche » pour que cela corresponde à l'œil photographié (révérer cette information tout juste avant de prendre les photos, car le logiciel la change automatiquement lorsque l'on déplace l'appareil de droite à gauche).
- Si ce n'est pas déjà fait, dans la section « Scan 3D » à droite, cocher « 50 images / 2 secs ».
- S'assurer que les cases « Fente lumineuse allumée » et « Déclenchement automatique » sont cochées.

- Pour l'alignement, suivre les indications suivantes :
 - Éteindre les lumières dans la pièce. Garder une lumière d'appoint au besoin, non dirigée vers l'appareil.
 - Ajuster la tête de l'animal à l'aide de serviettes
 - S'assurer que la lumière bleue émise par l'appareil est centrée sur la pupille
 - Il est possible de regarder la série d'images générées et de s'ajuster selon l'orientation de l'iris (qui devrait être généralement symétrique sur toutes les images)
 - Utiliser la manette de commande pour déplacer l'appareil jusqu'à ce la coupe de la chambre antérieure apparaisse en bas à gauche et avancer l'appareil jusqu'à ce que le point rouge sur la cornée soit traversé par la ligne horizontale rouge
 - Utiliser l'affichage en bas à droite pour se guider dans les dernières manipulations
 - L'appareil fera automatiquement ses photos lorsque le point rouge et la ligne rouge seront alignés en bas à gauche et lorsque la cible jaune sur l'œil et la cible rouge seront alignées en haut à droite.



IMPORTANT : Ne plus rien toucher pendant l'acquisition. La prise de photos dure 2 secondes, mais il y aura une attente d'une dizaine de secondes après celle-ci.

- Dans l'interface qui s'affiche alors, la ligne « QS » en haut droite doit avoir la mention « OK » pour que le test soit fiable. Si ce n'est pas le cas, recommencer la prise de photo.



Si le patient a déjà eu ses prises de vues, suivre les indications suivantes (à partir de l'interface de la base de données Oculus, ici-bas)

The screenshot shows the OCULUS database interface. At the top left, there is a search form for a patient with fields for Nom, Prénom, Né(e) le, and N° ID. A red arrow points to the 'Pentacam' button in the 'Fonctions' section. Below the search form is a table of patients, with the first row highlighted. To the right is a table of available exams, with the second row highlighted. At the bottom, there are buttons for 'Importer', 'Exporter', 'Effacer patient', and 'Effacer examen', along with a status bar showing 'Nombre de fiches patient: 1 (1)'.

Patient:

Nom: _____
Prénom: _____ Search by csv
Né(e) le: 7/27/2018 7/27/2018 Anêter
N° ID: 1853277 Avancée

Fonctions: **Pentacam** Paramètres
Sauvegarde
Quitter

Liste des patients:

#	Nom	Prénom	Né(e) le	ID
▶	HADET	KEVIN	7/28/1993	1853277

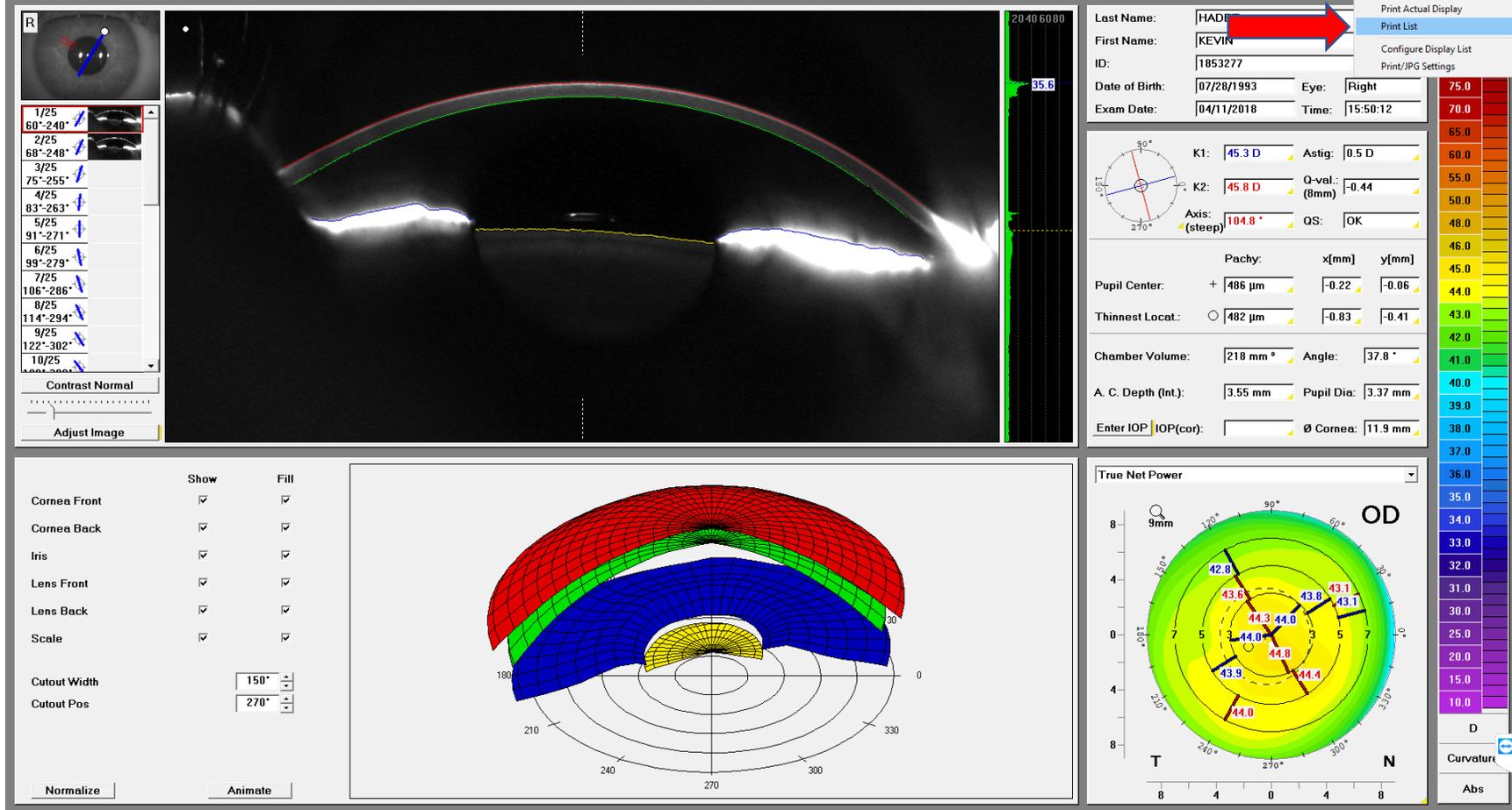
Examens disponibles:

#	Date	Heure	Appareil	Œil	Type	Notes
▶	4	4/11/2018	3:51:56 PM	Pentacam	Gauche	(25) Scan 3D HR
	3	4/11/2018	3:50:12 PM	Pentacam	Droit	(25) Scan 3D HR
	2	9/20/2017	9:07:50 AM	Pentacam	Gauche	(25) Scan 3D HR
	1	9/20/2017	9:05:32 AM	Pentacam	Droit	(25) Scan 3D HR

Importer Exporter Effacer patient Effacer examen

Nombre de fiches patient: 1 (1)

- Chercher le patient par ses informations d'identification. Normalement, le numéro de dossier suffit.
- Cliquer sur le patient dans la liste de gauche
- Cliquer sur l'examen de l'œil droit le plus récent (date ET HEURE) dans la liste de droite
- Cliquer sur le bouton « Pentacam » en haut (flèche rouge)



- Dès que l'examen a fini de charger, cliquer sur « Print », puis « Print liste » en haut à droite

The screenshot displays the OCULUS PENTACAM software interface. A 'Print' dialog box is open in the foreground, with a red arrow pointing to the 'Print' button. The dialog shows the printer 'Xerox ColorQube 8700/8900 Series Class Dri' selected. The main interface is divided into several sections:

- Top Left:** A list of meridian measurements:
 - merit: 60° - 240°
 - merit: 68° - 248°
 - merit: 75° - 255°
 - merit: 83° - 263°
 - merit: 91° - 271°
 - merit: 99° - 279°
 - merit: 106° - 286°
 - merit: 114° - 294°
- Top Center:** A live video feed of the eye with a red and green laser line. A vertical scale on the right shows a value of 85.6.
- Top Right:** Patient information form:
 - Last Name: HADET
 - First Name: KEVIN
 - ID: 1853277
 - Date of Birth: 07/28/1993
 - Exam Date: 04/11/2018
 - Eye: Right
 - Time: 15:50:12
- Middle Right:** Toric parameters:
 - K1: 45.3 D, Astig: 0.5 D
 - K2: 45.8 D, Q-val: (8mm) -0.44
 - Axis: (steep) 104.9°, QS: OK
- Bottom Right (Top):** Pupil and Chamber parameters:
 - Pachy: x(mm) y(mm)
 - Pupil Center: + 486 μm -0.22 -0.06
 - Thinnest Local: ○ 482 μm -0.83 -0.41
 - Chamber Volume: 218 mm³, Angle: 37.8°
 - A. C. Depth (Int.): 3.55 mm, Pupil Dia: 3.37 mm
 - Enter IOP | IOP(cor): Ø Cornea: 11.9 mm
- Bottom Left:** A table of 'Show' and 'Fill' options for various corneal layers:

	Show	Fill
Cornea Front	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Cornea Back	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Iris	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Lens Front	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Lens Back	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Scale	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
- Bottom Center:** A 3D topographic map of the cornea showing curvature variations in red, green, and blue.
- Bottom Right (Bottom):** A circular 'True Net Power' map with numerical values ranging from 42.8 to 44.8. A color scale on the far right indicates curvature values from 10.0 to 90.0.

- Après un certain temps, la fenêtre de l'imprimante s'affichera. Cliquer sur « Print »

Annexe 10 : Utilisation du microscope confocal Confoscan 3

Protocole adapté du manuel de l'appareil :

You can start ConfoScan3 from the main screen.

To Start ConfoScan3 from the Main Screen

Click the ConfoScan3 exam button:

NAVIS checks if you have a patient selected:

- **If you do not have a patient already selected** – the NAVIS window, *List of Patients*, is displayed. You have 2 options:

- *Option 1*: Select a patient from the *List of Patients*.
- *Option 2*: Add a patient (GLPX#).

- **If you do have a patient already selected** – ConfoScan3 is started for that patient.

ConfoScan3 is started and opens the *ConfoScan3 Acquisition Window* with the patient you have selected or added. The patient's name appears at the top of the window.



Recording Images

Generally, the process to record images follows this flow:

- Open the *Acquisition Window*.
- Review or set the examination parameters.
- Prepare the patient.
- Prepare the lens.
- Activate the recorder.
- Align the microscope with the patient's eye.
- Record the images.
- Review the images.
- Repeat, if necessary.
- Exit and save.

To Open The Acquisition Window

From the *ConfoScan3 Exam* window, you open the *Acquisition Window*:

1 You have 2 options:

- *Option 1*: Click the function button, **New**:

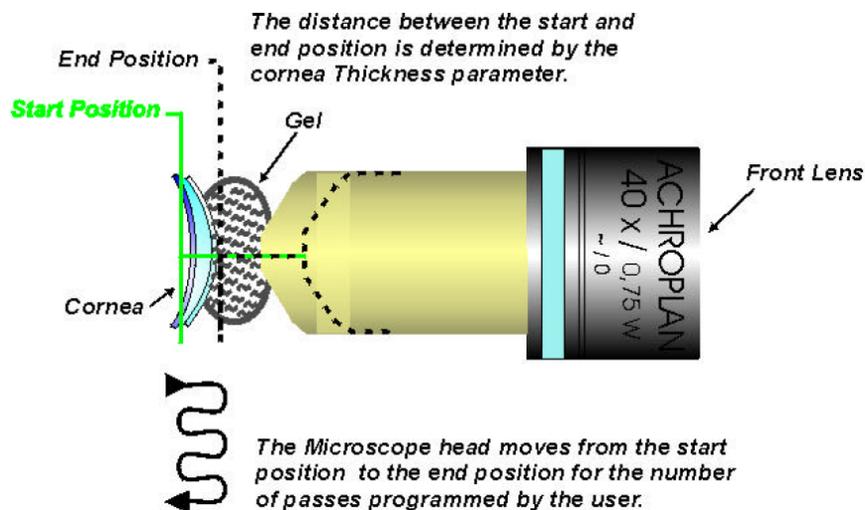


- *Option 2*: Select the menu command:

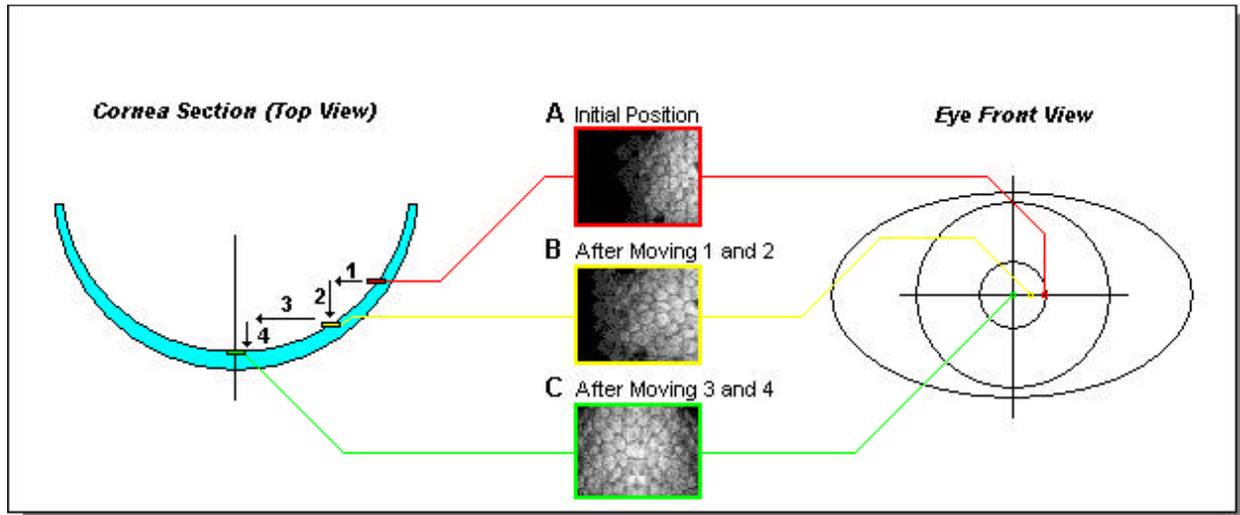
- Examination, New.

The *ConfoScan3 Acquisition Window* opens.

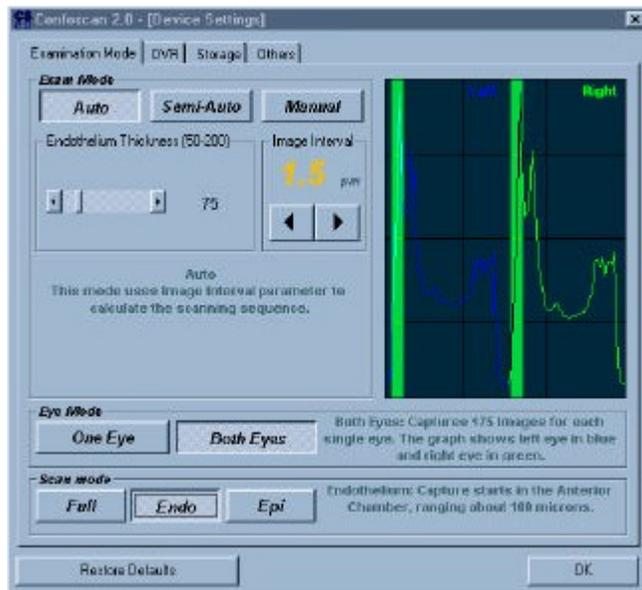
- Désinfecter l'extrémité distale de la lentille de l'appareil et attendre qu'elle sèche
- Placer le sujet endormi près de l'appareil et ajuster sa tête à l'aide de serviette pour que l'œil à examiner soit le plus près possible de la lentille sans lui toucher.
- Orienter la tête du sujet pour que la lentille fasse face à la région d'intérêt (ex. cornée centrale, implant périphérique, etc.)
- Apposer le gel sur la lentille.
- Rapprocher le sujet de la lentille jusqu'à ce que son œil touche le gel sans toucher à la lentille (voir figure ici-bas, tirée du manuel).



- En utilisant le joystick, veillez à aligner correctement la lentille de façon perpendiculaire à la cornée.



- Vous pouvez utiliser le mode auto ou semi auto pour la saisie des images et vous pouvez ajuster la distance entre chaque image dans l'axe Z dans les options. À noter que ces modes suppriment souvent les implants de leurs séries d'images parce que ces derniers sont très transparents (images presque noires). Il va cependant poursuivre sa course et se rendre à l'endothélium.



- Sauvegardez les images à la qualité maximales (TIFF).
- Exportez les images sur une clé USB.

Annexe 11 : Utilisation de l'angiographe HRA

PROTOCOLE ANGIOGRAPHIE CORNÉE HRA

Matériel :

- HRA (Heidelberg Retina Angiography; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) et sa table de travail (disponible dans le laboratoire d'optique de Santiago C.)
- Sédatif : Dexdomitor
- Cathéter Jelco (en amener plusieurs si risque de tentatives multiples)
- Bouteille (5 ml) de fluorescéine sodique 10% (FLUORESCITE Injectable 10%; Alcon Canada Inc.)
- 2 Seringues tuberculine (1 cc)
- Écarteur à paupières pour adulte
- 2 grandes boîtes en plastique vides
- Champs chirurgicaux bleus

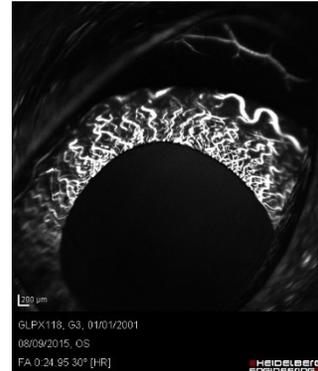
Préparation du sujet et angiographie

- Calculer la dose de fluorescéine à injecter à l'animal, de sorte qu'on obtienne 20 mg/kg. En mettre 0,05 ml de plus dans la seringue pour considérer la perte dans le cathéter et pour l'évacuation de l'air.
- Positionner le HRA, les boîtes en plastique et les champs bleus pour permettre au HRA de regarder l'œil du sujet lorsqu'il sera prêt.
- Endormir le sujet
- Pendant que le sujet s'endort, préparer le HRA :
 1. Ouvrir l'ordinateur
 2. Ouvrir la source d'électricité du HRA
 3. Positionner la manivelle sur le HRA vis-à-vis le « A » (angiographie) et non sur le « R »
 - a. Bonne position : R ●--- A
 4. Double-cliquer sur le programme « Heidelberg Eye Explorer »
 5. Archive OK → Cancel → OK
 6. New patient (petit bonhomme avec une étoile)
 - a. Last name : GLPX118
 - b. 1st name : G3
 - c. Title : laisser vide

- d. Date of birth : inscrire la date d'arrivée (JJ/MM/AAAA)
 - e. Sexe : M/F
 - f. Patient ID : laisser vide
 - g. Appuyer sur OK
 7. Device type : Spectralis HRA
 - a. Spectralis HRA
 - b. Operator : J
 - c. Study : G3
 8. Appuyer sur OK 2 fois
 9. Choisir OD ou OS
 10. Appuyer sur le bouton ON/OFF en bas à droite sur l'écran du HRA (devrait passer de jaune à vert)
 11. Vérifier que les paramètres de vidéo sont adéquats :
 - a. Cliquer sur FA sur l'écran du HRA
 - b. Cliquer sur « Composite » **2 fois** (ou tout autre mot qui est écrit à droite du bouton Single)
 - c. Vérifier que c'est écrit 45 s.
 - i. Si non, cliquer dessus et ajuster le temps avec les symboles +/- jusqu'à avoir 45 s (secondes)
 - d. Cliquer sur OK
 12. Cliquer sur « IR » sur l'écran du HRA
 13. Cliquer sur « Movie 45s »
- Arroser la patte d'alcool, faire un garrot avec la main et insérer le cathéter dans sa veine céphalique droite ou gauche. Si la veine est difficile à voir, raser un carré de poil dans la région de la patte. Maintenir la pression en proximal sur la veine, avec la main, pour empêcher la fuite de sang.
 - Pendant qu'une personne maintient la pression sur le cathéter, une autre personne se charge d'insérer la seringue sans son aiguille dans le cathéter. Pour se faire, il faut relâcher lentement la pression sur le cathéter pour que le sang veineux vienne rencontrer la seringue et ainsi empêcher l'air de se retrouver dans le conduit.
 - Une fois le cathéter et la seringue assemblés, on peut complètement relâcher la pression sur la veine
 - Placer le sujet sur les boîtes en plastique bleues de telle sorte que son menton repose délicatement devant l'objectif du HRA, avec la tête légèrement inclinée vers l'avant. Pour ce faire, utiliser des sarraus jaunes ou tout autre objet mou pour créer l'inclinaison de la tête voulue.
 - Placer un écarteur sur l'œil à analyser. Si possible, essayer d'écarter également la troisième paupière.
 - Effectuer le focus sur la cornée de l'œil avec la manivelle derrière le HRA.

À PARTIR DE CETTE ÉTAPTE IL EST PRIMORDIAL DE NE PLUS DÉPLACER LE SUJET

- Cliquer sur FA sur l'écran du HRA
- Cliquer sur « Inj. » sur l'écran du HRA **et commencer immédiatement l'injection de Fluorescéine (doit être fait en à peu près 3 secondes)**
 - ****S'il faut remettre à zéro le chronomètre de l'injection, aller sur « Setup » et cliquer sur « Reset Injection Timer »****
- Cliquer sur « Acquire » sur l'écran du HRA
- S'assurer que l'image est bien nette sur l'écran d'ordinateur et qu'on peut voir l'ensemble de la cornée du sujet. Réajuster le focus au besoin.
- Attendre le délai (45s) ou cliquer sur STOP quand l'acquisition désirée est terminée
- Cliquer sur le bouton ON/OFF sur l'écran du HRA
- Cliquer sur « Save Images » sur l'écran de l'ordinateur
- Cliquer sur « Exit »



Regarder et exporter les images:

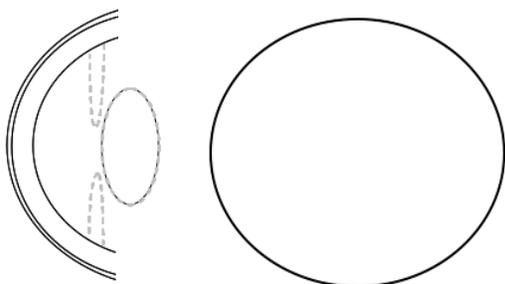
- Exporter en vidéo (AVI) :
 - Faire un clic-droit sur la vidéo, puis cliquer sur : Export → as picture → Sélectionner dossier → Save as : AVI Files (*.avi)
 - Current AVI Codec : Full Frames (Uncompressed) / Quality : 100%
 - Sinon : Set up Codec → Compressor → sélectionner «Full Frames» (en bas) → Cliquer sur OK → Save
- Exporter en images (Bitmap) :
 - Cliquer sur « Expand »
 - Sélectionner les images voulues (en utilisant CTRL + clic)
 - Faire un clic-droit sur une image sélectionnée, puis : Export → As picture → Save as type : BMP Files (*.bmp) → Sélectionner dossier → Save
 - Pour revenir au vidéo, cliquer sur l'icône de dossier supérieur (dossier avec une flèche pointant vers le haut)

****Noter que les fichiers sont volumineux (près de 100 MB par vidéo AVI)****

Annexe 12 : Feuille des examens d'imagerie spécialisée

GLPX: Examen par : Date: Heure: Postop#:

Sédation:	<input type="checkbox"/> Aucune	
	<input type="checkbox"/> Médétomidine (Dexdomitor ou Cepetor):	Dose : mL IM
	<input type="checkbox"/> Atipamézole (Antisedan ou Revertor):	Dose : mL IM
Pupille:	<input type="checkbox"/> Aucune gtte	<input type="checkbox"/> Pilocarpine 0.5% <input type="checkbox"/> Mydracyl 1% <input type="checkbox"/> Cyclogyl 1% <input type="checkbox"/> Phényl 2.5%



Microscopie spéculaire

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> OS | <input type="checkbox"/> OD |
| <input type="checkbox"/> Décompte de cellules effectué | <input type="checkbox"/> Décompte de cellules effectué |
- Commentaires :

Thorlabs

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> OS | <input type="checkbox"/> OD |
| <input type="checkbox"/> Central <input type="checkbox"/> Implant <input type="checkbox"/> Autre : | <input type="checkbox"/> Central <input type="checkbox"/> Implant <input type="checkbox"/> Autre : |
- Commentaires :

Visante

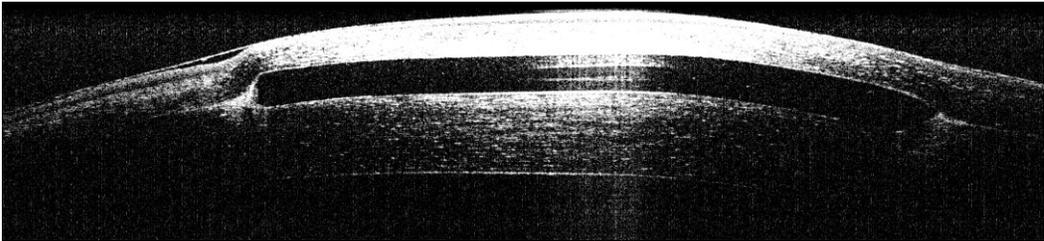
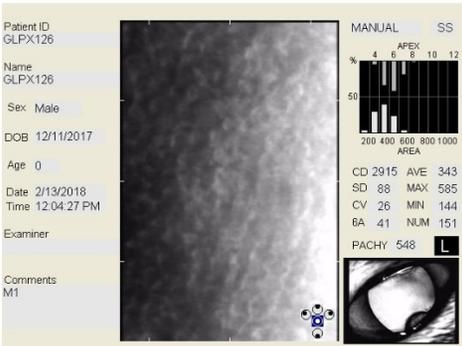
- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> OS Central | <input type="checkbox"/> OD Central |
| <input type="checkbox"/> Anterior segment | <input type="checkbox"/> Anterior segment |
| <input type="checkbox"/> Pachymetry | <input type="checkbox"/> Pachymetry |
| <input type="checkbox"/> Cornea 90 | <input type="checkbox"/> Cornea 90 |
| <input type="checkbox"/> Cornea 180 | <input type="checkbox"/> Cornea 180 |
| <input type="checkbox"/> CorneaX4 | <input type="checkbox"/> CorneaX4 |
| <input type="checkbox"/> OS Implant | <input type="checkbox"/> OD Implant |
| <input type="checkbox"/> Cornea 90 | <input type="checkbox"/> Cornea 90 |
| <input type="checkbox"/> Cornea 180 | <input type="checkbox"/> Cornea 180 |
| <input type="checkbox"/> CorneaX4 | <input type="checkbox"/> CorneaX4 |
- Commentaires :

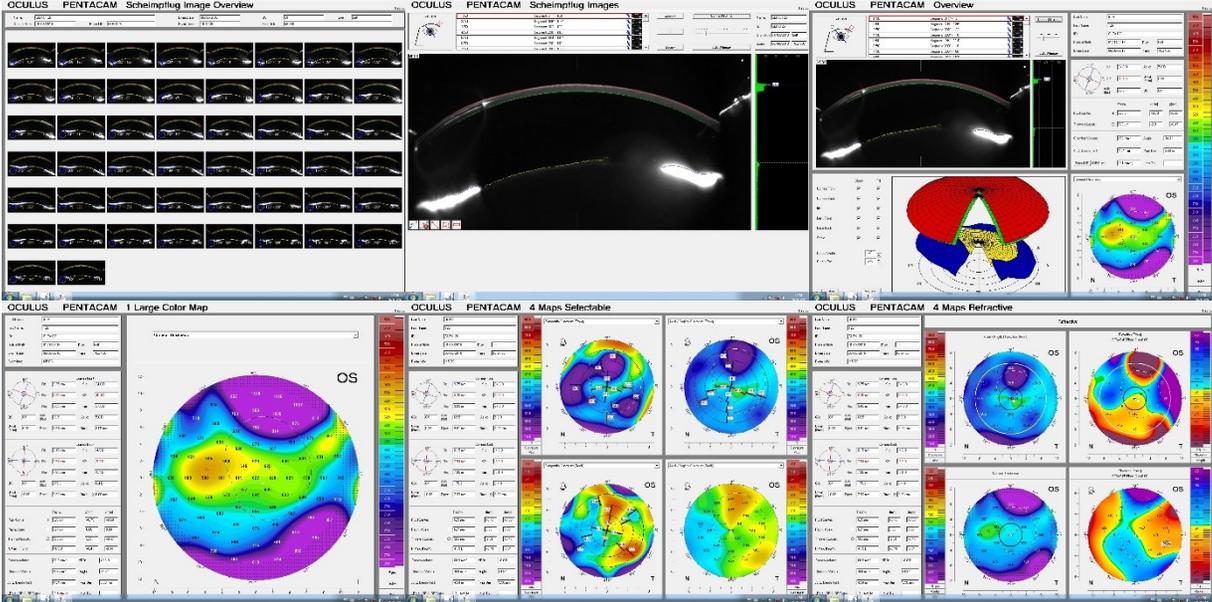
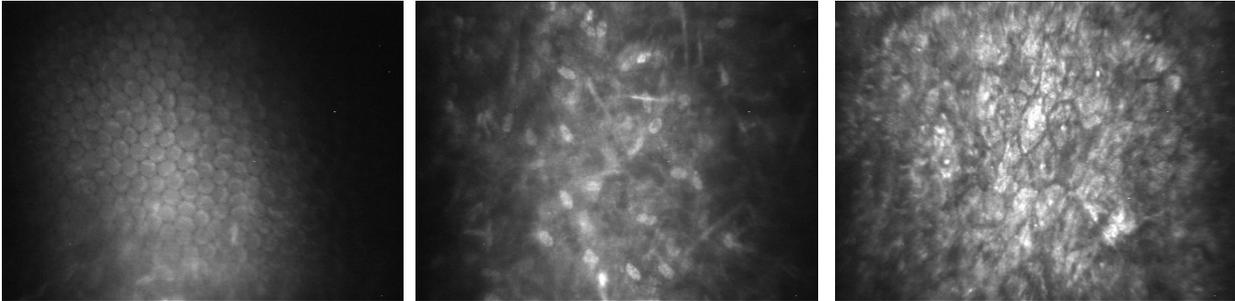
Pentacam

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| <input type="checkbox"/> OS | <input type="checkbox"/> OD |
|-----------------------------|-----------------------------|
- Commentaires :

Confoscan

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| <input type="checkbox"/> OS | <input type="checkbox"/> OD |
|-----------------------------|-----------------------------|
- Commentaires :

Appareil	Images à prendre	Exemples types
Thorlab OCT	3 belles images de l'implant Examen preop : central, inférieur, supérieur, pour les deux yeux	 <p>À prendre au milieu de l'implant, le plus centré possible. Prendre aussi des images d'un bout à l'autre de l'implant pour bien voir sa progression de chaque côté.</p>
Microscopie spéculaire	1 image par œil Examen preop : les deux yeux	 <p>MANUAL SS APEX % 4 6 8 10 12 50 200 400 600 800 1000 AREA CD 2915 AVE 343 SD 88 MAX 585 CV 26 MIN 144 BA 41 NUM 151 PACHY 548 L</p>
OCT Visante	3 images par implant : <ul style="list-style-type: none"> • Anterior • Cornea a 90 • Cornea a 180 Examen preop : central, inférieur, supérieur, pour les deux yeux	 <p>Image Analysis Report Patient name: GLPX126 GLPX Date of birth: 1/15/2018 Patient ID: C2M191607653 Exam date: 1/1/2022 11:34:37 PM Rx: Sphero: 0.0 Cylinder: 0.0 Axis: 0.0 Fresnel Angle: 0.0 Polarization: 64.0 Orientation: 160.0 Scale: GLP - Anterior segment (G2)</p> <p>Image Analysis Report Patient name: GLPX126 GLPX Date of birth: 1/15/2018 Patient ID: C2M191607653 Exam date: 1/2/2022 12:03:37 AM Rx: Sphero: 0.0 Cylinder: 0.0 Axis: 0.0 Fresnel Angle: 0.0 Polarization: 64.0 Orientation: 160.0 Scale: GLP - Cornea 90 (G1)</p> <p>Image Analysis Report Patient name: GLPX126 GLPX Date of birth: 1/15/2018 Patient ID: C2M191607653 Exam date: 1/2/2022 12:03:48 AM Rx: Sphero: 0.0 Cylinder: 0.0 Axis: 0.0 Fresnel Angle: 0.0 Polarization: 64.0 Orientation: 0.0 Scale: GLP - Cornea 180 (G1)</p> <p>Anterior Cornea à 90° Cornea à 180°</p> <p>À prendre au milieu de l'implant, le plus centré possible</p>

<p>Pentacam</p>	<p>1 image par œil</p> <p>Examen preop : les deux yeux</p>	 <p>The screenshot displays the Pentacam software interface. It includes a grid of Scheimpflug images, a large central image of the cornea, and several topographic maps. The maps are color-coded and labeled 'OS' (Oculus Sinister, left eye). The interface also shows various data fields and a color scale on the right side.</p> <p>Cartes générées automatiquement</p>
<p>Confoscan</p> <p>TERMINER LA SESSION AVEC CE TEST (GEL)</p>	<p>1 belle vidéo de l'implant</p> <p>Examen preop : central, inférieur, supérieur, pour les deux yeux</p>	 <p>The three grayscale images show different layers of the cornea. The first image on the left is labeled 'Endothélium', the middle one 'Stroma', and the right one 'Épithélium'. They are arranged horizontally.</p> <p>Extrait d'images provenant de l'enregistrement de la vidéo</p>

Annexe 13 : Kardex des coupes *ex vivo* au laser – SMILE

KARDEX GREFFE INJECTABLE (GLPY)

COUPE AU LASER – CONDITIONS STÉRILES

Matériel

- ___ 1 Cornée pour X implants injectables
- ___ 1 Matériel (implants) injectable

Instruments et paquets stériles

- ___ 1 Boîte d'instruments GREFFE
- ___ 1 Boîte BADIGEONS & POIGNÉES MICROSCOPE
- ___ 2 Paquets de compresses 4x4
- ___ 2 Bacs en acier inoxydable avec couvercle

Soluté et autres liquides

- ___ 1 BSS 500 ml

Fournitures

- ___ 1 Système d'irradiation avec diaphragme (par Émilio ou Marcelo d'OHI)
- ___ 1 Minicentrifugeuse pour tube 1.5ml (sinon par Émilio ou Marcelo d'OHI)
- ___ 1 Lame 57 (Beaver 375700): PRN kératectomie
- ___ 2 Aiguilles 18G (réservée pour aspiration du BSS du sac)
- ___ 1 Aiguilles 30G
- ___ 1 Canules 19G
- ___ 1 Canules 27G (#8065480120)
- ___ 1 Seringue 20 ml (canule 19 pour irrigation BSS)
- ___ 2 Seringue 10 ml (clamber la chambre; 2/chambre)
- ___ 1 Crayon marqueur stérile régulier
- ___ 2 Paquet d'éponges sapin avec poils
- ___ 3 Paquet d'éponges sapin sans poil
- ___ 1 Merocel stérile
- ___ ½ Petri 100mm
- ___ 1 Sharpie noir
- ___ 1 Nylon CU-1 (10-0-12 ; Alcon) ou nylon HGL5 (cornée & limbe)
- ___ 1 Serviettes à main blanches (papier absorbant-salle d'OP de HMR)
- ___ 1 Grand bac en métal avec couvercle – transport de chambre
- ___ 1 Petit bac en métal avec couvercle – transport de chambre
- ___ 2 Tampon d'alcool
- ___ 1 Papier d'aluminium pour les implants injectables (mettre dans la salle de culture)
- ___ 1 Chronomètre (cellulaire)
- ___ 1 Thermomètre avec microsenseur (par Émilio ou Marcelo d'OHI)

Gouttes ophtalmiques

- ___ 1 Vigamox

Champs

- ___ 1 Champ de table stérile
- ___ 1 Champ d'utilité
- ___ 1 Champ Mayo
- ___ 1 Piqués bleu

Autre

- ___ 1 Table à roulettes (emprunter à Josée)
- ___ 1 Petite poubelle (emprunter à Josée)

Gants chirurgicaux

- ___ 3 Isabelle: 5 ½
- ___ 3 FX: 8

À placer à l'entrée de la salle de chirurgie

- ___ Savon
- ___ Chapeau (charlottes)
- ___ Masque
- ___ Gants non stériles pour tout le monde

Boîte à transporter pour une coupe au laser (matériels stériles)

- ___ 1 Chambres artificielles Barron de Katena® (stérile – alcool)
- ___ 1 Crayon Sharpie
- ___ 1 Bac en métal avec couvercle stérile – transport de chambre
- ___ 3 Chapeau (charlottes)
- ___ 3 Masque
- ___ 3 Gants chirurgicaux (2 par personne)
- ___ ½ Pétris 100 mm
- ___ 1 Lame 57 (Beaver 375700):
- ___ 1 Paquet de compresses 4x4
- ___ 2 Seringue 10 ml (clamper la chambre; 2/chambre)
- ___ 1½ Aiguilles 18G
- ___ 2 Canules 19G
- ___ 1 Couteau Crescent
- ___ 1 Couteau 30 (#3775300)
- ___ 1 Couteau aseredge (REFE7510)
- ___ 4 Champ d'utilité
- ___ 1 Kit Trotman microciseau et lame beaver (boîte à FX)
- ___ 1 BSS 500 ml
- ___ 2 Étiquettes stériles (identifier la chambre)
- ___ 2 Paquets d'éponges sapin avec poils
- ___ 2 Paquets d'éponges sapin sans poil
- ___ 1 Pot histologique
- ___ 3 Tampons d'alcool
- ___ 1 Clé USB

Maintien des GLPY

- ___ 1 Seringue 60 ml
- ___ 2 Tubulures
- ___ 1 DMEM

Annexe 14 : Kardex des coupes *ex vivo* manuelles

KARDEX GREFFE INJECTABLE (GLPY)

COUPE MANUELLE – CONDITIONS STÉRILES

Fournitures pour stériliser les chambres (à faire la vieille)

_____	1	Chambres artificielles Barron de Katena
_____	1	Éthanol 70%
_____	1	Eau stérile
_____	2	Grand bac stérile
_____	1	Seringue 10 ou 20ml
_____	1	Pot stérile pour ranger la chambre à l'intérieur
_____	1	Compresse

Fournitures pour la préparation de l'injectable - salle de culture

_____	1	Spray Éthanol 70%
_____	1	Minicentrifugeuse pour eppendorff
_____	1	Bac de glace
_____	1	Vortex ou Sonicateur (à emprunter)
_____	1	Papier d'aluminium

Fournitures pour l'incubation des cornées

_____	1	Bac dans l'incubateur avec de l'eau distillée
_____	1	Bouteille pour recueillir le liquide
_____	1	Bac stérile pour recevoir les cornées
_____	1	Support à cornée
_____	2	Tubulure
_____	1	Papier collant coloré pour identifier les tubulures (in / out)
_____	1	Seringue avec milieu
_____	1	Pousse-seringue

Fournitures pour l'irradiation – dans le coin de la salle de chirurgie

_____	1	Système d'irradiation et thermomètre (OHI)
_____	1	Grande couche bleue sous le système
_____	1	Pousse-seringue
_____	1	Seringue 60ml avec BSS + cap à seringue
_____	1	Tubulure
_____	1	Chronomètre (cellulaire)
_____	1	Boîte avec les lunettes protectrices
_____	1	Collant avec le numéro de la cornée pour mettre sur le bac une fois terminé
_____	1	Feuille pour prendre la température de la cornée aux 10 minutes

Instruments et paquets stériles

_____	1	Boîte d'instruments GREFFE
_____	1	Boîte BADIGEONS & POIGNÉES MICROSCOPE
_____	1	Boîte COUTEAU À DIAMANT (300 um)
_____	1	Paquet de compresses 4x4
_____	1	Boîte BAC EN ACIER

Soluté et autres liquides

_____	1	BSS 500 ml
_____	1	Bouteille eau stérile (sous l'évier)

Fournitures pour l'injection

_____	1	Lame de trépan de Hanna (ou biopsy punch) 6 mm
_____	1	Couteau Crescent (neuf ; pour dissection stromale)
_____	1	Lame couteau 30 (Micro sharp blade 377530) pour couper le fil de suture
_____	1	Lame 57 (Beaver 375700): PRN kératectomie
_____	2	Aiguilles 18G (réservée pour aspiration du BSS du sac)
_____	1	Aiguilles 30G
_____	2	Canules 19G
_____	1	Canules 27G
_____	1	Seringue 30 ml (canule 19 pour irrigation BSS)
_____	2	Seringue 10 ml (clamber la chambre; 2/chambre)
_____	1	Seringue 5 ml (sur aiguille 30G pour injection intraoculaire)
_____	1	Seringue cap VWR : CA10836-706
_____	1	Crayon marqueur stérile régulier
_____	5	Paquet d'éponges sapin (avec et sans poiles)
_____	1	Merocel stérile
_____	1	Pétris 100 mm (préalablement mis dans un sac stérile)
_____	1	Nylon CU-1 (10-0-12 ; Alcon) ou nylon HGL5 (cornée & limbe)
_____	1	Ciseaux
_____	1	Serviettes à main blanches (papier absorbant-salle d'OP de HMR)
_____	10	Tampon d'alcool

Matériel

_____		Cornée pour X implants injectables (demander d'avance à la Banque d'Yeux)
-------	--	---

Gouttes ophtalmiques

_____	1	Vigamox
-------	---	---------

Champs

_____	2	Champ de table stérile (un pour la table de chirurgie et l'autre pour la table des instruments)
_____	1	Utility draps

Gants chirurgicaux

_____	Isabelle: 5 ½	_____	MP : 7½
-------	---------------	-------	---------

À placer à l'entrée de la salle de chirurgie:

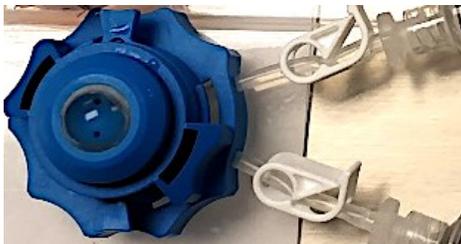
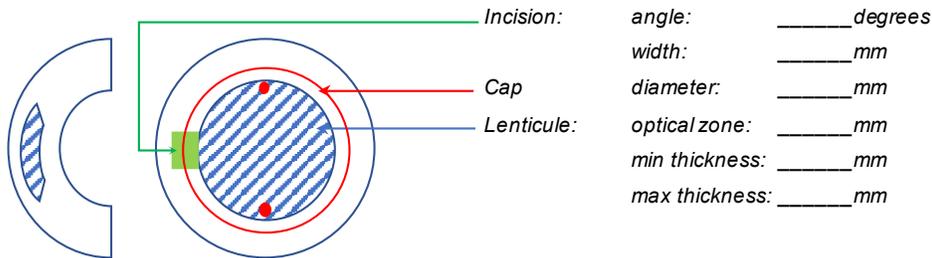
_____	Savon
_____	Chapeau (charlottes)
_____	Masque
_____	Gants non stériles pour tout le monde
_____	Bonnet
_____	Jaquette jaune

Annexe 15 : Détails et compte-rendu des expériences *ex vivo*

GLPY _____ **Experimental Details** *Date* (dd/mm/yyyy): _____

Eye Bank Identification No: _____ OD (Code 3000) OS (Code 4000)
 Date of death: _____
 Donor age: _____
 Endothelial cell count: _____ cells / mm²

Laser Surgery/SMILE/Visumax: *Start:* _____ *End:* _____ *Done By:* ____ / ____
 De-epithelization: Yes No
 Suction ring on a: free cornea mounted cornea
 SMILE surgery by: Dr. Michel Podtetenev



Sutures: *Start:* _____ *End:* _____ *Done By:* ____ / ____
 Manual incision: WxL: _____
 Number of sutures: _____

Preparation of Injectable Implant: *Start:* _____ *End:* _____ *Done By:* ____ / ____

- **Formulation:**
- Total Formulation prep time _____ minutes
- Time between Prep & Inj: _____ minutes

Injection of Implant:

Start: _____ End: _____ Done By: ____ / ____

- Viscosity:
- Approximative volume (Thorlabs):
- Homogeneity (interfaces; bubbles; debris)
- Comments:

Crosslinking:

Start: _____ End: _____ Done By: ____ / ____

- Cycle Frequency: _____ sec on _____ sec off
- Irradiance: _____ mW/cm²
- Total CXL time: _____ minutes
- BSS Irrigation Interval: _____ minutes

Pre- and Follow-up Examinations:

Done By:

Time	LAF	Thorlabs	Visante	Comments
Pre-injection			√	
Post-inject & Pre-CXL		√		
H0 Post-CXL	√	√	√	
H2	√	√	√	
H4	√	√	√	
H6	√	√	√	
D1	√	√	√	
D2	√	√	√	
D3	√	√	√	
D4	√	√	√	
D5	√	√	√	
D6	√	√	√	
W1	√	√	√	
W2	√	√	√	
W3	√	√	√	
W4	√	√	√	

Attachments: SMILE Printout Eye Bank donor form

Annexe 16: Expériences *ex vivo* complémentaires

Expérience C : Impact de la kératotomie, de la lumière bleue et de la riboflavine

❖ Buts :

- Tester sur trois cornées différentes l'effet de la kératotomie seule (C4), l'effet de la kératotomie et de l'irradiation par la lumière bleue (C5), ainsi que l'effet de la kératotomie, de l'injection de riboflavine (sans les autres ingrédients de l'implant) et de l'irradiation par la lumière bleue (C6).

❖ Hypothèse :

- En absence d'implant, il ne devrait pas y avoir d'opacification cornéenne.

❖ Modifications au protocole:

- Une photo à la LAF et OCT sera dorénavant prise avant d'opérer la cornée.

❖ Nombre de cornées opérées : 3 (C4-6)

❖ Type de chirurgie : kératotomie manuelle

❖ Durée du suivi post-op : 24 heures

❖ Résultats :

- C4-6 : aucun heurt lors des manipulations durant cette expérience.
- C4-6 : aucun changement perçu à la LAF (**Figure 63**).
- C6 : légère diffraction lumineuse perçue à l'OCT post réticulation (**Figure 64**).

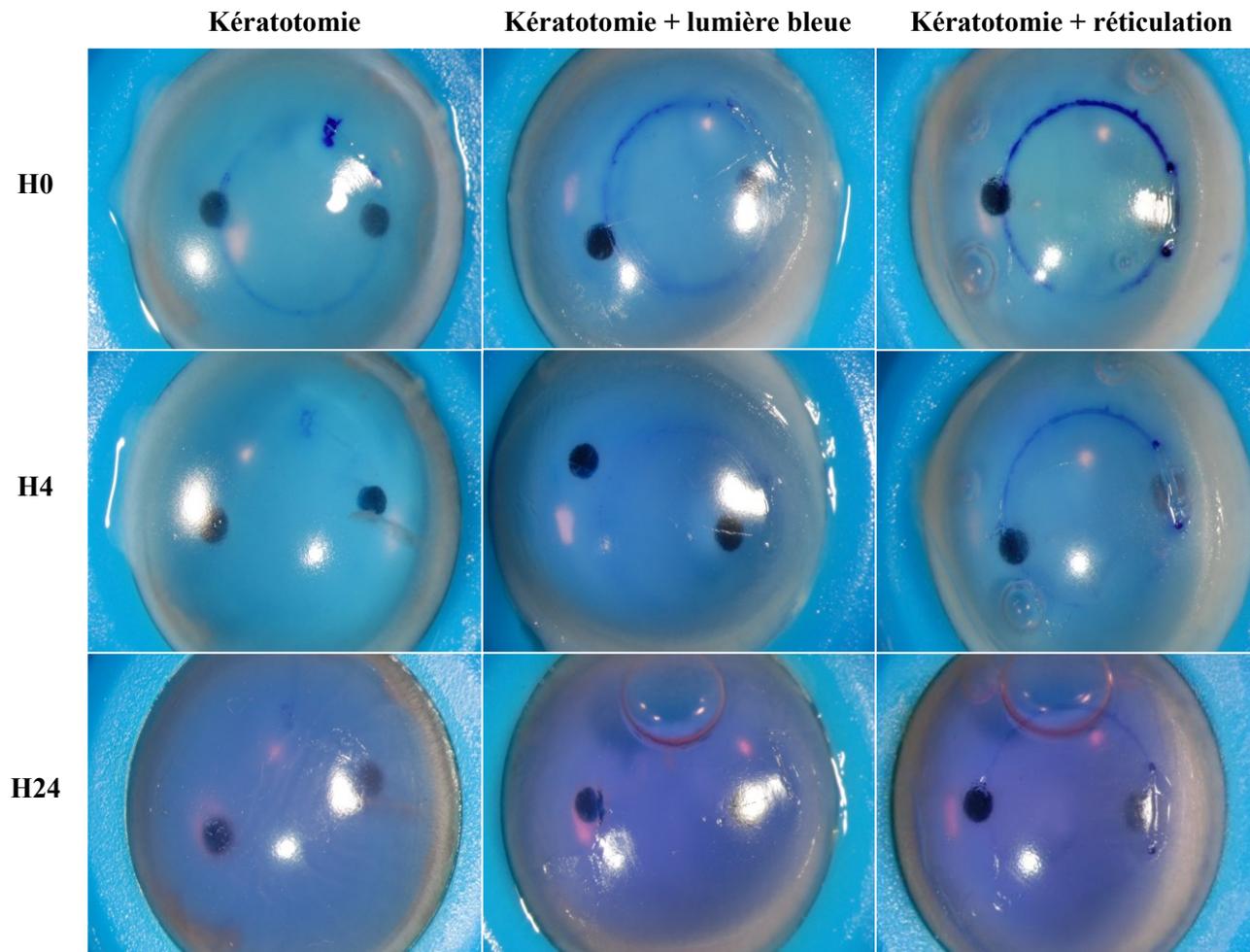


Figure 63. C4-6 : Évolution de la transparence cornéenne sur 24h.

L'image de gauche prise quelques minutes après la réticulation de la riboflavine dans la poche stromale ne montre pas de différence visible d'opacité cornéenne après 4h (image du centre) ou 24h (image de droite). La cornée dans l'image de droite apparaît légèrement rosée à cause de la couleur du milieu de culture qui circule dans la chambre antérieure artificielle.

Légende : H-1 (1 heure préop), H0 (postop immédiat), H4 (4h postop) et H24 (24h postop).

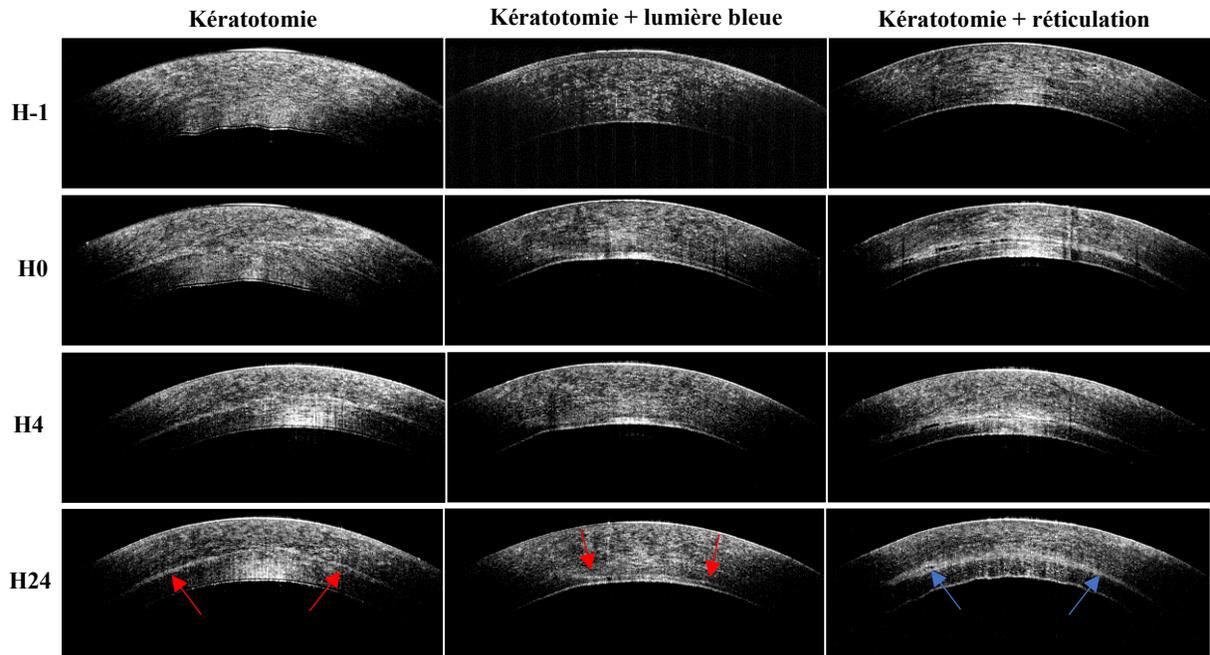


Figure 64. C4-6 : Impact cornéen de la kératotomie, de l'irradiation et de la réticulation.

En comparant le suivi des 3 cornées ci-haut, on peut constater que la kératotomie seule (rangée de gauche) produit une légère désorganisation stromale responsable de la ligne blanche observée le long du trajet de la lame Crescent (flèches rouges). Après l'irradiation de la lumière bleue (rangée du centre), aucune différence n'est notée dans l'apparence du trait de coupe (bien qu'il soit ici anormalement très postérieur : flèches rouges). Enfin, la réticulation de la riboflavine (rangée de droite) est l'étape qui a produit le plus grand changement à l'OCT, avec une zone hyperréfléctive plus épaisse et qui affecte le stroma antérieur et postérieur à la coupe (flèches bleues).

Analyse

Cette simple expérience a permis de mettre en évidence qu'en effet, la réticulation de la riboflavine peut produire une zone hyperréfléctive à l'OCT, mais que ceci ne se traduit pas nécessairement par un résultat dysfonctionnel au niveau de la transparence cornéenne telle qu'à la LAF. Ni la kératotomie manuelle, ni l'irradiation de la lumière bleue ne permettent de reproduire l'opacification cornéenne pourtant visible en seulement 4 heures à la LAF lors de l'expérience B. Il est donc plus probable que ces changements soient en fait dus à la présence de l'implant dans la poche stromale et il serait donc important d'évaluer si l'implant en soi ou sa réticulation provoquent une réaction cornéenne toxique.

Expérience E : Répétabilité de la kératotomie manuelle

❖ Buts:

- Évaluer la variabilité de la profondeur de la kératotomie manuelle en tentant cette fois de viser 150 μm de profondeur plutôt que 350 μm .

❖ Hypothèse :

- Les coupes devraient avoir une profondeur moyenne de 150 $\mu\text{m} \pm 25 \mu\text{m}$.

❖ Modifications au protocole:

- Viser 150 μm de profondeur plutôt que 350 μm lors de la kératotomie manuelle.

❖ Nombre de cornées opérées : 6 (C9-14)

❖ Type de chirurgie : kératotomie manuelle, précoupe sur 3 mm en temporal avec un couteau 20G, avec une angulation perpendiculaire à la surface cornéenne

❖ Durée du suivi post-op : 1 heure

❖ Résultats (mesures faites grâce à l'OCT de Thorlabs™) :

- C9-14 : Profondeur des coupes (épaisseur du mur antérieur) = 163 \pm 71 μm (**Figure 65**)
- C9-14 : Pachymétrie centrale = 633 \pm 46 μm

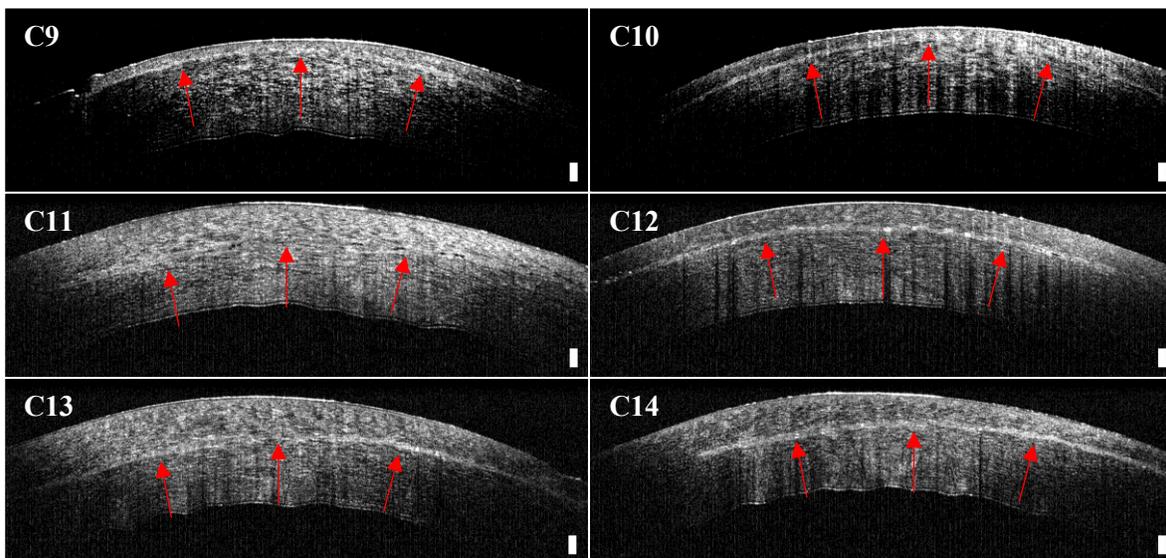


Figure 65. C9-14 : Répétabilité de la kératotomie manuelle.

Ces clichés capturés grâce à l'OCT Thorlabs™ mettent en évidence la variabilité de la profondeur de coupe de la kératotomie manuelle. Bien que toutes les coupes soient visiblement dans la portion antérieure de la cornée, on voit facilement que les coupes ne sont pas toutes à la même profondeur et que certains (C13 et C14) ont même une profondeur qui augmente visiblement le long du trajet de la lame. L'œdème cornéen, présent seulement dans la C11, rend plus difficile la visualisation du trajet de la lame.

Barre d'échelle verticale : 100 μm

Analyse

Cette simple expérience a permis de confirmer que les coupes manuelles sont effectivement source d'une variabilité significative dans la profondeur de la poche stromale, mais que la moyenne des coupes tourne quand même autour de la valeur cible (ici de 150 μm). La technique SMILE reste donc la méthode à privilégier, si accessible, pour s'assurer d'avoir toujours les mêmes paramètres de coupe.

Expérience I : Concentration en oxygène lors de la réticulation

❖ But :

- Reproduire exactement les conditions de réticulation de la cornée dans un modèle *in vitro* et les comparer à un modèle à taux d'oxygène atmosphérique (21%).

❖ Hypothèse :

- Assumant que la réaction de type II ait effectivement lieu dans la poche stromale, menant à une déplétion en oxygène en quelques secondes et que cette déplétion empêche l'implant de se solidifier, car ceci nécessite une réaction de type II de façon prédominante, un implant irradié en présence d'oxygène deviendra solide, et celui irradié en l'absence d'oxygène sera moins solide ou restera sous forme liquide.

❖ Formulation et réticulation des implants :

- Hydrogel #587 (numéro utilisé par le labo d'ÉA) : humidité et O₂ à 21%
- Hydrogel #588 : humidité et N₂ (O₂ à 1%)

❖ Résultats :

- L'hydrogel #587, irradié sous un niveau atmosphérique d'oxygène forme un implant solide, facilement manipulable par des pinces et qui garde cette consistance durant plus d'un mois.
- L'hydrogel #588, irradié à un niveau faible d'oxygène, demeure sous forme liquide, bien qu'une fine couche plus solide apparaisse à sa surface.

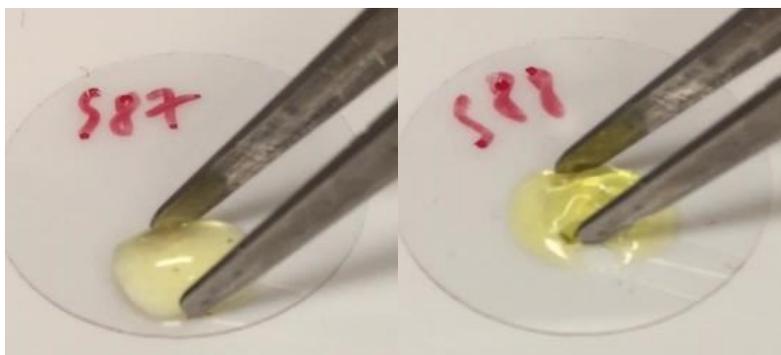


Figure 66. Consistance d'implants produits à un taux d'oxygène atmosphérique ou faible.

L'hydrogel #587 a été produit dans des conditions humides, mais à un taux d'O₂ atmosphérique (21%), alors que l'hydrogel #588 a été produit à des conditions humides et sous une chambre à N₂ qui vient imiter l'environnement stromal pendant l'irradiation de la lumière. L'hydrogel #587 est saisissable à l'aide de pince et se plie lorsqu'on applique de la pression sur ses bords. L'hydrogel #588, bien qu'une fine couche plus solide soit présente à sa surface, se déforme et brise lors qu'on tente de le saisir. Ces images ont été capturées par Dr Marcelo Muñoz, PhD, à l'UOHI, le 5 juillet 2018.

Analyse

Les résultats montrent assez franchement que les implants ont effectivement besoin d'un taux d'oxygène atmosphérique constant pour se solidifier. En sachant que la concentration d'oxygène prend 15 secondes pour chuter à 3 mW/cm² à 25 °C (température pièce), et en 5 secondes à 30 mW/cm², qu'elle prend 3 à 4 minutes pour revenir à son niveau de base quand la lumière est éteinte (avec une vitesse initiale assez rapide cependant : **Figure 58**)²⁹⁸ et que nous utilisons une intensité lumineuse de 5 mW/cm², il pourrait être possible d'utiliser une lumière pulsatile d'intensité courte (par ex. 2,5 secondes allumée pour 2,5 secondes éteinte) pour éviter de consommer entièrement l'oxygène dans la poche stromale et laisser le temps à la concentration en oxygène de remonter un peu à chaque fois. En fait, en utilisant les mêmes conditions environnementales que l'hydrogel #588, le laboratoire d'EA a été en mesure de former un gel aussi consistant que l'hydrogel #587 en utilisant une lumière pulsée par intervalle de 2,5 secondes.

Maintenant qu'il a été démontré que la confection d'implant solide était possible *in vitro* en reproduisant les conditions de la cornée, il faut mettre le modèle *ex vivo* à l'essai. D'une part, il serait pertinent de voir comment ce dernier hydrogel (#614) préformé *in vitro* va évoluer lorsqu'inséré dans une cornée pendant 1 mois. D'autre part, il faut maintenant voir si l'utilisation d'une lumière pulsée est une solution adéquate au problème de déplétion en oxygène dans la poche stromale.