



HAL
open science

Etude expérimentale de faisabilité d'une photothérapie au rose Bengale sur la cornée du cheval

Laura Lassalle

► **To cite this version:**

Laura Lassalle. Etude expérimentale de faisabilité d'une photothérapie au rose Bengale sur la cornée du cheval. Médecine vétérinaire et santé animale. 2019. dumas-04423158

HAL Id: dumas-04423158

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04423158v1>

Submitted on 29 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ETUDE EXPERIMENTALE DE FAISABILITE D'UNE PHOTOTHERAPIE AU ROSE BENGAL SUR LA CORNEE DU CHEVAL

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

LASSALLE Laura
à SAINT-PALAIS (64)

Directeur de thèse : M. Jean-Yves DOUET

JURY

PRESIDENT :
M. Pierre FOURNIE

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Jean-Yves DOUET
Mme Isabelle RAYMOND-LETRON

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
M. Matthieu CREMOUX

Docteur vétérinaire

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur: Professeur Pierre SANS

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie - Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, (Emérite) - *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1°
CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2°
CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et Économie de la santé animale*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT
AGRICOLE**

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS
CLASSE**

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe
normale)**

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **HERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

CHARGES D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

M. **BOLON Pierrick**, *Production et pathologie aviaire*
M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophtalmologie*
Mme **TOUSSAIN Marion**, *Pathologie des équidés*

**ENSEIGNANT DE PREMIERE ANNEE COMMUNE AUX ETUDES
VETERINAIRES**

Mme **GAUCHARD Cécile**, *Biologie-écologie-santé*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*

M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*

M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*

M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

M. **LESUEUR Jérémie**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

REMERCIEMENTS

A Monsieur Pierre Fournié, président du jury de soutenance de thèse

Chef de service d'Ophtalmologie à l'hôpital Pierre-Paul Riquet

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Qui me fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

Hommages respectueux

A Madame Isabelle RAYMOND-LETRON, assesseur du jury de soutenance de thèse

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Anatomie pathologique

Qui me fait l'honneur de participer à mon jury de thèse,

Sincères remerciements

A Monsieur Jean-Yves DOUET, directeur de thèse

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Ophtalmologie

Qui m'a fait l'honneur d'encadrer cette thèse,

Pour son aide précieuse dans la réalisation de ce travail,

Sincères remerciements

A Monsieur Matthieu CREMOUX, membre invité du jury de soutenance de thèse

Docteur vétérinaire

Qui m'a fait l'honneur de travailler sur ce projet

Pour son aide précieuse dans la réalisation des expérimentations et les recherches bibliographiques,

Pour ses conseils et sa disponibilité,

Sincères remerciements

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	10
I. RAPPELS ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES ^{1,2}	12
A. Les tuniques de l'œil.....	13
a) La tunique fibreuse	13
b) La tunique vasculaire.....	15
c) La tunique nerveuse	17
B. Les milieux de l'œil	17
a) L'humeur aqueuse.....	17
b) Le cristallin	18
c) Le corps vitré.....	18
C. Les mécanismes de cicatrisation de la cornée	18
a) Cicatrisation de l'épithélium cornéen	18
b) Cicatrisation du stroma.....	19
c) Cicatrisation de l'endothélium cornéen.....	20
II. LES KERATOPATHIES ULCERATIVES CHEZ LE CHEVAL	20
A. Etiologie des ulcères cornéens chez le cheval	21
a) Ulcères traumatiques.....	21
b) Ulcères bactériens et mycosiques	24
c) Kératite ulcéreuse présumée virale	26
d) Ulcère d'exposition : le syndrome de l'œil sec.....	26
e) Cas particulier des abcès cornéens.....	28
B. Diagnostic.....	29
C. Traitement	30
a) Ulcère épithélial simple.....	30
b) Ulcère bactérien ou mycosique	31
III. UTILISATION DU <i>CROSS-LINKING</i> DANS LE TRAITEMENT DES KERATOPATHIES	35
A. Présentation de la technique de <i>cross-linking</i> (riboflavine, UV-A)	35
a) Mécanisme	36
b) Applications cliniques	38
c) Utilisation du <i>cross-linking</i> cornéen en ophtalmologie vétérinaire	40

B.	Optimisation du <i>cross-linking</i> avec association à l'iontophorèse	42
C.	Photothérapie au rose Bengale, état des lieux des connaissances actuelles 44	
a)	Mécanisme	45
b)	Applications cliniques	47
IV.	ETUDE EXPERIMENTALE DE FAISABILITE D'UNE PHOTOTHERAPIE AU ROSE BENGALE CHEZ LE CHEVAL	53
A.	Matériel et méthodes	53
B.	Résultats	60
a)	Validation de la méthode de mesure	60
b)	Impact de l'épithélium sur la diffusion du rose Bengale	61
c)	Effet du courant électrique	63
d)	Effet de la lumière	64
C.	Discussion	67
	CONCLUSION	73
	BIBLIOGRAPHIE	74
	ANNEXES	90

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Organisation générale du globe oculaire. Source : Dr Jean-Yves DOUET, Dr Sylvain MEDAN	12
Figure 2 - Coupe histologique de la cornée du cheval x40. Source : d'après Equine Ophthalmology, Gilger (2011).....	13
Figure 3 - Ulcères cornéens superficiels chez le cheval (crédits photos ENVT ophtalmologie)	22
Figure 4 - Différents types de plaie cornéenne chez le cheval (crédits photos ENVT ophtalmologie)	23
Figure 5 - Ulcères cornéens infectés chez le cheval (crédits photos ENVT ophtalmologie)	25
Figure 6 - Abcès cornéens chez le cheval (crédits photos ENVT ophtalmologie).....	29
Figure 7 - Prise en charge d'un ulcère épithélial chronique (crédits photos ENVT ophtalmologie)	31
Figure 8 - Exemple de prise en charge chirurgicale d'ulcères cornéens	34
Figure 9 - Structure de la riboflavine.....	36
Figure 10 - Mécanismes d'oxydation photosensibilisée. D'après Foote (1987) et Kashaf et Hamblin (2018)	37
Figure 11 - Résumé des principales utilisations du cross-linking cornéen.....	38
Figure 12 - Exemple d'utilisation du cross-linking pour traiter une kératomycose chez un cheval (A)Kératomycose confirmée à la cytologie (coloration fluorescéine et rose Bengale) (B) Kératectomie lamellaire réalisée sur cheval sédaté. (C) administration de riboflavine par iontophorèse (IONTOFORVET ND) 2 cycles de 1mA.min réalisés pour couvrir l'ensemble de la zone à traiter (D) illumination lampe UV (368 nm), 10mW.cm ² , pendant 9 min, pour énergie totale de 5.4 J. Evolution de la cicatrisation à J2 (E), J6 (F), J15 (G) et J40 (H)	42
Figure 13- Structure du rose Bengale.....	45
Figure 14 – Spectre d'absorption du rose Bengale. Source : Cherfan et al. (2015)..	45
Figure 15 - Procédure d'iontophorèse, à l'aide du dispositif Iontoforvet ND	54
Figure 16 - Nombre de cornées dans les conditions comparées épi-on/épi-off	56
Figure 17 - Nombre de cornées par condition pour les différents protocoles en épi-off	57
Figure 18 - Nombre de cornées pour les protocoles avec lumière	58
Figure 19 - Exemple de mesures effectuées dans ImageJ.....	59
Figure 20 - Exemple de représentation des 3 lieux de mesure, en jaune, bleu et vert.	59
Figure 21 - Répartition des écarts à la moyenne des mesures par les 2 opérateurs	60
Figure 22 - Répartition des écarts de pourcentages de pénétration selon les observateurs.....	61
Figure 23 - Comparaison des cornées épi-on/épi-off.....	62
Figure 24 – Effet des conditions d'iontophorèse sur la diffusion du rose Bengale	63
Figure 25 - Effet de la lumière sur l'épaisseur totale des cornées	64
Figure 26 - Mesures de pachymétrie	65

Figure 27 - Image après recoupe d'une cornée traitée par instillation avec du rose Bengale 1%.	67
Figure 28 - Désépithélialisation incomplète avec conservation de la basale de l'épithélium. On note l'absence de pénétration stromale du rose Bengale	68
Figure 29 - Réalisation d'une iontophorèse de rose Bengale 1% sur un cheval sédaté (A) Kératectomie préalable pour retirer un abcès cornéen d'origine mycosique (B) Dispositif en place (C) Aspect post traitement	70
Figure 30 - Effet du traitement Cross-linking. Les 2 cornées ont reçu le même protocole d'iontophorèse après désépithélialisation. Celle de gauche a été exposée à 10 min de lumière verte (550nm). Notez l'aspect compacté et très réorganisé du stroma antérieur, par ailleurs coloré en rose	71
Figure 31 - Cas cliniques de kératites infectieuses traitées par photothérapie au rose Bengale et lumière verte	72

LISTE DES ABREVIATIONS

MMP = métalloprotéinases de la matrice

EHV = herpes virus équin

KCS = kératoconjonctivite sèche

ROS = reactive oxygen species

CXL = *cross-linking* de la cornée (riboflavine, UV-A)

PACK-CXL = photo activated chromophore for infectious keratitis

I-CXL = iontophorèse et *cross-linking* de la cornée (riboflavine, UV-A)

RGX = *cross-linking* de la cornée (rose Bengale, lumière verte)

PDT = thérapie photodynamique

INTRODUCTION

Les affections oculaires sont le troisième motif de consultation le plus fréquent en pathologie équine, derrière les boiteries et les coliques. Parmi ces affections, les ulcères cornéens représentent une dominante pathologique majeure. Les ulcères sont des lésions douloureuses pour l'animal et, quel que soit leur grade, peuvent mettre en jeu la fonction visuelle. La qualité du diagnostic étiologique est souvent déterminante pour le pronostic et nécessaire à la mise en œuvre d'un traitement adapté le plus rapidement possible. En effet, les causes sont diverses et les échecs thérapeutiques relativement fréquents. De plus, l'arsenal thérapeutique médical est limité, notamment pour les affections fongiques. Le traitement chirurgical est parfois indispensable afin de conserver un œil fonctionnel.

Une nouvelle approche thérapeutique s'est développée en ophtalmologie vétérinaire : le *cross-linking* cornéen. Utilisé en ophtalmologie humaine depuis quelques années, les premiers travaux en médecine vétérinaire sont prometteurs avec des effets sur la réticulation du collagène mais aussi sur la résistance à la digestion enzymatique et un effet antimicrobien. Cette technique repose sur la libération de radicaux libres par un chromophore sous l'effet d'un rayonnement lumineux. La technique princeps utilise la riboflavine comme chromophore et une source de lumière UV. Les premiers résultats dans le traitement des kératites infectieuses du cheval étaient encourageants, mais la technique reste à améliorer, notamment à cause d'un effet qui resterait très superficiel. Parallèlement, des données *in vitro* suggèrent que l'activité anti-infectieuse d'une photothérapie réalisée au rose bengale, serait supérieure à celle obtenue avec de la riboflavine. Cependant, c'est une molécule de poids moléculaire important, sa diffusion au sein de la cornée peut donc être un facteur limitant à son usage notamment sur des cornées épaisses, comme celle du cheval.

Après des rappels d'anatomie et de physiologie de la cornée, l'étiologie des ulcères cornéens, les méthodes diagnostiques et les options thérapeutiques seront présentées. Nous développerons également la technique de *cross-linking* et les données actuelles en ophtalmologie vétérinaire. Enfin, au travers de cette étude expérimentale, nous évaluerons la possible utilisation du rose Bengale en photothérapie sur des cornées de chevaux, en s'intéressant à différents protocoles d'administration et leurs éventuels effets sur la profondeur de diffusion du colorant.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. RAPPELS ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES ^{1,2}

L'œil est l'organe clé de la vision : il joue le rôle de récepteur de l'information visuelle, le nerf optique permet la transmission au cortex occipital qui assure l'intégration des données et donc la perception visuelle. Chez les chevaux et autres herbivores, les yeux sont situés latéralement afin d'avoir un champ visuel large. Le globe oculaire est contenu dans l'orbite dont il occupe environ 1/5 du volume total. Le reste de l'espace est rempli par les muscles oculomoteurs, les faisceaux vasculo-nerveux et la graisse orbitaire.

Le globe oculaire est constitué de trois tuniques concentriques (tunique fibreuse, tunique vasculaire et tunique nerveuse) délimitant les chambres oculaires contenant les milieux réfringents (humeur aqueuse, cristallin et corps vitré).

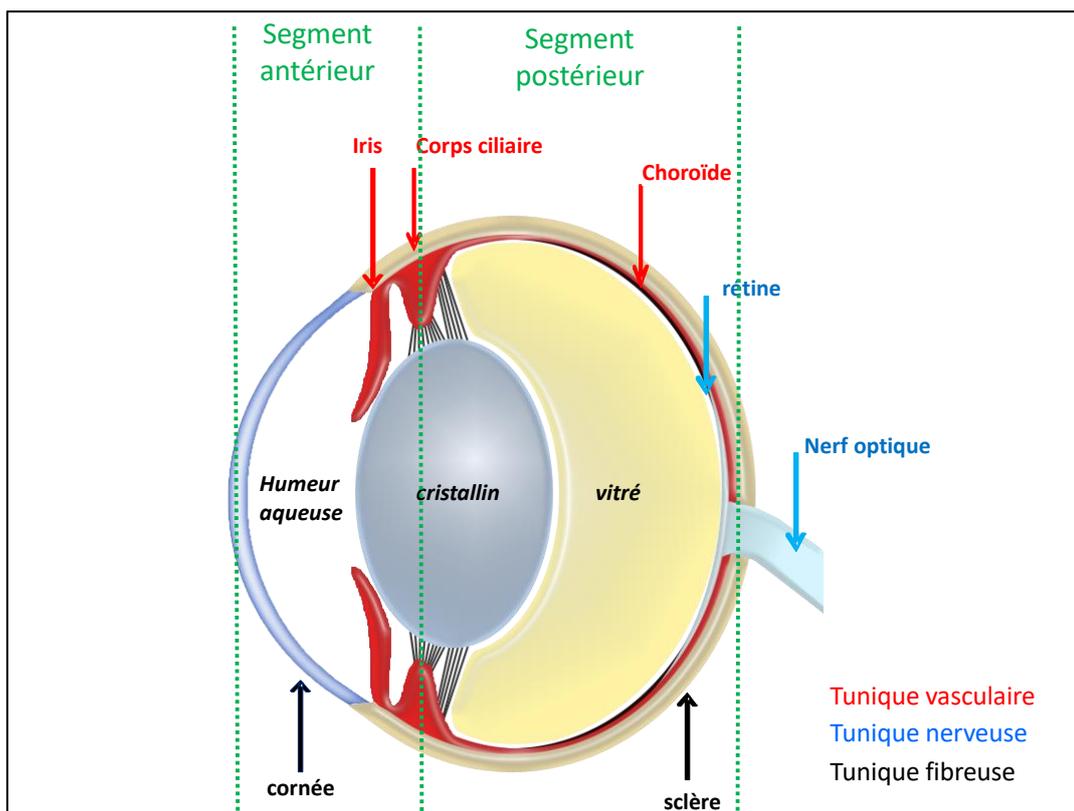


Figure 1 - Organisation générale du globe oculaire. Source : Dr Jean-Yves DOUET, Dr Sylvain MEDAN

A. Les tuniques de l'œil

a) La tunique fibreuse

La tunique fibreuse se compose de la cornée, située antérieurement et légèrement convexe, et de la sclère, plus étendue postérieurement, qui se rejoignent au niveau du limbe.

i. La cornée

La cornée est complètement transparente, lisse et avasculaire. Elle est l'interface entre le milieu extérieur et l'œil. Elle représente le premier dioptré du système optique oculaire. Chez le cheval, son épaisseur est de 0.8 mm en périphérie et 1 à 1.5 mm au centre. La cornée est composée de quatre couches :

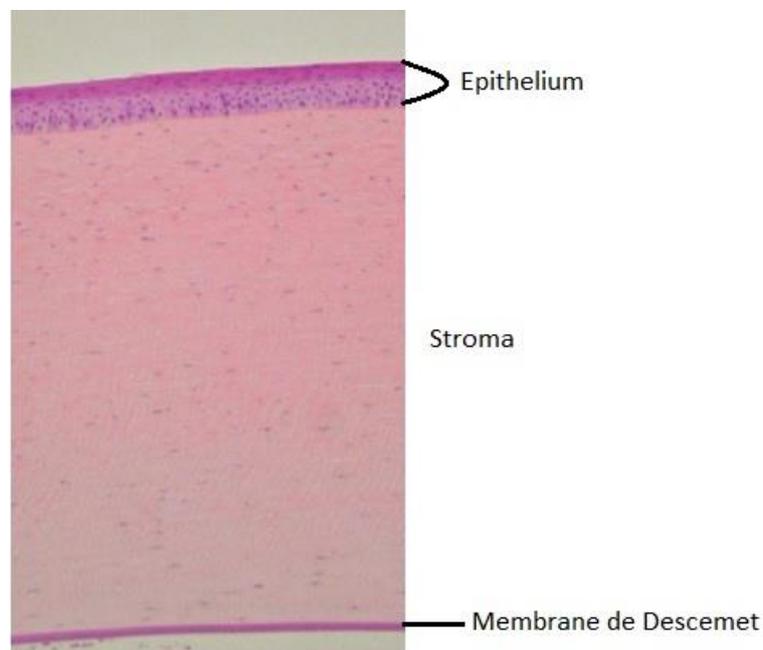


Figure 2 - Coupe histologique de la cornée du cheval x40. Source : d'après *Equine Ophthalmology*, Gilger (2011)

- L'épithélium : c'est la couche la plus superficielle, qui représente environ 10% de l'épaisseur totale de la cornée. L'épithélium est pavimenteux, pluristratifié mais non kératinisé, et a des propriétés lipophiles. Il est recouvert par le film lacrymal et repose sur la membrane de Bowman, couche acellulaire constituée de microfilaments de collagène, rarement visible chez le cheval.

- Le stroma : il représente environ 90% de l'épaisseur de la cornée et est hydrophile. Sa teneur en eau est d'environ 75-85%, il est donc relativement déshydraté comparé aux tissus adjacents. Il est composé de faisceaux de fibres de collagènes entrelacés, principalement de collagène de type I mais également de type III, V, VI et XII dans une moindre mesure. Les fibrilles de collagène sont immergées dans une substance fondamentale de glycosaminoglycanes (sulfate de kératane et de dermatane, sulfate d'héparane, acide hyaluronique, sulfate de chondroïtine, chondroïtine-6-sulfate et chondroïtine-4sulfate) et de glycoprotéines. On retrouve également des kératocytes (fibrocytes) et quelques leucocytes dispersés au sein de cette matrice. Les kératocytes et l'endothélium sont responsables de la synthèse des glycosaminoglycanes du stroma. Les kératocytes peuvent également se transformer en myofibroblastes lors de lésion du stroma afin de permettre la cicatrisation.

- La membrane de Descemet : membrane basale de l'endothélium, relativement élastique et composée de fibrilles de collagène de type I, III, IV, V, VI et VIII. Elle est produite continuellement par l'endothélium et s'épaissit donc avec l'âge. Elle est fortement extensible et résistante. Elle permet de lier le stroma profond et l'endothélium.

- L'endothélium : c'est une couche unicellulaire formée de cellules plates, régulières, hexagonales. Il forme une barrière physique incomplète entre la cornée et l'humeur aqueuse. La fonction principale de l'endothélium est de maintenir la transparence de la cornée en régulant son hydratation.

La cornée étant avasculaire, elle est nourrie à partir du film lacrymal, de l'humeur aqueuse et des vaisseaux du limbe. En revanche, la cornée est richement innervée, notamment sur sa partie superficielle, par les nerfs ciliaires longs issus de la branche ophtalmique du nerf trijumeau. Les atteintes superficielles de la cornée sont donc généralement réputées plus douloureuses que les atteintes profondes.

ii. La sclère

Elle représente environ les 5/6 de la surface de l'enveloppe fibreuse chez l'homme et les carnivores. La limite antérieure de la sclère forme le limbe scléro-cornéen. A l'arrière la lame criblée permet le passage des fibres du nerf optique. L'épaisseur de la sclère est la plus fine à l'équateur. La sclère a une fonction de "squelette" du globe ce qui implique un rôle de maintien et de protection mécanique. C'est également la zone d'insertion des muscles oculomoteurs, responsables des mouvements du globe, et une voie de passage des éléments nerveux (dont le nerf optique) et vasculaires.

b) La tunique vasculaire

La tunique vasculaire, également nommée uvée, se situe entre la tunique fibreuse et la rétine. Elle est formée par l'iris, le corps ciliaire et la choroïde.

i. L'iris

L'iris est situé en avant du cristallin et joue le rôle de diaphragme en régulant le diamètre de la pupille. Au centre de l'iris, concentriquement au bord pupillaire, se trouve le muscle sphincter de l'iris qui permet le myosis, tandis que le muscle dilatateur de la pupille s'étend vers la périphérie de l'iris afin de permettre la mydriase. L'iris est en continuité avec l'endothélium cornéen par l'intermédiaire du ligament pectiné pour former l'angle irido-cornéen, responsable du drainage de l'humeur aqueuse.

ii. Le corps ciliaire

Portion intermédiaire de l'uvée, le corps ciliaire est classiquement dichotomisé en deux structures : le muscle ciliaire, responsable de l'accommodation, et les procès ciliaires, lieu de production de l'humeur aqueuse.

Le cheval ayant une faible capacité d'accommodation, le corps ciliaire est peu développé et possède une forme plus aplanie que chez l'homme où l'accommodation est très importante. Antérieurement, il reçoit la racine de l'iris. Cette insertion conditionne le degré d'ouverture de l'angle iridocornéen. C'est à ce niveau que commence le muscle dilatateur de l'iris. La zone intermédiaire, appelée *pars plicata*, correspond aux procès ciliaires, lieu de production de l'humeur aqueuse vers la chambre postérieure. Ces procès ciliaires sont également reliés aux fibres zonulaires (Zonule de Zinn), attachées au cristallin, et participent donc au phénomène d'accommodation via le muscle ciliaire.

La partie postérieure appelée *pars plana* est la zone de transition vers la choroïde et la rétine.

iii. La choroïde

La choroïde est richement vascularisée et pigmentée. Elle assure la vascularisation de la rétine. Elle se compose de la lame suprachoroïdienne (au contact de la *lamina fusca* de la sclère), de la lame vasculaire richement vascularisée, de la zone du tapis sur la partie supérieure du fond d'œil (aire de couleur variable, de nature fibreuse chez les Herbivores, qui réfléchit la lumière et permet l'adaptation à la vision nocturne), et de la lame choroïdocapillaire qui assure la nutrition des couches rétinienne externes et reliée à la rétine par la membrane de Bruch.

c) La tunique nerveuse

La tunique nerveuse correspond à la rétine qui est composée de deux parties délimitées par l'*ora serrata* : la partie aveugle (cellules pigmentaires) sur les procès ciliaires et l'iris, et la partie fonctionnelle (photorécepteurs) sur toute la partie postérieure de l'œil. Le disque optique correspond à l'interface de la rétine avec le nerf optique.

B. Les milieux de l'œil

Afin d'atteindre la rétine, la lumière doit traverser la cornée puis différents milieux réfringents contenus dans le globe oculaire.

a) L'humeur aqueuse

L'humeur aqueuse est le fluide présent dans les chambres postérieure et antérieure de l'œil. Produite par les procès ciliaires, partie intégrante du corps ciliaire, l'humeur aqueuse chemine ensuite jusqu'à la chambre antérieure par la pupille, pour atteindre finalement l'angle iridocornéen après lequel elle intègre la circulation générale.

Son existence est nécessaire au maintien d'un tonus oculaire rendant possible la fonction visuelle. Elle possède un rôle optique de par sa transparence, un rôle nutritionnel de par sa composition chimique et un rôle émonctoire par évacuation des produits du catabolisme. Elle contribue ainsi à la nutrition du cristallin, de la cornée et des structures de l'angle iridocornéen (AIC) et permet l'élimination des déchets issus du catabolisme.

b) Le cristallin

Le cristallin est une lentille transparente biconvexe élastique située en arrière de l'iris, suspendu par les zonules au centre du corps ciliaire. Il permet l'accommodation grâce à son élasticité et à l'action du muscle ciliaire.

c) Le corps vitré

Le vitré occupe près de 2/3 du volume postérieur du globe oculaire. C'est un gel qui comble le segment postérieur et maintient en place la rétine. Il est constitué de fibrilles de collagène arrangées au hasard, entrecroisées en tous sens, et de molécules d'acide hyaluronique occupant les espaces délimités par les fibrilles. Ces constituants ont pour fonction de fixer des molécules d'eau (le vitré est constitué de 99 % d'eau). Il est délimité par une pseudo-membrane constituée de fibrilles vitréennes appelée hyaloïde. Celle-ci est adhérente à la capsule postérieure du cristallin dans la région équatoriale du bulbe, en regard de la *pars plana* et autour de la papille optique.

C. Les mécanismes de cicatrisation de la cornée

La cornée étant avasculaire, la cicatrisation est particulière et spécifique. Selon la profondeur de l'atteinte cornéenne, les mécanismes de cicatrisation de la cornée sont différents.

a) Cicatrisation de l'épithélium cornéen

L'épithélium cornéen constitue la barrière principale de la cornée. Un turn-over régulier de 7 jours des cellules épithéliales est permis par les cellules basales qui assurent le renouvellement en se divisant. Les cellules épithéliales superficielles sont alors éliminées dans les larmes³. Lors d'une atteinte de l'épithélium cornéen, on observe une phase de latence de quelques heures où les cellules en marge de la

lésion réorganisent leurs jonctions avec les cellules adjacentes, puis les cellules basales migrent vers la lésion et reprennent la mitose, avec un comblement de la lésion en 72h en l'absence de complications ^{4,5}. Les cellules souches du limbe assurent le renouvellement des cellules basales ⁶.

La fibronectine joue un rôle clé dans la cicatrisation épithéliale. Elle est produite par les cellules basales de l'épithélium et les kératocytes du stroma, mais on en retrouve également dans les larmes. Elle forme une matrice temporaire le temps que les cellules épithéliales comblent la lésion et attire également les leucocytes, favorisant la phagocytose de potentielles bactéries ^{6,7}.

Lors d'atteinte de la membrane basale, la ré-épithélialisation est rapide mais fragile durant plusieurs semaines, le temps de reformer la membrane basale et de consolider son ancrage au stroma ^{5,6}.

b) Cicatrisation du stroma

Lors de lésion du stroma, on observe le même phénomène de comblement par la fibronectine produite par les kératocytes adjacents à la lésion qui se sont transformés en myofibroblastes. La fibronectine va favoriser l'adhésion cellulaire, la migration cellulaire et la synthèse de protéines. Les cellules ainsi recrutées vont produire les protéoglycanes et le collagène nécessaire à la formation de la matrice extracellulaire du stroma. Des leucocytes vont également être recrutés afin de débrider la lésion. En parallèle, ils stimulent les réponses vasculaires et cellulaires. On va donc avoir une néovascularisation à partir du limbe.

Dans une cornée saine, il y a un équilibre constant entre la synthèse de matrice extracellulaire du stroma et sa dégradation afin de garantir son renouvellement et son bon fonctionnement ⁸. La dégradation du stroma est assurée par les protéases, notamment les métalloprotéinases de la matrice (MMP) et les sérines protéinases :

- Les MMP-2 et MMP-9 sont les plus importantes : lors de lésion cornéenne, on observe une augmentation de ces MMP dans l'ensemble de la cornée. Elles permettent la dégradation des fibrilles de collagène et assurent donc la détersion de la lésion.

Les MMP-2 sont synthétisées par les kératocytes et sont présentes dans des cornées saines afin d'assurer la détersion de microlésions. Les MMP-9 sont synthétisées par les cellules épithéliales et les polynucléaires neutrophiles, uniquement lors de lésion importante. L'action des MMP doit toutefois rester sous contrôle. Si l'effet protéolytique s'emballe, l'ulcère cornéen peut évoluer en kératomalacie ^{6,8}.

- Les sérines protéases sont synthétisées par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages. Elles permettent la dégradation du collagène de type III et IV, des laminines, des fibronectines et du sulfate d'héparane ⁹. Leur action est plus facilement régulée que celle des MMP.

Le contrôle de l'activité des protéases est permis par des inhibiteurs de protéases, que l'on retrouve principalement dans le film lacrymal.

La réorganisation de la matrice extracellulaire du stroma implique une perte de transparence de plusieurs semaines. Selon la gravité de la lésion, une opacité cicatricielle peut persister à vie ⁶.

c) Cicatrisation de l'endothélium cornéen

En cas de lésion de l'endothélium, les mécanismes de cicatrisation sont beaucoup plus limités. Il n'y a pas de prolifération de cellules par mitose, ce sont les cellules adjacentes à la lésion qui vont s'aplatir afin de s'étendre et combler la lésion sans rupture de jonctions. La quantité de pompes Na⁺/K⁺ ATPases va augmenter afin de maintenir la déturgescence de la cornée et limiter la formation d'œdème cornéen ⁶.

II. LES KERATOPATHIES ULCERATIVES CHEZ LE CHEVAL

L'ulcère de la cornée est une dominante de la pathologie cornéenne du cheval et même dans ses formes mineures, il doit être considéré comme une lésion pouvant

mettre en danger la fonction visuelle. Son pronostic est étroitement lié à la qualité du diagnostic et à l'adéquation de la thérapeutique aux caractères cliniques de la lésion.

A. Etiologie des ulcères cornéens chez le cheval

a) Ulcères traumatiques

Les ulcères traumatiques sont très fréquents chez le cheval du fait de la prééminence du globe oculaire sur la partie latérale du crâne, et de l'environnement (vie en troupeau, arbres, ...) propice aux corps étrangers et aux traumatismes ¹⁰. Une étude des traumatismes cornéens sur 48 chevaux a identifié 47% de cas de contusion, 25% de traumatismes contondants et dans 30% des cas la cause est restée indéterminée. Ces traumatismes cornéens peuvent se diviser en non perforant et perforant selon le degré d'impact sur la cornée. Le prolapsus de l'iris (iridocèle) lors de lésion perforante représentait presque un cas sur 2 (46% cas) dans cette étude ¹⁰.

i. Ulcère épithélial

L'ulcère épithélial aigu se définit comme une perte de substance d'apparition brutale touchant l'épithélium cornéen et possiblement le stroma superficiel, et qui est présent depuis moins de 7 jours. Du fait de l'importance de l'innervation sensitive de la cornée superficielle, le motif de consultation est un tableau clinique de douleur oculaire aiguë avec un blépharospasme et un épiphora parfois très marqués. Un myosis peut également matérialiser l'existence de la douleur. A l'examen de la cornée, la perte de substance apparaît comme une zone grisâtre (zone d'œdème), de faible profondeur par rapport au reste de la cornée saine. Celle-ci est avasculaire car les vaisseaux n'ont pas eu le temps de se développer, il n'y a pas d'infiltrat inflammatoire étendu au-delà de la perte de substance. La coloration à la fluorescéine confirme la présence de l'ulcère (Figure 3A). Le diagnostic différentiel doit se faire avec les ulcères épithéliaux chroniques, ceux liés à la présence d'un distichiasis ou à une kératite possiblement associée à une infection par un *Herpesvirus*.

L'ulcère épithélial chronique est un ulcère superficiel présent depuis au moins 2 semaines, et n'a aucune tendance à cicatriser malgré l'absence de cause décelable. Il est moins fréquent que chez le chien, et peut être considéré comme équivalent de l'ulcère épithélial chronique observé chez ce dernier ("ulcère du Boxer"). La pathogénie de l'ulcère épithélial chronique n'a pas été étudiée chez le cheval, et les seules données dont on dispose sur cette affection proviennent d'études faites chez le chien pour lequel elle est considérée comme une dystrophie épithélio-basale. Il apparaît chez des chevaux adultes, d'un âge moyen de 12-13 ans, sans prédisposition liée au sexe et à la race. Les signes de douleur oculaire sont variables d'un cas à l'autre mais constituent généralement le motif de consultation. L'examen de la cornée identifie la perte de substance épithéliale, de forme et de taille variable, mais avec un bord épithélial décollé et souvent œdémateux (Figure 3B et 3C). La présence de vaisseaux cornéens s'observe dans 30-40% des cas. La coloration par la fluorescéine montre que le colorant diffuse sous le bord décollé de l'ulcération.

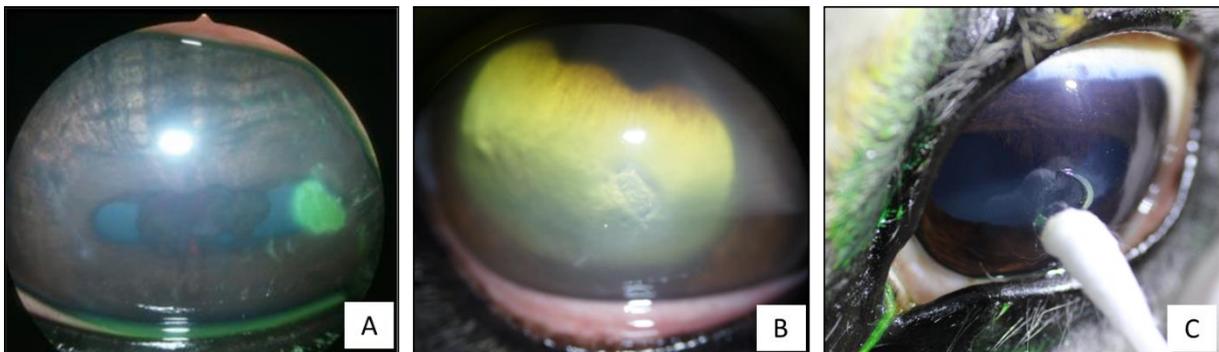


Figure 3 - Ulcères cornéens superficiels chez le cheval (crédits photos ENVT ophtalmologie)

(A) Ulcère épithélial simple (B) Ulcère épithélial chronique. Notez la bordure épithéliale irrégulière et la néovascularisation cornéenne périphérique (C) Décollement de l'épithélium anormal au coton tige confirmant l'hypothèse d'ulcère épithélial chronique

ii. Plaies de la cornée

Les traumatismes cornéens sont associés à des signes de douleur oculaire souvent marqués. Un œdème conjonctival peut être présent, formant un véritable bourrelet qui peut rendre difficile l'observation de la cornée. Après contusion oculaire (ex : coup par un autre cheval), les signes oculaires sont dominés par l'existence de

l'uvéite antérieure qui résulte du choc. Des lésions d'abrasion de la cornée peuvent être présentes.

Lors de plaie non perforante par corps vulnérant (ex : clou, morceau de bois), le volet cornéen découpé est facilement identifiable car œdémateux. Il peut être mobile s'il est rattaché à la cornée par un pédicule, lors de scalp cornéen (Figure 4A). Des signes d'uvéite réactionnelle sont présents.

Lors de lacération avec perforation cornéenne, le globe peut apparaître plus petit que l'œil sain opposé. Une masse pigmentée faisant hernie par l'orifice de la plaie est souvent visible et traduit le passage d'une partie de l'iris et/ou des grains iriens à travers la plaie cornéenne. La chambre antérieure contient du sang et de la fibrine, qui parfois comblent son espace, et peuvent occlure temporairement l'ouverture cornéenne (Figure 4B et 4C).

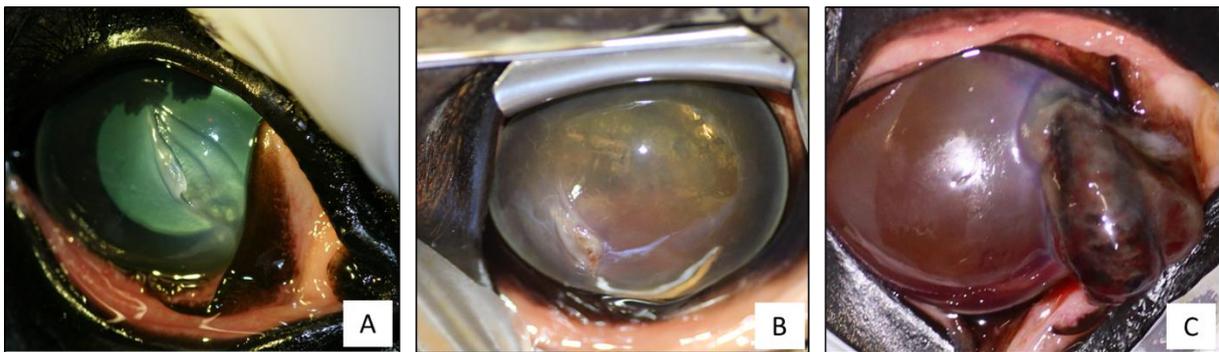


Figure 4 - Différents types de plaie cornéenne chez le cheval (crédits photos ENVT ophtalmologie)

(A) Lacération cornéenne, le scalp, attaché par sa base, est facilement identifiable (B) Plaie cornéenne transfixiante comblée par de la fibrine, qui a par ailleurs rempli la chambre antérieure, masquant l'observation de l'iris (C) Perforation latérale avec large iridocèle

iii. Brûlures thermiques ou chimiques

Les cas d'ulcères liés à des brûlures, thermiques ou chimiques, sont relativement rares et peu décrits dans la littérature. Le plus important est de rincer abondamment l'œil et, dans le cas d'accident chimique, d'identifier le produit responsable et son pH. Le pronostic est réservé et va dépendre du pH du produit, de sa concentration, de la quantité et de la durée d'exposition. Les produits acides entraînent en général des ulcères larges mais assez superficiels, tandis que les

produits basiques vont déstabiliser les membranes plasmiques des cellules causant une nécrose des cellules épithéliales et des kératocytes. De plus, suite à l'atteinte stromale, il va y avoir un recrutement important de polynucléaires neutrophiles et donc une sécrétion massive de protéases pouvant entraîner une kératomalacie. Dans le meilleur des cas, on observera une cicatrice opaque plus ou moins étendue, mais les lésions peuvent entraîner une fibrose du globe causant une phtisie oculaire ^{6,11}.

b) *Ulcères bactériens et mycosiques*

L'ulcère cornéen peut être rapidement compliqué d'une infection bactérienne ou mycosique locale opportuniste. La flore saprophyte des culs de sacs conjonctivaux est très polymorphe et la plupart des bactéries peut devenir pathogène. Les germes aérobies les plus fréquents sont Gram négatif comme les entérobactéries, ou *P. aeruginosa*, ou Gram positif comme *S. epidermidis*, *streptococcus* spp, et *Corynebacterium*. De nombreux autres agents microbiens ont été isolés d'ulcères cornéens chez le cheval, y compris des anaérobies ^{6,12-15}. De plus, des agents fongiques peuvent être à l'origine de kératites, en association avec une infection bactérienne, ou lorsqu'ils ont été sélectionnés par un traitement antibiotique local de longue durée ou mal maîtrisé. La majorité des germes impliqués sont commensaux à la flore oculaire saine du cheval, les autres sont issus de l'environnement. Les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. et *Penicillium* spp. ^{14,16}. La flore commensale se propage suite à une altération de l'épithélium. La contamination via un corps étranger végétal est notamment possible. Un défaut d'instabilité du film lacrymal, une corticothérapie prolongée, une antibiothérapie mal contrôlée déséquilibrant la flore oculaire sont également susceptibles de favoriser le développement de kératomyose ^{12,17,18}. La vie en box soumet les chevaux à une pression fongique plus importante du fait de la poussière et du manque d'aération. On observe également une certaine saisonnalité, la chaleur et l'humidité étant plus propices au développement des hyphes ¹⁹. Les champignons hautement pathogènes vont avoir tendance à évoluer en profondeur en libérant des protéases, tandis que les faiblement pathogènes vont s'étendre horizontalement au sein du stroma. Certains peuvent former des biofilms, *Fusarium* spp. par exemple, les rendant plus résistants aux traitements anti-fongiques ⁶.

Le signe d'appel est en général une douleur importante, parfois associée à une uvéite réactionnelle (myosis, effet Tyndall voire hypopion). L'ulcère, de profondeur variable, est accompagné d'un œdème et d'un infiltrat cellulaire périphérique, conférant à la cornée un aspect opalescent (Figure 5A). Le centre est parfois comblé de dépôts de fibrine ou de pus. Une néovascularisation superficielle et ou profonde est présente, suivant la profondeur de l'ulcère et la durée d'évolution. Lors d'ulcères profonds, le risque majoré de perforation impose une manipulation très prudente de l'animal.

La kératomalacie est une complication fréquente des ulcères chez le cheval. Elle résulte de l'activité de métalloprotéases induites qui hydrolysent le collagène du stroma cornéen. Il en résulte une véritable fonte cornéenne, qui apparaît blanche et liquéfiée et majore les risques de perforation du globe (Figure 5B et 5D).

La kératomycose superficielle se présente comme de multiples microérosions colorées par le rose bengale, ou comme un ulcère superficiel à bord bien défini, blanc-jaunâtre. Le fond de l'ulcère peut être couvert d'un dépôt blanchâtre constituant la plaque fongique (Figure 5C). La présence d'une néovascularisation cornéenne et d'une uvéite antérieure est habituelle. La kératomycose stromale prend l'aspect d'un ulcère profond avec kératomalacie. La douleur oculaire et les signes d'uvéite antérieure sont majorés²⁰. L'autre forme classiquement associée à l'infection fongique est l'abcès cornéen.

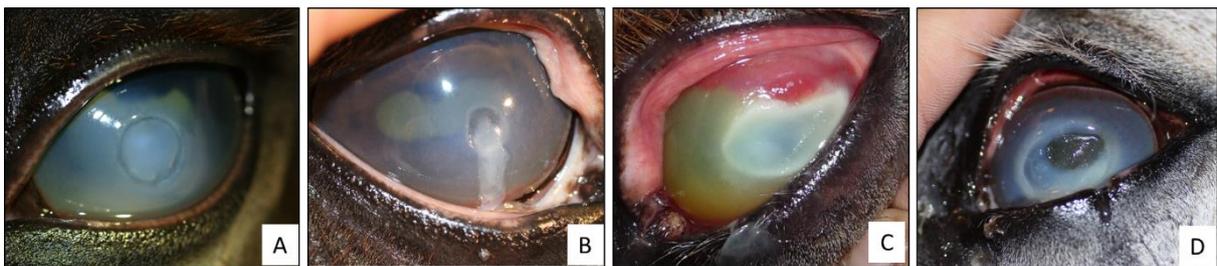


Figure 5 - Ulcères cornéens infectés chez le cheval (crédits photos ENVT ophtalmologie)

(A) Ulcère stromal antérieur nummulaire avec sillon disjoncteur, infecté par un streptocoque B Hémolytique (B) Ulcère à *Pseudomonas*, compliqué de kératomalacie, véritable liquéfaction du stroma cornéen (C) Plaque fongique (*Aspergillus* spp) étendue associée à une kératite très intense (D) Kératomycose stromale : large ulcère atteignant le stroma profond avec descemetocèle dorsale. Notez l'aspect blanchâtre infiltré de la marge lésionnelle évoquant le contexte infectieux.

c) Kératite ulcéreuse présumée virale

Si les virus sont rarement mis en cause dans les kératites du cheval, le développement récent d'outils diagnostiques performants, a permis d'associer l'Herpesvirus équin de type 2 (EHV2) à certaines formes particulières de kératites superficielles et de kérato-conjonctivites ²¹. La pathogenèse est encore mal connue, mais repose toutefois sur une alternance de période de latence et de recrudescence, lors de période de stress par exemple. Il s'agit de kératites aiguës, se manifestant par une douleur importante, des fissures épithéliales ou des ulcères ponctués multifocaux, assez caractéristiques.

Les EHV sont latents dans les lymphocytes et l'EHV-2 peut également entrer en latence dans le ganglion trigéminal et dans le ganglion ciliaire. Ceci pourrait expliquer la diffusion du virus sur la surface de la cornée ainsi qu'au sein de l'arbre respiratoire, les muqueuses oculaires et nasales étant innervées par des branches du nerf trijumeau ^{22,23}.

Bien que la clinique permette de suspecter une atteinte virale, le diagnostic de certitude repose sur la PCR à partir d'un prélèvement cornéen (frottis, raclage) ²⁴. Malgré la latence du virus et donc une possible réactivation ultérieure, la mise en place d'un traitement antiviral et antibiotique avec une éventuellement analgésie et un traitement cycloplégique permet de gérer les manifestations cliniques et la douleur associée ⁶.

d) Ulçère d'exposition : le syndrome de l'œil sec

Le syndrome de l'œil sec regroupe deux entités chez le cheval : les kératopathies d'exposition et la kératoconjonctivite sèche (KCS). Les mécanismes de ces pathologies sont différents mais résultent d'un défaut de production ou de distribution du film lacrymal ²⁵. Cela va entraîner une kératite superficielle avec une cornée terne et d'aspect collant, associée à une atteinte de l'épithélium, une néovascularisation et une possible pigmentation.

i. Kératopathies d'exposition

Les kératopathies d'exposition sont généralement associées à une lagophtalmie, (fermeture incomplète des paupières) ou à une incongruence anatomique des paupières. Elles peuvent être consécutives à des affections palpébrales (phénomène néoplasique, traumatisme, blépharite, conjonctivite, ...) ou à une exophtalmie. De rares cas de chalazion et d'inflammation des glandes de Meibomius ont également été décrits : la production de la couche lipidique du film lacrymal étant altérée, celui-ci est plus s'évapore plus rapidement²⁵. Les atteintes nerveuses (parésie du nerf facial, syndrome de Claude Bernard Horner, dysautonomie, ...) peuvent entraîner des kératopathies d'exposition, mais cela reste assez rare ⁶.

Les anesthésies générales sont par contre facteur de risque : les paupières restent ouvertes, empêchant la lubrification de la cornée. Il est donc indispensable de régulièrement lubrifier et protéger la cornée lors des chirurgies.

ii. Kératoconjonctivite sèche (KCS)

La kératoconjonctivite sèche (KCS) est un défaut de production, qualitatif ou quantitatif, de la partie aqueuse du film lacrymal. Chez le cheval, La kératoconjonctivite sèche est essentiellement quantitative. Elle est le plus souvent due à une atteinte du nerf parasympathique innervant la glande lacrymale. Les causes de cette atteinte nerveuse sont diverses : fracture de l'os stylohyoïde ²⁶, fracture de la mandibule ²⁷, fracture du crâne ²⁸, ostéoarthropathie temporohyoïde ²⁹ ... Plus rarement décrits, on retrouve également en cause de KCS : l'intoxication suite à l'ingestion de plantes du genre *Astragalus* et *Oxytropis* (toxicité pour la glande lacrymale) ³⁰, l'hypothyroïdie (neuropathie périphérique) ³¹, la dacryoadénite éosinophilique granulomateuse (cause primaire probablement parasitaire *Thelazia lacrymalis*) ³² et la destruction de la glande lacrymale par médiation immunitaire ³³.

Le tableau clinique montre souvent un blépharospasme, une cornée terne et collante associée à un épiphora mucopurulent, une conjonctivite et éventuellement la présence d'ulcères cornéens.

Le pronostic dépend de la cause primaire et de sa possible résolution, il est donc en général plutôt réservé avec un traitement palliatif à base de larmes artificielles à vie.

e) Cas particulier des abcès cornéens

L'abcès de cornée est particulièrement représenté dans l'espèce équine. Il apparaît de manière isolée, ou plus généralement comme aggravation d'un ulcère récent, parfois cliniquement cicatrisé. Sa genèse fait suite à la cicatrisation épithéliale d'un ulcère infecté. Les tests de coloration sont alors négatifs. Les mécanismes de formation sont complexes et encore mal connus. La majorité des abcès se forment suite à un ulcère cornéen, sur lequel l'épithélium a migré afin de combler la lésion, enfermant ainsi les agents infectieux ou le corps étranger, qui se retrouvent alors protégés des traitements topiques^{6,34}. Les neutrophiles sont activés et migrent jusqu'au site infectieux et sécrètent des enzymes protéolytiques mais cela contribue à la dégradation du stroma et amplifie la migration des neutrophiles, créant un cercle vicieux. La cornée étant avasculaire, la reconnaissance microbienne est ralentie. La néovascularisation est indispensable à la résorption de l'abcès et va se former suite à la libération de facteurs angiogéniques initiée par l'inflammation. Elle ne se développera toutefois pas sur l'abcès, sûrement à cause de facteurs anti-angiogéniques libérés par les agents infectieux. Une autre hypothèse concernant la formation d'abcès cornéen est la migration depuis la chambre antérieure, au travers de l'endothélium, d'agents infectieux, par exemple lors d'atteintes systémiques³⁵.

L'abcès se présente comme une tâche blanche laiteuse, circonscrite, associée à un œdème périphérique (Figure 6A et 6B). Les signes associés à l'ulcère initial (s'il a été diagnostiqué) persistent et le tableau clinique peut s'aggraver brutalement. En effet, les germes emprisonnés lysent le stroma en profondeur, pouvant conduire à l'apparition d'une uvéite septique par rupture de l'abcès en chambre antérieure (Figure 6C).



Figure 6 - Abscès cornéens chez le cheval (crédits photos ENVT ophtalmologie)

(A) Abscès en formation lors d'une kératomycose. Notez l'infiltrat granuleux périphérique et l'œdème. (B) Abscès cornéen ventral, associé à un œdème cornéen dense un pannus. (C) abscess ponctiforme profond. Notez la réaction vasculaire et l'hypopyon sédimenté en partie ventrale de la chambre antérieure

B. Diagnostic

Le diagnostic clinique d'ulcère cornéen est facile et basé sur l'examen de la cornée avant et après coloration à la fluorescéine. Les signes cliniques observés au cours de l'examen à l'œil nu : blépharospasme, épiphora, hyperhémie conjonctivale et éventuellement lésion cornéenne évocatrice d'une perte de substance. Un diagnostic différentiel peut être envisagé avec les autres affections responsables du syndrome « œil rouge » : conjonctivite, uvéite, glaucome.

Les confirmations cliniques et diagnostiques sont étroitement liées et basées sur un examen ophtalmologique complet et méthodique. L'analyse des annexes et des modifications cornéennes devra être complétée par l'examen de la chambre antérieure et de l'iris, à la recherche d'éventuels signes d'uvéite. Il est très important de systématiser l'examen de la face postérieure de la membrane nictitante. L'examen de la cornée est renouvelé après coloration à la fluorescéine et au rose bengale. L'analyse des annexes et des modifications cornéennes devra être complétée par l'examen de la chambre antérieure et de l'iris, à la recherche d'éventuels signes d'uvéite. Il est très important de systématiser l'examen de la face postérieure de la membrane nictitante. La suite du diagnostic étiologique repose sur des examens complémentaires, comme (1) l'examen cytologique de prélèvements cornéens à la cytobrosse pour la mise en évidence directe de germes en position extra- ou intra cellulaire ou d'hyphes mycéliens ou (2) l'écouvillonnage pour bactériologie avec antibiogramme et mycologie pour

caractériser le champignon pathogène. Les infections mixtes ne sont d'ailleurs pas rares ⁶.

Finalement, le bilan diagnostique d'un ulcère cornéen doit prendre en compte :

- le niveau de gravité de l'ulcère : il est établi à partir de sa profondeur, de sa taille et des éléments d'accompagnements tels que l'œdème périphérique, la néovascularisation, la kératomalacie, mais aussi la rapidité d'évolution.
- la cause déclenchante, qui doit donner lieu, lorsqu'elle est identifiée à des mesures spécifiques : retrait d'un corps étranger, correction d'anomalies ciliaires ou palpébrales, traitement anti-infectieux ciblé, ... Notons que cet aspect ne sera pas développé de manière spécifique dans ce manuscrit.

C. Traitement

Le pronostic de prise en charge est étroitement lié à la qualité du diagnostic et à l'adéquation de la thérapeutique aux caractères cliniques de la lésion. La démarche clinique et diagnostique tient compte de la profondeur de l'ulcère, de sa vitesse de développement et des signes locaux d'accompagnement. Le traitement poursuit deux objectifs : (1) faire disparaître la cause déclenchante, si celle-ci a été identifiée, et (2) favoriser la cicatrisation de la perte de substance de la cornée. Des solutions médicales et chirurgicales permettent de s'adapter aux différentes situations cliniques.

a) Ulcère épithélial simple

Une antibioprofylaxie locale à large spectre type association polymyxine-néomycine sous forme de collyre (4 à 6 fois/jour) ou pommade ophtalmique (3 à 4 fois/jour) est prescrite. La gestion de la douleur se fait par instillation d'atropine collyre 1% à effet, complétée par l'administration par voie générale d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (ex : flunixin méglumine, phénylbutazone). L'ulcère doit guérir en une semaine maximum. La cornée du cheval se ré-épithélialise à la vitesse de 0,6 mm/jour ⁶. Si des symptômes d'aggravation sont observés en cours de traitement le schéma thérapeutique doit être changé et remplacé par celui décrit pour les ulcères bactériens.

Dans le cas particulier de l'ulcère épithélial chronique, au sens dystrophie épithéliobasale, le traitement est principalement chirurgical et associe deux gestes. La désépithélialisation est le geste le plus important. Elle se fait, après anesthésie locale par instillation d'un collyre de tétracaïne ou d'oxybuprocaïne, avec un coton-tige, et vise à enlever l'épithélium non adhérent qui entoure l'ulcère (Figure 3C). Elle est complétée par une kératotomie à l'aiguille ou au microcautère (thermokératoplastie) ou un polissage du stroma avec une fraise à tête diamant (AlgerbrushND) (Figure 7).



Figure 7 - Prise en charge d'un ulcère épithélial chronique (crédits photos ENVT ophtalmologie)
(A) Aspect après désépithélialisation. La prise de fluorescéine matérialise les marges initiales de l'ulcère (B)
Aspect après thermokératoplastie (C) Suivi à 15 jours, l'épithélialisation est complète et les cicatrices créées par
le thermocautère s'estompent progressivement

Le pronostic est habituellement bon. La guérison (15 à 23 jours) est plus fréquente avec l'association désépithélialisation/kératotomie (75-80%) qu'avec la seule désépithélialisation (63%)³⁶. En cas de récurrences, la désépithélialisation peut être refaite. En cas d'échec, une kératectomie superficielle permet de résoudre l'ulcère dans la plupart des cas.

b) Ulcère bactérien ou mycosique

i. *Traitement anti-infectieux*

Si l'ulcère est de petite taille, une antibiothérapie à large spectre pourra être choisie : l'instillation de collyre associant néomycine et polymyxine B, ou l'application de pommade au chloramphénicol représentent un bon choix de première intention. Lorsque l'ulcère est plus compliqué (grade 2 et plus), le choix de l'anti-infectieux à prescrire est guidé par le résultat des examens complémentaires, cytologie voire antibiogramme. Les molécules le plus souvent employées sont la gentamicine, ou la tobramycine. En cas de nécessité, notamment suite à la réalisation de l'antibiogramme, les quinolones humaines comme la ciprofloxacine ou la norfloxacine sont également envisageables (décret n°2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance de médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique). Lors de kératomycose, il est possible d'instiller une solution de povidone iodée diluée à 1%, ou d'appliquer localement du miconazole (DAKTARIN ND, gel buccal), de la terbinafine (LAMISIL ND, pommade à usage cutanée) 3 à 4 fois par jour. La nécessité d'administrations répétées et fastidieuses (6 à 8 fois par jour initialement) doit être compensée par la pose d'un système d'irrigation sous palpébral ³⁷. L'injection sous conjonctivale est une alternative possible pour le traitement antibiotique d'attaque mais ne peut être répétée que 2 à 3 fois maximum à 48h d'intervalle. Lors d'ulcères compliqués, la nécessité d'un traitement initial intensif et d'un suivi étroit doivent motiver une hospitalisation.

En cas de perforation ou d'atteinte profonde avec une uvéite antérieure associée, un traitement antibiotique par voie générale sera nécessaire pour compléter la prise en charge.

Dans tous les cas, une thérapeutique antalgique doit être mise en place. Elle associe l'instillation d'un collyre à l'atropine 1% pour induire une cycloplégie, levant le spasme ciliaire et l'utilisation parentérale d'AINS comme la flunixin-méglumine.

ii. Traitement anti-collagénase

Lors de kératomalacie, il est nécessaire d'utiliser des antiprotéases comme la N-acétylcystéine (NACND), de l'EDTA 1%, administrés 6 à 8 fois par jour. Ces

molécules sont utilisées seules ou rajoutées aux collyres extemporanés. Une alternative est l'utilisation de sérum autologue ³⁸.

Récemment, une nouvelle approche thérapeutique s'est développée en ophtalmologie vétérinaire : la technique de *cross-linking* du collagène cornéen. Utilisée depuis une vingtaine d'années en ophtalmologie humaine, il s'agit d'un processus photochimique qui repose sur la libération de radicaux libres par un chromophore, la riboflavine, sous l'effet d'un rayonnement ultraviolet. Les conséquences biologiques et morphologiques sont, pour la cornée, l'augmentation de la solidité et de la résistance du collagène à la digestion enzymatique, l'inactivation des germes bactériens *in situ* et la modulation de la réponse inflammatoire. Cette technique peut représenter une alternative à la chirurgie cornéenne et a été utilisée avec succès chez le cheval ³⁹. Le procédé sera développé en détails dans la troisième partie de cette thèse.

i. Traitement chirurgical

Lors d'ulcères larges et profonds (atteignant le mi-stroma et au-delà) le protocole médical précédent doit être mis en place ou maintenu, mais il faut lui associer un traitement chirurgical dont l'objectif est la protection et le soutien physique de la cornée. La technique la mieux adaptée est la greffe pédiculée de conjonctive bulbaire, qui par son apport vasculaire amène en plus du soutien tectonique des facteurs anti-infectieux et des facteurs de cicatrisation ⁴⁰.

Dans le cas des abcès cornéens, le traitement chirurgical doit être choisi d'emblée pour les abcès profonds ou étendus et sera une option complémentaire du traitement médical si ce dernier ne parvient pas à améliorer les signes de l'inflammation cornéenne et uvéale après une semaine de traitement. Le matériel purulent d'un abcès cornéen n'est jamais liquéfié et de ce fait ne peut pas être drainé ou évacué par simple ponction. Plusieurs techniques ont été proposées parmi lesquelles la kératectomie lamellaire avec greffe conjonctivale est la plus courante. L'utilisation de biomatériaux est également envisageable dans l'objectif d'obtenir à terme une meilleure transparence cornéenne (Figure 8A) ⁴⁰.

Les plaies cornéennes non perforantes peuvent être traitées médicalement comme les ulcères d'origine infectieuse. Si un volet de cornée a été découpé par le traumatisme, il pourra être suturé si l'intervention se fait dans les 24 heures qui suivent le traumatisme. Au-delà, il devra être enlevé par exérèse avec des ciseaux à cornée.

En cas de lacération avec perforation, l'iris prolabé sera remis en chambre antérieure si la plaie a moins de 12h sinon il sera réséqué. La fermeture de la plaie cornéenne par suture pourra être complétée par une greffe conjonctivale pédiculée (figure 8B). Le pronostic est réservé et dépend de la taille de la brèche, de sa localisation ainsi que de la cause primaire. Une perforation franche et peu étendue par corps étranger aura ainsi un meilleur pronostic qu'un ulcère à kératomalacie par exemple.

La vision peut être conservée suite à la mise en place d'un traitement agressif : environ 80% des chevaux récupèrent un œil visuel dans le cas des lacérations avec protrusion de l'iris, 67 % dans le cas de kératites ulcéraives perforantes ⁴¹. La présence d'hypHEMA, les perforations de plus de 15 jours, et la surinfection bactérienne et/ou fongique sont des facteurs aggravants concernant le risque de perte de vision ⁴¹.

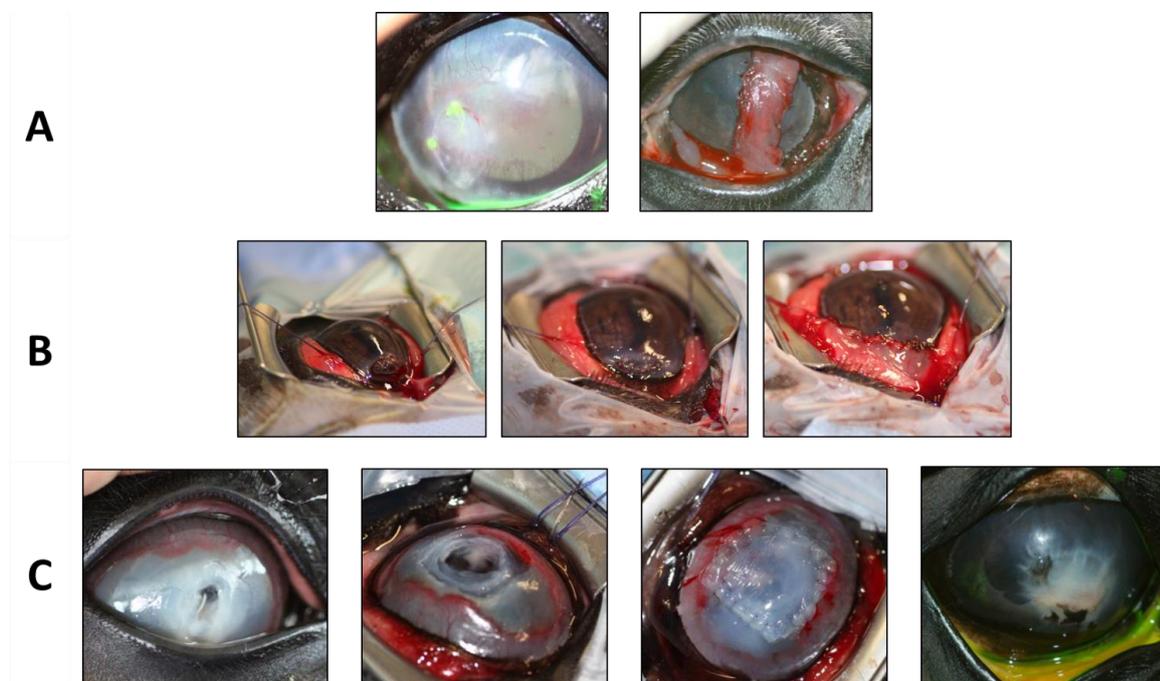


Figure 8 - Exemple de prise en charge chirurgicale d'ulcères cornéens

*A : par greffe de biomatériau (ACELLvetND) ou greffe conjonctivale en pont, à 15 jours post-opératoire
 B : réduction d'une iridocèle. Suture cornéenne directe et greffe conjonctivale d'avancement
 C : descemetocèle centrale surinfectée traité par kératectomie et greffe lamellaire de cornée équine congelée.
 Vue per-opératoire et aspect à 8 mois*

III. UTILISATION DU CROSS-LINKING DANS LE TRAITEMENT DES KERATOPATHIES

La photothérapie dynamique est utilisée en médecine pour détruire des tissus pathologiques. Elle repose sur l'activation d'une molécule photosensibilisante par un rayonnement lumineux. Les premiers travaux ont été réalisés au début du vingtième siècle, en 1904, par Hermann Von Tappeiner avec une application locale d'éosine sur des lésions cutanées (lupus, psoriasis, ...) puis exposition à la lumière ⁴². L'utilisation de la photothérapie dynamique n'a toutefois été approuvée qu'en 1999. Elle est désormais utilisée dans de nombreux domaines : dermatologie, ophtalmologie, oncologie, ...

A. Présentation de la technique de *cross-linking* (riboflavine, UV-A)

Le *cross-linking* est une technique non invasive de réticulation du collagène basée sur des réactions photochimiques induites par la lumière. La riboflavine, exposée à des UV-A (longueur d'onde 360-370 nm pour une absorption optimale par la riboflavine ⁴³), libère des radicaux libres d'oxygène qui induisent des ponts covalents entre les acides aminés des fibrilles de collagène de la cornée via un processus oxydatif ^{44,45}.

La riboflavine (Figure 9), également connue sous le nom de vitamine B2, est une molécule hydrophile de poids moléculaire 376.4 Da et de pKa 10,2. L'épithélium de la cornée étant lipophile et peu perméable aux molécules de plus de 180 Da ⁴⁶, il est nécessaire de le débrider pour que la riboflavine puisse diffuser dans le stroma cornéen. Gallhoefer *et al.* se sont intéressés à la pénétration de la riboflavine dans la cornée des lapins et des chevaux suite à un protocole classique de *cross-linking* ⁴⁷ : application de gouttes de riboflavine 0.1% toutes les 3 min pendant 30 minutes, puis irradiation 30 minutes avec une lumière produisant des UV-A (longueur d'onde 365nm, irradiance 3 mW/cm²) avec application de riboflavine tous les 3 min durant l'irradiation.

Après désépithélialisation, le *cross-linking* a fonctionné sur le tiers antérieur du stroma chez le lapin. Pour le cheval, dont la cornée est environ deux fois plus épaisse (812-835 μm)⁴⁸, la riboflavine ne pénètre pas suffisamment pour voir des effets significativement différents. Pour les deux espèces, lorsque l'épithélium est conservé, la riboflavine ne peut diffuser dans le stroma. Chez l'Homme, il est admis que le *cross-linking* est efficace sur environ 300 μm , ce qui représente quasiment la moitié antérieure du stroma^{43,49}. Germann *et al.* ont toutefois récemment observé que les modifications de l'organisation des fibres de collagènes dans le stroma se retrouvent également dans des zones plus profondes après le *cross-linking*⁵⁰.

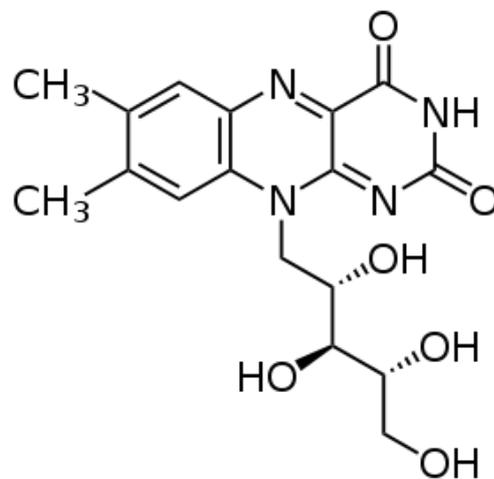


Figure 9 - Structure de la riboflavine

a) Mécanisme

Le mécanisme détaillé du *cross-linking* avec la riboflavine n'est pas encore totalement expliqué. McCall *et al.* ont montré qu'en l'absence de groupement carbonyle et d'oxygène singulet, le *cross-linking* cornéen n'a pas lieu⁴⁴. L'oxygène singulet est un état excité métastable de la molécule de dioxygène. Kamaev *et al.* se sont intéressés au mécanisme de photo-oxydation. La molécule photosensibilisante, ici la riboflavine, absorbe les UV-A pour passer à un état excité (triplet de riboflavine). Une grande partie de la riboflavine va repasser à son état fondamental en émettant de la lumière (fluorescence)⁵¹. Toutefois, en présence d'oxygène, deux types de réaction peuvent se produire avec les triplets restants à l'état excité (Figure 10)⁵²⁻⁵⁴ :

- Type I : une réaction avec le substrat (transfert d'électron ou d'atome d'hydrogène) pour donner des radicaux libres ou des ions radicalaires, qui vont alors réagir avec l'oxygène pour produire des ROS = reactive oxygen species : ion superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle.
- Type II : un transfert d'énergie avec l'oxygène donnant un oxygène singulet (ROS) qui va ensuite réagir avec le substrat.

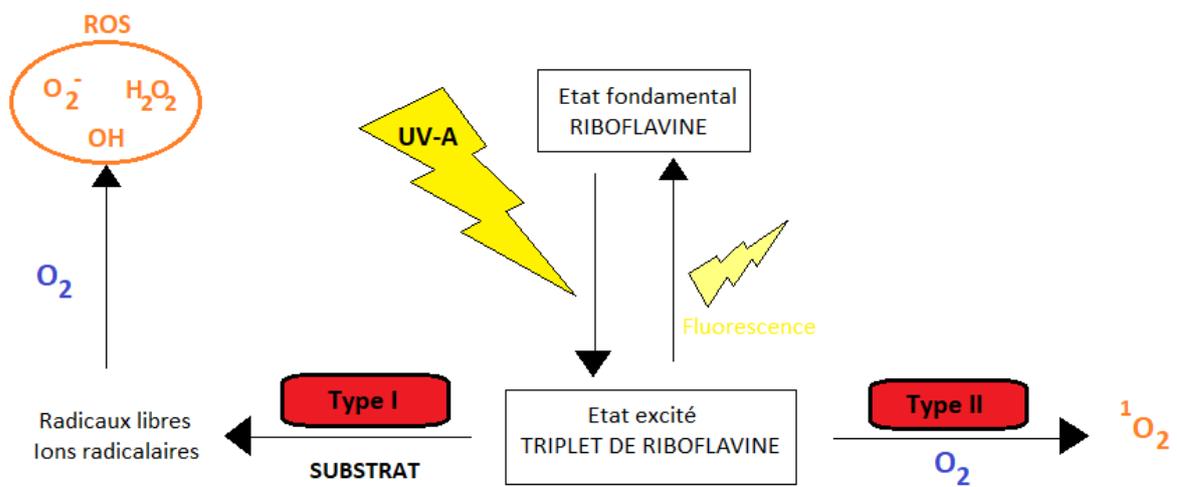


Figure 10 - Mécanismes d'oxydation photosensibilisée.
D'après Foote (1987) et Kashef et Hamblin (2018)

Les expériences de Kamaev *et al.* montrent une prédominance des réactions de type I lors du *cross-linking* avec la riboflavine, bien qu'il y ait une courte phase de type II au début de l'illumination ainsi qu'en fin de processus ⁴⁵. Le mécanisme principal du *cross-linking* avec la riboflavine reposerait donc sur les interactions directes entre le triplet de riboflavine (stade excité) et les protéines de la cornée, via l'oxydation d'acides aminés, notamment l'histidine ^{45,55}. Sur le plan biochimique, ces ponts correspondent à une réaction de glycation : les chaînes hydrocarbonées du collagène forment des ponts azotés entre elles. Les protéoglycanes de la matrice extracellulaire vont également former des ponts, entre eux mais aussi avec les fibres de collagène ⁴⁴.

b) Applications cliniques

Les principales applications cliniques du *cross-linking* cornéen sont résumées dans la figure 11.

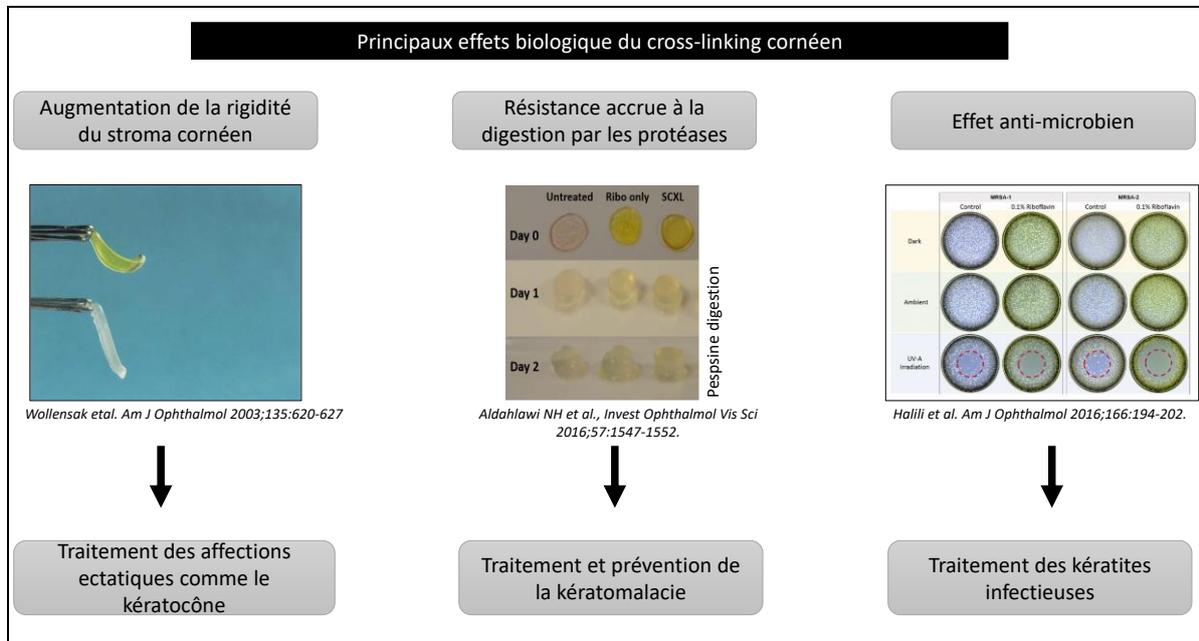


Figure 11 - Résumé des principales utilisations du cross-linking cornéen

i. *Stabilisation des ectasies cornéennes*

La formation de ces liaisons covalentes permet une augmentation de la rigidité de la cornée et de sa résistance à la digestion enzymatique⁵⁶. Pour cette raison, le *cross-linking* est utilisé en médecine humaine pour la stabilisation des kératocônes et ectasies de la cornée ainsi qu'en complément pour le traitement des ulcères à collagénases, ou kératomalacies^{57-59,39,60}. C'est d'ailleurs l'indication majeure en médecine vétérinaire. Le protocole standard, également appelé protocole de Dresde repose sur 30 minutes d'irradiation à 3 mW/cm² avec une dose totale d'UV-A de 5.4 J/cm² après désépithélialisation et instillation d'une solution isotonique de riboflavine 0.1% durant 30 minutes^{57,61}.

Bien que les UV-A présentent une cytotoxicité pour les kératocytes, il a été démontré qu'avec ce protocole cela ne touchait que les 300 µm antérieurs du stroma

⁴⁹, et qu'une repopulation des kératocytes était observée au bout de 6 mois ⁴³. La toxicité pour l'endothélium n'est observée que lorsque les cellules sont irradiées avec 0.35 mW/cm² ⁴⁹, or la riboflavine absorbant les UV-A, la dose réellement reçue par les cellules de l'endothélium sur une cornée de 400 µm correspond à la moitié de la dose toxique ⁴³. Par conséquent, il est recommandé de n'utiliser le *cross-linking* que sur les cornées de plus de 400 µm afin de ne pas léser l'endothélium et les structures postérieures de l'œil.

Des études expérimentales ont également été réalisées pour la prévention et la stabilisation de la myopie en procédant à un *cross-linking* scléral ⁶²⁻⁶⁴. Bien que les premiers résultats soient intéressants, les doses utilisées sont beaucoup plus importantes et leur éventuelle toxicité est encore à évaluer. De plus amples expérimentations sont encore en cours dans ce domaine, en ciblant plus précisément la zone équatoriale, plus stratégique et moins à risque en terme de toxicité éventuelle ⁶⁵.

ii. Effet antimicrobien

Parallèlement à cet effet biomécanique de renforcement de la cornée, il a également été montré que la photo activation de la riboflavine pouvait avoir un effet antimicrobien via la production de ROS. Iseli *et al.* se sont intéressés au *cross-linking* comme traitement adjuvant lors de kératites infectieuses associées à des fontes de la cornée chez l'Homme avec des résultats prometteurs ⁶⁶. Les expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont démontré une bonne efficacité anti bactérienne et anti virale ⁶⁷⁻⁷¹, mais des résultats décevants pour les kératites fongiques ^{68,72,73} et les kératites à *Acanthamoeba* ^{68,74,75}. Néanmoins, cela peut s'avérer être un complément au traitement antifongique ou anti-amibes ^{76,77}. L'effet anti-bactérien du *cross-linking* peut s'avérer très intéressant pour le traitement des kératites bactériennes résistantes aux antibiotiques ^{70,78}. L'ensemble de ces résultats se fonde sur le protocole classique de *cross-linking*, le protocole de Dresde, et le mécanisme d'action repose entre autre sur l'oxydation des lipides membranaires, des acides aminés des protéines et de l'ADN microbien ^{69,79,80}. Afin de faire la différence avec le *cross-linking* conventionnel réalisé pour la réticulation du collagène (CXL), les protocoles utilisés pour l'effet anti-infectieux

sont regroupés sous le nom de PACK-CXL : *photo activated chromophore for infectious keratitis* ⁸¹. Au vu des résultats prometteurs avec le protocole de Dresde, des modifications ont été étudiées pour optimiser le traitement. En augmentant l'irradiance, c'est-à-dire le débit d'énergie, on raccourcit la durée d'exposition nécessaire (loi de réciprocité de Bunsen-Roscoe ²²) pour obtenir la même dose totale d'UV-A (fluence), tout en conservant l'effet antibactérien ^{82,83}. L'innocuité des protocoles de *cross-linking* accélérés (A-CXL) a été démontrée, pour une dose totale d'UV-A de 5.4 J/cm² ⁸⁴. L'effet sur la réticulation du collagène est conservée jusqu'à 30 mW/cm², mais diminue avec l'augmentation de l'irradiance ⁸⁵⁻⁸⁷. Cependant les répercussions sur la résistance de la cornée à la digestion enzymatique seraient moins importantes. Une alternative possible pour palier à cette diminution d'efficacité lors des A-CXL pourrait être d'augmenter la concentration de la riboflavine ⁸⁸, des études supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour démontrer l'innocuité de ce changement de paramètre.

iii. Alternative aux sutures cornéennes

Plus récemment, l'utilisation de la réticulation du collagène avec la riboflavine s'est avérée intéressante pour la suture des plaies cornéennes. En effet, Seiler *et al.* ont réalisé des flaps cornéens qu'ils ont ensuite soumis à différents protocoles de *cross-linking*. Cela a permis de renforcer l'adhésion du flap au stroma avec un optimum obtenu avec 2 minutes riboflavine 0.5% puis une exposition 4.5min avec une irradiance 30 mW/cm² (dose totale 8.1J/cm²) ⁸⁹. Ratzlaff *et al.* ont combiné l'utilisation du protocole classique de CXL et des sutures cornéennes : pourvu que les sutures rapprochent les marges de la plaie, la réticulation du collagène permet de solidifier la plaie ⁹⁰. Cela permettrait de diminuer le nombre de sutures nécessaires à la cicatrisation et donc de diminuer les complications induites (vascularisation, inflammation, cicatrice, astigmatisme, ...).

c) Utilisation du cross-linking cornéen en ophtalmologie vétérinaire

Les premières publications datent des années 2009-2010 chez le chien, le chat et le cheval. Les indications sont de deux types, comme nous venons de l'évoquer : les kératites infectieuses chez le chien ^{91,92}, le chat ⁹² et le cheval ^{39,40}, et les kératopathies bulleuses chez le chien ⁹³.

Chez le cheval, l'étude de Hellander-Edman *et al.* a mis en évidence la guérison de huit cas de kératites ulcéreuses sur neuf traités ³⁹. Neuf chevaux, âgés de un mois à 16 ans ont été traités avec une combinaison de CXL et de traitement médical pour une kératite fongique (deux cas) bactérienne (cinq cas) ou aseptique (deux cas). La kératomalacie, présente dans quatre cas a été stoppée en 24 heures. L'ulcération cornéenne a guéri dans huit cas sur neuf dans un temps moyen de deux semaines. Le dernier cas, présentant une kératite fongique, s'est aggravé et a nécessité l'énucléation de l'animal. Le CXL a pu être réalisé sur des chevaux debout, sous sédation. Aucun effet secondaire n'a été observé.

Plus récemment la même équipe a publié une étude prospective pour évaluer l'efficacité du *cross-linking* sans traitement adjuvant. Les résultats suggèrent que l'effet anti-bactérien, d'un protocole standard n'est pas suffisant pour contrôler le processus infectieux et qu'il ne permettrait pas, en l'état de s'affranchir d'un traitement antibiotique en parallèle de la procédure ³⁹.

Ces données chez le cheval mettent donc en évidence la nécessité d'adapter et d'améliorer le protocole. Une des limites notamment, est la faible diffusion de la riboflavine en présence d'un épithélium intègre et également un effet de la procédure qui resterait très superficiel chez le cheval ⁴⁷. Une alternative est de combiner le *cross-linking* avec la chirurgie pour améliorer la profondeur d'effet (Figure 12).

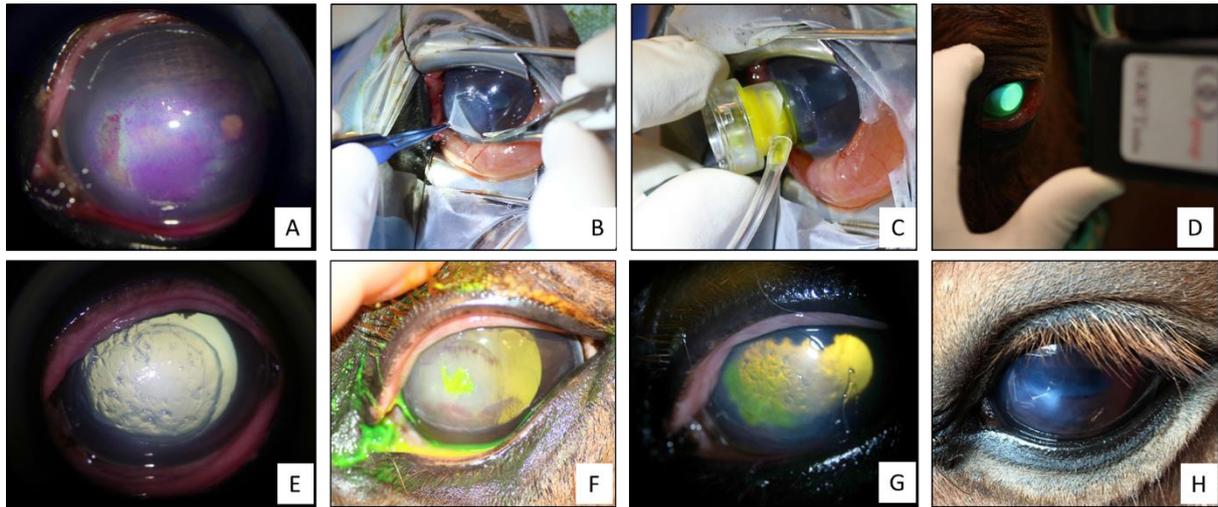


Figure 12 - Exemple d'utilisation du cross-linking pour traiter une kératomycose chez un cheval (A) Kératomycose confirmée à la cytologie (coloration fluorescéine et rose Bengale) (B) Kératectomie lamellaire réalisée sur cheval sédaté. (C) administration de riboflavine par iontophorèse (IONTOFORVET ND) 2 cycles de 1mA.min réalisés pour couvrir l'ensemble de la zone à traiter (D) illumination lampe UV (368 nm), 10mW.cm², pendant 9 min, pour énergie totale de 5.4 J. Evolution de la cicatrisation à J2 (E), J6 (F), J15 (G) et J40 (H)

B. Optimisation du *cross-linking* avec association à l'iontophorèse

La riboflavine ne peut pas pénétrer spontanément dans le stroma cornéen en raison de la barrière lipophile représentée par l'épithélium cornéen. La technique conventionnelle réalisée sur une cornée intègre (comme dans le traitement du kératocône) nécessite donc une désépithélialisation mécanique de la cornée préalable à l'imbibition. Toutefois, ce geste peut entraîner de la douleur, des troubles de la vision et surtout un risque augmenté d'infection. La conservation de l'épithélium permettrait de s'affranchir de ces effets indésirables. Les premières tentatives pour faire pénétrer la riboflavine à travers l'épithélium ont consisté à modifier la galénique, notamment son osmolarité ^{94,95}. Plusieurs molécules « facilitatrices » (enhancers) associées à la riboflavine ont également été proposées : le polyéthylène glycol, la lysine, le chlorure de benzalkonium ou l'EDTA ⁹⁴.

L'iontophorèse est une technique non invasive utilisée pour améliorer la pénétration de molécules polaires en solution aqueuse au sein des tissus. Le mécanisme exact de pénétration n'est pas clairement identifié mais ferait appel à un passage de la molécule par voie trans-cellulaire et inter-cellulaire.

Cette technique est déjà utilisée pour l'administration de médicaments en ophtalmologie depuis 1908 ⁹⁶, son efficacité et la sécurité de son usage ont déjà été démontrées pour l'application maximale d'un courant de 1 mA/cm² pendant 5 min (dose totale 5 mA.min) ^{97,98}. L'iontophorèse permettrait notamment de faire diffuser des molécules hydrophiles de poids moléculaire important au sein de la cornée ⁹⁹. La riboflavine étant chargée négativement, hydrophile, et de poids moléculaire faible, l'utilisation de l'iontophorèse pour optimiser la pénétration de la riboflavine pour le CXL a été étudiée : les protocoles utilisés étant regroupés sous le nom d'I-CXL. Les solutions utilisées sont des solutions aqueuses, tandis que celles utilisées pour le CXL sont plutôt huileuses.

Bikbova et Bikbov ont réalisé les premiers essais chez l'Homme avec succès : la combinaison de l'iontophorèse et du *cross-linking* permet de réduire les durées de traitement tout en conservant l'épithélium (5 à 10 min d'iontophorèse au lieu de 30 min d'application de riboflavine avant le CXL) ¹⁰⁰. Sur les animaux (lapins, chiens et chevaux), 5 minutes d'iontophorèse suffisent pour avoir au moins une pénétration de 80% de la cornée en ayant préalablement retiré l'épithélium ¹⁰¹. Les différences de pénétration inter-spécifiques seraient probablement dues à des différences d'ultrastructure de la cornée. Dans cette étude, des essais de diffusion transépithéliale ont également été réalisés : chez le cheval, malgré l'iontophorèse, l'épithélium est une barrière trop importante pour permettre la diffusion de la riboflavine, tandis que cela fonctionne chez le porc, mais de plus amples expérimentations sont nécessaires pour confirmer ces observations ¹⁰¹. Les premières conclusions concernant la réticulation du collagène sur des cornées humaines *ex vivo* et des cornées de lapin *in vivo* démontrent des résultats similaires à ceux obtenus avec le protocole classique, sans causer de dommages sur l'endothélium ^{102,103}. L'innocuité de l'I-CXL à 1 mA/cm² pendant 5 min sur l'endothélium a été démontrée *in vivo* chez l'Homme ¹⁰⁴. Les suivis sur long terme ont démontré une équivalence des effets de l'I-CXL par rapport au CXL pour le traitement des kératocônes, avec une récupération de l'acuité visuelle plus rapide et la suppression des risques de complications liés à la désépithélialisation^{59,105}.

L'utilisation de l'iontophorèse permet donc d'optimiser les procédures de *cross-linking* en raccourcissant les durées de traitements et en limitant la douleur et les risques d'infection. Néanmoins, cela représente un coût supplémentaire car les dispositifs sont à usage unique. Les dispositifs actuellement présents dans le

commerce permettent de délivrer entre 0.125 mA.min et 12.5 mA.min. Les plus utilisés en ophtalmologie sont les dispositifs délivrant une dose totale de 5 et 10 mA.min (Iontofor-Vet, OPIA Technologies, modèle ION-CXL).

C. Photothérapie au rose Bengale, état des lieux des connaissances actuelles

Le CXL avec la riboflavine et les UV-A présente quelques limites : cela entraîne une cytotoxicité pour les kératocytes ; les cornées fines (moins de 400 μm) ne peuvent être traitées sans risque de léser l'endothélium et l'efficacité anti-fongique est variable suivant les études. Pour ces raisons, de nouvelles techniques sont développées. L'une d'elle est le recours au rose Bengale et à la lumière verte.

Le rose Bengale (Figure 13), un dérivé de la fluorescéine, de la même famille que l'éosine, est une molécule hydrophile de 973 Da et de pKa 4,7, avec un rendement quantique élevé d'oxygène singulet : le rose Bengale permet donc de produire un grand nombre d'oxygène singulet avec peu de photons absorbés^{54,106}. Cela en fait un outil intéressant pour la photothérapie avec des protocoles potentiellement plus courts que le CXL classique. Son absorbance maximale est située dans le spectre de la lumière verte avec un pic à 562 nm et un palier entre 520 et 535 nm (Figure 14)¹⁰⁷. Le rose Bengale est déjà utilisé comme colorant en ophtalmologie notamment pour la détection de souffrance cellulaire ou de défauts qualitatifs du film lacrymal comme la couverture mucinique de l'épithélium cornéen¹⁰⁸⁻¹¹¹. Il est également utilisé pour l'exploration de la fonction hépatique et biliaire par scintigraphie¹¹².

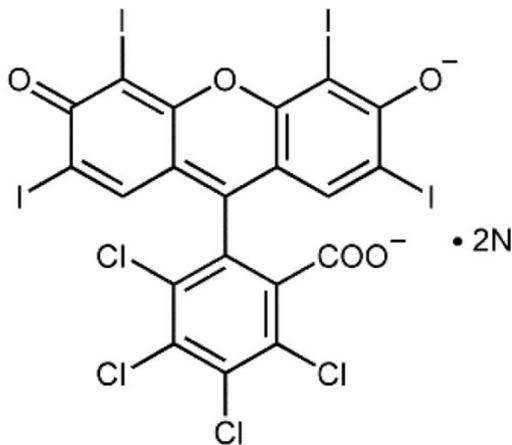


Figure 13- Structure du rose Bengale

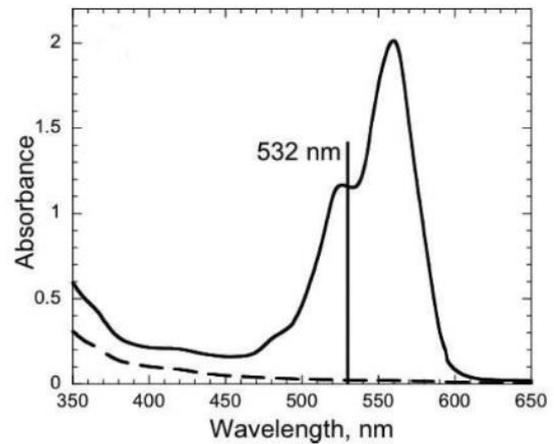


Figure 14 – Spectre d'absorption du rose Bengale. Source : Cherfan et al. (2015)

a) Mécanisme

Le mécanisme de *cross-linking* avec le rose Bengale repose sur les mêmes mécanismes que la riboflavine avec néanmoins une prédominance des réactions de type II : transfert d'énergie depuis le triplet de rose Bengale photoexcité par la lumière verte pour former un oxygène singulet qui va alors réagir avec les acides aminés du stroma (principalement l'histidine) pour former des liaisons covalentes entre les fibres de collagène⁵³⁻⁵⁵. Le *cross-linking* au rose Bengale peut néanmoins avoir lieu en conditions anaérobie s'il est combiné à des molécules « facilitatrices » (enhancers), telles que l'arginine, qui vont transférer un électron au rose Bengale et ainsi initier la réticulation du collagène¹¹³.

Du fait de sa taille plus importante, le rose Bengale pénètre moins profondément dans le stroma que la riboflavine¹¹⁴. Après désépithélialisation et application d'une solution de rose Bengale 0.1% pendant deux minutes, la pénétration est d'environ 100 μm chez le lapin^{107,114}. Les groupements lysine et arginine des fibres de collagène étant chargés positivement et le rose Bengale négativement, la formation de complexes entre le rose et ces groupements freine également la pénétration¹⁰⁷.

Cherfan *et al.* ont investigué la toxicité éventuelle du *cross-linking* avec le rose Bengale (RGX) *in vitro* chez le lapin en travaillant avec des protocoles à 50, 100 et 150 J/cm^2 (irradiation 200, 400 et 600 secondes avec une lumière verte 532 nm à

0.25W/cm²) après deux minutes de coloration au rose. Le rose Bengale absorbe 70 à 90% de la lumière verte émise ^{107,115,116}. Du fait de la forte liaison du rose aux fibres de collagène, peu de rose Bengale pénètre dans les cellules, la phototoxicité du rose Bengale lors du *cross-linking* serait donc moins importante que celle de la riboflavine. En effet, le *cross-linking* classique avec la riboflavine et les UV-A entraîne une perte des kératocytes dans la région antérieure du stroma, ce qui ne semble pas être le cas lors de l'utilisation du rose Bengale et de la lumière verte dans les expérimentations *in vitro* ¹⁰⁷. *In vivo*, une apoptose des kératocytes est tout de même observée mais uniquement dans la zone de pénétration du rose qui est moins importante que celle de la riboflavine ^{115,117,118}. En comparant la cicatrisation de la cornée après un protocole RGX et après une désépithélialisation seule, on constate que les mécanismes sont en grande partie similaires. Toutefois, lors d'une désépithélialisation seule, un œdème cornéen peut être persistant, tandis que l'on a une résolution plus rapide après un RGX. De plus, bien que la cicatrisation soit un peu plus lente pour les cornées soumises à un RGX, l'épithélium nouvellement formé n'est pas hyperplasique ¹¹⁷. Enfin, la pénétration superficielle du rose Bengale dans le stroma et sa haute absorption des rayons lumineux permet de s'affranchir des dommages sur l'endothélium ^{107,117,118}. Les cornées plus fines (moins de 400 µm) pourraient donc être traitées sans problème.

Les mesures de température sur la surface de la cornée restent inférieures à 42°C, sous le seuil de dommage thermique ¹¹⁹. Bien que des rayons de lumière verte puissent atteindre la rétine, les études *in vivo* réalisées chez le lapin démontrent que les doses sont bien inférieures aux seuils de sécurité pour les dommages thermiques et photochimiques (respectivement 75.5 mW/cm² et 159 mW/cm² ^{120,121}) ^{115,116}. Zhu *et al.* ont également démontré qu'il n'y avait pas de rupture de la barrière hémato-rétinienne ni d'atteinte des photorécepteurs ¹¹⁹. Les cellules de l'iris ne sont également pas impactées ^{115,119}. Naranjo *et al.* ont également démontré l'innocuité du *cross-linking* avec le rose Bengale sur les cellules souches limbiques ¹¹⁸.

L'innocuité du rose Bengale et de la lumière verte démontrée chez le lapin peut s'étendre à l'Homme ou à toute autre espèce ayant une cornée de taille similaire ou supérieure. L'utilisation du rose Bengale et de la lumière verte pour le *cross-linking* semble donc plus sûr que l'usage de la riboflavine, notamment pour la toxicité envers

les kératocytes. De plus, l'utilisation du rose permet de traiter les cornées plus fines sans dommage sur l'endothélium.

b) Applications cliniques

i. Modification des propriétés mécaniques de la cornée

Tout comme le CXL «classique », le *cross-linking* avec le rose Bengale (RGX) permet l'augmentation de la rigidité de la cornée mais requiert des protocoles bien plus courts (une dizaine de minutes) ^{107,114,116,122}. De nombreuses études se sont alors intéressées à la comparaison avec les résultats obtenus avec le CXL classique. Cherfan *et al.* ont comparé les protocoles RGX à 100 et 150 J/cm², avec un laser de lumière verte 532 nm de 1,2 cm de diamètre, au *cross-linking* avec la riboflavine : les protocoles RGX permettent de multiplier la résistance de la cornée respectivement par 2.3 et 3.8 par rapport aux cornées témoins, tandis que le CXL classique à 5.4 J/cm² la multiplie par 5.5 ¹⁰⁷. Des résultats similaires pour les valeurs de RGX ont été obtenus par Wang *et al.* ¹²². Bekesi *et al.* ont toutefois démontré que bien que le CXL donne une meilleure rigidité globale, la couche affectée par le RGX est plus rigide que celle du CXL, du fait de son épaisseur moindre et de sa saturation en rose importante ¹¹⁴.

Un autre aspect intéressant du RGX est la résistance à la digestion enzymatique par les collagénases. Wang *et al.* rapportent une durée de digestion enzymatique doublée pour les cornées soumises à un protocole RGX 100 J/cm² (0.4W/cm² pendant 250s) par rapport aux cornées témoins ¹²². Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec la riboflavine et le CXL ^{56,123}.

L'utilisation du rose Bengale pour le *cross-linking* permet donc des résultats quasi similaires à ceux obtenus avec la riboflavine, avec des durées de traitement bien plus courtes. En augmentant la pénétration du rose Bengale au sein de la cornée, par exemple via l'utilisation de l'iontophorèse, on pourrait augmenter l'effet sur la rigidité globale de la cornée. En plus de l'utilisation pour les troubles ectatiques, le RGX pourrait également être utilisé sur les ulcères à collagénases.

ii. Effet antimicrobien

De nombreuses études ont été réalisées sur l'effet antimicrobien de la thérapie photodynamique au rose Bengale chez l'Homme (PDT), dans divers domaines. Les mécanismes impliqués sont variés, successifs mais indépendants les uns des autres¹²⁴. Le mécanisme principal est la production de ROS (reactive oxygen species) suite à l'irradiation qui causent des dommages sur l'ADN microbien et une altération de la membrane cytoplasmique ainsi qu'un stress sur le réticulum endoplasmique entraînant l'apoptose de la cellule^{79,124}. Ce large panel de mécanismes de mort cellulaire indépendants les uns des autres s'avère intéressant dans le cadre de la thérapie anticancéreuse par exemple^{124,125}.

La photothérapie est également intéressante dans les cas de résistances ou lorsque la distribution antibiotique n'est pas facile (difficultés pour atteindre la dose thérapeutique). C'est notamment le cas pour les atteintes buccales. La photothérapie au rose Bengale a démontré une efficacité sur des souches bactériennes résistantes de streptocoques *in vitro* avec une lumière verte (515 nm)¹²⁶. Elle s'est également avérée efficace sur des isolats d'entérobactéries avec l'utilisation d'une lumière bleue (460 nm)¹²⁷. Dahl *et al.* ont observé que l'inactivation des bactéries Gram – était bien plus longue que celle des Gram +, sûrement lié à la durée nécessaire au rose pour pénétrer dans la cellule¹²⁸. Contrairement au PACK-CXL, la photothérapie au rose Bengale et lumière verte donne des résultats prometteurs sur les agents fongiques *in vitro* : Costa *et al.* ont démontré une efficacité sur différentes souches et biofilms de *Candida albicans* obtenus à partir de prélèvements buccaux chez des patients sains¹²⁹ et dans un autre domaine, Cronin *et al.* ont également eu des résultats prometteurs sur des souches de *Trichophyton rubrum* observées sur des mycoses des ongles¹³⁰.

En ophtalmologie, on retrouve ce même effet du rose Bengale et de la lumière verte pour inhiber la croissance d'isolats de kératites fongiques, tandis que le PACK-CXL est sans effet⁷³. Amescua *et al.* ont rapporté le premier cas de kératite fongique chez l'Homme traité par thérapie photodynamique au rose Bengale (kératite à *Fusarium* résistant) : la kératite a été totalement traitée après deux sessions de PDT au rose Bengale 0.1 % et lumière verte 0.9 J/cm² pour la première session et 2.7 J/cm² pour la seconde (13 jours plus tard), soit des doses de lumière infimes. Le suivi sur 8 mois n'a démontré aucune rechute ou effet secondaire¹³¹. Pour les kératites

bactériennes, le rose a démontré une meilleure efficacité que la riboflavine, pour une même dose de lumière (5.4 J/cm²), sur des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* multi-résistant^{70,71}. Concernant les kératites à *Acanthamoeba*, pour lesquelles le PACK-CXL n'était pas efficace, Atalay *et al.* ont démontré l'intérêt de la PDT au rose Bengale pour diminuer la charge parasitaire et la sévérité de la kératite avec des protocoles à 5.4 J/cm²^{132,133}. Le rose Bengale seul a également été utilisé pour inhiber la réplication d'un herpes virus HSV-1 *in vitro* en pré-traitant les cellules épithéliales de la cornée humaine, mais l'efficacité en traitement de kératite virale n'a pas été démontrée¹³⁴.

Les résultats observés suggèrent donc une meilleure efficacité du protocole au rose Bengale comparativement au CXL à la riboflavine sur les aspects anti-infectieux. Le recours à la photothérapie permet d'avoir une action ciblée, en faisant abstraction des résistances et à moindre coût.

iii. Alternative aux sutures cornéennes

Tout comme la riboflavine, le *cross-linking* avec le rose Bengale peut être utilisé afin d'optimiser voire remplacer les sutures cornéennes. Ce fut d'ailleurs les premières utilisations du rose Bengale. Les premières études datent des années 2000 avec l'utilisation d'une source laser 514 nm. Mulroy *et al.* ont réalisé des premières expérimentations *ex vivo* avec des doses de lumière très importantes causant des dommages thermiques (blanchiment de la cornée, déformation) à partir de 762 J/cm²¹³⁵. Un autre défaut relevé était que la rupture du globe était alors irréversible, tandis que les sutures limitaient la perforation. Pour les essais *in vivo*, ils ont utilisé des doses inférieures (115, 153 et 192 J/cm² avec une irradiance de 0.64W/cm²) et placé trois points de sutures le temps de la procédure. Ils ont obtenu des effets significatifs et persistants sur 2 semaines, sans signes cliniques de dommages thermiques¹³⁶. Pour l'études des paramètres optimaux, Seiler *et al.* ont soumis plusieurs cornées avec un flap cornéen à différents protocoles de *cross-linking*. Les meilleurs résultats d'adhésion du flap au stroma ont été obtenus avec 2 minutes de coloration au rose 0.1 % puis 14 minutes de lumière verte laser 532 nm à 180 mW/cm² pour une dose totale de 150 J/cm²⁸⁹.

Wang *et al.* se sont intéressés à l'utilisation du *cross-linking* avec le rose Bengale pour remplacer les sutures de cornée en comparant les 2 techniques. Les protocoles RGX se basaient sur l'utilisation d'une lumière verte laser 532 nm avec une irradiance 0.6 W/cm² et une dose totale de 120, 150 et 180 J/cm². Les 3 protocoles permettaient la fermeture de l'incision, avec une résistance moindre que les sutures mais suffisante au vu de la pression intraoculaire physiologique ¹³⁷. En cas de forte augmentation de la pression intraoculaire, les sutures étaient plus élastiques que le kératodesmos obtenu par RGX qui lâchait, entraînant une rupture du globe. Une autre étude a également été menée pour les greffes de conjonctives en utilisant un protocole RGX 150 J/cm² avec 5 minutes de coloration au rose 0.1% puis 250 secondes de lumière verte 532 nm avec une irradiance de 0.6 W/cm². Les résultats obtenus étaient équivalents à ceux des sutures de la greffe, sans dommages thermiques et avec une meilleure évolution clinique (moins d'écoulements et de congestion), une meilleure réponse inflammatoire (diminution des taux d'IL-6 et de TNF- α , moins d'infiltration de neutrophiles) et surtout une durée bien plus courte : au total 550 secondes de procédure au lieu de 30 minutes de sutures ¹³⁸.

Le *cross-linking* a également été testé pour les fixer des greffes de membrane amniotique ^{119,139,140}. Plusieurs protocoles ont été décrits avec succès : Gu *et al.* ont greffé de la membrane amniotique utilisée comme substrat pour la culture de cellules souches limbiques avec un protocole laser 80 J/cm², avec une meilleure opacité post chirurgicale et une inflammation moindre comparée aux greffes avec sutures ¹³⁹ ; Soeken *et al.* ont utilisé un protocole laser 68 J/cm² censé permettre 90% du *cross-linking* mais les incisions étaient trop importantes et nécessitaient la mise en place de points sutures¹¹⁹ tandis que Verter *et al.* ont utilisé un protocole laser 150 J/cm² pour des greffes sur des incisions profondes pour un maximum de résistance ¹⁴⁰.

Le *cross-linking* au rose Bengale peut donc être une bonne alternative aux sutures, ou utilisé en complément dans le cas de lacérations importantes, afin de réduire le temps opératoire et l'inflammation post-opératoire.

iv. Autres utilisations

L'utilisation du *cross-linking* avec le rose Bengale s'étend également à d'autres domaines médicaux.

Le rose Bengale est utilisé en oncologie pour le traitement de mélanomes en injection locale, soit associé à une exposition à la lumière naturelle, soit administré sous une forme plus concentrée (10% - PV10), cette forme étant approuvée pour un usage en oncologie ^{125,141}.

L'intérêt du RGX pour la substitution aux sutures cornéennes se retrouve également pour les sutures cutanées avec des premiers essais *in vivo* ¹⁴². De plus, la photothérapie au rose Bengale intervient dans la passivation tissulaire de la peau : cela améliore la cicatrisation et inhibe l'activité des myofibroblastes, ce qui limite la fibrose et les contractures ¹⁴³. On peut supposer que cette analogie tissulaire peut s'étendre à la cornée. En ophtalmologie, cette propriété de « photocollage » s'avère intéressante dans les chirurgies de pose d'implant cristallin suite à une phacoémulsification par exemple ¹⁴⁴. Il a également été démontré chez le lapin *in vivo* que la photothérapie au rose Bengale permet de diminuer l'opacification capsulaire suite à la phacoémulsification ¹⁴⁵.

Le rose pourrait aussi être utilisé dans le traitement du glaucome. Actuellement, c'est la vertéporfine, un autre agent photosensibilisant, qui est à l'étude car son usage est approuvé par la FDA pour le traitement des néovascularisations choroïdiennes. Les premiers essais ont démontré son efficacité et sa sécurité, avec des premiers essais chez l'Homme ^{146,147}. Elle est injectée par voie intra veineuse et diffuse dans les procès ciliaires, ces derniers sont alors détruits une fois exposés à la source de lumière par voie trans-sclérale ^{148,149}. Le rose Bengale pourrait être une alternative d'agent photosensibilisant.

Le rose Bengale a donc différents usages, seul, ou combiné à la lumière. Mais il peut également être utilisé avec des ultrasons ¹⁵⁰. Tout comme pour la photothérapie, il présente alors des propriétés antimicrobiennes et anticancéreuses. Cette technique peut s'avérer intéressante pour les tissus profonds qui ne peuvent donc pas être exposés à la lumière.

ETUDE EXPERIMENTALE

IV. ETUDE EXPERIMENTALE DE FAISABILITE D'UNE PHOTOTHERAPIE AU ROSE BENGAL CHEZ LE CHEVAL

L'objectif de cette étude est d'étudier la faisabilité d'une photothérapie au rose Bengale chez le cheval à partir d'expérimentations *ex vivo*. Pour cela, nous avons tout d'abord étudié la pénétration du rose Bengale au sein de la cornée du cheval et comparé différents protocoles d'administration afin d'optimiser cette pénétration. Dans un second temps, nous avons travaillé avec la lumière verte afin d'observer les éventuels effets de la photothérapie sur la cornée.

A. Matériel et méthodes

a. Préparation des échantillons.

Les globes oculaires ont été prélevés en abattoir dans l'heure suivant la mort de l'animal, par une énucléation trans-conjonctivale. Les prélèvements étaient conservés sous régime de froid, et traités dans la journée. Tous les globes ont été examinés afin de s'assurer de leur intégrité et de l'absence d'anomalie cornéenne significative. Au total, 70 yeux de chevaux ont été prélevés.

b. Solutions de rose Bengale

Des solutions à 0.1%, 1% et 10% ont été préparées en diluant la molécule (Rose Bengale, 85 ACROS Organics™) dans du NaCl isotonique 0.9%.

c. Procédure d'iontophorèse

Le générateur commercialisé pour l'iontophorèse de riboflavine a été utilisé ([Iontofor-Vet](#), OPIA Technologies, modèles ION-CXL pour les protocoles à 0.5 et 1 mA et le prototype K-IONO pour les protocoles à 2.5 et 4 mA).

Le dispositif comprend une source de courant continu et deux électrodes de charge opposée. L'anode ou électrode de retour était placée au niveau du nerf optique avec une aiguille 22G plantée directement sur le nerf (Figure 15). La cathode, constituée d'une électrode grillagée de 8 mm de diamètre était placée sur la cornée, sur une zone préalablement délimitée avec un trépan à cornée diamètre équivalent. Cette électrode est sertie dans une cupule-réservoir ronde avec un anneau de succion prévu pour permettre un maintien autonome et une étanchéité à la surface de l'œil. Cependant le rayon de courbure ne correspondant pas à celui de la cornée du cheval, l'électrode était maintenue en place manuellement tout le long de la procédure. De plus, afin de limiter les fuites de produits, des mousses hydrophiles étaient insérées dans le dispositif pour servir de réservoir.

Les intensités et durées sont définies par le générateur afin de délivrer un courant constant et une dose totale prédéfinie. Le générateur se stoppe automatiquement en cas de contact insuffisant entre l'électrode et la cornée.

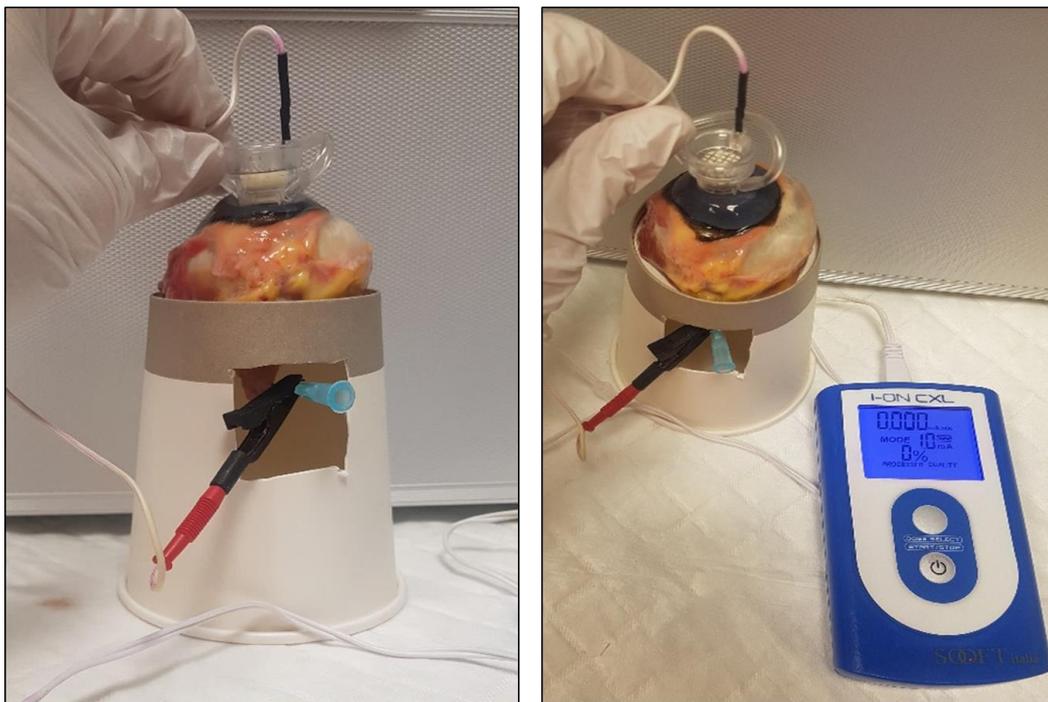


Figure 15 - Procédure d'iontophorèse, à l'aide du dispositif IontoforvetND

d. Source de lumière

Pour les besoins de l'étude, un dispositif basé sur la technologie LED a été développé par la société [EFFILUX](#). La lampe délivre un faisceau lumineux de 12 mm centré sur 550 nm avec un filtre bande de 33 nm et délivrant une irradiance de 234 mW.cm².

e. Protocoles d'administration

Dans une première étude (N cornées = 31), nous avons évalué l'influence de la barrière représentée par l'épithélium cornéen sur la diffusion de la molécule. Nous avons donc comparé pour les 3 concentrations testées (i.e. 0.1%, 1% et 10%), l'influence de la présence (EPI-ON) ou de l'absence (EPI-OFF) de l'épithélium cornéen. Ce dernier a été retiré par désépithélialisation mécanique réalisée à l'aide d'une lame Beaver n°64, sous loupe binoculaire (x2.5), en prenant soin de ne pas léser le stroma sous-jacent. Pour chaque condition, nous avons administré le rose soit :

- En instillation, telle que proposée dans le protocole de Dresde, soit d'une goutte de rose Bengale sur la cornée toutes les 2 minutes durant 30 minutes.
- En iontophorèse, suivant les 2 protocoles standard de l'appareil utilisé (ION-CXL), délivrant chacun une dose totale de 10mA.min.

Ces conditions sont résumées dans la figure 16.

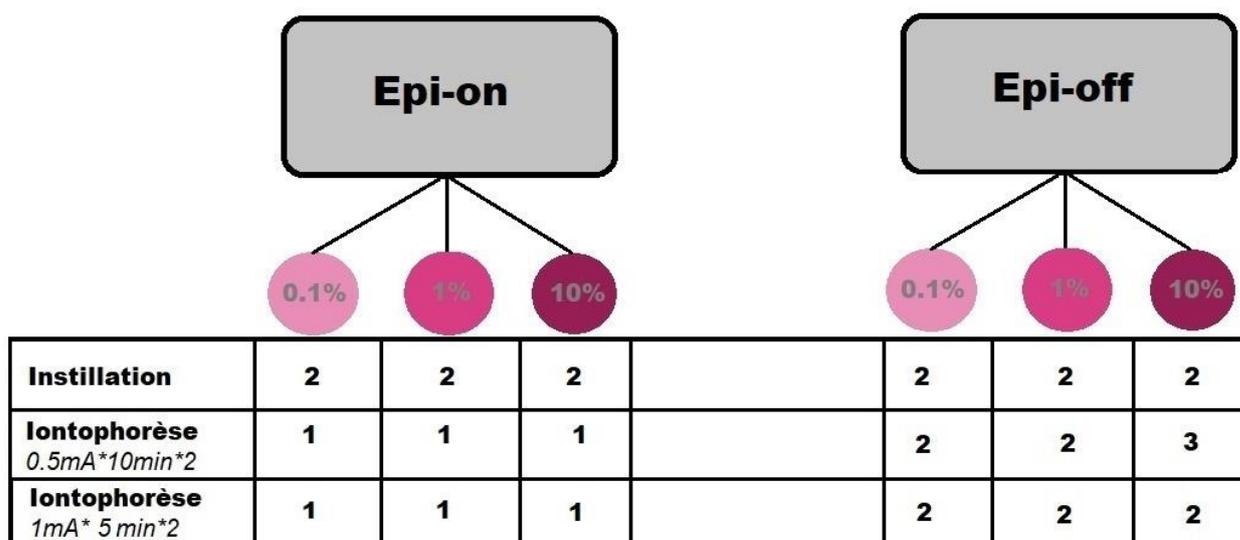


Figure 16 - Nombre de cornées dans les conditions comparées épi-on/épi-off

Dans une deuxième étude (N cornée = 26), nous avons testé l'effet du courant appliqué sur l'efficacité de l'iontophorèse. Quatre protocoles à 10 mA.min ont été testés, ainsi qu'un protocole à 20 mA.min. Pour ces conditions, seules les concentrations à 0.1 et 1% de rose Bengale ont été testées, du fait du nombre de cornées limité et la concentration 10% étant considérée comme trop concentrée pour être utilisable en pratique.

Ces conditions sont résumées dans la figure 17.

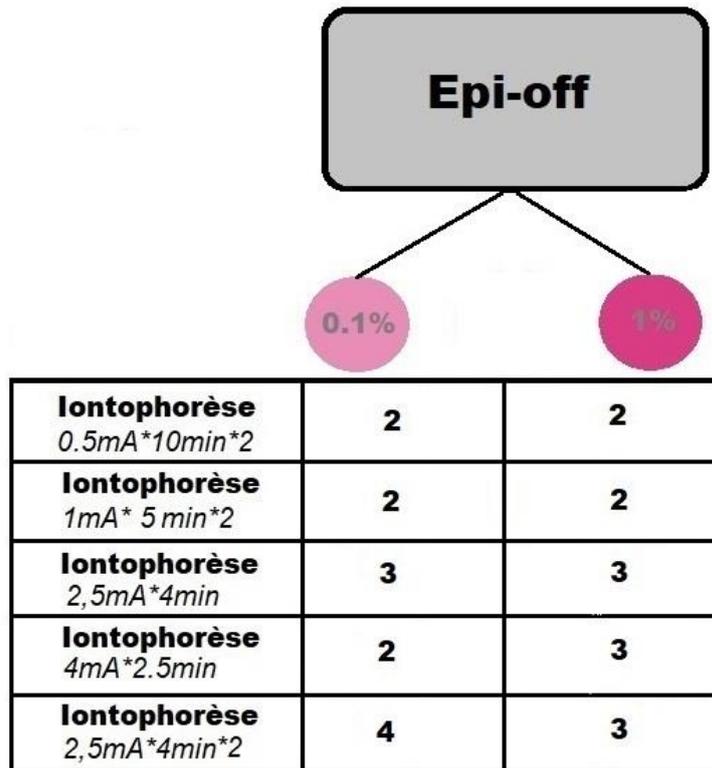


Figure 17 - Nombre de cornées par condition pour les différents protocoles en épi-off

Enfin, dans une dernière étude (N cornées = 13) les conditions d'iontophorèse 10 mA.min avec administration de rose Bengale 0.1% et 1% ont été reproduites et les cornées ont été exposée à la source de lumière verte (pic à 550 nm, irradiance 234 mW.cm², dose totale 150 J/cm²) durant 10 min.

Ces conditions sont résumées dans la figure 18.

Nous avons eu accès dans cette dernière étape à un pachymètre ultrasonore (iPac® pachymeter, Reichert) (non disponible sur les expériences précédentes), qui nous a permis de suivre les variations d'épaisseur de la cornée, avant et après désépithélialisation, après administration de rose et après exposition à la lumière.

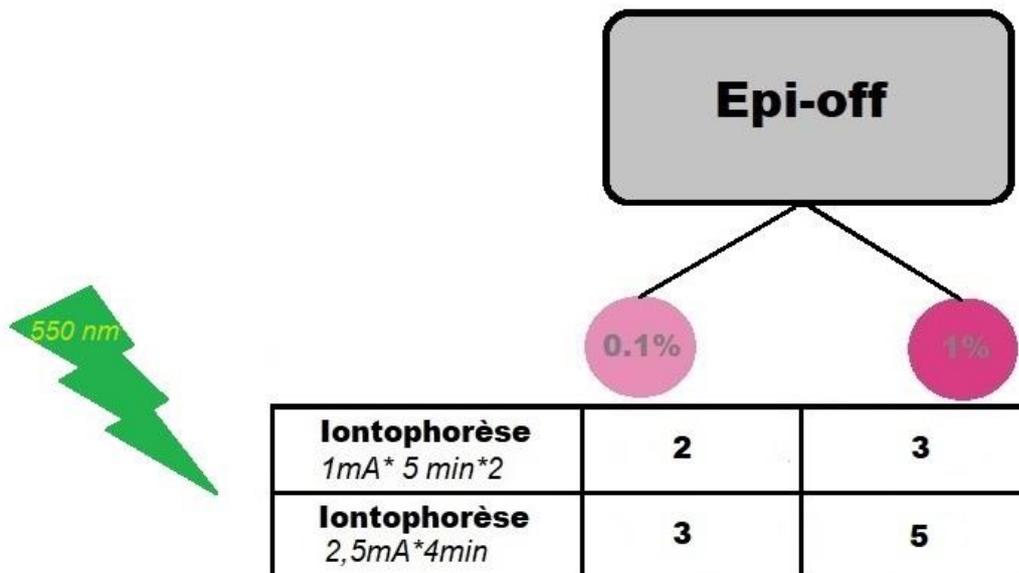
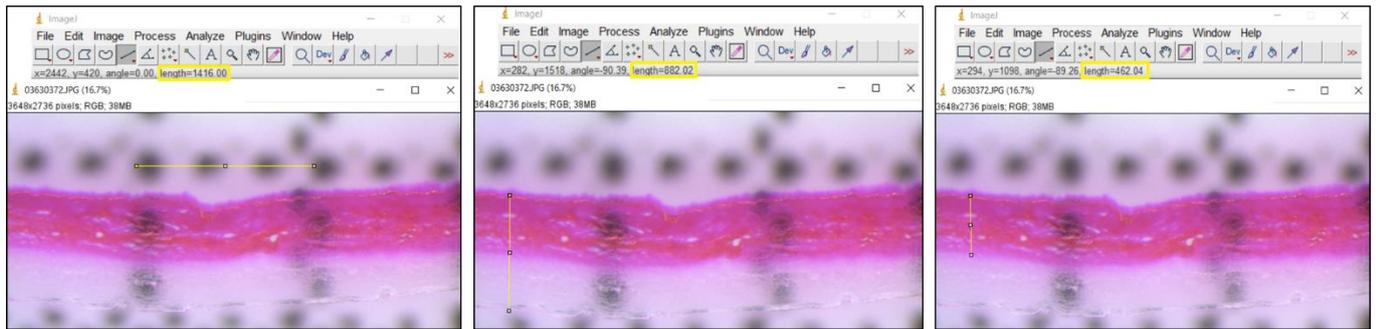


Figure 18 - Nombre de cornées pour les protocoles avec lumière

f. Traitement des échantillons

Dès la fin du protocole d'application, les cornées étaient disséquées au limbe à l'aide de ciseaux Stevens puis immédiatement plongées dans de l'azote liquide afin de stopper la progression du rose dans le stroma. Les prélèvements étaient ensuite fixés dans de la colle OCT (optimal cutting temperature compound) puis coupés au cryostat afin d'obtenir des coupes de 15 µm d'épaisseur. Les lames étaient ensuite observées au microscope x60 et photographiées. Pour calibrer la prise de vue, une trame millimétrique était placée sous chaque lame.

Pour chaque cornée, les trois meilleures images étaient conservées afin de réaliser les mesures. Chaque cornée a été mesurée par deux observateurs, à l'aide du logiciel [ImageJ®](#). Tout d'abord, chaque observateur mesurait la trame millimétrique afin d'obtenir une équivalence pixels/millimètre afin de pouvoir raisonner en valeur absolue. Ensuite, chaque observateur mesurait l'épaisseur totale de la cornée et la pénétration de rose Bengale en un même point de la cornée (Figure 19).



Trame millimétrique

Epaisseur totale

Diffusion rose bengale

Figure 19 - Exemple de mesures effectuées dans ImageJ

Cette opération était renouvelée sur 2 autres localisations afin d'obtenir 3 points de mesures pour chaque cornée (Figure 20). Les ratios et pourcentages de pénétration ont ensuite été calculés à partir des valeurs compilées des deux observateurs.

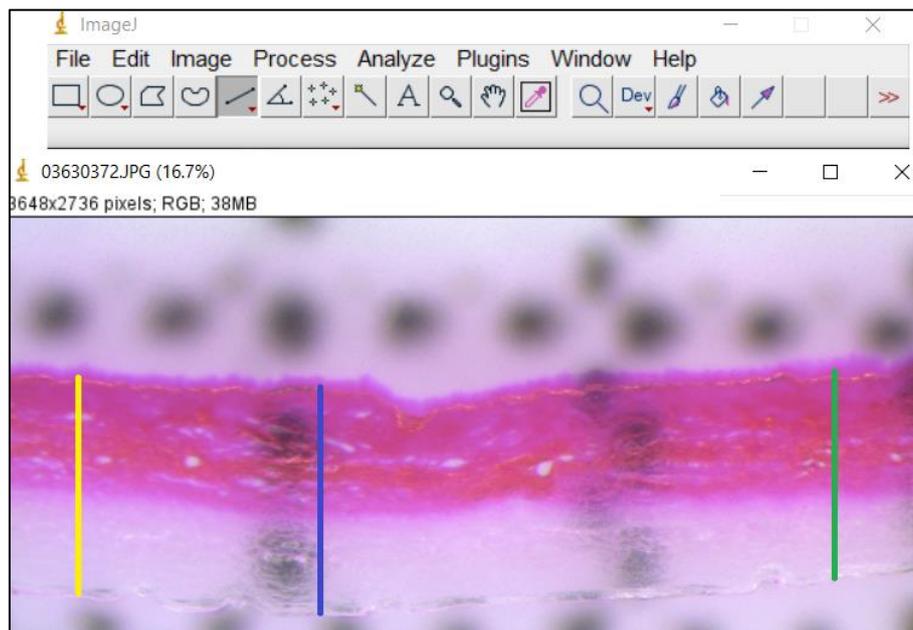


Figure 20 - Exemple de représentation des 3 lieux de mesure, en jaune, bleu et vert.

g. Analyse statistique

Une première étude préliminaire a été réalisée sur 3 cornées afin d'évaluer le biais de mesure entre les 2 observateurs. Les mesures de pénétration et de cornées

totales ont été comparées à partir de la moyenne de ces mesures et de la différence entre les observateurs.

Une fois l'ensemble des mesures terminées, un test de Student était réalisé avec les variances de chaque groupe de l'étude afin de s'assurer que les conditions définies ont bien un effet significatif sur la pénétration du rose Bengale.

B. Résultats

a) Validation de la méthode de mesure

Dans une première séance préliminaire, 3 cornées traitées par instillation ont été fixées et analysées pour vérifier que la cohérence des mesures effectuées par les 2 opérateurs.

La dispersion des écarts à la moyenne des mesures a été compilée dans un graphique (Figure 21).

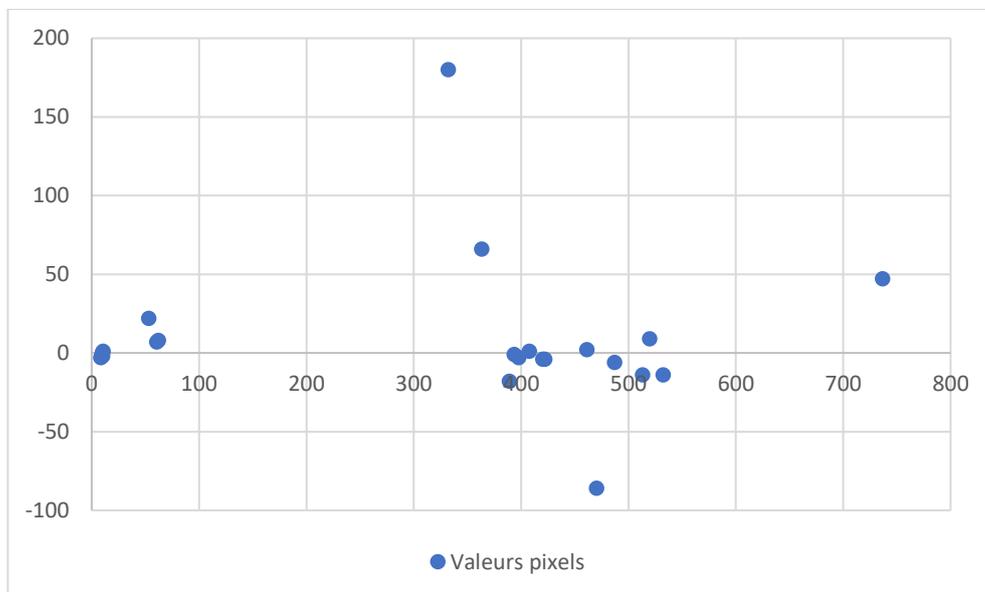


Figure 21 - Répartition des écarts à la moyenne des mesures par les 2 opérateurs

Sur l'ensemble des mesures, on constate qu'une seule présente une différence notable entre les deux observateurs et 3 sont plus discutables. Le reste des

mesures (83%) présente une différence absolue de 50 μm , soit l'équivalent de 5% de la cornée environ.

Concernant les pourcentages de pénétration (Figure 22), on constate que pour les faibles taux de pénétration, les deux observateurs ont des mesures relativement proches (moins de 1% de différence). Un biais un peu plus important est noté sur les cornées où la pénétration est plus profonde, mais reste néanmoins inférieur à 5%. La méthode de mesure a donc été considérée comme suffisamment objective pour permettre la compilation des mesures des deux observateurs.

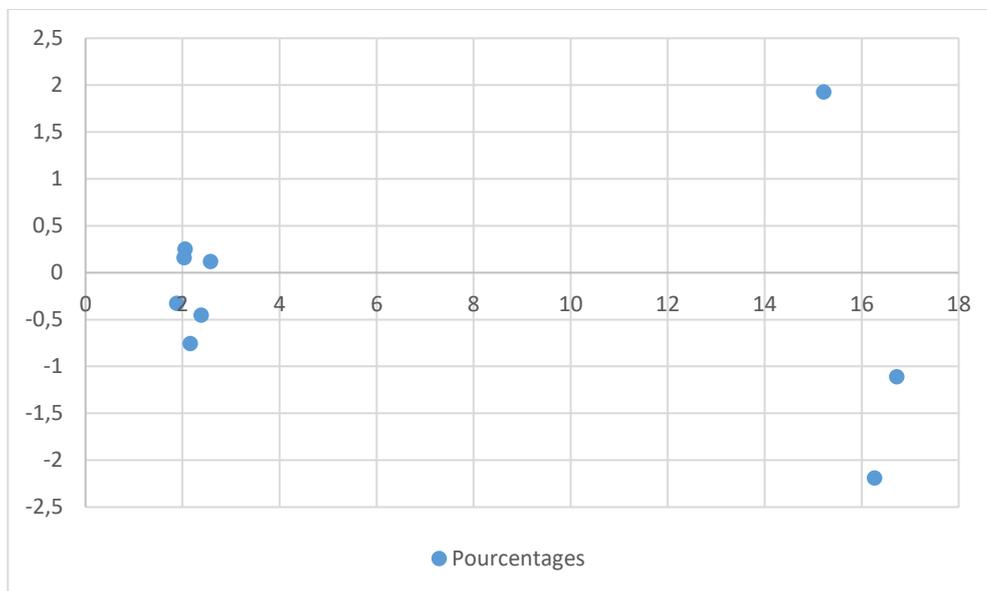


Figure 22 - Répartition des écarts de pourcentages de pénétration selon les observateurs

b) Impact de l'épithélium sur la diffusion du rose Bengale

Plusieurs cornées ont dû être exclues de l'étude suite à des mauvaises manipulations (mauvais contact de l'électrode, perforation du globe, ...) aboutissant à des mesures aberrantes comparées aux autres cornées d'une même condition. Un premier lot de cornées a été utilisé pour comparer la pénétration du rose Bengale dans la cornée selon que l'épithélium cornéen soit conservé ou non. Les concentrations de rose Bengale (0.1%, 1% et 10%) ainsi que les protocoles d'administrations (instillation

ou iontophorèse) ont également été comparés. Les résultats obtenus pour les pourcentages de pénétration totale sont présentés en figure 23.

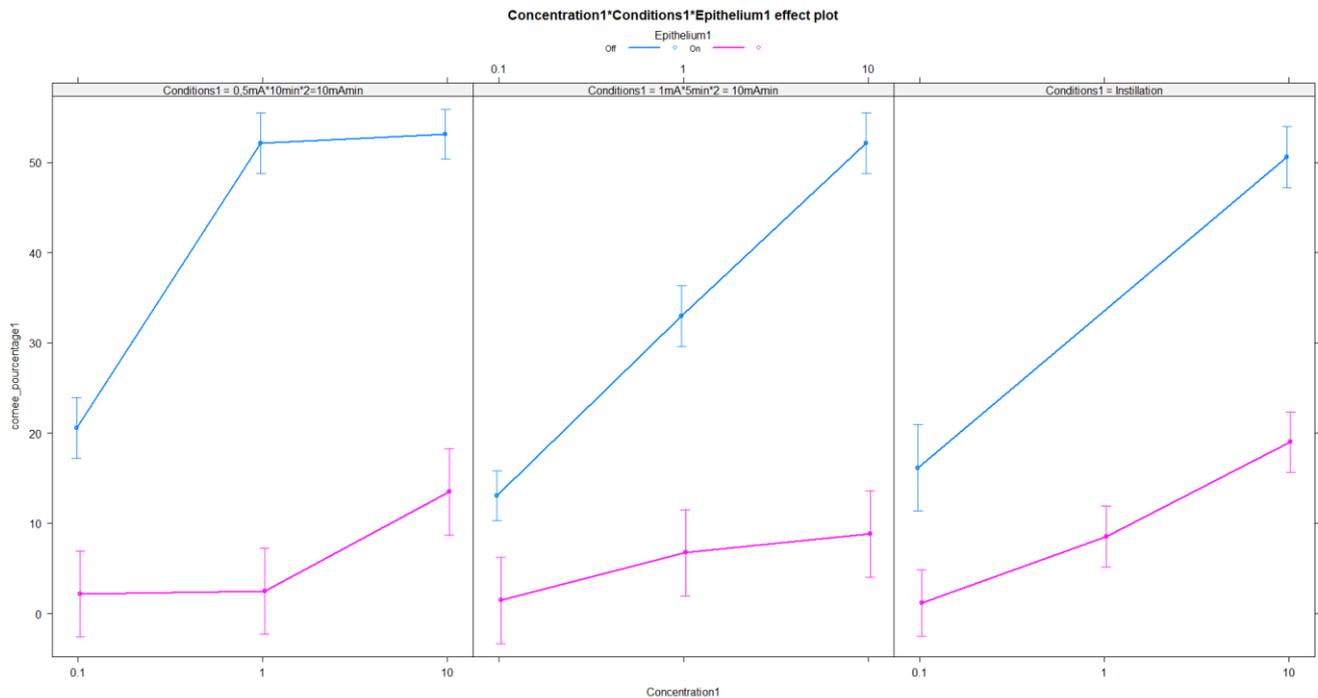


Figure 23 - Comparaison des cornées épi-on/épi-off

Une analyse de variance a été réalisée (disponible en annexe) et démontrant que l'ensemble des conditions (épithélium conservé ou non, concentration du rose et conditions d'applications) ont un effet sur le pourcentage de pénétration du rose dans la cornée.

Concrètement, on constate que la désépithélialisation améliore grandement la pénétration du rose Bengale. En effet, si l'épithélium est conservé, la pénétration du rose se limite à la couche épithéliale (10% antérieurs de la cornée), excepté pour l'instillation de rose Bengale 10% qui pénètre légèrement dans le stroma antérieur. De plus, pour l'ensemble des cornées, il semble que plus le rose soit concentré, meilleure soit la pénétration.

Concernant les cornées épithélialisées, l'iontophorèse ne semble pas améliorer significativement les résultats, avec une tendance de pénétration même légèrement meilleure pour l'instillation.

Après désépithélialisation, l'effet de l'iontophorèse est significatif : le protocole à 1mA*5min*2 donne des résultats équivalents à légèrement meilleurs que l'instillation ; mais le protocole à 0.5mA*10min*2 permet une nette amélioration de la pénétration du rose, notamment pour la concentration 1% où il permet d'atteindre en moyenne 52% de la cornée (soit une diffusion moyenne de 341 μm) au lieu de 28% en instillation et 33% avec le protocole à 1mA*5min*2.

Le retrait de l'épithélium semble donc indispensable à une pénétration en profondeur du rose Bengale, malgré l'utilisation de l'iontophorèse.

c) Effet du courant électrique

La pénétration étant améliorée avec le retrait de l'épithélium, un deuxième lot de cornées a donc été soumis à différents protocoles d'iontophorèse (dose totale 10 et 20 mA.min) après désépithélialisation afin de voir si le courant administré influe sur la pénétration du rose. Seules les concentrations à 0.1 et 1% ont été utilisées pour ces expérimentations. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 24.

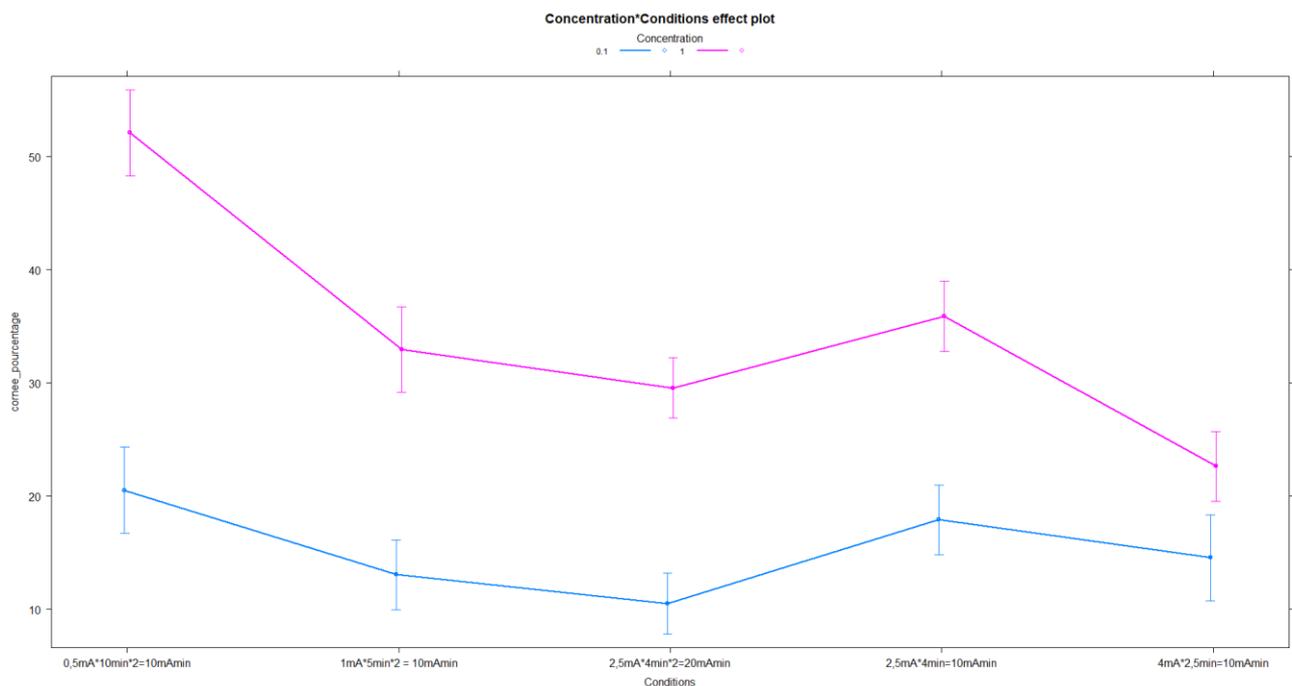


Figure 24 – Effet des conditions d'iontophorèse sur la diffusion du rose Bengale

Une analyse de variance a été effectuée (disponible en annexe) et démontre un effet significatif de la concentration et du courant sur la pénétration.

On constate que, tout comme lors de l'expérimentation précédente, la pénétration est meilleure avec le rose Bengale à 1% qu'à 0.1% pour l'ensemble des protocoles. Concernant l'iontophorèse, le protocole 0.5mA*10min*2 à 10mA.min est nettement supérieur aux autres avec une pénétration moyenne de 52% pour le rose à 1% et 21% pour le rose 0.5%. Ces résultats préliminaires suggèrent que plus l'intensité du courant est haute, moins le rose pénètre. Le protocole à 2.5mA réalisé en 4 et 8 minutes, pour obtenir des doses totales de 10 et 20mA.min respectivement, est également moins efficace quand il est prolongé.

Les protocoles plus rapides et plus intenses ne permettent donc pas d'obtenir de meilleurs résultats. Le protocole à 0.5mA semble être à privilégier pour une pénétration optimale.

d) Effet de la lumière

Les dernières expérimentations se sont intéressées à l'effet de la lumière sur la polymérisation des fibres de collagène, matérialisée par une compaction de la cornée. Les mesures obtenues ont été regroupées sous forme de graphique visible en figure 25.

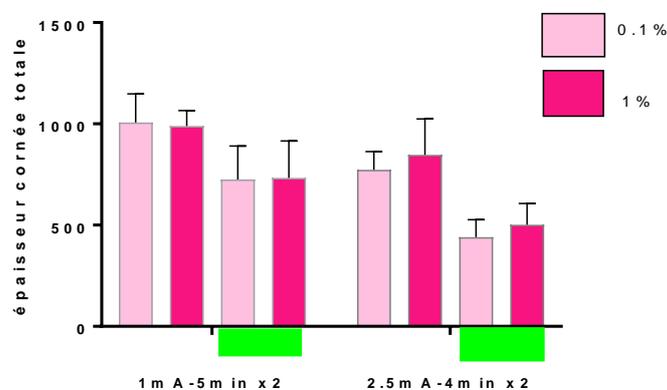


Figure 25 - Effet de la lumière sur l'épaisseur totale des cornées

L'analyse de variance réalisée à partir des mesures (disponible en annexe) a montré que seules les conditions d'iontophorèse et l'irradiation à la lumière avaient un effet significatif sur l'épaisseur totale de la cornée.

En effet, comme on peut le voir sur le graphique, la concentration de rose Bengale utilisée n'a pas d'influence significative sur l'épaisseur totale de la cornée. Les cornées traitées avec 2.5mA*4min d'iontophorèse sont toutefois moins épaisses que celles traitées à 1mA*5min*2 mais cet effet est présent sur l'ensemble des cornées, exposées à la lumière ou non.

Au cours de cette série d'expérience, un suivi par pachymétrie a pu être effectué à chaque étape : avant et après désépithélialisation, après iontophorèse et après illumination. L'ensemble des mesures est disponible en annexe. Les résultats ont été regroupés sous forme de graphique (Figure 26) avec « T0 » = mesure initiale avant désépithélialisation et « fin procédure » = mesure après iontophorèse.

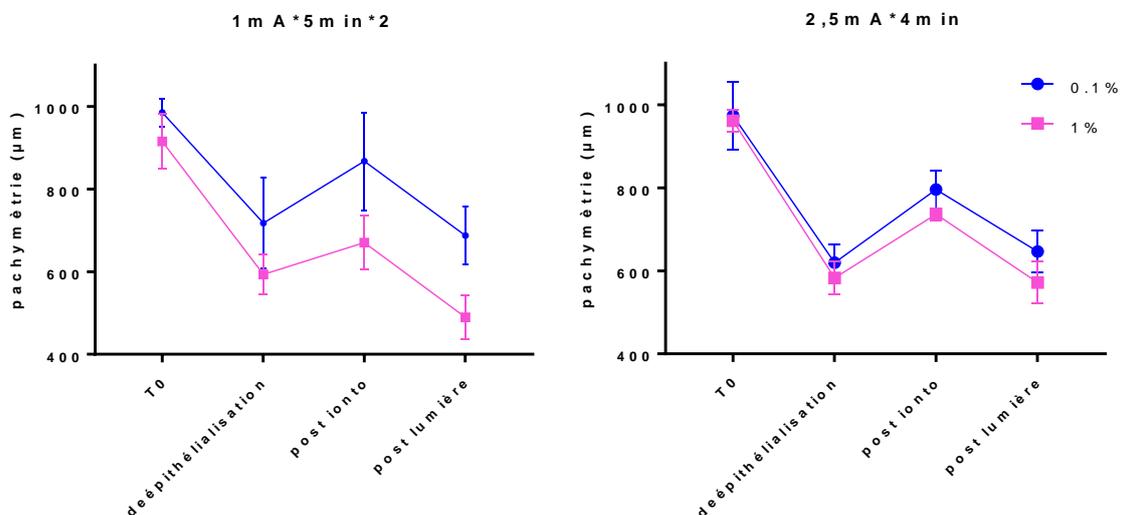


Figure 26 - Mesures de pachymétrie

L'analyse de variance réalisée et disponible en annexe a mis en évidence un effet de signification des périodes et de la concentration de rose utilisée. Les conditions de iontophorèse n'ont pas de différence significative.

Les cornées traitées au rose 1% semblent légèrement moins épaisses, donc plus compactes que celles traitées au rose 0.1% mais les différences sont peu significatives.

Les mesures des périodes ont été comparées deux à deux pour chaque période successive (analyse de variance disponible en annexe). L'analyse a démontré que toutes les périodes étaient significativement différentes, exceptées après désépithélialisation et suite à l'irradiation à la lumière.

Comme on peut le voir sur le graphique, les mesures de cette période sont effectivement très proches, avec des mesures moyennes après exposition à la lumière légèrement inférieures. Les cornées après illumination ne sont donc pas significativement plus compactes qu'avant traitement. Pour les cornées avec rose à 1% iontophorèse à $1\text{mA} \cdot 5\text{min} \cdot 2$, on note toutefois une compaction un peu plus marquée après irradiation (490 μm contre 593 μm en moyenne après désépithélialisation).

C. Discussion

Cette étude évalue pour la première fois la possibilité d'utiliser le rose Bengale comme agent photo-activable pour réaliser un *cross-linking* des fibres de collagène du stroma cornéen chez le cheval. La faisabilité d'un *green light cross linking* est connue *in vivo* et *in vitro* à la fois chez le lapin et chez l'homme^{107,115}. Cependant, comme le montraient déjà les résultats obtenus par Gallhoeffler *et al.* sur la pénétration de la riboflavine⁴⁷, des variations interspécifiques importantes peuvent exister et il apparaît impérieux d'évaluer cette technique prometteuse chez le cheval. Nos résultats amènent plusieurs points de discussion.

Tout d'abord, **l'épithélium cornéen est un obstacle majeur à la diffusion du rose bengale et l'iontophorèse ne permet pas de s'affranchir de cet effet de barrière**. L'étude de Gallhoeffler *et al.* avait déjà démontré que la pénétration de la riboflavine après instillation, sur les cornées de chevaux intacts était très limitée⁴⁷. La riboflavine étant de poids moléculaire et de taille inférieure au rose Bengale, il n'est pas surprenant de retrouver cette barrière avec le rose Bengale. Seul la forte concentration (10%) semble pouvoir traverser l'épithélium, mais la pénétration stromale reste très superficielle. La figure 27 illustre bien ce phénomène.

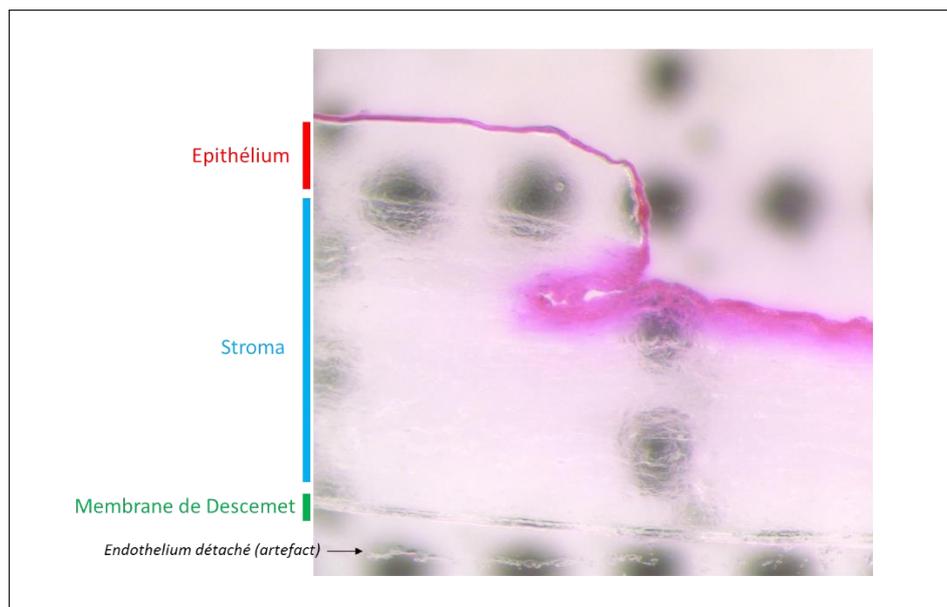


Figure 27 - Image après recoupe d'une cornée traitée par instillation avec du rose Bengale 1%. La recoupe est centrée sur la périphérie de la zone de désépithélialisation et on voit très clairement l'absence complète de diffusion du rose en regard de l'épithélium dans le stroma antérieur

Par ailleurs, il apparaît que l'intégralité de l'épithélium doit être retiré afin d'obtenir une diffusion significative du rose bengale au sein du stroma. En effet, pour des cornées sur lesquelles la basale de l'épithélium n'avait pas été retirée, la diffusion stromale du colorant était négligeable (Figure 28).

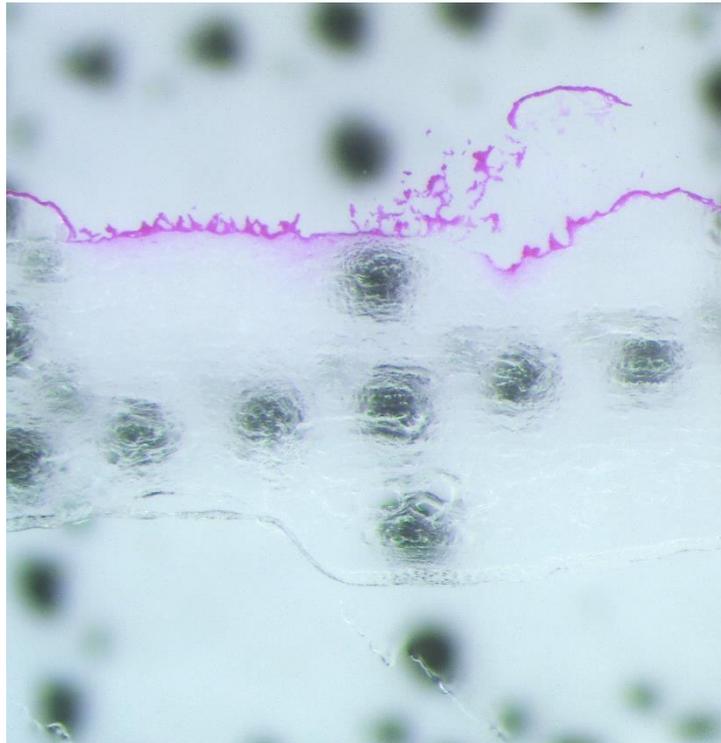


Figure 28 - Désépithélialisation incomplète avec conservation de la basale de l'épithélium. On note l'absence de pénétration stromale du rose Bengale

De plus, l'iontophorèse ne permet pas la traversée de l'épithélium chez le cheval, même sur des protocoles de 20 minutes à 10mA.min. Ces résultats sont, là aussi, en accord avec les études déjà publiées sur la riboflavine où, avec un protocole d'iontophorèse similaire, la pénétration stromale de la riboflavine dans la cornée du cheval était nulle si l'épithélium était conservé ¹⁰¹.

Sur le plan technique et pratique, des difficultés ont été rencontrées pour désépithélialiser correctement les cornées fraîches à la lame Beaver 64 ND. La volonté était de ne pas recourir à une désépithélialisation chimique (alcool), par crainte de

modifier les propriétés du stroma antérieur, en particulier sa perméabilité. De nombreuses cornées ont dû être écartées car la désépithélialisation était incomplète.

D'autres cornées ont également été exclues suite au protocole d'iontophorèse. En effet, le système de succion n'est pas fonctionnel sur les cornées de chevaux et le fait de travailler en post-mortem, donc sur des globes relativement mous, entraîne un manque de stabilité de l'électrode. Le contact avec la cornée peut donc être de mauvaise qualité.

Par ailleurs, sur la première série de cornées, un manque d'anticipation sur le stockage à plat des cornées dans les cassettes de stockage après prélèvement et avant congélation a rendu certaines lames inexploitable. Ces conditions ont donc été refaites lors des sessions suivantes, avec une attention particulière à la disposition du prélèvement dans la cassette.

Une autre difficulté rencontrée a été de déterminer de manière objective la limite de diffusion du Rose Bengale. Cette limite était beaucoup moins nette avec la solution de rose bengale à 0,1% qu'avec les solutions plus concentrées, y compris en transformant l'image en niveau de gris. Il a donc été décidé de travailler directement sur les photos brutes et d'évaluer le biais de mesure. Le biais entre observateurs a été estimé à 5% environ, et considéré comme acceptable pour l'interprétation des mesures.

En l'absence d'épithélium cornéen, **l'iontophorèse améliore sensiblement la diffusion de la molécule** par rapport à l'instillation et elle permet de réduire le temps nécessaire à cette étape. Zibura *et al.* ont d'ailleurs récemment démontré que ce procédé appliqué à la riboflavine permettait de saturer complètement le stroma cornéen du cheval¹⁰¹. Dans notre étude, les protocoles de faible intensité et de plus longue durée ont permis d'obtenir la meilleure diffusion du rose Bengale. Cependant, il semble difficile de progresser au-delà de la moitié du stroma. Il n'en demeure pas moins que l'ensemble des protocoles testés a permis d'obtenir une pénétration au moins équivalente, si ce n'est meilleure, que celle obtenue avec le procédé d'instillation classique, dans un temps plus réduit. Ceci présente un intérêt clinique direct. La réalisation d'une iontophorèse en pratique clinique sur cheval debout sous sédation forte et anesthésies loco-régionales est plus complexe, du fait de la verticalité du dispositif ainsi que de l'absence d'un moyen de fixation de l'électrode à la cornée.

Les protocoles rapides sont donc plus faciles à exécuter. Si leur efficacité est à minima équivalente à celle de l'instillation, leur utilisation permet un réel gain de temps sur la procédure globale (Figure 29).

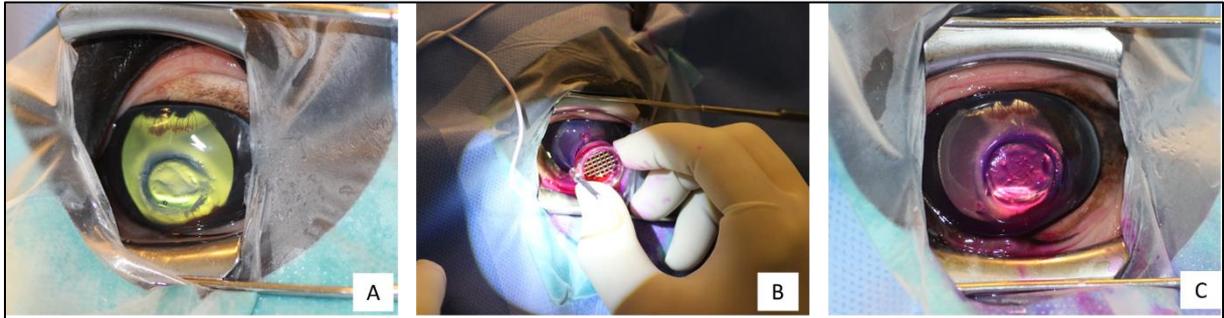


Figure 29 - Réalisation d'une iontophorèse de rose Bengale 1% sur un cheval sédaté (A) Kératectomie préalable pour retirer un abcès cornéen d'origine mycosique (B) Dispositif en place (C) Aspect post traitement

Enfin, bien que très préliminaires, les premiers tests avec le dispositif LED spécialement développé à cet effet semble permettre d'induire une réticulation des fibres de collagène du stroma, par réaction photochimique. Ceci demeure toutefois à objectiver et à caractériser. Nous avons subjectivement observé une compaction du collagène du stroma antérieur sur les cornées traitées à la lumière verte à 550 nm pendant 10 minutes (Figure 30). En particulier, à la cryocoupe, les fibres apparaissent beaucoup plus cohésives et solidaires. Par ailleurs, ces échantillons étaient plus compliqués à recouper.

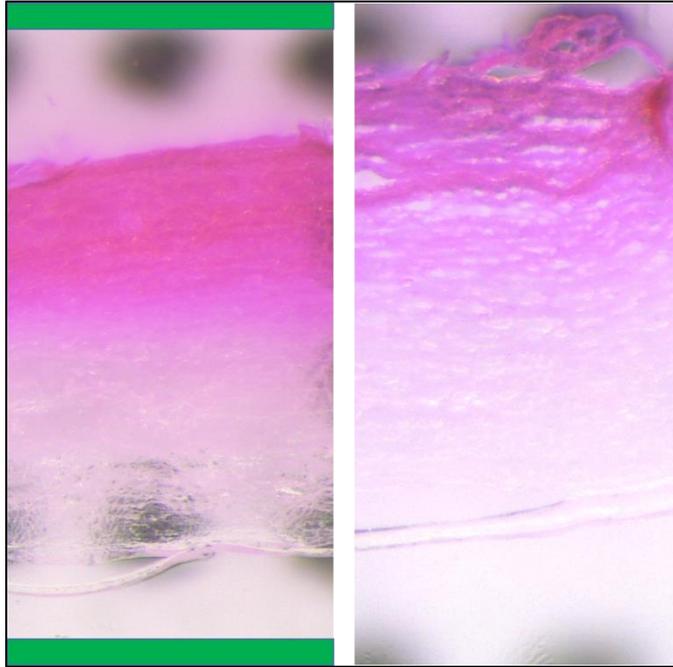


Figure 30 - Effet du traitement Cross-linking. Les 2 cornées ont reçu le même protocole d'iontophorèse après désépithélialisation. Celle de gauche a été exposée à 10 min de lumière verte (550nm). Notez l'aspect compacté et très réorganisé du stroma antérieur, par ailleurs coloré en rose

Les expérimentations présentées dans ce travail ne permettent pas d'objectiver cette réticulation. Bien qu'une phase d'épaississement de la cornée suite à l'administration du rose Bengale soit observée, puis une phase d'amincissement suite à l'illumination par la lumière verte, il est impossible d'attribuer ces variations de pachymétrie à la seule réticulation. Un effet d'œdème stromal consécutif à l'administration du rose Bengale, puis un effet de déshydratation lors de l'exposition à la lumière ne peuvent être exclus (bien que n'expliquant pas une meilleure tenue des cornées à la cryocoupe). L'effet biologique réel d'une telle procédure sur les cornées de cheval doit donc être investigué, par exemple en réalisant des tests de traction (appréciation de la rigidité)¹⁵¹, ou de résistance à la protéolyse¹²³.

Il serait également possible d'observer ces cornées en microscopie biphotonique et génération de seconde harmonique. En effet, ces techniques permettent la visualisation de l'organisation structurale du collagène et sont applicables sur la cornée^{152,153}. Ces observations permettraient d'analyser la réorganisation et la compaction des fibres de collagène, ainsi que la zone dans laquelle ce procédé a lieu. Ainsi, ces données pourraient être comparées à celles connues avec la riboflavine et les UV-A. Il pourrait également être intéressant de comparer la

réticulation du collagène selon les concentrations de rose Bengale et les protocoles utilisés (iontophorèse ou protocole de Dresde).

Notons qu'en se fondant sur les données connues à ce jour dans les autres espèces et en particulier chez le lapin, la procédure a été déployée sur quelques cas de chevaux atteints de kératite ou d'ulcération compliquées. Les premiers essais précliniques donnent des résultats très encourageants, notamment en améliorant la prise en charge des kératites infectieuses (Figure 31).



Figure 31 - Cas cliniques de kératites infectieuses traitées par photothérapie au rose Bengale et lumière verte

- A :** 1 - kératectomie lamellaire dans un cas de kératomycose stromale
 2- aspect post-opératoire après cross-linking (rose Bengale 1%, illumination 550nm)
 3 à 5 - suivi d'épithélialisation de J3 à J10. Le cheval est sorti d'hospitalisation à ce stade et le suivi ultérieur par téléphone rapportait une bonne évolution
- B :** 1 - kératomalacie extensive suite à une surinfection par *Pseudomonas aeruginosa*.
 2 - débridement cornéen et kératectomie lamellaire
 3 – post-opératoire immédiat
 4 - suivi à 2 mois
 5 - suivi à 6 mois
- C :** 1 - abcès cornéen traité par kératectomie
 2 - cross-linking rose Bengale
 3 - greffe de biomatériau (sous-muqueuse vésicale porcine, AcellvetND)
 4 - aspect à 10 jours post-opératoire
 5 - aspect à 4 semaines

CONCLUSION

Les ulcères cornéens représentent une grande partie des affections oculaires du cheval. La précocité et l'adéquation du diagnostic sont des éléments clés pour la mise en place d'une thérapeutique adaptée. Médicalement, les moyens à disposition sont parfois insuffisants pour traiter l'affection. C'est le cas notamment pour les ulcères d'origine fongique. Le traitement chirurgical reste envisageable mais représente un coût supplémentaire, et s'accompagne toujours d'une fibrose cicatricielle pouvant avoir un impact sur la fonction visuelle.

Le *cross-linking* s'avère donner des résultats très encourageants pour le traitement des ulcères à kératomalacie. L'utilisation du rose Bengale chez l'Homme et le lapin a également donné de bons résultats sur les ulcères d'origine fongique. Le recours au *cross-linking* est un entre-deux entre le traitement médical et le traitement chirurgical. En effet, la désépithélialisation est indispensable à sa réalisation. Le développement de l'iontophorèse permet néanmoins de travailler sur des protocoles relativement rapides, plus faciles à instaurer en clinique. Les premiers essais thérapeutiques sur des ulcères fongiques ou à kératomalacie chez les chevaux sont très prometteurs. Le *cross-linking* s'avère également très intéressant dans les cas de bactéries multi-résistantes.

Les études cliniques sont encore à poursuivre, notamment pour estimer l'incidence réelle du *cross-linking* dans la prise en charge de ces ulcères (efficacité, estimation de la fibrose cicatricielle par rapport à une kératectomie, ...). Au vu des études actuellement publiées chez les autres espèces, le recours au *cross-linking* en médecine vétérinaire pourrait également se développer pour d'autres usages : sutures, cancérologie, ...

BIBLIOGRAPHIE

1. Barone, R. Barone Tome 7 Neurologie II 2010.pdf. (2010).
2. Gelatt, K. N., Gilger, B. C. & Kern, T. J. *Veterinary Ophthalmology*. 2186.
3. Zieske, J. D., Takahashi, H., Hutcheon, A. E. K. & Dalbone, A. C. Activation of Epidermal Growth Factor Receptor during Corneal Epithelial Migration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 1346–1355 (2000).
4. Crosson, C. E., Klyce, S. D. & Beuerman, R. W. Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **27**, 464–473 (1986).
5. Maggs, D. J. Cornea and sclera. in *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology, 4th Edition* (eds. David, J., Bysc & Paul, E.) 175–202 (W.B Saunders, 2008).
6. Brooks, D. E., Matthews, A. & Clode, A. Diseases of the cornea. in *Equine Ophthalmology 3rd edition* (ed. Gilger, B. C.) 252–368 (John Wiley & Sons, Inc, 2016).
7. Fukuda, M. *et al.* Fibronectin in the tear film. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**, 459–467 (1996).
8. Ollivier, F. J. *et al.* Proteinases of the cornea and preocular tear film. *Vet. Ophthalmol.* **10**, 199–206 (2007).
9. Strubbe *et al.* Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis. *Vet. Ophthalmol.* **3**, 111–119 (2000).
10. Jd, L., Ga, S. & Sm, R. Lacerations of the equine eye: a review of 48 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **184**, 1243–1248 (1984).
11. Andrew, S. & Willis, A. Diseases of the Cornea and Sclera. in *Equine Ophthalmology* 157–251 (2005). doi:10.1016/B0-72-160522-2/50007-8.
12. Gemensky-Metzler, A. J. *et al.* Changes in bacterial and fungal ocular flora of clinically normal horses following experimental application of topical antimicrobial or

- antimicrobial-corticosteroid ophthalmic preparations. *Am. J. Vet. Res.* **66**, 800–811 (2005).
13. McLaughlin, Brightman, Helper & Tomes. Pathogenic bacteria and fungi associated with extraocular disease in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **182**, 241–242 (1983).
 14. Moore, C. P., Fales, W. H., Whittington, P. & Bauer, L. Bacterial and fungal isolates from Equidae with ulcerative keratitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **182**, 600–603 (1983).
 15. Keller, R. L. & Hendrix, D. V. H. Bacterial isolates and antimicrobial susceptibilities in equine bacterial ulcerative keratitis (1993--2004). *Equine Vet. J.* **37**, 207–211 (2005).
 16. Voelter-Ratson, K., Pot, S. A., Florin, M. & Spiess, B. M. Equine keratomycosis in Switzerland: A retrospective evaluation of 35 horses (January 2000–August 2011). *Equine Vet. J.* **45**, 608–612 (2013).
 17. Galera, P. D. & Brooks, D. E. Optimal management of equine keratomycosis. *Vet. Med. Res. Rep.* **3**, 7–17 (2012).
 18. O'Day, D. M., Ray, W. A., Robinson, R. & Head, W. S. Efficacy of antifungal agents in the cornea. II. Influence of corticosteroids. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **25**, 331–335 (1984).
 19. Moore, C. P. *et al.* Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. *Am. J. Vet. Res.* **49**, 773–777 (1988).
 20. Scotty, N. C. Equine Keratomycosis. *Clin. Tech. Equine Pract.* **4**, 29–36 (2005).
 21. Kershaw, O. *et al.* Detection of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) in horses with keratoconjunctivitis. *Virus Res.* **80**, 93–99 (2001).
 22. Collinson, P. N., O'Rielly, J. L., Ficorilli, N. & Studdert, M. J. Isolation of equine herpesvirus type 2 (equine gammaherpesvirus 2) from foals with keratoconjunctivitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **205**, 329–331 (1994).

23. Rizvi, S. M. *et al.* Detection and distribution of equine herpesvirus 2 DNA in the central and peripheral nervous systems of ponies. *J. Gen. Virol.* **78**, 1115–1118 (1997).
24. Hollingsworth, S. R. *et al.* Detection of equine herpesvirus in horses with idiopathic keratoconjunctivitis and comparison of three sampling techniques. *Vet. Ophthalmol.* **18**, 416–421 (2015).
25. Crispin, S. M. Tear-deficient and evaporative dry eye syndromes of the horse. *Vet. Ophthalmol.* **3**, 87–92 (2000).
26. Spurlock, S. L., Spurlock, G. H. & Wise, M. Keratoconjunctivitis sicca associated with fracture of the stylohyoid bone in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **194**, 258–259 (1989).
27. Joyce, J. R. & Bratton, G. R. Keratoconjunctivitis sicca secondary to fracture of the mandible. *Vet. Med. Small Anim. Clin. VM SAC* **68**, 619–620 (1973).
28. Reilly, L. & Beech, J. Bilateral keratoconjunctivitis sicca in a horse. *Equine Vet. J.* **26**, 171–172 (1994).
29. Blythe, L. L. Otitis media and interna and temporohyoid osteoarthropathy. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **13**, 21–42 (1997).
30. Van Kampen, K. R. & James, L. F. Ophthalmic lesions in locoweed poisoning of cattle, sheep, and horses. *Am. J. Vet. Res.* **32**, 1293–1295 (1971).
31. Schwarz, B. C., Sallmutter, T. & Nell, B. Keratoconjunctivitis sicca attributable to parasympathetic facial nerve dysfunction associated with hypothyroidism in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **233**, 1761–1766 (2008).
32. Spiess, B. M., Wilcock, B. P. & Physick-Sheard, P. W. Eosinophilic granulomatous dacryoadenitis causing bilateral keratoconjunctivitis sicca in a horse. *Equine Vet. J.* **21**, 226–228 (1989).

33. Collins, B. K. (u U. of M., Johnson, P. J., Moore, C. P., Collier, L. L. & Shaw, M. S. Immune-mediated keratoconjunctivitis sicca in a horse. *Vet. Comp. Ophthalmol. USA* (1994).
34. Hendrix, D. V. *et al.* Corneal stromal abscesses in the horse: a review of 24 cases. *Equine Vet. J.* **27**, 440–447 (1995).
35. Brooks *et al.* Iris abscesses with and without intralenticular fungal invasion in the horse. *Vet. Ophthalmol.* **12**, 306–312 (2009).
36. Michau, T. M., Schwabenton, B., Davidson, M. G. & Gilger, B. C. Superficial, nonhealing corneal ulcers in horses: 23 cases (1989-2003). *Vet. Ophthalmol.* **6**, 291–297 (2003).
37. Dulaurent, T., Guillot, E. & Regnier, A. Indications et techniques de pose d'un cathéter sous-palpébral chez le cheval. *Nouv. Prat. Vét. Équine* 61–63 (2006).
38. Ollivier, F. J. *et al.* Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrix metalloproteinases in the tear film of horses with ulcerative keratitis. *Am. J. Vet. Res.* **64**, 1081–1087 (2003).
39. Hellander Edman, A., Ström, L. & Ekesten, B. Corneal cross-linking (CXL)-A clinical study to evaluate CXL as a treatment in comparison with medical treatment for ulcerative keratitis in horses. *Vet. Ophthalmol.* **22**, 552–562 (2019).
40. Greenberg, S. Ulcerative keratitis and keratomalacia in horses: Medical management and surgical considerations. *Equine Vet. Educ.* **31**, 179–182 (2019).
41. Chmielewski, N. T. *et al.* Visual outcome and ocular survival following iris prolapse in the horse: a review of 32 cases. *Equine Vet. J.* **29**, 31–39 (1997).
42. Szeimies, R.-M., Dräger, J., Abels, C. & Landthaler, M. Chapter 1 History of photodynamic therapy in dermatology. in *Comprehensive Series in Photosciences* (eds. Calzavara-Pinton, P., Szeimies, R.-M. & Ortel, B.) vol. 2 3–15 (Elsevier, 2001).

43. Spoerl, E., Mrochen, M., Sliney, D., Trokel, S. & Seiler, T. Safety of UVA-Riboflavin Cross-Linking of the Cornea. *Cornea* **26**, 385–389 (2007).
44. McCall, A. S. *et al.* Mechanisms of Corneal Tissue Cross-linking in Response to Treatment with Topical Riboflavin and Long-Wavelength Ultraviolet Radiation (UVA). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 129–138 (2010).
45. Kamaev, P., Friedman, M. D., Sherr, E. & Muller, D. Photochemical kinetics of corneal cross-linking with riboflavin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 2360–2367 (2012).
46. Huang, A. J., Tseng, S. C. & Kenyon, K. R. Paracellular permeability of corneal and conjunctival epithelia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **30**, 684–689 (1989).
47. Gallhoefer, N. S. *et al.* Penetration depth of corneal cross-linking with riboflavin and UV-A (CXL) in horses and rabbits. *Vet. Ophthalmol.* **19**, 275–284 (2016).
48. Pirie, C. G., Alario, A. F., Barysaukas, C. M., Gradil, C. & Uricchio, C. K. Manual corneal thickness measurements of healthy equine eyes using a portable spectral-domain optical coherence tomography device. *Equine Vet. J.* **46**, 631–634 (2014).
49. Wollensak, G., Spoerl, E., Wilsch, M. & Seiler, T. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea* **23**, 43–49 (2004).
50. Germann, J. A., Martínez-Enríquez, E., Martínez-García, M. C., Kochevar, I. E. & Marcos, S. Corneal Collagen Ordering After In Vivo Rose Bengal and Riboflavin Cross-Linking. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **61**, 28 (2020).
51. Green, T. J., Wilson, D. F., Vanderkooi, J. M. & DeFeo, S. P. Phosphorimeters for analysis of decay profiles and real time monitoring of exponential decay and oxygen concentrations. *Anal. Biochem.* **174**, 73–79 (1988).
52. Foote, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* **54**, 659 (1991).

53. John D. Spikes, Hui-Rong Shen, Pavla Kopeckova and Jindřich Kopeček. Photodynamic Crosslinking of Proteins.111. Kinetics of the FMN and Rose Bengal-sensitized Photooxidation and Intermolecular Crosslinking. *Photochem. Photobiol.* (1999).
54. Kochevar, I. E. & Redmond, R. W. Photosensitized production of singlet oxygen. *Methods Enzymol.* **319**, 20–28 (2000).
55. Verweu, H. & Steveninck, J. van. Model Studies on Photodynamic Cross-Linking. *Photochem. Photobiol.* **35**, 265–267 (1982).
56. Spoerl, E., Wollensak, G. & Seiler, T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr. Eye Res.* **29**, 35–40 (2004).
57. Wollensak, G., Spoerl, E. & Seiler, T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am. J. Ophthalmol.* **135**, 620–627 (2003).
58. Wollensak, G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **17**, 356–360 (2006).
59. Cantemir, A. *et al.* Iontophoretic collagen cross-linking versus epithelium-off collagen cross-linking for early stage of progressive keratoconus - 3 years follow-up study. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **95**, e649–e655 (2017).
60. Casola, C., Pot, S. A., Lavaud, A. & Voelter, K. Corneal cross-linking as a treatment for corneal dystrophy with secondary bacterial infection in a Friesian horse. *Clin. Case Rep.* **8**, 709–715 (2020).
61. Santhiago, M. R. & Santhiago, M. R. Corneal Crosslinking: The Standard Protocol. *Rev. Bras. Oftalmol.* **76**, 43–49 (2017).
62. Wollensak, G. & Spoerl, E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera: *J. Cataract Refract. Surg.* **30**, 689–695 (2004).

63. Dotan, A. *et al.* Scleral Cross-linking Using Riboflavin and Ultraviolet-A Radiation for Prevention of Axial Myopia in a Rabbit Model. *J. Vis. Exp. JoVE* e53201 (2016) doi:10.3791/53201.
64. Rong, S. *et al.* Iontophoresis-assisted accelerated riboflavin/ultraviolet A scleral cross-linking: A potential treatment for pathologic myopia. *Exp. Eye Res.* **162**, 37–47 (2017).
65. Kwok, S. J. J. *et al.* Selective Equatorial Sclera Crosslinking in the Orbit Using a Metal-Coated Polymer Waveguide. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **60**, 2563 (2019).
66. Iseli, H. P., Thiel, M. A., Hafezi, F., Kampmeier, J. & Seiler, T. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea* **27**, 590–594 (2008).
67. Martins, S. A. R. *et al.* Antimicrobial Efficacy of Riboflavin/UVA Combination (365 nm) In Vitro for Bacterial and Fungal Isolates: A Potential New Treatment for Infectious Keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 3402–3408 (2008).
68. Alio, J. L., Abbouda, A., Valle, D. D., Del Castillo, J. M. B. & Fernandez, J. A. G. Corneal cross linking and infectious keratitis: a systematic review with a meta-analysis of reported cases. *J. Ophthalmic Inflamm. Infect.* **3**, 47 (2013).
69. Kumar, V. *et al.* Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. *Photochem. Photobiol.* **80**, 15–21 (2004).
70. Halili, F. *et al.* Rose Bengal- and Riboflavin-Mediated Photodynamic Therapy to Inhibit Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Keratitis Isolates. *Am. J. Ophthalmol.* **166**, 194–202 (2016).
71. Durkee, H. *et al.* Rose bengal photodynamic antimicrobial therapy to inhibit Pseudomonas aeruginosa keratitis isolates. *Lasers Med. Sci.* (2019) doi:10.1007/s10103-019-02871-9.

72. Said, D. G. *et al.* Collagen cross-linking with photoactivated riboflavin (PACK-CXL) for the treatment of advanced infectious keratitis with corneal melting. *Ophthalmology* **121**, 1377–1382 (2014).
73. Arboleda, A. *et al.* Assessment of rose bengal versus riboflavin photodynamic therapy for inhibition of fungal keratitis isolates. *Am. J. Ophthalmol.* **158**, 64-70.e2 (2014).
74. Kashiwabuchi, R. T. *et al.* Assessing efficacy of combined riboflavin and UV-A light (365 nm) treatment of Acanthamoeba trophozoites. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 9333–9338 (2011).
75. Hager, T., Hasenpus, A., Stachon, T., Seitz, B. & Szentmáry, N. Crosslinking and corneal cryotherapy in acanthamoeba keratitis — a histological study. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **254**, 149–153 (2016).
76. Özdemir, H. B. *et al.* Comparison of corneal collagen cross-linking (PACK-CXL) and voriconazole treatments in experimental fungal keratitis. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **97**, e91–e96 (2019).
77. Nateghi Pettersson, M., Lagali, N., Mortensen, J., Jofré, V. & Fagerholm, P. High fluence PACK-CXL as adjuvant treatment for advanced Acanthamoeba keratitis. *Am. J. Ophthalmol. Case Rep.* **15**, 100499 (2019).
78. Makdoui, K. & Bäckman, A. Photodynamic UVA-riboflavin bacterial elimination in antibiotic-resistant bacteria. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **44**, 582–586 (2016).
79. Hamblin, M. R. & Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* **3**, 436–450 (2004).
80. Kashef, N. & Hamblin, M. R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **31**, 31–42 (2017).

81. Tabibian, D., Richo, O. & Hafezi, F. PACK-CXL: Corneal Cross-linking for Treatment of Infectious Keratitis. *J. Ophthalmic Vis. Res.* **10**, 77–80 (2015).
82. Richo, O. *et al.* Antibacterial efficacy of accelerated photoactivated chromophore for keratitis-corneal collagen cross-linking (PACK-CXL). *J. Refract. Surg. Thorofare NJ* **1995** **30**, 850–854 (2014).
83. Kling, S. *et al.* High Fluence Increases the Antibacterial Efficacy of PACK Cross-Linking. *Cornea* **Publish Ahead of Print**, (2020).
84. Kobashi, H. & Tsubota, K. Accelerated Versus Standard Corneal Cross-Linking for Progressive Keratoconus: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Cornea* **39**, 172–180 (2020).
85. 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.* **54**, 1176–1180 (2013).
86. Aldahlawi, N. H. *et al.* Enzymatic Resistance of Corneas Crosslinked Using Riboflavin in Conjunction With Low Energy, High Energy, and Pulsed UVA Irradiation Modes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 1547–1552 (2016).
87. Kanellopoulos, A. J., Loukas, Y. L. & Asimellis, G. Cross-Linking Biomechanical Effect in Human Corneas by Same Energy, Different UV-A Fluence: An Enzymatic Digestion Comparative Evaluation. *Cornea* **35**, 557–561 (2016).
88. O’Brart, N. A. L., O’Brart, D. P. S., Aldahlawi, N. H., Hayes, S. & Meek, K. M. An Investigation of the Effects of Riboflavin Concentration on the Efficacy of Corneal Cross-Linking Using an Enzymatic Resistance Model in Porcine Corneas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **59**, 1058–1065 (2018).

89. Seiler, T. G., Engler, M., Beck, E., Birngruber, R. & Kochevar, I. E. Interface Bonding With Corneal Crosslinking (CXL) After LASIK Ex Vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 6292–6298 (2017).
90. Ratzlaff, T., Wei, D., Wang, Y., Xu, M. & Johnson, D. Collagen cross-linking as an adjunct for repair of corneal lacerations: a cadaveric study. *Can. J. Ophthalmol. J. Can. Ophthalmol.* **52**, 508–512 (2017).
91. Famose, F. Evaluation of accelerated collagen cross-linking for the treatment of melting keratitis in eight dogs. *Vet. Ophthalmol.* **17**, 358–367 (2014).
92. Pot, S. A. *et al.* Corneal collagen cross-linking as treatment for infectious and noninfectious corneal melting in cats and dogs: results of a prospective, nonrandomized, controlled trial. *Vet. Ophthalmol.* **17**, 250–260 (2014).
93. Famose, F. Evaluation of accelerated corneal collagen cross-linking for the treatment of bullous keratopathy in eight dogs (10 eyes). *Vet. Ophthalmol.* **19**, 250–255 (2016).
94. Raiskup, F., Pinelli, R. & Spoerl, E. Riboflavin osmolar modification for transepithelial corneal cross-linking. *Curr. Eye Res.* **37**, 234–238 (2012).
95. Kaya, V., Utine, C. A. & Yılmaz, Ö. F. Intraoperative corneal thickness measurements during corneal collagen cross-linking with hypoosmolar riboflavin solution in thin corneas. *Cornea* **31**, 486–490 (2012).
96. Wirtz. Die ionentherapie in der augenheilkunde- Klin Monatsbl Augenheilkd. (1908).
97. Sarraf, D. & Lee, D. A. The role of iontophoresis in ocular drug delivery. *J. Ocul. Pharmacol.* **10**, 69–81 (1994).
98. Rootman, D. S. *et al.* Pharmacokinetics and safety of transcorneal iontophoresis of tobramycin in the rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **29**, 1397–1401 (1988).

99. Sekijima, H. *et al.* Characterization of Ocular Iontophoretic Drug Transport of Ionic and Non-ionic Compounds in Isolated Rabbit Cornea and Conjunctiva. *Biol. Pharm. Bull.* **39**, 959–968 (2016).
100. Bikbova, G. & Bikbov, M. Transepithelial corneal collagen cross-linking by iontophoresis of riboflavin. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **92**, e30-34 (2014).
101. Zibura, A. E. *et al.* Optimizing corneal riboflavin administration in ex vivo horse, dog, rabbit, and pig samples for use in corneal collagen cross-linking. *Vet. Ophthalmol.* vop.12807 (2020) doi:10.1111/vop.12807.
102. Mencucci, R. *et al.* Early effects of corneal collagen cross-linking by iontophoresis in ex vivo human corneas. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* **253**, 277–286 (2015).
103. Cassagne, M. *et al.* Iontophoresis Transcorneal Delivery Technique for Transepithelial Corneal Collagen Crosslinking With Riboflavin in a Rabbit Model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 594–603 (2016).
104. Li, N., Fan, Z., Peng, X., Pang, X. & Tian, C. Clinical observation of transepithelial corneal collagen cross-linking by iontophoresis of riboflavin in treatment of keratoconus. *Eye Sci.* **29**, 160–164 (2014).
105. Vinciguerra, P. *et al.* Iontophoresis CXL With and Without Epithelial Debridement Versus Standard CXL: 2-Year Clinical Results of a Prospective Clinical Study. *J. Refract. Surg. Thorofare NJ 1995* **35**, 184–190 (2019).
106. Tedesco, A. C., Primo, F. L. & Jesus, P. da C. C. de. Chapter 2 - Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) Action Based on Nanostructured Photosensitizers. in *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* (ed. Grumezescu, A. M.) 9–29 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-323-52725-5.00002-2.

107. Cherfan, D. *et al.* Collagen cross-linking using rose bengal and green light to increase corneal stiffness. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 3426–3433 (2013).
108. Feenstra, R. P. & Tseng, S. C. Comparison of fluorescein and rose bengal staining. *Ophthalmology* **99**, 605–617 (1992).
109. Foulks, G. N. Challenges and pitfalls in clinical trials of treatments for dry eye. *Ocul. Surf.* **1**, 20–30 (2003).
110. Forster, H. W. Rose bengal test in diagnosis of deficient tear formation. *AMA Arch. Ophthalmol.* **45**, 419–424 (1951).
111. Murube, J. Rose bengal: the second most commonly used surfocular vital stain. *Ocul. Surf.* **12**, 14–22 (2014).
112. Franchi, R., Marabini, A., Giorgetti, P. G. & Santeusano, E. Use of the radioiodinated Rose Bengal in the study of icterogenic hepatopathies. *Ric. Clin. Lab.* **5**, 73–95 (1975).
113. Wertheimer, C. M. *et al.* Enhancing Rose Bengal-Photosensitized Protein Crosslinking in the Cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **60**, 1845–1852 (2019).
114. Bekesi, N., Kochevar, I. E. & Marcos, S. Corneal Biomechanical Response Following Collagen Cross-Linking With Rose Bengal-Green Light and Riboflavin-UVA. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 992–1001 (2016).
115. Zhu, H., Alt, C., Webb, R. H., Melki, S. & Kochevar, I. E. Corneal Crosslinking With Rose Bengal and Green Light: Efficacy and Safety Evaluation. *Cornea* **35**, 1234–1241 (2016).
116. Wang, T. *et al.* Subacute effects of rose Bengal/Green light cross linking on rabbit thin corneal stability and safety. *Lasers Surg. Med.* **50**, 324–332 (2018).
117. Gallego-Muñoz, P. *et al.* Corneal Wound Repair After Rose Bengal and Green Light Crosslinking: Clinical and Histologic Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 3471–3480 (2017).

118. Naranjo, A. *et al.* Cellular and molecular assessment of rose bengal photodynamic antimicrobial therapy on keratocytes, corneal endothelium and limbal stem cell niche. *Exp. Eye Res.* **188**, 107808 (2019).
119. Soeken, T. A. *et al.* Sealing of Corneal Lacerations Using Photoactivated Rose Bengal Dye and Amniotic Membrane. *Cornea* **37**, 211–217 (2018).
120. *American National Standard for safe use of lasers: approved March 16, 2007.* (The Laser Institute of America, 2007).
121. Delori, F. C., Webb, R. H., Sliney, D. H. & American National Standards Institute. Maximum permissible exposures for ocular safety (ANSI 2000), with emphasis on ophthalmic devices. *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.* **24**, 1250–1265 (2007).
122. Wang, T. *et al.* Photochemical activation increases the porcine corneal stiffness and resistance to collagenase digestion. *Exp. Eye Res.* **123**, 97–104 (2014).
123. Fadlallah, A. *et al.* Corneal Resistance to Keratolysis After Collagen Crosslinking With Rose Bengal and Green Light. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 6610–6614 (2016).
124. Panzarini, E., Inguscio, V. & Dini, L. Timing the multiple cell death pathways initiated by Rose Bengal acetate photodynamic therapy. *Cell Death Dis.* **2**, e169–e169 (2011).
125. Srivastav, A. K. *et al.* Photosensitized rose Bengal-induced phototoxicity on human melanoma cell line under natural sunlight exposure. *J. Photochem. Photobiol. B* **156**, 87–99 (2016).
126. Pérez-Laguna, V. *et al.* Comparative effect of photodynamic therapy on separated or mixed cultures of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **19**, 98–102 (2017).

127. Rossoni, R. D., Junqueira, J. C., Santos, E. L. S., Costa, A. C. B. & Jorge, A. O. C. Comparison of the efficacy of Rose Bengal and erythrosin in photodynamic therapy against Enterobacteriaceae. *Lasers Med. Sci.* **25**, 581–586 (2010).
128. Dahl, T. A., Midden, W. R. & Neckers, D. C. Comparison of photodynamic action by Rose Bengal in gram-positive and gram-negative bacteria. *Photochem. Photobiol.* **48**, 607–612 (1988).
129. Costa, A. C. B. P. *et al.* The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses* **55**, 56–63 (2012).
130. Cronin, L. *et al.* An in vitro study of the photodynamic effect of rose bengal on *Trichophyton rubrum*. *J. Biophotonics* **7**, 410–417 (2014).
131. Amescua, G. *et al.* Rose Bengal Photodynamic Antimicrobial Therapy: A Novel Treatment for Resistant *Fusarium Keratitis*. *Cornea* **36**, 1141–1144 (2017).
132. Atalay, H. T. *et al.* Effect of Riboflavin/Rose Bengal-Mediated PCK-CXL on *Acanthamoeba* Trophozoites and Cysts in Vitro. *Curr. Eye Res.* **43**, 1322–1325 (2018).
133. Atalay, H. T. *et al.* Rose Bengal-Mediated Photodynamic Antimicrobial Treatment of *Acanthamoeba Keratitis*. *Curr. Eye Res.* 1–6 (2020)
doi:10.1080/02713683.2020.1731830.
134. Chodosh, J., Banks, M. C. & Stroop, W. G. Rose bengal inhibits herpes simplex virus replication in vero and human corneal epithelial cells in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **33**, 2520–2527 (1992).
135. Mulroy, L. *et al.* Photochemical keratodesmos for repair of lamellar corneal incisions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 3335–3340 (2000).
136. Proaño, C. E. *et al.* Photochemical Keratodesmos for Bonding Corneal Incisions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 2177–2181 (2004).

137. Wang, T. *et al.* Photochemical Cross-Linking for Penetrating Corneal Wound Closure in Enuclated Porcine Eyes. *Curr. Eye Res.* **42**, 1413–1419 (2017).
138. Wang, Y. *et al.* Comparison of Photochemical Crosslinking Versus Sutures for Bonding Conjunctival Grafts. *Lasers Surg. Med.* **n/a**,
139. Gu, C. *et al.* Photochemical tissue bonding: a potential strategy for treating limbal stem cell deficiency. *Lasers Surg. Med.* **43**, 433–442 (2011).
140. Verter, E. E. *et al.* Light-initiated bonding of amniotic membrane to cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 9470–9477 (2011).
141. Ross, M. I. Intralesional therapy with PV-10 (Rose Bengal) for in-transit melanoma: Therapies for Melanoma. *J. Surg. Oncol.* **109**, 314–319 (2014).
142. Pupkaite, J. *et al.* Collagen-Based Photoactive Agent for Tissue Bonding. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 9265–9270 (2017).
143. Goldstein, R. L. *et al.* Photochemical Tissue Passivation Prevents Contracture of Full Thickness Wounds in Mice. *Lasers Surg. Med.* **51**, 910–919 (2019).
144. Alejandre-Alba, N., Gutierrez-Contreras, R., Dorronsoro, C. & Marcos, S. Intraocular Photobonding to Enable Accommodating Intraocular Lens Function. *Transl. Vis. Sci. Technol.* **7**, 27 (2018).
145. Koh, H. J. *et al.* The Effect of Photodynamic Therapy with Rose Bengal on Posterior Capsule Opacification in Rabbit Eyes. *Ophthalmic Res.* **34**, 107–112 (2002).
146. Charisis, S. K., Naoumidi, I. I., Ginis, H. S., Detorakis, E. T. & Tsilimbaris, M. K. Contact Transcleral Ciliary Body Photodynamic Therapy with Verteporfin in Pigmented Rabbits: Effect of Repeated Treatments. *Photochem. Photobiol.* **86**, 194–199 (2010).
147. Charisis, S. K. *et al.* Contact transcleral photodynamic cyclo-suppression in human eyes: a feasibility study. *Can. J. Ophthalmol.* **46**, 196–198 (2011).

148. Matsubara, A. *et al.* Investigating the Effect of Ciliary Body Photodynamic Therapy in a Glaucoma Mouse Model. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **47**, 2498 (2006).
149. Stasi, K., Paccione, J., Bianchi, G., Friedman, A. & Danias, J. Photodynamic treatment in a rabbit model of glaucoma surgery. *Acta Ophthalmol. Scand.* **84**, 661–666 (2006).
150. Vanerio, N., Stijnen, M., de Mol, B. A. J. M. & Kock, L. M. Biomedical Applications of Photo- and Sono-Activated Rose Bengal: A Review. *Photobiomodulation Photomed. Laser Surg.* **37**, 383–394 (2019).
151. Tefon Aribas, A. B., Sarikaya, B. & Bilgihan, K. Iontophoresis-Assisted Rose Bengal and Green Light Corneal Cross-Linking. *Cornea* **39**, 1533–1540 (2020).
152. Zoumi, A., Yeh, A. & Tromberg, B. J. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11014–11019 (2002).
153. Raub, C. B., Putnam, A. J., Tromberg, B. J. & George, S. C. Predicting bulk mechanical properties of cellularized collagen gels using multiphoton microscopy. *Acta Biomater.* **6**, 4657–4665 (2010).

ANNEXES

ANNEXE 1 : Analyses de variance

Première analyse : comparaison épi-on/épi-off

Analysis of Variance Table

Response: cornee_pourcentage1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Conditions1	2	4735	2368	141.9316	< 2.2e-16	***
Epithelium1	1	33880	33880	2031.0059	< 2.2e-16	***
Concentration1	2	22170	11085	664.5152	< 2.2e-16	***
Conditions1:Epithelium1	2	707	354	21.1923	8.695e-09	***
Conditions1:Concentration1	4	639	160	9.5745	6.893e-07	***
Epithelium1:Concentration1	2	3920	1960	117.4945	< 2.2e-16	***
Conditions1:Epithelium1:Concentration1	3	897	299	17.9189	6.287e-10	***
Conditions1:Epithelium1:Concentration1:Num_corneel	12	3024	252	15.1045	< 2.2e-16	***
Residuals	143	2385	17			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Seconde analyse : effet courant

Analysis of Variance Table

Response: cornee_pourcentage

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Concentration	1	14349.6	14349.6	324.090	< 2.2e-16	***
Conditions	4	5983.6	1495.9	33.786	< 2.2e-16	***
Concentration:Conditions	4	1820.0	455.0	10.276	2.017e-07	***
Residuals	158	6995.7	44.3			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Troisième analyse : effet lumière

Analysis of Variance Table

Response: epaisseur

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Conditions	1	1752379	1752379	192.3503	< 2.2e-16	***
Concentration	1	2282	2282	0.2505	0.61762	
Lumiere	1	5055308	5055308	554.8972	< 2.2e-16	***
Conditions:Concentration	1	33031	33031	3.6256	0.05919	.
Conditions:Lumiere	1	14986	14986	1.6449	0.20202	
Concentration:Lumiere	1	121	121	0.0133	0.90836	

```

Conditions:Concentration:Lumiere          1    4969    4969    0.5454    0.46159
Conditions:Concentration:Lumiere:Num_cornee 17 1128937    66408    7.2893 4.168e-12 ***
Residuals                                125 1138794    9110
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Quatrième analyse : effet sur la pachymétrie

Analysis of Variance Table

Response: Pachymetrie

```

              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Conditions          1      978      978    0.4029  0.530949
Concentration        1  142292  142292  58.6379 3.092e-08 ***
Periode             3 1087655  362552 149.4054 < 2.2e-16 ***
Num_cornee          10  106518   10652    4.3896 0.001036 **
Conditions:Periode   3   11614    3871    1.5953 0.213603
Concentration:Periode 3   21489    7163    2.9518 0.050443 .
Conditions:Concentration:Periode 3    2844     948    0.3906 0.760679
Residuals           27   65519    2427
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Cinquième analyse : effet sur la pachymétrie, comparaison des périodes 2 à 2

Comparaison 2 à 2 des périodes

Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level
 factor levels have been ordered

Fit: aov(formula = ana5)

```

$Periode
              diff      lwr      upr    p adj
apres_desepithelialisation-suite lumiere 45.23077 -21.13470 111.5962 0.2738211
fin procedure-suite lumiere             172.00000 105.63453 238.3655 0.0000002
T0-suite lumiere                        373.00000 306.63453 439.3655 0.0000000
fin procedure-apres_desepithelialisation 126.76923  60.40376 193.1347 0.0000553
T0-apres_desepithelialisation           327.76923 261.40376 394.1347 0.0000000
T0-fin procedure                         201.00000 134.63453 267.3655 0.0000000

```

ANNEXE 2 : exemple de données compilées

Conditions expérimentales							Mesure diffusion			Mesure épaisseur totale		
Epithélium	Administration RB	Concentration RB	Code cornée	Investigateur	Code lame	RB1	RB2	RB3	Totale1	Totale 2	Totale3	
On	Instillation	0,1	2	1	001	13.0	14.0	13.0	1244.1	1248.3	1458.0	
On	Instillation	0.1	2	2	001	16.5	16.0	14.0	1248.0	1224.0	1236.0	
Off	0.5mA*10min*2	1	22	1	001	217.3	204.0	221.4	392.0	382.3	392.1	
Off	0.5mA*10min*2	1	22	2	001	209.0	205.0	207.0	368.8	365.2	354.2	
Off	1mA*5min*2	1	29	1	003	282.1	297.1	216.1	864.4	789.1	810.10	
Off	1mA*5min*2	1	29	2	003	224.0	232.0	212.0	768.0	764.0	708.0	

Etude expérimentale de faisabilité d'une photothérapie au rose Bengale sur la cornée du cheval

RESUME : Le *cross-linking* cornéen est un processus de polymérisation et de renforcement du collagène cornéen qui repose sur l'activation *in situ* d'un chromophore par un rayonnement lumineux. Cette technique s'est développée récemment en ophtalmologie humaine puis vétérinaire. Initialement dédiée au traitement des affections cornéennes ectatiques comme le kératocône, elle a également été utilisée pour le traitement des kératites infectieuses qu'elles soient bactériennes ou fongiques. La technique princeps utilise la riboflavine comme chromophore et une source de lumière UV. Les premiers résultats dans le traitement des kératites infectieuses du cheval étaient encourageants, mais la technique reste à améliorer, notamment à cause d'un effet qui resterait très superficiel. Parallèlement, des données *in vitro* suggèrent que l'activité anti-infectieuse d'une photothérapie réalisée au rose bengale, serait supérieure à celle obtenue avec de la riboflavine. Cependant, c'est une molécule de poids moléculaire important, sa diffusion au sein de la cornée peut donc être un facteur limitant à son usage notamment sur des cornées épaisses, comme celle du cheval. Cette étude expérimentale s'intéresse à la possible utilisation du rose Bengale en photothérapie sur des cornées de chevaux, en s'intéressant à différents protocoles d'administration et leurs éventuels effets sur la profondeur de diffusion du rose. Elle ouvre des perspectives très intéressantes pour la prise en charge des kératomycoses dans cette espèce, où les solutions thérapeutiques médicales restent très limitées.

MOTS CLES : EQUINE, ROSE-BENGALE, CORNEE, PHOTOTHERAPIE, CROSS-LINKING, KERATOMYCOSE

ABSTRACT : Corneal cross-linking is a photochemical method, using a photosensitizer and light irradiation to create covalent bonds in the collagen fibrils, therefore increasing corneal stiffness. This technique has been developed recently in human and then veterinary ophthalmology. At the beginning, it was used for the treatment of ectatic disorders such as keratoconus, but also for infectious keratitis (bacterial or fungal). The first technique is using riboflavin as chromophore and UV-light. First results on equine infectious keratitis were encouraging but the technique has to be improved, especially because of the superficial effect. At the same time, *in vitro* experimentations suggest that anti-infectious activity of rose Bengal photodynamic therapy might be superior to the one with riboflavin. Nevertheless, the high molecular weight of rose Bengal could limit its diffusion through cornea, especially on thick corneas like horse's. This experimental study is focused on the use of rose Bengal for dynamic phototherapy on horse cornea, with different administration protocols and their effects on depth penetration of rose. It opens prospects for treatment of keratomycosis in this species, in which therapeutic medical means are very limited.

KEYWORDS : EQUINE, ROSE-BENGALE, CORNEA, PHOTOTHERAPY, CROSS-LINKING, KERATOMYCOSIS