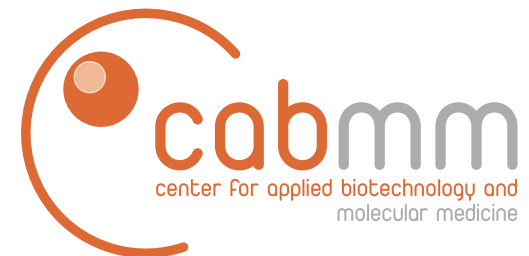


Riboflavine, oxygène et lumière

Sabine Kling, PhD, Farhad Hafezi, MD, PhD



Universität Zürich

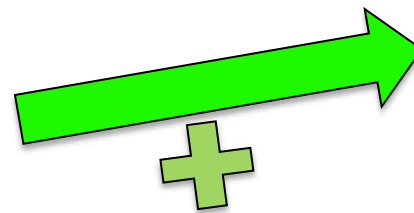
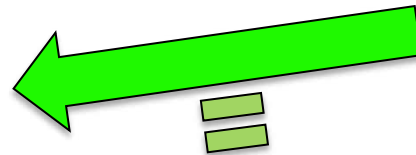


Cross-linking cornéenne

Augmentation de la rigidité cornéenne pour arrêter la progression du kératocône



désépithélialisation



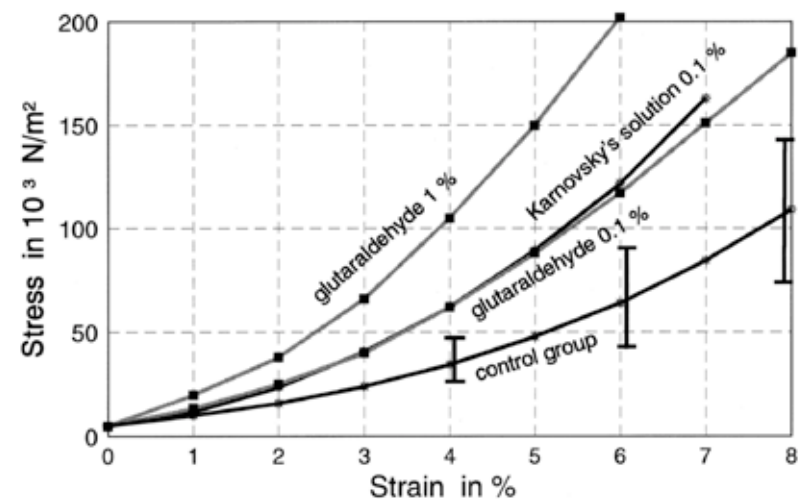
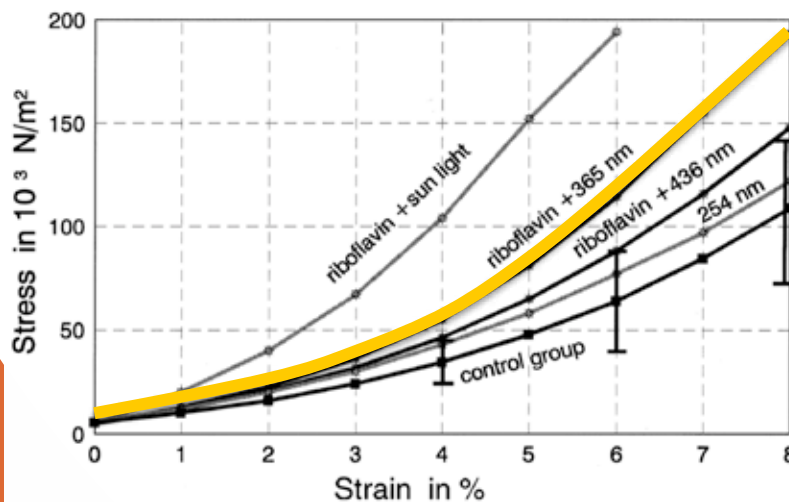
365 nm,
3mW/cm²



photosensibilisateur
30 min

Différentes techniques de cross-linking

- Chimiquement (par exemple glutaraldéhyde)
- Rayonnement ionisant (par exemple rayon γ , rayon e^-)
- Photo-chimiquement (par exemple **lumière UV** + photosensibilisateur)



Avantages de la réticulation induite par photochimie

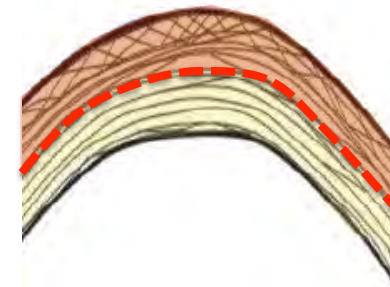
X Aucune mutation de l'ADN à cause de rayonnement



X Aucun risque pour la santé dû aux produits chimiques



✓ Profondeur de pénétration réglable

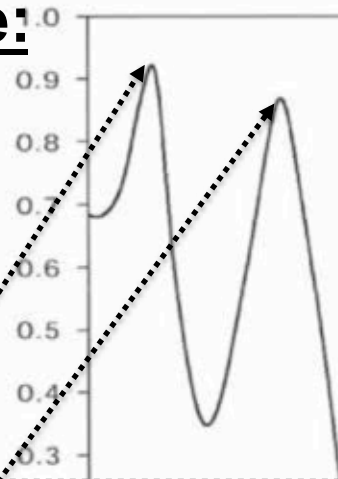


Sélection du photosensibilisateur et de la longueur d'onde

Sélection du photosensibilisateur et de la longueur d'onde

- Augmentation de l'absorption des rayons UV
- Excitation du photosensibilisateur

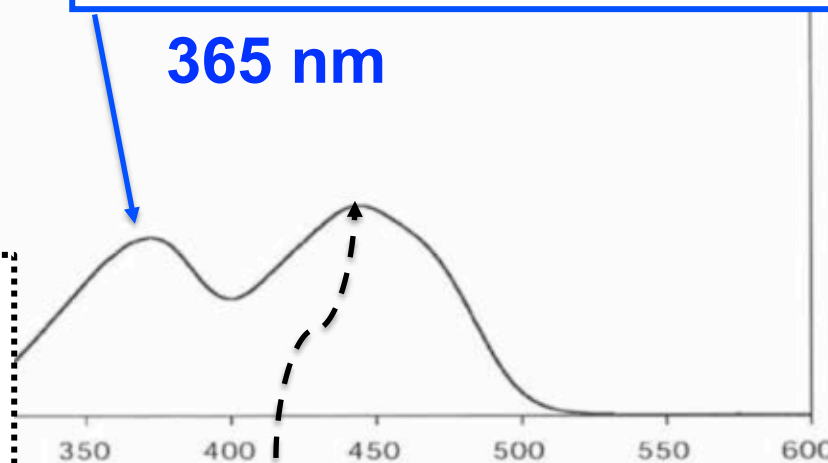
Riboflavine:



+ Énergie UV modérée
+ Profondeur de pénétration modérée
+ Non absorbée par l'AND
→ utilisé pour CXL

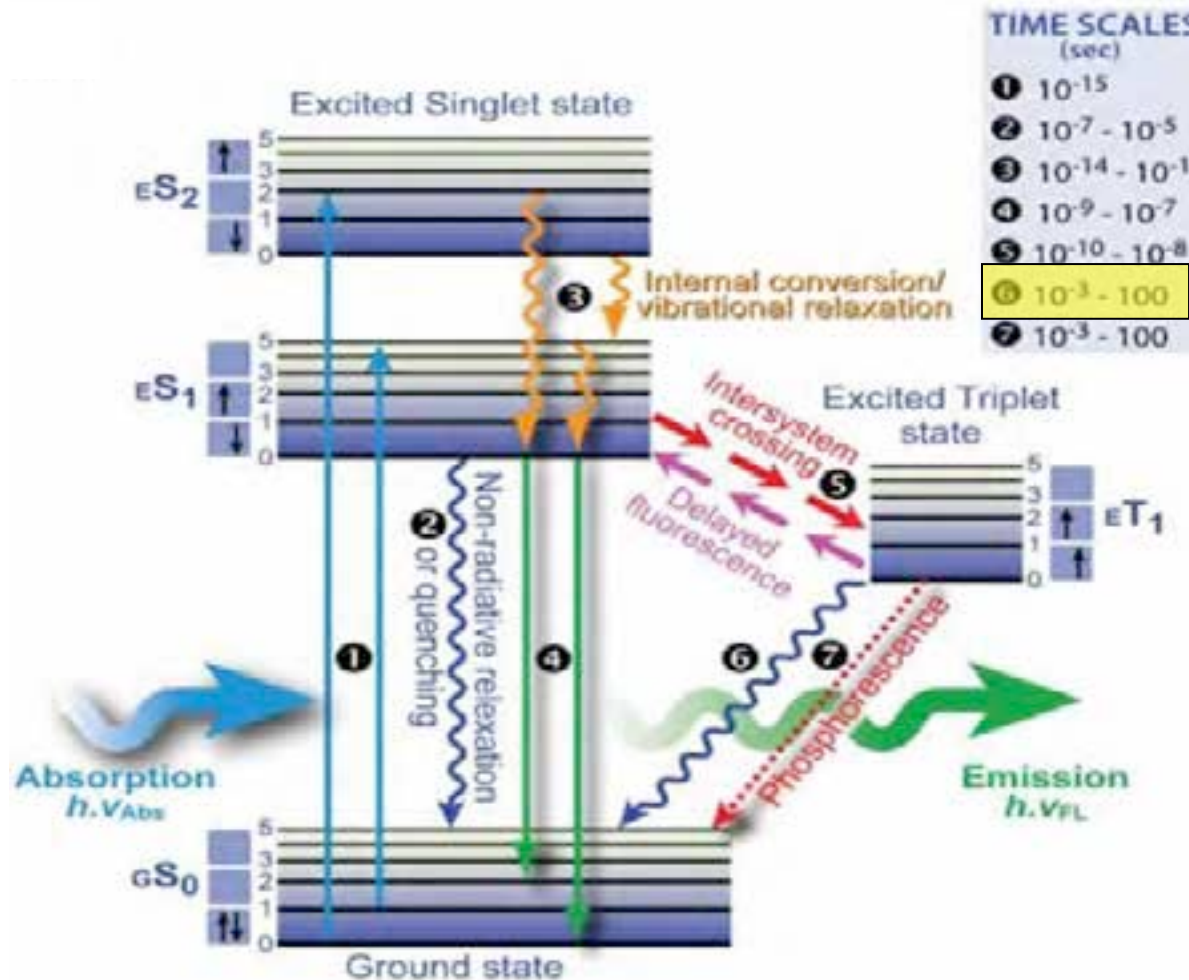
365 nm

+ haute énergie UV
-faible profondeur de pénétration
-fortement absorbée par l'AND
-→ dommages à l'ADN

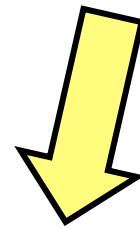


+ Profondeur de pénétration modérée
-énergie UV inférieure
-→ moins efficace

Photosensibilisateur



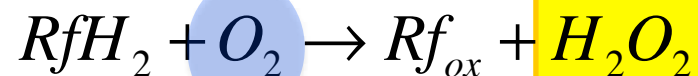
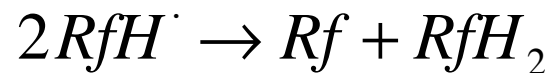
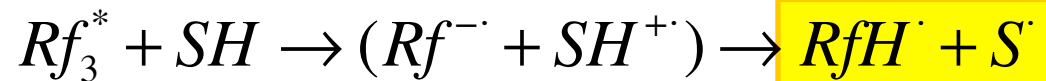
Etat triplet à longue vie: permet des réactions chimiques



Génération d'espèces réactives d'oxygène

Mécanisme de réaction

Mécanisme de type I:

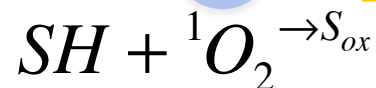
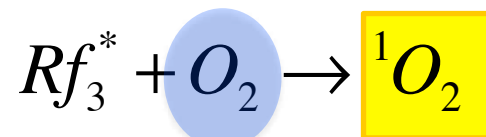


radicaux

Peu de consommation d'oxygène.

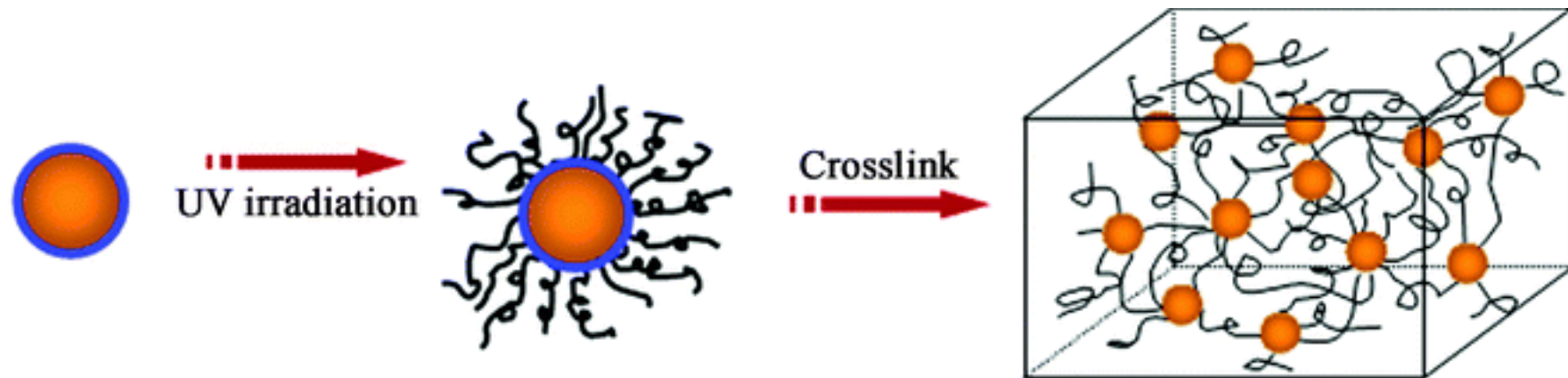
espèces réactives
de l'oxygène

Mécanisme de type II:



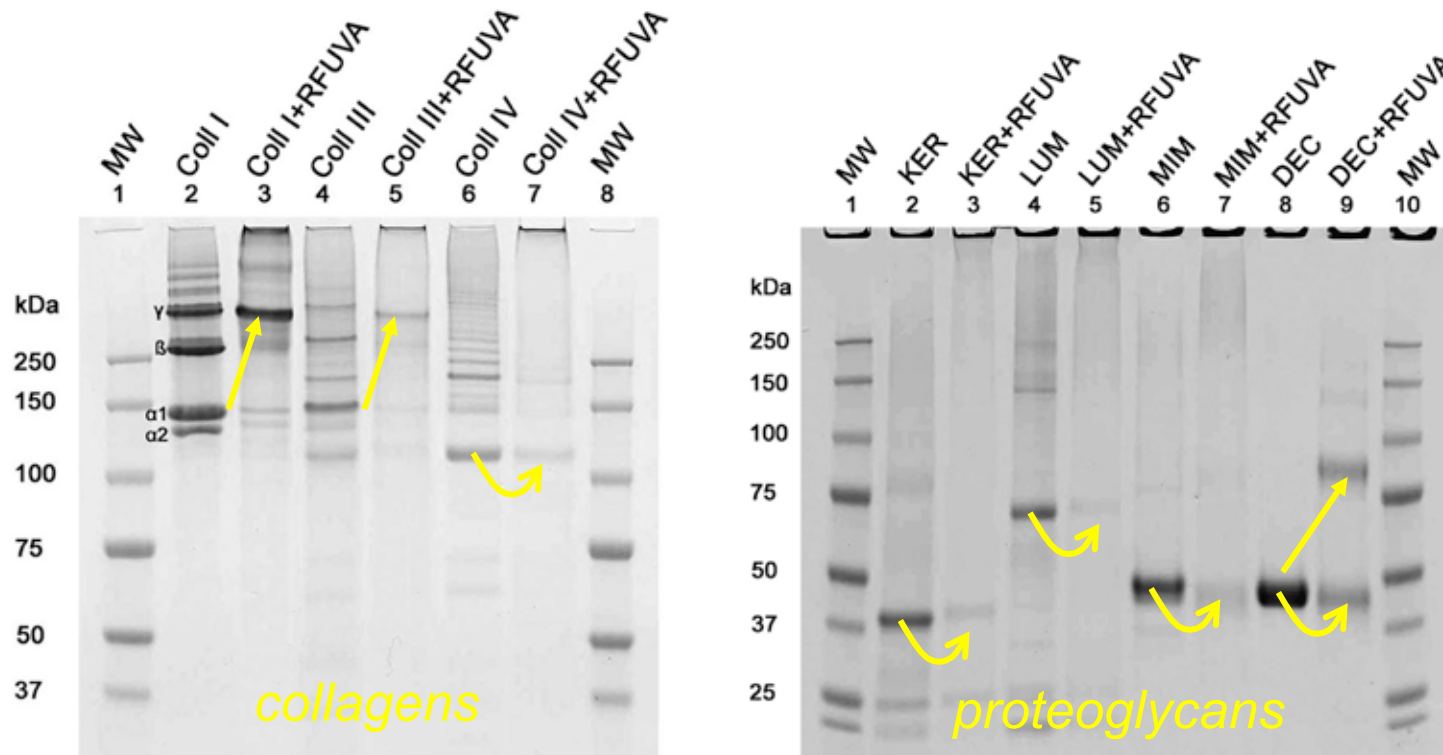
Consommation d'oxygène élevée.

Oxydation de la matrice extracellulaire



- Formation de nouvelles liaisons transversales
- Augmentation de la rigidité mécanique du tissu cornéen

Réticulation du collagène et / ou des protéoglycanes?



REF. Zhang Y. J Biol Chem 2011

- parmi les collagènes
- parmi les protéoglycanes
- entre les collagènes et les protéoglycanes

Riboflavine

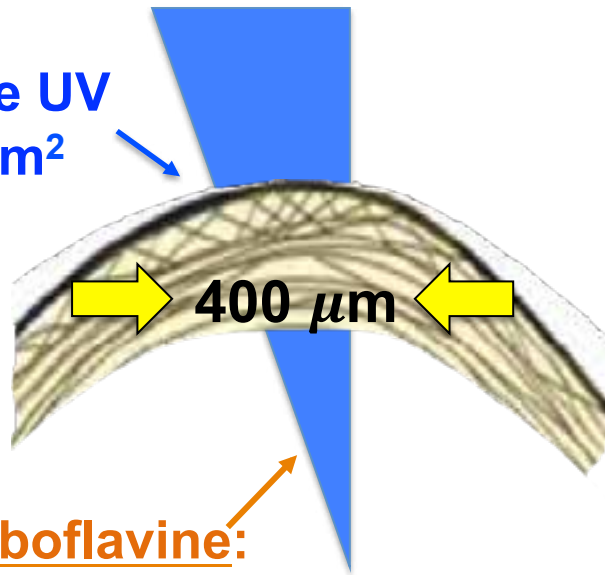
- **la concentration**
- **l'osmolarité**
- **modes d'application**
- **photo-dégradation**

Fonction de la riboflavine

- Génération de radicaux en présence d'UV et d'oxygène
- Protection de l'endothélium et du cristallin contre les UV

Sécurité du traitement CXL

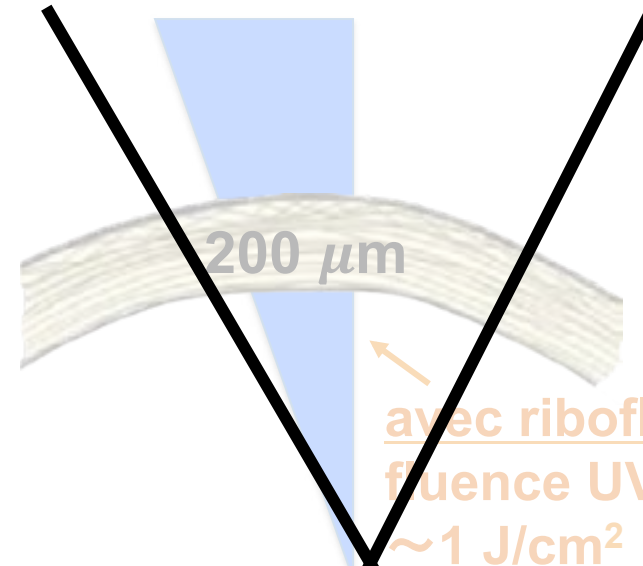
fluence UV
5.4 J/cm²



avec riboflavine:
fluence UV
~0.18 J/cm²

Cornée normale:

- haute absorption UV
→ protection de
l'endothélium et du
cristallin

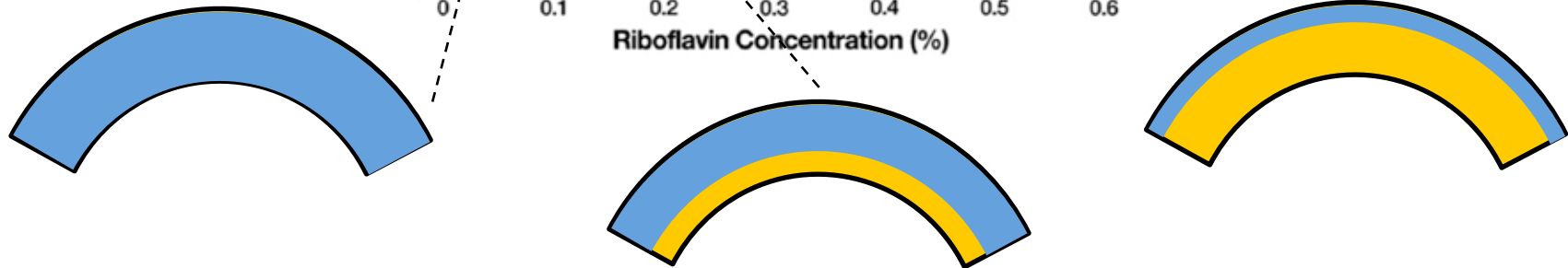
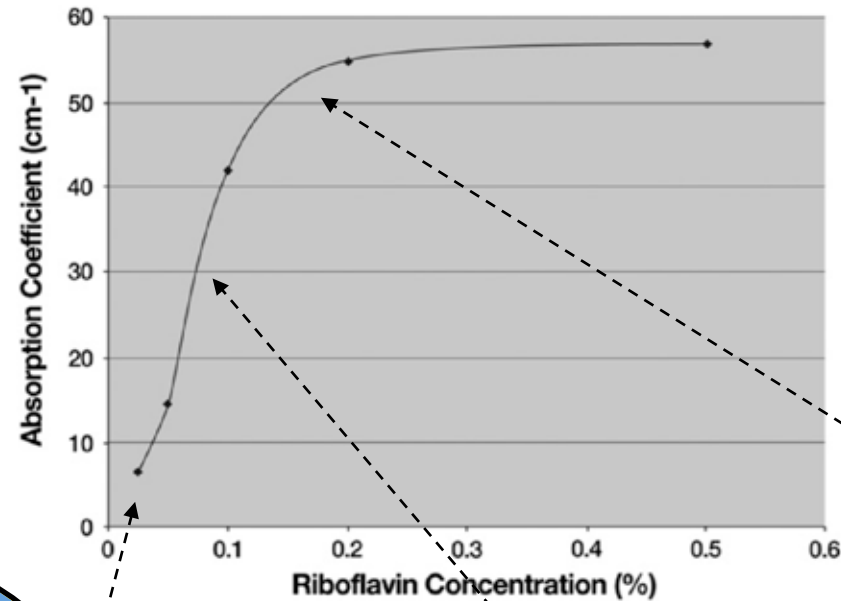


avec riboflavine:
fluence UV
~1 J/cm²

Cornée fine:

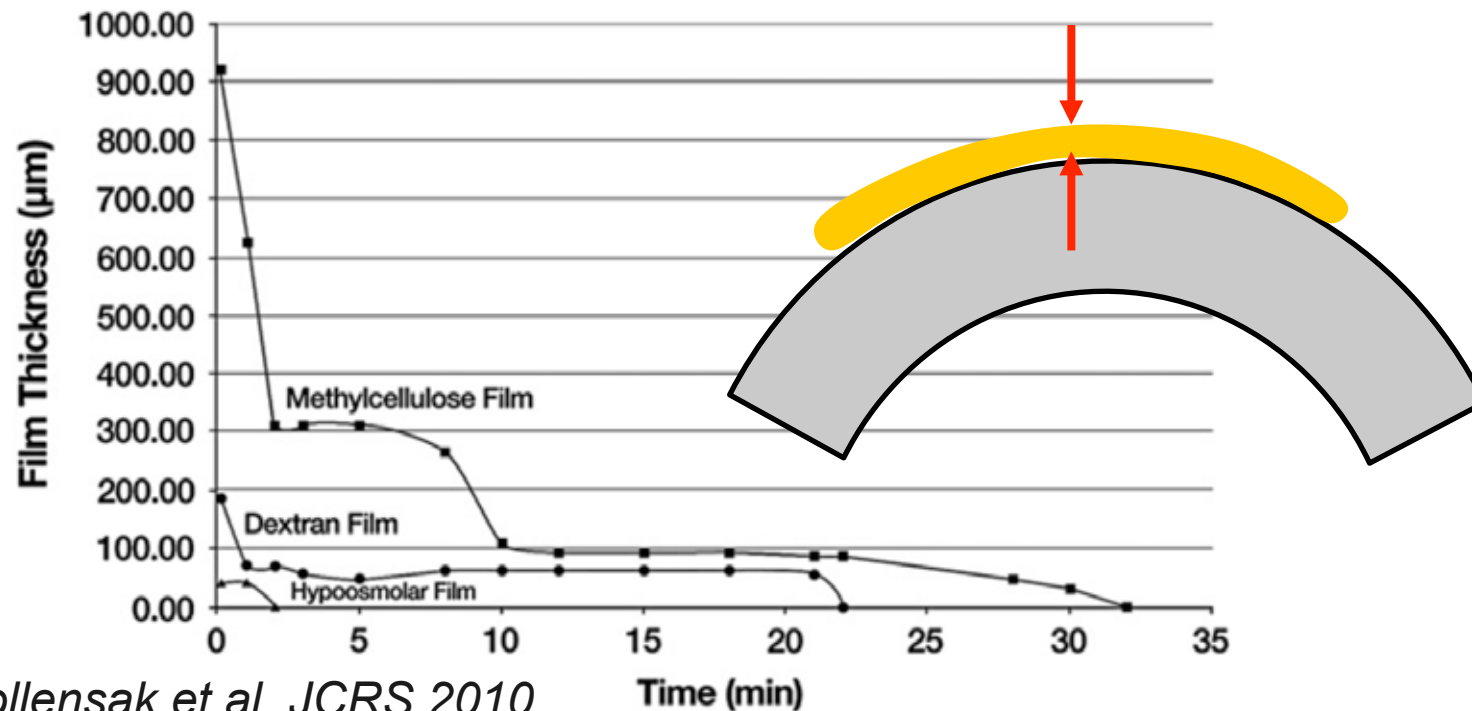
- faible absorption UV
 - dose UV plus élevée à
l'endothélium
- risque de lésion endothéliale
→ risque de cataracte

Absorption UV de la riboflavine



- **Le plus élevée la concentration de riboflavine, le plus forte est l'absorption UV.**
- **Le plus forte l'absorption UV, le moins profondes est la pénétration dans le stroma.**

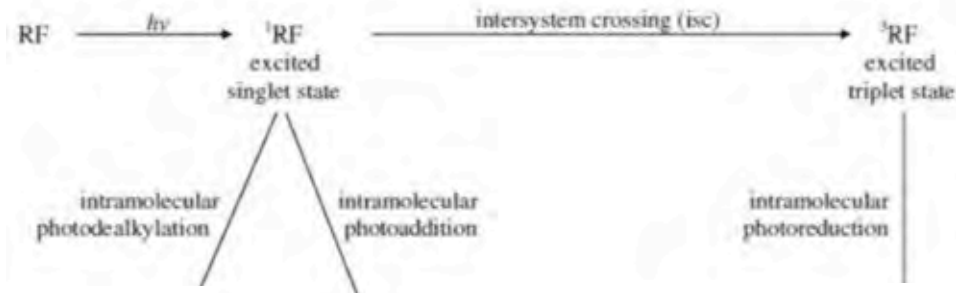
Viscosité de la solution de riboflavine



Wollensak et al. JCRS 2010

- **Le plus élevée la viscosité, le plus épais est le film de riboflavine sur la surface cornéenne.**
- **Le plus épais est le film de riboflavine, le moins énergie UV atteint le stroma cornéen.**

Photodégradation de la riboflavine



lumichrome

cyclodehydro-riboflavin

formylmethylflavin

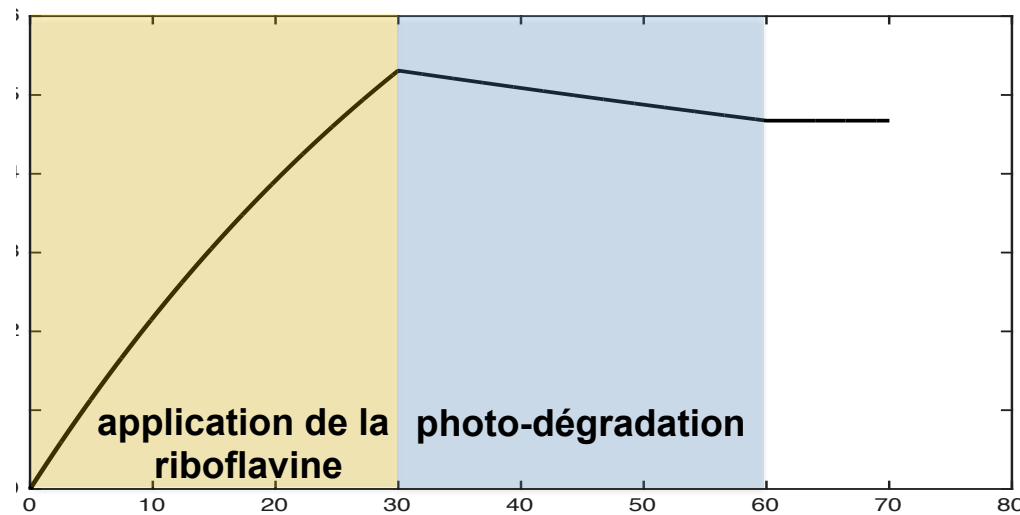
[O] neutral and alkaline solution

acid, neutral and alkaline solution

carboxymethylflavin

lumiflavin

lumichrome



Différentes solutions de riboflavine

EPI-OFF

Hypertonic:

- riboflavine 0.1 g, dextran 500 (VibeX)

Isotonic:

- 0.1% Riboflavine, 1.1% HPMC (MedioCROSS D)

Hypoosmolar / hypotonic:

- 0.1% Riboflavine, 1.1% HPMC (MedioCROSS M)
- 0.1% B₂-riboflavine-5-phosphate, 0.9% chlorure de sodium

Accéléré:

- riboflavine 0.1 g, HPMC (VibeX Rapid)

EPI-ON

Hypoosmolar:

- 0.25% Riboflavine, 1.2% HPMC, 0.01% Chlorure de benzalkonium (MedioCROSS TE)

Accéléré:

- 0.25% Riboflavine, HPMC, BAC (Paracel)

lontophoresis:

- 0.1% Riboflavine + exhausteurs (RICROLIN®TE)



Osmolarité

=> considère la concentration totale de solutés pénétrants et de solutés non pénétrants

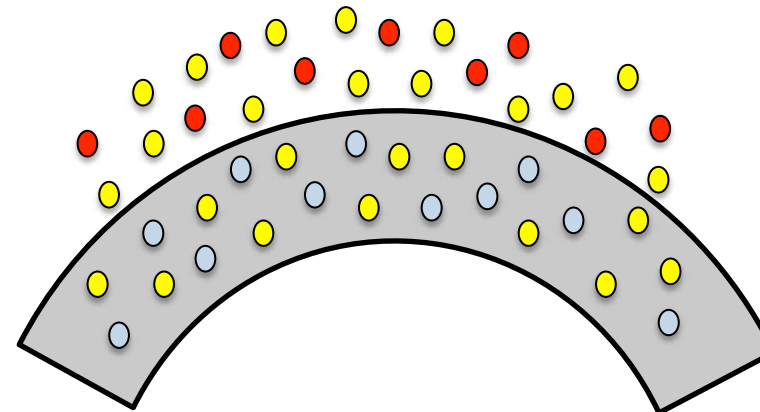
L'osmolalité est une propriété d'une solution particulière et est indépendante de toute membrane.

$$\text{osmolarity} = \sum_i \varphi_i n_i C_i$$

osmotic coefficient φ_i

number of particles into which a molecule dissociates n_i

solute molar concentration C_i



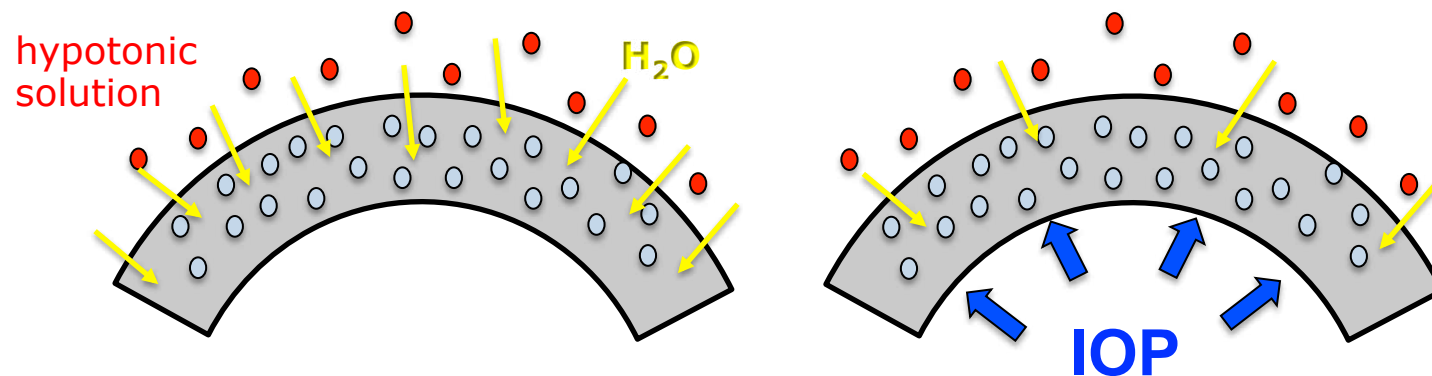
cornée humaine = 300 mOsm/L

Tonicité

⇒ considère la concentration totale de solutés non pénétrants

⇒ considère la la différence de pression externe (pression unilatérale)

La tonicité est une propriété d'une solution par rapport à une membrane particulière.



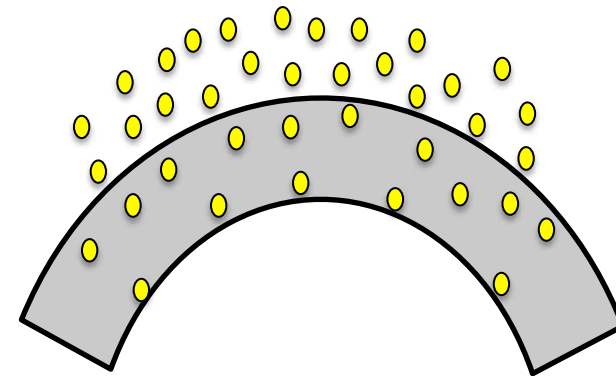
Le Dextran T500 ne peut pas pénétrer dans le stroma dénudé. Si préparé comme solution hyperosmolaire => hypertonique => déshydratation stromale

La riboflavine peut pénétrer le stroma dénudé. Si préparé comme solution hyposomolaire => hypotonique => gonflement du stromal

Modalités d'administration

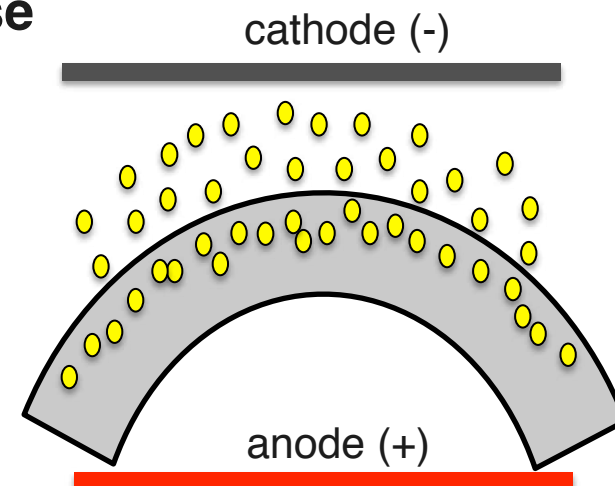
Application des gouttes en intervalles de 3 à 5 min sur la surface cornéenne

- Distribution déterminée par la loi de diffusion de Fick



Application assistée par iontophorèse

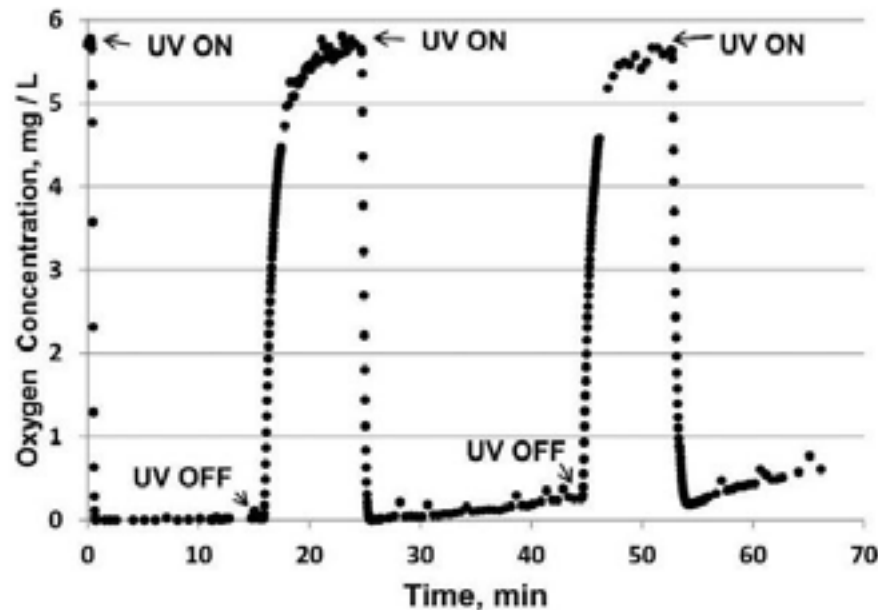
- Distribution déterminée par la tension appliquée



Oxygène

- **Disponibilité**
- **Consommation**

Dépendance à l'oxygène



Épuisement rapide de l'oxygène (UV):

- 10-15 secondes (3mW / cm²)
- 2-5 secondes (30mW / cm²)

Remplissage lent d'oxygène (UV off):

- 3-4 minutes

REF. Kamaev P. IOVS 2012

Pas d'effet biomécanique en l'absence d'oxygène.

REF. Richoz O. IOVS 2013

La diffusion d'oxygène dans le stroma cornéen

La loi de Fick sur la diffusion:

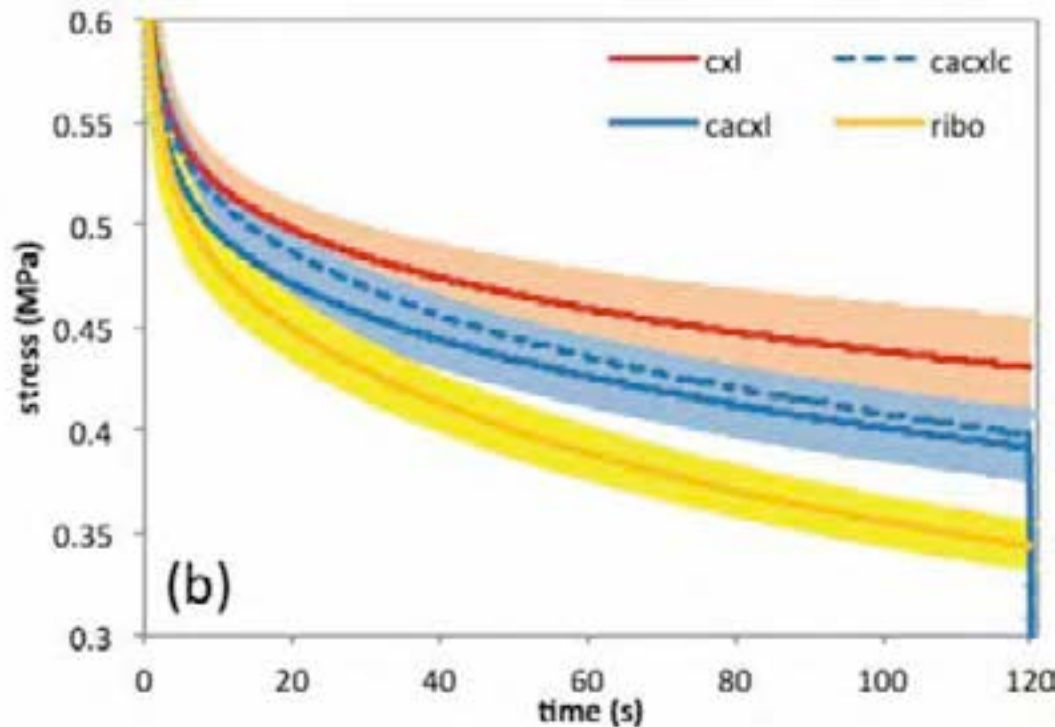
$$\frac{\partial_{concentration}}{\partial_{time}} = -diffusion\ coefficient \cdot \frac{\partial^2_{concentration}}{\partial_{distance^2}}$$

corneal thickness

En fonction de la pression partielle d'oxygène dans l'air, c'est-à

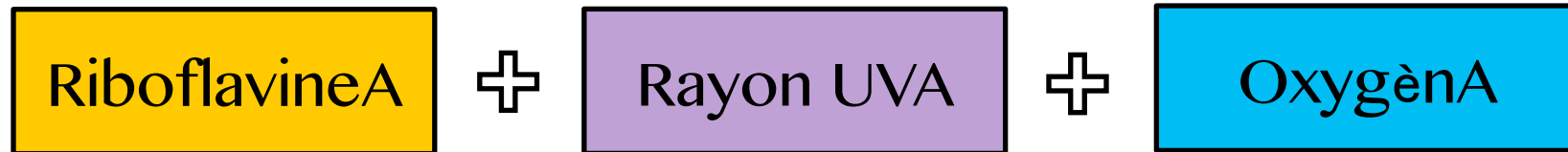
- la pression atmosphérique
- le pourcentage d'oxygène

L'effet de la réduction de l'oxygène sur le raidissement biomécanique



La réduction de l'oxygène de -50% conduit à un effet de raidissement diminué de -50%.

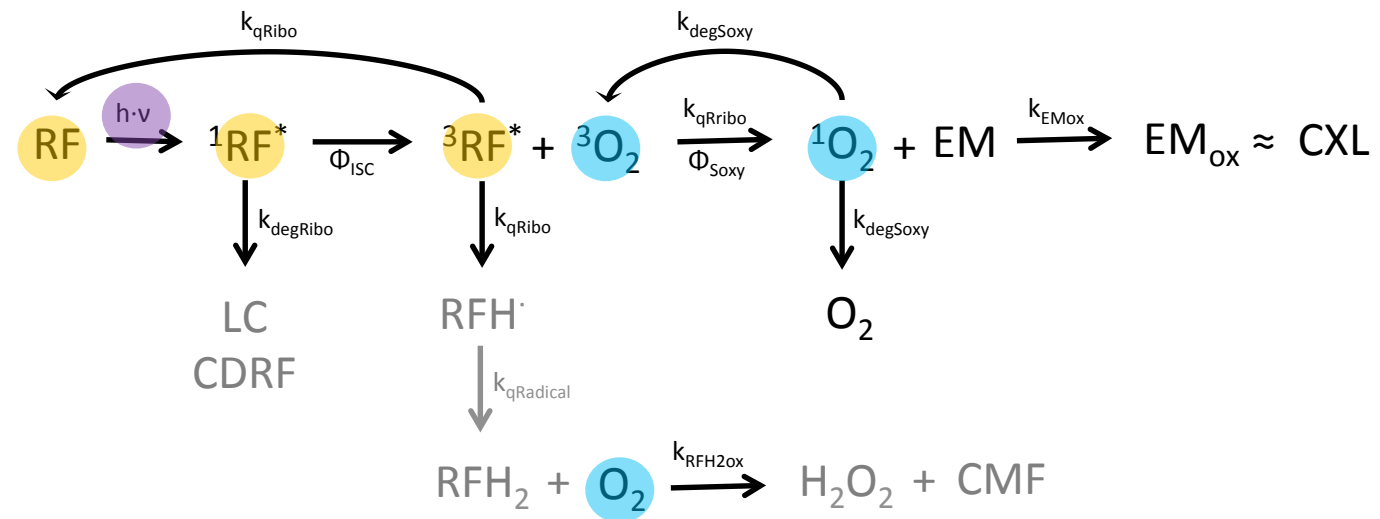
3 composants essentiels pour CXL:



- absorption des rayons UVA
- excitation de l'oxygèneA

- excitation de la riboflavineA

- oxydation de la matrice extracellulaireA



Implications cliniques

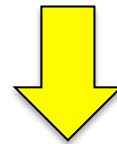
temps d'irradiation



Accélération du traitement CXL

Bunsen-Roscoe loi de la réciprocité:

Un certain effet biologique est directement proportionnelle à la dose énergétique totale, indépendamment du régime administré.

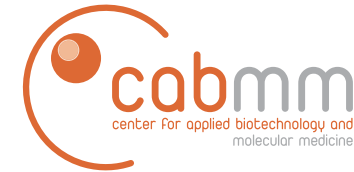


raideur cornéenne ~ fluence UV (?)



temps d'irradiation

CXL accéléré



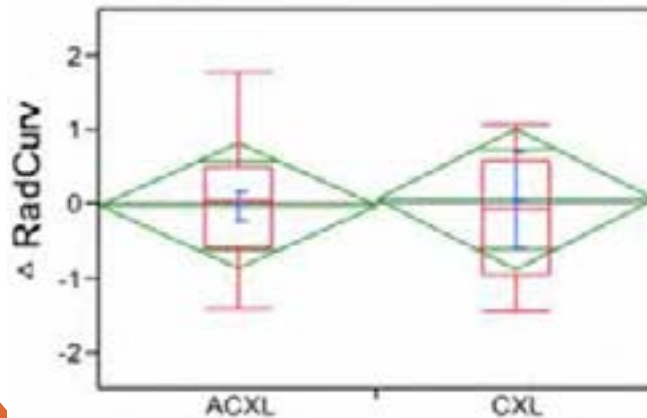
Idée: Réduire le temps de traitement en augmentant l'énergie UV.

Résultat clinique:

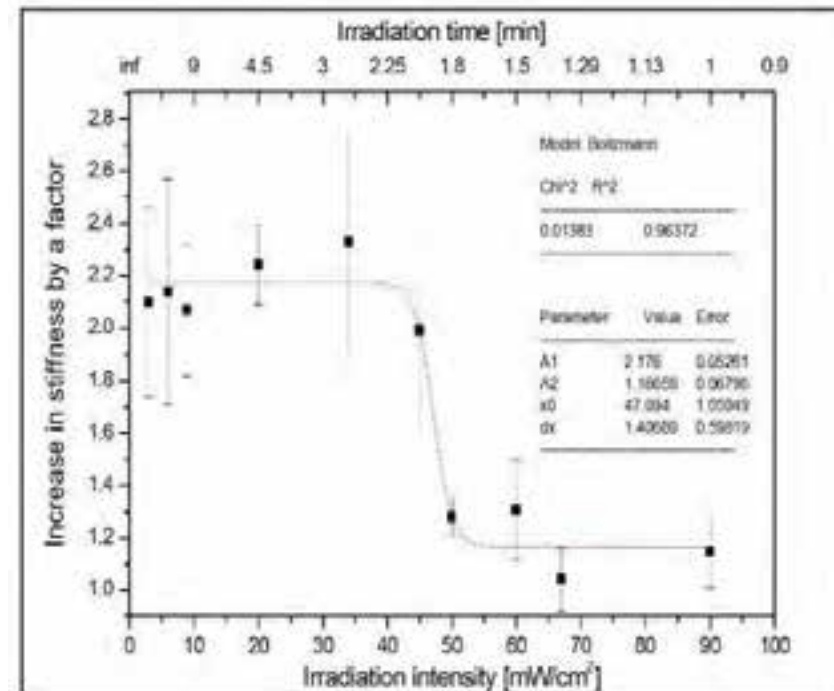
- Arête efficacement la progression du kératocône
- Pas de différence avec le CXL standard

Quantification expérimentale:

- moins efficace



REF. Tomita M. JCRS 2014



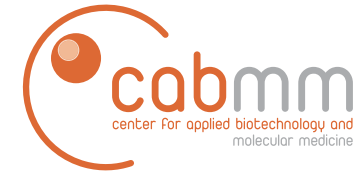
REF. Wernli J. IOVS 2013

REF. Hammer A. IOVS 2014



disponibilité d'oxygène

CXL pulsé

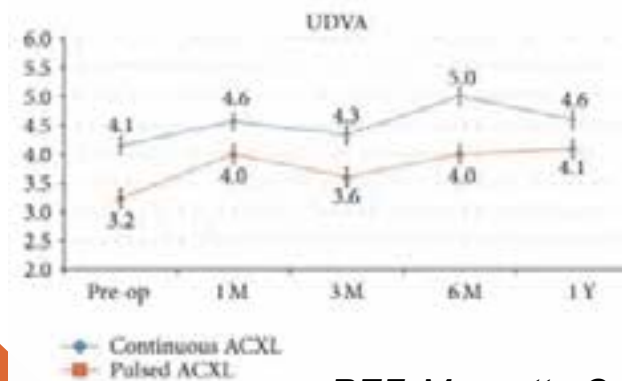


Idée: Interrompre l'irradiation UV périodiquement pour permettre la diffusion de l'oxygène dans la cornée

- ⇒ Augmenter l'effet de CXL
- ⇒ Raccourcir le temps d'irradiation (10 min)

Résultat clinique:

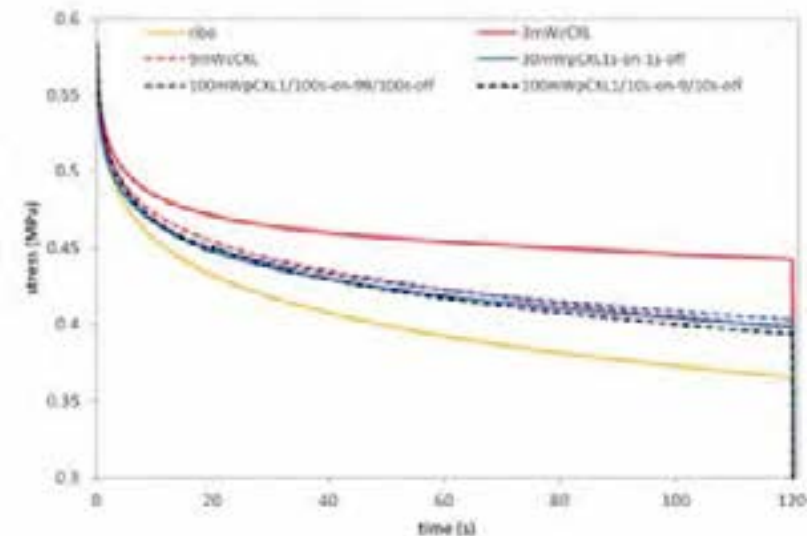
- Stoppe efficacement la progression du kératocône
- Pas de différence avec la norme CXL



REF. Mazzotta C.
J Ophthalmol 2014

Quantification expérimentale:

- moins efficace

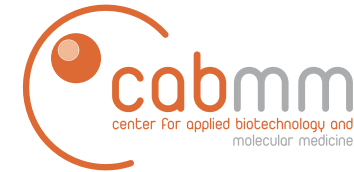


REF. Kling S. ESCRS 2015



disponibilité d'oxygène

CXL transépithélial

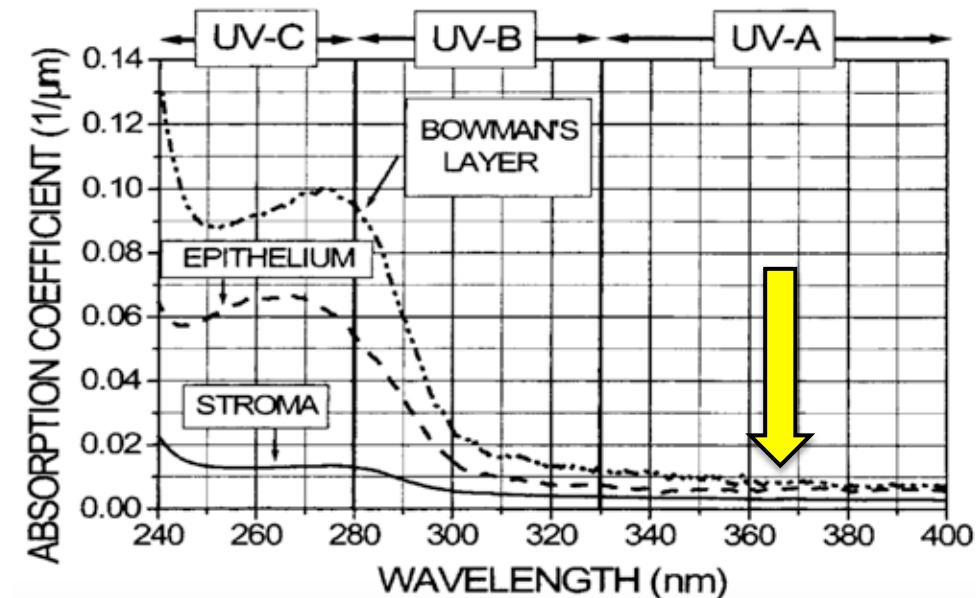


- moins efficace que le CXL standard

REF. Leccisotti A. JRS (2010)

Absorption UV et consommation d'oxygène similaires dans les cellules épithéliales et le stroma.

Toutefois: Aucun effet biomécanique dans l'épithélium

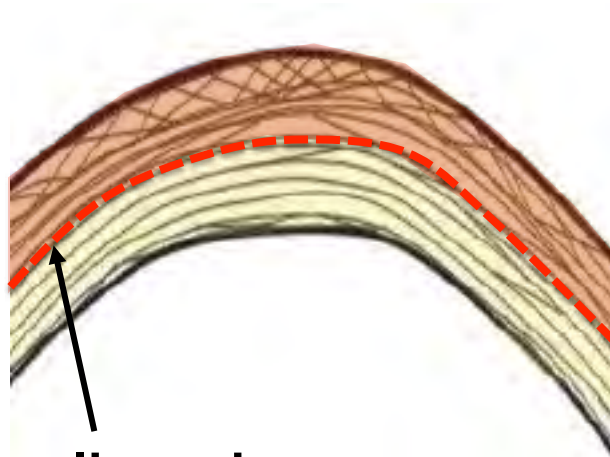


REF. Kolozsvari L. IOVS (2002)

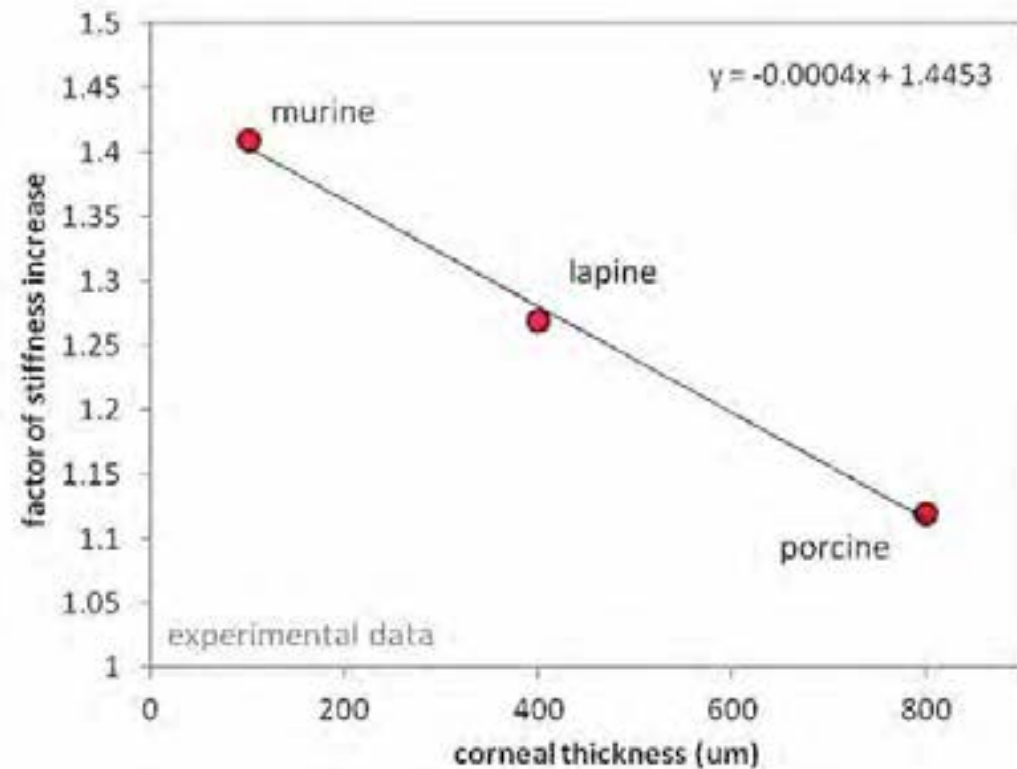
→ comparable au CXL dans une couche stromale plus profonde



L'efficacité du CXL en fonction de l'épaisseur cornéenne



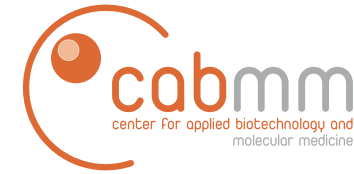
ligne de démarcation



→ Le CXL est plus puissant dans les cornées plus minces

Fluence UV

Complications du CXL dans les cornes minces



**100 μm cornée murine
traitée avec 5.4 J/cm²**



*REF. Kling S.
CXL congress (2014)*

**404 μm cornée humaine
traitée avec 5.4 J/cm²**

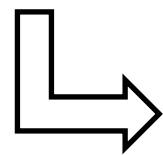
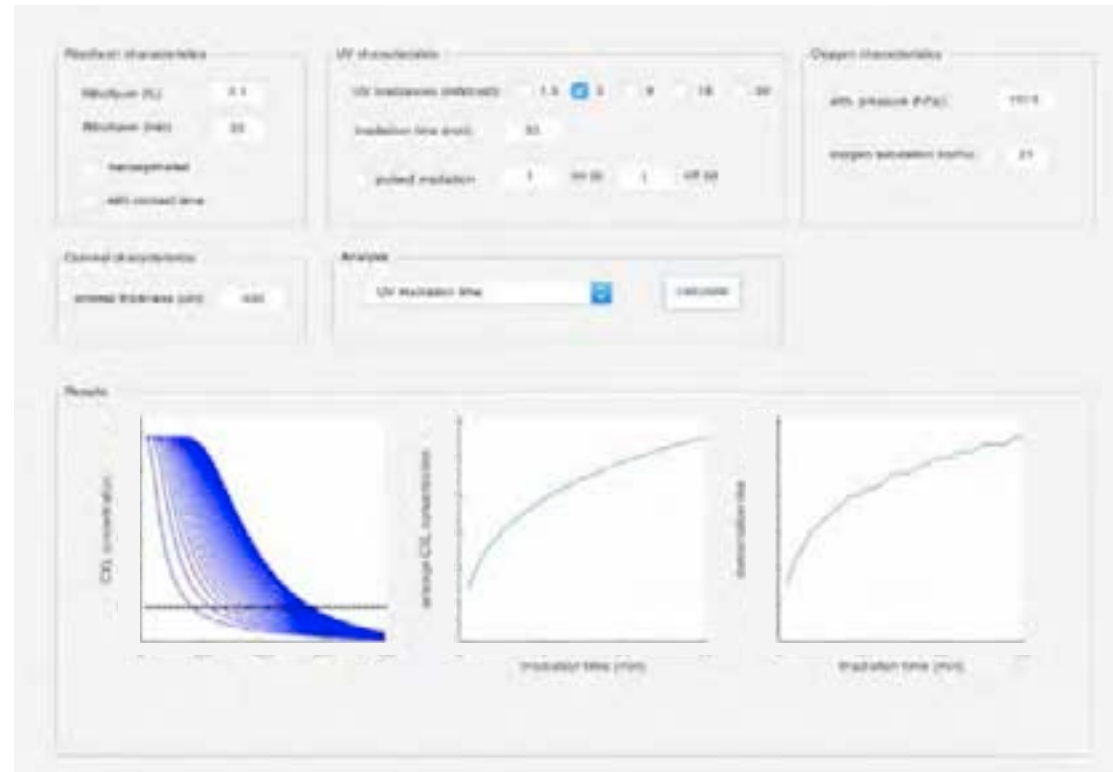


*REF. Soeters N. J Pediatr
Ophthalmol Strabismus (2011)*



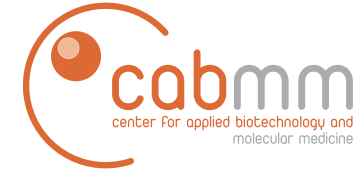
Un modèle pour prédire l'effet biomécanique de CXL

Demain



Adaptation spécifique des paramètres de traitement CXL aux patients

Conclusions



- **CXL a besoin de 3 composants principaux: photosensibilisateur (riboflavine), lumière UV (365nm, 5,4J / cm²) et de l'oxygène.**
- **La riboflavine est nécessaire pour la production de liaisons transversales, mais aussi pour la protection de l'endothélium et de la lentille.**
- **L'oxygène est rapidement consommé pendant le CXL. Les protocoles actuels sont limités par le taux de diffusion de l'oxygène dans le stroma.**
- **Les protocoles CXL peuvent être cliniquement efficaces, même s'ils ont un effet biomécanique inférieur dans les mesures expérimental.**



**Je vous remercie
pour votre attention**