

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2019

N° 2019-24

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

DES d'OPHTALMOLOGIE

par

Dimitri Coeuru

Né le 06.04.1989 à Saint-Nazaire

Présentée et soutenue publiquement le 22 Mars 2019

Evaluation du Cross-linking du collagène cornéen dans le traitement des kératites
infectieuses : une étude prospective, randomisée de 21 patients.

Président : Monsieur le Professeur Michel WEBER

Directeur de thèse : Madame le Docteur Isabelle ORIGNAC

Membres du jury : Monsieur le Docteur Bertrand VABRES
Monsieur le Docteur Pierre LEBRANCHU
Madame le Docteur Guylène LE MEUR

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Weber :

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury.

Merci pour votre enseignement et votre investissement.

A Madame le Docteur Orignac :

Merci de me faire l'honneur de diriger cette thèse.

Apprendre à tes côtés était enrichissant et un véritable plaisir.

A Monsieur le Docteur Vabres :

Merci pour votre enseignement médical et chirurgical.

Je vous remercie pour tous vos précieux conseils, j'ai beaucoup appris à vos côtés.

A Monsieur le Docteur Lebranchu :

Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Merci pour ton écoute et ton soutien pendant tout mon internat qui m'ont été indispensables.

A Madame le Docteur Le Meur :

Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité.

Et un grand merci à l'ensemble du service d'ophtalmologie de m'avoir accompagné pendant toutes ces années.

SUMMARY:

ABBREVIATIONS	3
1. INTRODUCTION	4
1.1 Infectious keratitis	4
1.2 Therapeutic approaches	4
1.3 Diagnostic of infectious keratitis	5
2. METHODS	6
2.1 Ethics approval	6
2.2 Study design	6
2.3 Population	6
2.4 Endpoints	7
2.5 Statistical analysis	8
3. RESULTS	9
3.1 Evaluation of PACK-CXL	9
3.2 Particularity of AS OCT	10
4. DISCUSSION	14
4.1 About PACK-CXL as adjunction treatment	14
4.2 About AS OCT in microbial keratitis	17
5. CONCLUSION	19
APPENDIXES	20
Appendix 1: Figures	20
Appendix 2: Final rapport	24
BIBLIOGRAPHY	46

ABBREVIATIONS:

AS OCT: Spectral domain Anterior Segment Optical Coherence Tomography

DNA: Deoxyribonucleic Acid

PACK-CXL: Corneal Cross-Linking with Photoactivated Chromophore for Infectious Keratitis

RNA: Ribonucleic Acid

UV: Ultraviolet

WHO: World Health Organization

Nous présentons une étude réalisée grâce au financement d'un appel d'offre interne du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes. Il s'agit d'un essai clinique, prospectif et randomisé, enregistré au registre des études cliniques, dans Clinical Trials, sous le numéro : NTC02088970.

1. INTRODUCTION:

1.1 Infectious keratitis:

Infectious keratitis is an important public health problem. According to the World Health Organization (WHO) and literature data, corneal diseases, including infectious keratitis, are the fourth leading cause of blindness in the world [1–3]. They account for 10% of visual impairment [3,4]. The microbial keratitis can be bacterial, fungal or amoebic.

In France and other western countries, bacterial keratitis is the leading cause of infectious keratitis. The most frequent risk factor is the use of contact lenses [5–7]. Indeed, contact lenses are involved in 40 to 50% of cases [8]. Gram-positive organisms (*Staphylococcus* and *Streptococcus*) are the most frequently isolated microorganisms. However, Gram-negative bacterial keratitis (*Pseudomonas*) is relatively common, especially amongst contact lens wearers [5,6].

In developing countries, fungal infection is the leading cause of keratitis. Minor corneal trauma and limited access to medical care are frequent risk factors [2].

Fungal keratitis is less common in France and Western countries. Fungal keratitis are due to filamentous fungi (*Fusarium*, *Aspergillus*) or due to yeasts (*Candida*). Risk factors for filamentous fungi are the use of contact lens and trauma by plant [9–11]. Yeast infections occur mostly on pathological corneas (corneal surface diseases, keratoplasty, ...) [12]. The use of local steroids promote the development of all types of fungal infection [8].

1.2 Therapeutic approaches:

Treatment usually consists of long-term and intensive topical chemotherapy. Although those treatments are efficient, they have some side effects and cause resistance. Many studies have shown the emergence of resistance against ophthalmic antibiotics. A well-known example, described by studies at the end of the 1990s, is the use of fluoroquinolones in the treatment of microbial keratitis which leads to the emergence of bacterial resistance [13–15]. New

therapeutic approaches need to be established consequently to the emergence of resistance and the side effects of treatments.

Corneal cross-linking uses UV-A and riboflavin. The irradiation of riboflavin by UV-A (at 365 nm) generates reactive oxygen species enabling the formation of bonds in the corneal stroma [16]. It was introduced by Wollensak in 2003 for the treatment of keratoconus [17].

It was established in the 1960s that when subjected to UV light, riboflavin could inactivate the RNA of tobacco mosaic virus [18]. Since then, riboflavin as a photosensitizer has been used to inactivate pathogens in plasma, platelet and red blood cell products [19,20]. The photoactivation of riboflavin damages the RNA and DNA of microorganisms, causing lesions in chromosomal strands [19–21].

In case of infectious keratitis, the antimicrobial action of PACK-CXL has been known for several years. Several studies have demonstrated its efficacy *in vitro* [22–24]. Other case reports and series have revealed its clinical efficacy in the management of advanced infectious keratitis with corneal melting [25–27]. PACK-CXL limited the progression of corneal melting and reduced complications. However, all of these studies were performed without a control group and PACK-CXL was studied alone, not as adjunct treatment.

1.3 Diagnostic of infectious keratitis:

The first aim of this study was to evaluate the efficacy of PACK-CXL in severe infectious keratitis as an adjunction to standard antimicrobial treatment. The microbiological diagnostic is also important in microbial keratitis: the determination of causal germ is necessary to choose the best therapeutic. During the follow-up of patients, several parameters were analyzed for the description of secondary outcomes, such as Spectral domain anterior segment optic coherence tomography (AS OCT).

Microbiological exams are recommended to find the microbiological pathogen but the rate of positive cultures is approximately 65% in the literature [5,6,28]. Corneal imaging *in vivo* confocal microscopy can help the clinician identify the germ. *In vivo*, confocal microscopy is useful for fungal keratitis diagnosis for it reveals the injury caused by filamentous species [29–32].

AS OCT could also help guide treatment by identifying the germ [33]. In this study we also describe AS OCT in microbial keratitis to establish if AS OCT could be helpful in microbiological agent determination.

This work will be composed of two parts:

- The evaluation of the PACK-CXL in severe infectious keratitis as an adjunction treatment.
- The description of particularity of AS OCT in microbial keratitis.

2. METHODS:

2.1 Ethics approval:

The study was approved by the French Ethical Research Committee (CPP) which adheres to the tenets of the Declaration of Helsinki.

2.2 Study design:

This was a prospective, randomised and controlled study. The participants were recruited in the Department of Ophthalmology, Nantes University Hospital, France. Patients were randomised from the 2nd of September 2014 to the 5th of September 2016. The Follow-up was finished the 1st of December 2016. Written informed consent was obtained from all patients.

2.3 Population:

Patients hospitalised for infectious keratitis were included. The indication of hospitalisation was defined by the “1, 2, 3 rule” [34]: corneal infiltrate of more than 2 mm and/or within 3 mm of the optical axis and/or anterior chamber inflammation scored more than 1+ for Tyndall effect and cells.

The following patients were excluded from the study: pregnant women, patients under 18, patients with a history or evidence of herpetic keratitis, with acanthamoeba keratitis, corneal perforation or descemetocoele. Amniotic membrane transplantation during follow-up was not an exclusion criterion.

All of the patients were hospitalized and randomised to receive the standard treatment (topical chemotherapy) with or without PACK-CXL. Microbiological analysis was performed on all of the patients on admission. The samples were obtained by corneal scraping.

The duration of hospitalisation depended on the clinical evolution. Standard treatment consisted of hourly instillation of fortified Vancomycin (50 mg/mL), Amikacin (2.5%), Ceftazidim (20 mg/mL) or Amphotericin B (0.15%) for 48 hours. The choice of the therapy was left to the discretion of the clinician and the patient's medical history. Vancomycin and

Ceftazidim were administered if the patient did not wear lenses. Vancomycin and Amikacin were administered if the patient wore contact lenses. Patients with latent clinical histories, corticosteroids or immunosuppression received antifungal therapy with Amphotericin B and antibacterial therapy with Vancomycin and Ceftazidim. Subsequently, topical treatment was adapted according to microbial analysis results or clinical follow-up. The diagnosis of bacterial or fungal keratitis was established by the clinical evolution, microbial analysis or the clinical response or not to initial antibacterial therapy.

For the patients randomised to PACK-CXL, UV-A therapy (365 nm) sensitized with hypotonic riboflavin (Ricola®) was performed with CBM X Linker, Vega (CSO, Florence, Italy) during the first 48 hours. Cross-linking consisted of local ocular application of riboflavin for 20 min followed by a UV delivery phase calibrated at 3 mW/cm² per 5-minute range for 30 minutes under local anaesthesia (total UV-A dose at 5.4 J/cm²). For PACK-CXL, a spot size 3 mm larger than the size of the ulcer after scraping was performed (there was no additional epithelium removal).

During hospitalisation, a daily ophthalmologic examination was performed for each patient including slit-lamp biomicroscopy, slit-lamp photography and visual acuity. These exams were performed at all follow-up consultations as well. In order to evaluate corneal thickness, AS OCT was performed on the first day and at the final consultation. AS OCT were carried out with Heidelberg SD-OCT (Spectralis OCT; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). Pachymetry, measured with the AS OCT at the first consultation, had to be larger than 400 µm to achieve the PACK-CXL. The final AS OCT was used to measure final cornea thickness.

Consultations were performed on inclusion (C1), every day during hospitalisation (C2), on the last day of hospitalisation (C3), 7 days after discharge (C4), 30 days after discharge (C5) and 90 days after discharge (C6). All patients were examined by two different clinicians. One clinician examined all images.

2.4 Endpoints:

The primary outcome was the time to epithelial healing defined as complete re-epithelialization of the cornea. Secondary outcomes were the final size of the stromal scar, the final corneal thickness in the infiltrated area, the best corrected visual acuity (BCVA) based on the logMar scale at 3 months and the speed of epithelial healing. The corneal healing was complete for all patients the last day of hospitalisation.

The final size of the stromal scar was obtained by the ratio between the size of the corneal scar at 3 months and the initial ulcer on the first day. This made it possible to compare the effect of the PACK-CXL on the final stromal scar compared with the initial stage for a given patient. The size of stromal scar was obtained by slit-lamp biomicroscopy at a magnification 10 or 16. It was measured in square millimetres with Image J (NIH, USA), with the help of a reference image of known length to set scale converting pixels in mm. Stromal scar area was then measured with Image J delineating the contours.

Final corneal thickness in the infiltrated area was compared with corneal thickness in the healthy area with the ratio between pachymetric measurements of the infiltrated and healthy areas at 3 months. This enabled comparison of the thickness for a given patient. Pachymetry was measured by AS OCT. The healthy area was determinate by the clinician in the same eye.

The speed of epithelial healing was also compared between the two groups in millimetres per day (mm/day). It was calculated with the initial size of the epithelial ulcer measured with slit-lamp biomicroscopy, in millimetres, divided by corneal healing, in days. The benefit of measuring the speed of epithelial healing is to override the initial size of an ulcer. The time of epithelial healing was indeed longer if the initial ulcer was larger.

During the follow-up, we noted that the early AS OCT of fungal and bacterial keratitis presented different aspects. We decided to review all of the fungal keratitis OCT and compared them with the bacterial keratitis OCT and co-infected fungal and bacterial keratitis. This review will compose the second part about the particularity of AS OCT in microbial keratitis.

2.5 Statistical analysis:

Analyses were conducted on data from the intention-to-treat (ITT) population. Continuous data were expressed as median and interquartile range (IQR) and categorical data were expressed as number and percentage.

Endpoints were compared using the Mann-Whitney test. A two-sided *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed with SAS statistical software (SAS 9.4 Institute, Cary, NC, USA).

3. RESULTS:

3.1 Evaluation of PACK-CXL:

There were 21 patients enrolled in our study, 14 men (66.7%) and 7 women (33.3%). Nine patients were randomised in the PACK-CXL group and 12 in the control group. The median age was comparable between both groups; it was 60 years [35-64] in the PACK-CXL group and 54 years [33-63.5] in the control group. Four (44.4%) and 6 (50%) patients in the PACK-CXL group and control group, respectively, wore contact lens. The median size of the initial ulcer was also comparable between both groups. It was 3.00 mm [1.60-4.80] in the PACK-CXL group, and 2.75 mm [1.75-3.90] in the control group.

One patient in the control group was lost to follow-up from C5. This patient was not excluded for the calculation of primary outcome because the duration of corneal healing was available for this patient. Some AS OCT were not performed in all of the patients – creating missing data as shown in Table 2.

One patient in the PACK-CXL group was excluded owing to a serious complication. A membrane amniotic graft was initially performed on this patient following a lack of epithelial healing with corneal melting. Unfortunately, a perforation appeared secondarily. A penetrating keratoplasty was therefore performed. There were no other amniotic membrane grafts in the PACK-CXL group.

Following unfavourable evolution of epithelial healing, 3 patients in the control group underwent amniotic membrane graft during follow-up. The durations of corneal healing after amniotic membrane grafting were 71, 52 and 29 days for these 3 patients. Two patients in each group (22.2% in the PACK-CXL group, 16.7% in the control group) were treated with antifungal therapy, including one patient for a coinfection. The culture of microorganisms was positive in 4 (44.4%) patients in the PACK-CXL group and in 8 (66.7%) in the control group.

The median initial pachymetry at the infiltrated area, measured with AS OCT, was 855 μ m [722-970] in the PACK-CXL group and 843 μ m [790-910] in the control group. We noted an increase in the thickness of the infiltrate at the initial stage which will be discussed in a later study.

Baseline characteristics and microbial analyses are shown in Table 1.

Table 1: Baseline characteristics and microbial analysis of all participants: PACK-CXL group (treated with Corneal collagen cross-linking as adjunction to standard treatment) and control group (treated with standard treatment).

Parameter	PACK-CXL group (n=9)	Control group (n=12)
Median age in years [IQR]	60 [35.0-64.0]	54.0 [33.0-63.5]
Male	5 (55.6%)	9 (75.0%)
Contact lens wear	4 (44.4%)	6 (50%)
Median size of initial ulcer, in mm, longest axis [IQR]	3.00 [1.60-4.80]	2.75 [1.75-3.90]
Median best corrected visual acuity, in logMar [IQR]	1.30 [0.40-2.30]	2.30 [0.25-2.30]
Median of minimal thickness, in μm , [IQR]	855 [722-970]	843 [790-910]
Microorganisms	2 fungal keratitis (22.2%) * 6 bacterial keratitis (66.7%) 1 coinfection bacterial and fungal (11.1%)	2 fungal keratitis (16.7%) * 10 bacterial keratitis (83.3%)
Microbial culture	4 positive cultures (44.4%) 1 <i>Moraxella spp.</i> 2 <i>Pneumococcus spp.</i> 1 <i>Pseudomonas spp.</i>	7 positive cultures (58.3%) 1 <i>Moraxella spp.</i> 2 <i>Proteus spp.</i> 4 <i>Pseudomonas spp.</i>

*: No identified germ, but favorable evolution with Amphotericin B and/or Voriconazole.

The median [IQR] duration of corneal healing was 18.5 days [9.0-33.5] in the PACK-CXL group and 9.5 days [5.0-32.5] in the control group. There was no significant difference between the two groups ($P = 0.62$).

There was also no beneficial effect on secondary outcomes. Concerning the final stromal scar, the ratios between the size of the final stromal scar and the size of the initial ulcer were 0.89 [0.70-1.0] in the PACK-CXL group and 1.14 [0.80-1.14] in the control group ($P = 0.11$).

We studied final corneal thickness with the ratio between the minimal pachymetry in the infected area and the pachymetry in the healthy area. They were 0.05 [0.02-0.10] in the PACK-CXL group and 0.06 [-0.19-1.13] in the control group ($P = 0.68$).

The differences between the initial BCVA, in logMar, and the final BCVA (J90) were -0.50 [-1.65 to -0.30] in the CXL group and -0.60 [-2.00 to -0.30] in the control group ($P = 0.84$).

The speeds of epithelial healing were 0.16 [0.11-0.24] mm/day in the PACK-CXL group and 0.21 [0.13-0.45] mm/day in the control group ($P = 0.52$). The results are shown in Table 2.

Table 2: Effect of corneal collagen cross-linking as adjunction to standard treatment on corneal healing and secondary outcomes compared with standard treatment.

Parameter	PACK-CXL group (n=9) Median [IQR] (number of patients)	Control group (n=12) Median [IQR] (number of patients)	P
Corneal healing (days)	18.5 [9.0-33.5] (8)	9.5 [5.0-32.5] (12)	0.62
<i>Final stromal scar (mm²)</i>	2.60 [1.25-3.50] (8)	3.0 [1.50-4.0] (11)	0.11
Ratio between the size of the final stromal scar and the size of the initial ulcer	0.89 [0.70-1.0] (8)	1.14 [0.80-1.14] (11)	
<i>Final corneal thickness in infected area, minimal pachymetry (micrometres)</i>	552.0 [502.0-588.0] (7)	521.0 [480.0-595.0] (9)	0.68
Ratio between the minimal pachymetry in infected area and pachymetry in healthy area	0.05 [0.02-0.10] (7)	0.06 [-0.19-1.13] (9)	
<i>Final BCVA (logMar)</i>	0.05 [0.00-0.45] (8)	0.20 [0.00-0.90] (11)	0.84
Difference between the initial BCVA (J0) and the final BCVA (J90)	-0.50 [-1.65 to -0.30] (8)	-0.60 [-2.00 to -0.30] (11)	
Speed of epithelial healing, millimetre per day	0.16 [0.11-0.24] (8)	0.21 [0.13-0.45] (12)	0.52

Remarks about missing data in table 2:

In the PACK-CXL group: 1 patient was excluded owing to an unfavourable evolution with perforation. 1 patient for whom the final AS OCT was not performed.

In the control group: 1 patient lost to follow-up for whom corneal healing and speed of epithelial healing were available. 2 patients for whom the final AS OCT were not performed.

3.2 Particularity of AS OCT:

In the twenty-one eyes included, 2 patients (9.5%) had fungal keratitis, 18 patients (85.7%) had bacterial keratitis and 1 patient (4.8%) had bacterial and fungal co-infection.

The diagnosis of fungal keratitis was confirmed by unfavorable follow-up with antibacterial therapy (Ceftazidime 20mg/mL, Vancomycin 50mg/mL or Amikacin 2.5%) for 1 patient and with clinical history (plant trauma) for 1 patient. All of the patients presented a response with antifungal therapy (Voriconazole 1% or Amphotericin B 0.15%)

The diagnosis of bacterial keratitis was confirmed by microbiological analysis for 10 patients, favorable clinical evolution with local antibacterial therapy (Ceftazidime 20mg/mL, Vancomycin 50mg/mL or Amikacin 2.5%) for 8 patients.

The diagnosis of bacterial and fungal co-infection was retained with microbiological (bacterial and fungal) analysis and favorable evolution with antibacterial and antifungal therapy. For statistical analysis, we included this patient in the fungal keratitis group.

On the AS OCT of fungal keratitis, we noted the presence of hyper-reflective lesion attached to the corneal endothelium, inflammatory plaque, without hyper-reflective area in the anterior corneal stroma in 2 out of 2 patients with fungal keratitis, and in the patient with the associated fungal and bacterial infection (100%) (Figure 1 and 2). This description was only noted in 1 patient with a bacterial keratitis (5.6%). Endothelial inflammatory plaque was away from the hypopyon, which excluded imaging of the hypopyon.

On the AS OCT of bacterial keratitis, we observed a thickened and hyper-reflective area in the anterior stromal cornea (stromal infiltrate) with a hypo-reflective area behind this thick stromal infiltrate in 17 patients with bacterial keratitis (94.4%) (Figure 3).

The AS OCT of the bacterial and fungal co-infection presented both characteristics previously described: a thick anterior stromal infiltrate with a hypo-reflective area behind the thick stromal and endothelial inflammatory plaque. We considered this patient to have fungal keratitis with inflammatory endothelial plaque as described.

Results are shown in Table 3.

Table 3: Early SD anterior segment OCT and microbial keratitis germs.

	Fungal Keratitis	Bacterial Keratitis
Endothelial inflammatory plaque	3	1
Thickened cornea: hyper-reflective anterior stroma with a hypo-reflective area behind it	1*	17

*: Correspond to the patient with co-infection bacterial and fungal, AS OCT had both descriptions.

4. DISCUSSION:

4.1 About PACK-CXL as adjunction treatment:

Infectious keratitis is a significant and potentially serious ocular disease worldwide. Standard treatment is based on fortified antibiotic eye drops. Infectious keratitis is a major cause of vision loss due to its complications including corneal melting, perforation or stromal scar if it is not treated sufficiently.

Due to these complications and the emergence of resistance to microorganisms, it is necessary to find new alternative treatment for the management of infectious keratitis. The emergence and increase of bacterial resistance has indeed reached alarming levels [13–15,35].

Our randomised controlled trial did not support the beneficial effect of epithelial healing of PACK-CXL as additional therapy. There were also no differences in the final size of the stromal scar and final visual acuity. PACK-CXL in the present study also had no benefit on corneal thinning in the infected area. To our knowledge, this is the first trial on the effect of PACK-CXL on final corneal thickness.

Other controlled studies have investigated the effect of PACK-CXL as additional therapy. In a randomised controlled study in Egypt, Said *et al.* [36] (2014) studied 40 eyes with advanced infectious keratitis with corneal melting in 2 groups: a CXL group and a control group. They concluded that PACK-CXL did not shorten the duration of corneal healing. However, they

showed that the complication rate (perforation or recurrence) was lower in the PACK-CXL group (0%) than in the control group (21%), but this difference was not statistically significant. Compared with our study, PACK-CXL was not performed at the initial stage of the disease in the Said study. As shown in the baseline tables of the Said study, many patients had already had several weeks of treatment before their first consultations. Furthermore, it was only performed in infectious keratitis with corneal melting.

Vajpayee *et al.* [37] (2015) analysed the effect of PACK-CXL on mycotic keratitis in a hospital in India. A retrospective analysis was performed to analyse 20 cases of CXL-treated mycotic keratitis compared with 21 control cases. In their study, PACK-CXL as additional treatment did not demonstrate any advantage vis-à-vis the resolution time of infection, corneal healing or the BCVA. Kasetsuwan *et al.* [38] (2016) evaluated the efficacy of PACK-CXL as adjunct therapy in moderate to severe infectious keratitis. Thirty patients were recruited in a Thai hospital: 15 in a PACK-CXL group and 15 in a control group. There were no beneficial effects on day 30 on the sizes of stromal infiltrates, epithelial defect, complication rate or BCVA.

The conclusion of the present study concurs with the results of these studies. However, the profile of infectious keratitis was different in these studies: there was more fungal keratitis which is more frequent in warmer climate countries. In the Kasetsuwan *et al.* study, they treated 53% of the cases of fungal keratitis in the PACK-CXL group and 67% in the control group. Vajpayee *et al.* only studied PACK-CXL in fungal keratitis. As described in the literature [5] in western countries, there is more bacterial keratitis than fungal keratitis. There were 22.2% and 16.7% fungal keratitis respectively in the PACK-CXL and control groups in the present study.

Bamdad *et al.* [39] (2015) also studied PACK-CXL as additional treatment in moderate infectious keratitis. This is the only randomised controlled trial with a beneficial effect of PACK-CXL in patients with moderate infectious keratitis compared with standard treatment. They compared the effect of PACK-CXL in 16 patients with 16 patients from a control group. The epithelial defect and the infiltrated area were significantly smaller in the PACK-CXL group after 7 and 14 days of treatment. Compared with the present study, there were no long-term results. PACK-CXL was performed after epithelial removal and a therapeutic lens was provided after PACK-CXL. These two elements could have modified the results noted by Kasetsuwan *et al.* since moderate infectious keratitis does not go deep into the stroma, complete epithelial removal may have a benefit effect on corneal healing.

Compared with the present study, Iseli *et al.* and Makdouni *et al.* [25,26] both reported a beneficial effect of PACK-CXL but in cases of severe infectious keratitis with corneal melting. Although they did not conduct a randomised study, PACK-CXL may have had a beneficial effect on advanced infectious keratitis. Said *et al.* also reported a lower complication rate with PACK-CXL in cases with corneal melting, though it was not statistically significant. We performed PACK-CXL only at the initial stage of infectious keratitis but corneal melting was not an inclusion criterion.

Our study is in agreement with most of the literature. It confirms that PACK-CXL as additional treatment for infectious keratitis does not improve the duration of healing and clinical evolution. We conducted this study in a population that was different from previous studies with fewer cases of fungal keratitis. However, our study has some limitations: a low number of patients were recruited and it was not a blinded study. There were also some missing data during the follow-up. Furthermore, we decided to not separate fungal and bacterial keratitis cases in the analysis. When we started the study, it was not described that the PACK-CXL was more effective in bacterial or fungal keratitis.

In addition, the PACK-CXL group was smaller (9 patients vs 12 patients in control group), older (60 years old vs 54 years old in control group) with larger median initial ulcer (3.0 mm vs 2.75 mm in control group). It can be bias for primary endpoint results, and could explain the lack of efficacy of PACK-CXL in current study.

Three amniotic membrane grafts were performed owing to insufficient epithelial healing. These three cases were in the control group. One penetrating keratoplasty due to corneal perforation was performed in the PACK-CXL group and this patient was excluded from the statistical analysis. This serious complication in the PACK-CXL group compared with the three amniotic membrane grafts in the control group did not enable statistical comparison of these data. We therefore cannot conclude on a reduction of complications with PACK-CXL.

In addition, in agreement with other studies, we did not note a specific side effect of PACK-CXL (Figure 4).

A new accelerated protocol was studied in 2014. The efficacy of the accelerated protocol of PACK-CXL (3 minutes at 30mW/cm²) was shown *in vitro* [40]. Tabibian *et al.* [41] reported the successful use of accelerated PACK-CXL as a first-line and sole treatment in a case of early fungal keratitis. More recently, Knyaser *et al.* [42] evaluated the effect of accelerated PACK-CXL as additional treatment in 20 cases of therapy-resistant infectious keratitis in a non-

randomised prospective study with encouraging results. The accelerated PACK-CXL could be a good alternative to PACK-CXL with the standard protocol. Randomised prospective studies are obviously needed to confirm these results.

In conclusion, our study did not show the benefit of PACK-CXL as an adjuvant treatment in the initial stage of infectious keratitis, in particular, bacterial. However, PACK-CXL alone could perhaps be interesting in infectious keratitis. It could avoid the using of chemotherapy antimicrobial and hospitalization. Randomized controlled trials should be conduct to study the difference between PACK-CXL and standard treatment antimicrobial. However, this kind of study raises ethical issues.

4.2 About AS OCT in microbial keratitis:

In the present study, we performed AS OCT to determinate the effect of PACK-CXL on final cornea thickness. This has shown the interest of AS OCT in diagnosis of infectious keratitis.

In Fungal keratitis, it seems that the early AS OCT imaging revealed inflammatory plaque attached to the corneal endothelium. This plaque could result from inflammatory cells attached to the endothelium. Lesions of stromal necrosis then appeared on AS OCT at the late stages [33]. In bacterial keratitis, it seems that the early AS OCT imaging showed a thickened cornea with a hyper-reflective area in the anterior corneal stroma which corresponded to the stromal infiltrate and a hypo-reflective area behind the stromal infiltrate.

Inflammatory plaque was described by Konstantopoulos *et al.* [43] in one case of diphtheroid bacterial infection progressing for three to four weeks. It was also described by Soliman *et al.* [33] in 5 cases of microbial infections, 2 bacterial and 3 fungal. However, in their study, the AS OCT were not performed in the early stages (the time from first presentation to the time OCT was performed was 15 days $\pm$ 9 days) when compared with the current study, endothelial plaque was described at later stages in the above cited studies.

Abbouda *et al.* described inflammatory plaque in fungal keratitis with AS OCT performed at the first visit consultation [44]. In our study, the results of early AS OCT showed almost constant results for fungal keratitis. Inflammatory plaque could be a specific aspect of fungal keratitis on AS OCT when it is performed in the early stages.

To our knowledge, the appearance of endothelial inflammatory plaque with AS OCT has never been described in the initial stages of bacterial keratitis.

Early AS OCT of bacterial keratitis has been described in the literature and our results are in agreement: thickened cornea, corresponding to stromal edema and in the hyper-reflective area corresponding to stromal infiltrate [33,43,45].

The clinical presentation can be used to identify the germ. Clinical signs and history [46,47], such as trauma by vegetable material, can help ophthalmologists. The clinical presentation is able to correctly differentiate bacterial from fungal germs in approximately 70% of the cases in the literature [48,49]. Nevertheless, in cases of fungal keratitis, the rate of correct diagnosis only due to clinical presentation is lower: 38% according to Dahlgren *et al.* [48].

AS OCT is a non-invasive exam and the results are available earlier than those of microbiological investigations. However, in our study, AS OCT could not differentiate the type of fungi, filamentous or yeast-like. Moreover, microbiological investigations are the Gold standard to identify the germ and should be performed in patients with suspected microbial keratitis [46]. Although microbial investigations have a rate of positive results of approximately 65% [6], treatment should be continued even if the germ has not been identified [49]. AS OCT could encourage clinicians to start antifungal therapy immediately without the results of microbiological investigations and even if they are negative.

For several years, *in vivo* confocal microscopy, a non-invasive technique, has been developing for imaging of the cornea. It enables identification of filamentous fungal keratitis or *Acanthamoeba* keratitis [29]. The sensitivity of confocal microscopy is moderate and is highly dependent on the clinician's experience [29] and the willingness of the patient to endure a corneal contact exam. Moreover, it is less available than the SD anterior segment OCT owing to recent developments in OCT for retinal diseases.

We are not able to conclude about the particularity of AS OCT in microbial keratitis. We described the AS OCT on a small number of patients. The main limiting factor was that we did not identify fungi with microbiological cultures in the fungal keratitis group. However, a resolution of infection was observed with antifungal therapy in each patient in the fungal keratitis group. To conclude on the description of AS OCT in microbial keratitis, one needs a real well conducted study.

5. **CONCLUSION:**

PACK-CXL as an early adjunct treatment did not show a beneficial effect on the corneal healing. Some studies show a beneficial effect, but none of them is randomized and controlled. PACK-CXL could be interesting in the treatment of infectious keratitis, but with other modalities that have to be defined (alone, accelerated protocol, etc.).

In terms of diagnosis, early AS OCT imaging in microbial keratitis could be an additional tool to differentiate bacterial or fungal keratitis, although the gold standard is microbiological analysis of samples. AS OCT findings could encourage clinicians to start antifungal therapy before the results of the microbiological culture. We purpose to continue the study about the AS OCT over the coming years.

APPENDIXES:

Appendix 1: Figures

Figure 1: A 58-year-old man with fungal keratitis. Unfavorable evolution with antibacterial therapy, then favorable evolution with Amphotericin B. Early AS OCT shows the presence of endothelial inflammatory plaque (*), does not correspond to the hypopyon.

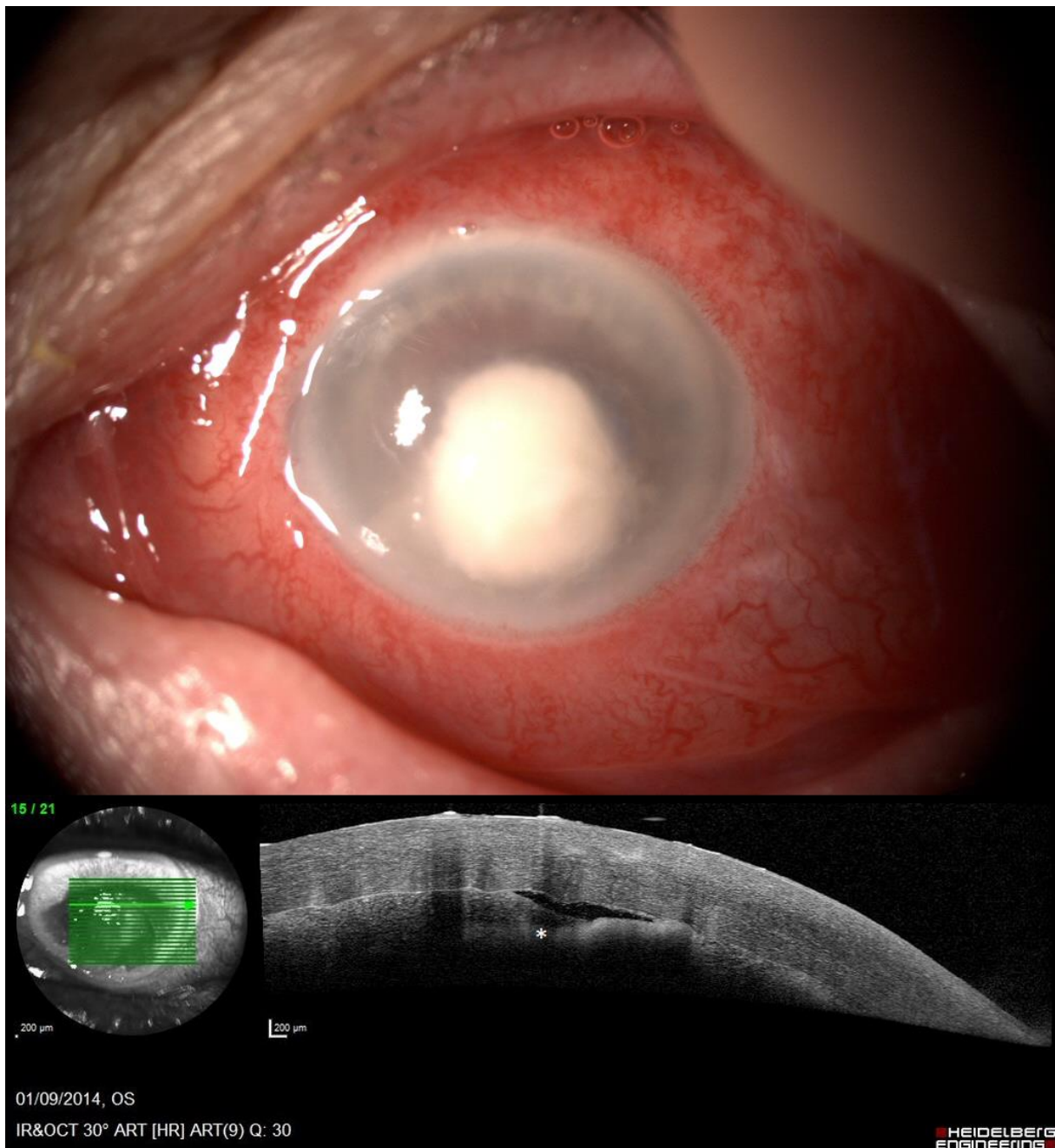


Figure 2: A 54-year-old man with *Pseudomonas Aeruginosa* keratitis. AS OCT shows a thickened cornea in the infiltrated area hyper-reflective (*) and a hypo-reflective area behind the hyper-reflective lesion (>).

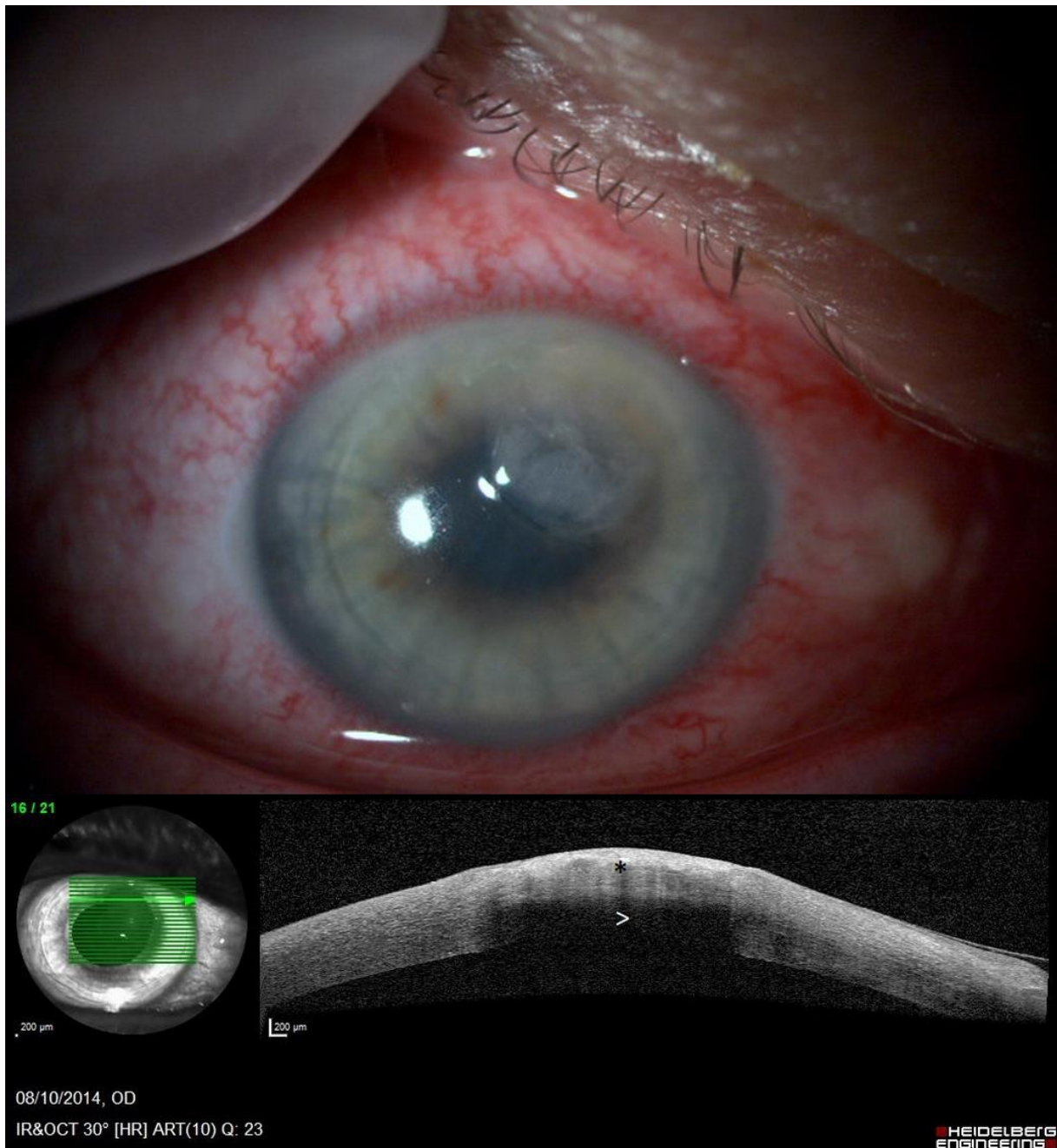
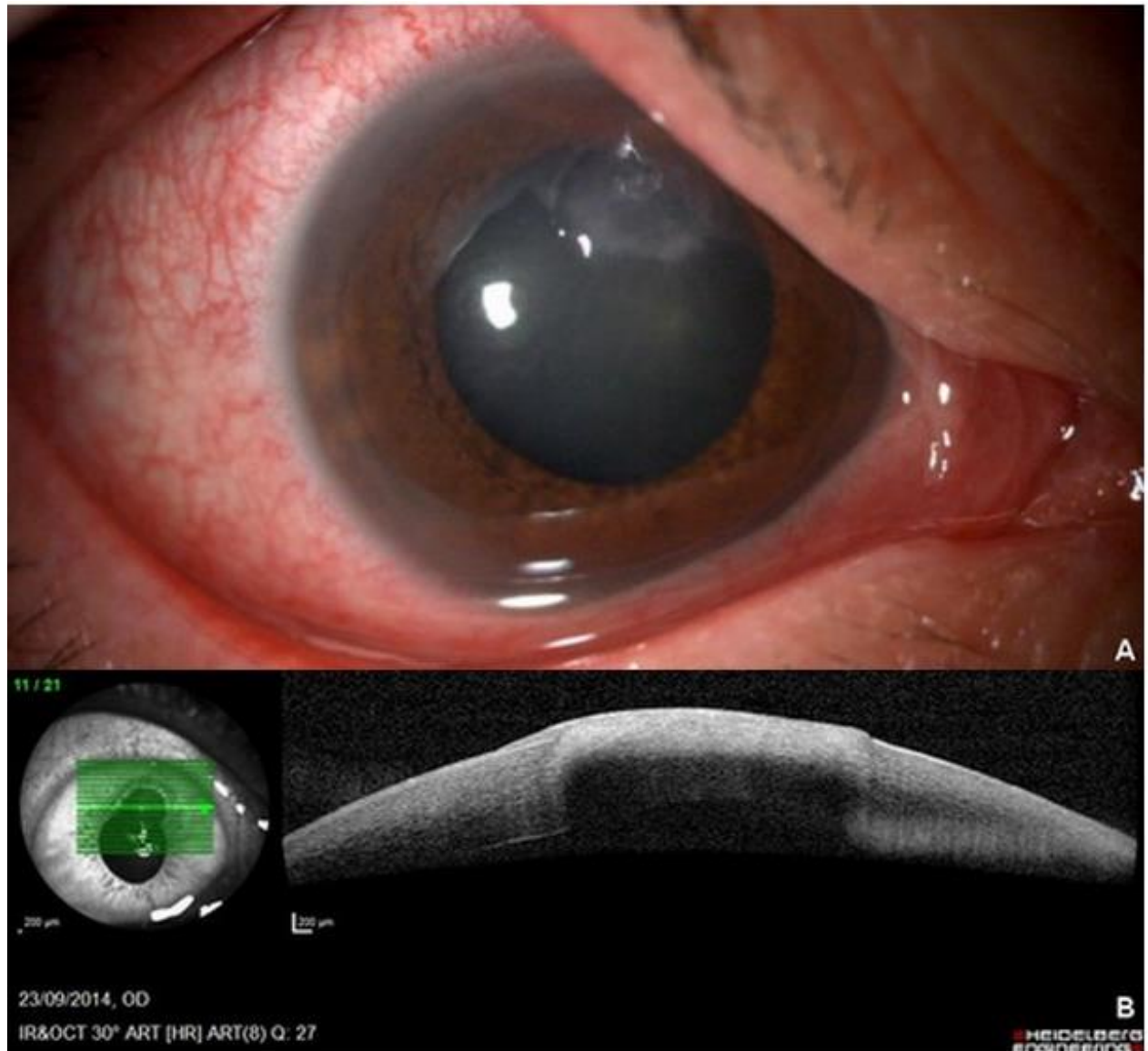
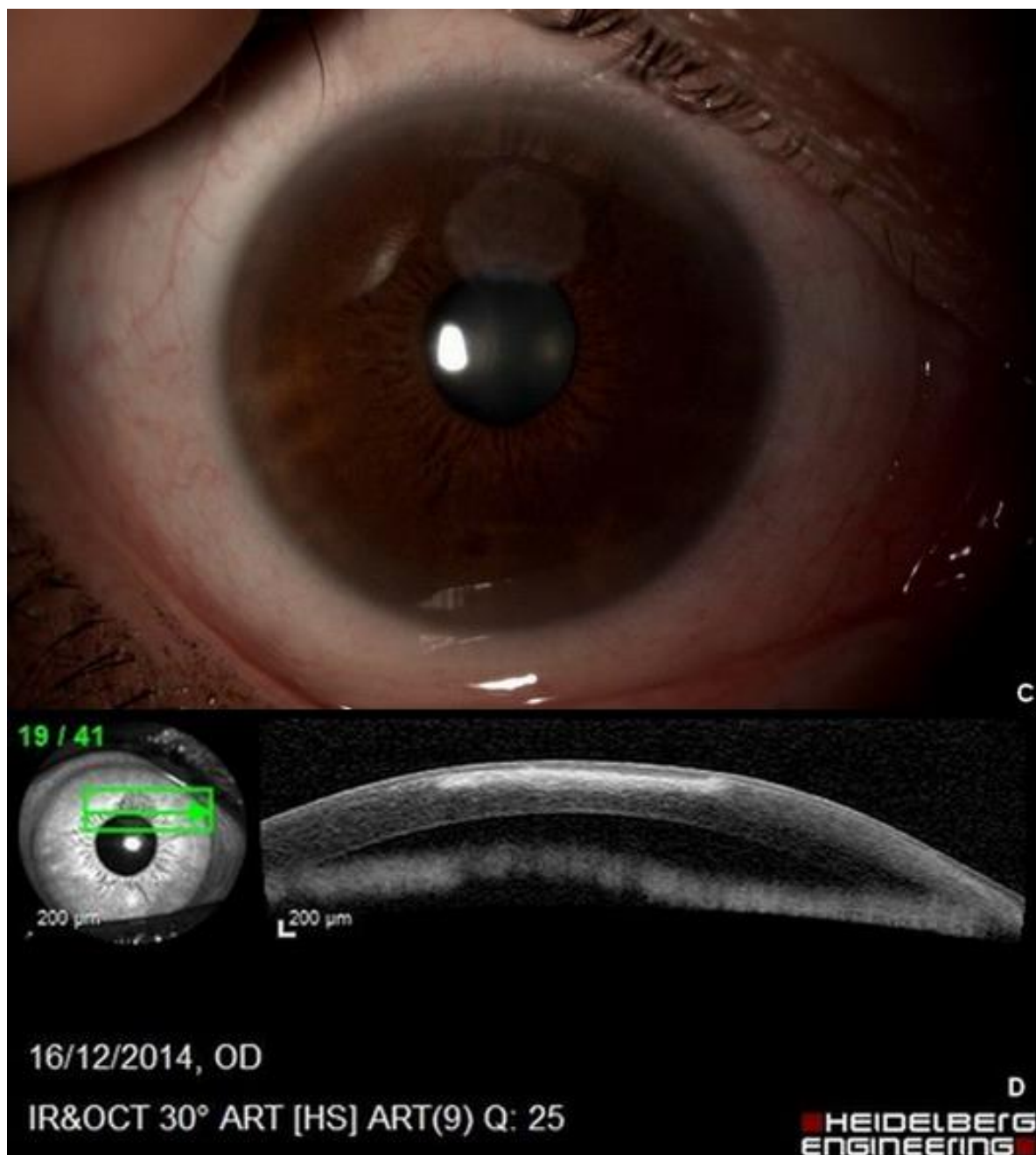


Figure 3: Slit-lamp photography and SA OCT before PACK-CXL (A-B) and after J90 PACK-CXL (C-D), in a 54-year-old contact-lens wearer with bacterial keratitis (negative culture). Total reepithelialisation after 3 months and persistence of corneal scar out of optical axis. No specific adverse effects of PACK-CXL.





Appendix 2: Final report

Rapport final du protocole intitulé :

« Evaluation de l'efficacité de l'UVAthérapie augmentée par Riboflavine dans le traitement des kératites infectieuses non perforées : étude monocentrique, contrôlée, prospective randomisée du dispositif médical Ricrolin »

EudraCT : n° 2014-A00028-39

Référence CPP : 07/14

Réf. RC14_0004

Promoteur : CHU de Nantes

Direction de la recherche
5, allée de l'île Gloriette
4093 Nantes cedex 01 (France)
Tél : 02 53 48 28 35

Investigateur Principal/ Coordonnateur	Isabelle Orignac, PH Ophtalmologie
Investigateurs associés	Dr Bertrand Vabres
Méthodologiste	Fanny Feuillet
Biostatisticien	Fanny Feuillet
Dénomination du produit sur lequel porte la recherche	Emetteur UV-A (CBM X Vega Linker) + Ricrolin : riboflavine stérile.
Indication étudiée	Kératite infectieuse
Brève description du schéma de l'essai	Durée totale : 36 mois. Période de recrutement : 33 mois. Durée de traitement par patients : 1 de durée 40 min. Durée de suivi par patient : 3 mois. Produit utilisé comme référence : Collyres horaires
Phase de développement	☐ Phase I ☐ Phase II ☐ Phase III ☐ Phase IV ☒ NA
Date de 1° mise en place	23/05/2014
Date de 1° inclusion	02/09/2014
CPP ayant évalué le protocole	CPP Ouest IV - Nantes
Date de 1° avis favorable	14/03/2014
Date de l'arrêt anticipé de la recherche	19/04/2017
Date du rapport final	07/03/2018

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations et définition des termes employés	26
Introduction	26
1 Objectif principal et objectifs secondaires de la recherche.....	26
2 Informations sur les traitements à l'étude	26
2.1 Dénomination et description du dispositif médical sur lequel porte la recherche	26
2.2 Modalités d'attribution du Dispositif Médical	27
2.3 Traitements autres que le dispositif médical évalué	27
2.3.1 Identification des traitements	27
2.3.2 Administration	28
2.4 Médicaments et traitements autorisés et interdits.....	28
2.4.1 Traitements autorisés	28
2.4.2 Traitements non autorisés	29
2.4.3 Traitement d'urgence	29
3 Méthodologie et conception de la recherche.....	29
3.1 Description de la conception de la recherche et description succincte de la méthodologie	29
3.2 Description des personnes se prêtant à la recherche	29
3.2.1 Critères d'inclusion.....	29
3.2.2 Critères d'exclusion.....	29
3.2.3 Nombre de personnes se prêtant à la recherche et leur répartition	29
3.3 Evaluation de l'efficacité et de la sécurité	30
3.4 Méthodes statistiques prévues dans le protocole et détermination de la taille de l'échantillon	30
4 Description des situations non conformes au protocole / difficultés techniques relatives :.....	31
4.1 Aux critères d'inclusion ou de non-inclusion et à la prise en charge des personnes	31
4.2 A la conduite de la recherche.....	31
4.3 A l'évaluation des paramètres recueillis sur les personnes s'étant prêtées à la recherche	31
4.4 Aux méthodes statistiques prévues	31
5 Résultats	31
5.1 Analyse de la population étudiée	31
5.2 Evaluation de l'efficacité.....	31
5.2.1 Description de l'échantillon des données sur lesquelles porte l'analyse de l'efficacité ...	31
5.2.2 Caractéristiques démographiques et autres données pertinentes par rapport à l'état initial	32
des personnes incluses	32
5.2.3 Présentation des résultats individuels	32
5.2.4 Analyse statistique et/ou descriptive des données	32
5.2.5 Conclusions sur l'efficacité	32
5.3 Présentation et évaluation des données relatives à la sécurité	32
5.3.1 Liste, description et analyse des décès, autres événements et/ou effets indésirables	32
graves et incidents graves.....	32
5.3.2 Conclusions sur la sécurité du (des) produit(s) sur le(s)quel(s) porte la recherche	35
6 Discussion et conclusions générales sur les résultats d'efficacité et de sécurité.....	35
Conclusion	36
Liste des annexes.....	37
Annexe 1 : Tableau des inclusions.....	38
Annexe 2 : Tables, figures et graphiques mentionnés dans le texte.....	39

LISTE DES ABREVIATIONS ET DEFINITION DES TERMES EMPLOYES

AL	Anesthésie Locale
CPP	Comité de Protection des Personnes
Evènement /effet Indésirable Grave (EvIG/EIG)	Tout événement ou effet indésirable qui entraîne la mort, met en danger la vie de la personne qui se prête à la recherche, nécessite une hospitalisation ou la prolongation de l'hospitalisation, provoque une incapacité ou un handicap important ou durable, ou bien se traduit par une anomalie ou une malformation congénitale
EIG I	Effet Indésirable Grave Inattendu
RAS : Rapport Annuel de Sécurité	Document de synthèse regroupant les données de sécurité et évaluant le bénéfice/ risque de la recherche sur la période concernée. Il permet aux autorités de juger de la sécurité des personnes qui se prêtent à la recherche et par conséquent de l'intérêt de la poursuite de l'étude.
SPP	<i>species pluralis</i>

INTRODUCTION

1 Objectif principal et objectifs secondaires de la recherche

L'objectif principal de l'étude est de démontrer que l'utilisation de l'UVA thérapie augmentée par Riboflavine réduit la durée de cicatrisation épithéliale complète dans les kératites infectieuses.

4 objectifs secondaires ont été définis dans le protocole :

Evaluer la taille de la taie cornéenne finale.

Evaluer l'amincissement cornéen séquellaire.

Evaluer le gain d'acuité visuelle entre l'inclusion et la visite finale.

Evaluer la vitesse de cicatrisation épithéliale complète

2 Informations sur les traitements à l'étude

2.1 Dénomination et description du dispositif médical sur lequel porte la recherche

- Identification du dispositif médical :**

Riboflavine 0,1%.	Emetteur UV-A
Ricrolin. Marquage CE : CE 0037. Dispositif médical classe IIb. Fabriqué par SOOFT et distribué par Horus pharma.	Modèle : Vega, CBM X Linker. (CSO, Florence, Italie)

- Identification du fabricant du dispositif :**

Le distributeur Horus Pharma met à disposition des seringues de Ricrolin avec une réduction de 53%.

- **Composition**

Ricrolin : Riboflavine 0,1%.
Emetteur UV-A.

- **Conditionnement du produit**

Riboflavine : conditionnement en seringue de 1,5mL.

- **Destination prévue du dispositif médical**

Utilisation prévue dans le cadre des kératocônes.

- **Destination prévue du dispositif médical dans la recherche**

Même protocole que dans les kératocônes. Utilisé dans les 72 premières heures de la prise en charge dans le groupe cross linking.

2.2 Modalités d'attribution du Dispositif Médical

- **Description des procédures médicales, de laboratoire ou chirurgicales impliquées dans l'utilisation du dispositif médical**

Procédure en une fois au bloc opératoire sous AL dans les 72 premières heures de la prise en charge : imprégnation de la cornée à raison de 1 à 2 gouttes de Riboflavine toutes les 5 minutes durant 10 minutes puis démarrage de l'irradiation UV-A focalisé sur la cornée pour une durée de 30 minutes en continuant une instillation de gouttes toutes les 5 minutes. Taille du spot : taille de l'ulcère + 3mm.
Pour l'opérateur : lavage chirurgical des mains, gants stériles, casaque stérile.

- **Durée du traitement si applicable**

1 fois dans les 72h premières heures.

- **Instructions d'utilisation ou d'installation du dispositif médical**

Conservation dans un endroit sec, à température ambiante.
Conservation de la seringue et de sa canule dans un étui stérile.
Vérification de la date de péremption du produit.
Etalonnage de l'émetteur UV-A avant chaque utilisation.

2.3 Traitements autres que le dispositif médical évalué

2.3.1 Identification des traitements

Vancomycine :

- Vancomycine.
- Collyre de préparation hospitalière de la pharmacie du CHU de Nantes.
- Conditionnement en flacon, à conserver à 4°C, valable 7 jours.

Fortum :

- Ceftazidime.
- Collyre de préparation hospitalière de la pharmacie du CHU de Nantes.
- Conditionnement en flacon, à conserver à 4°C, valable 7 jours.

Amiklin :

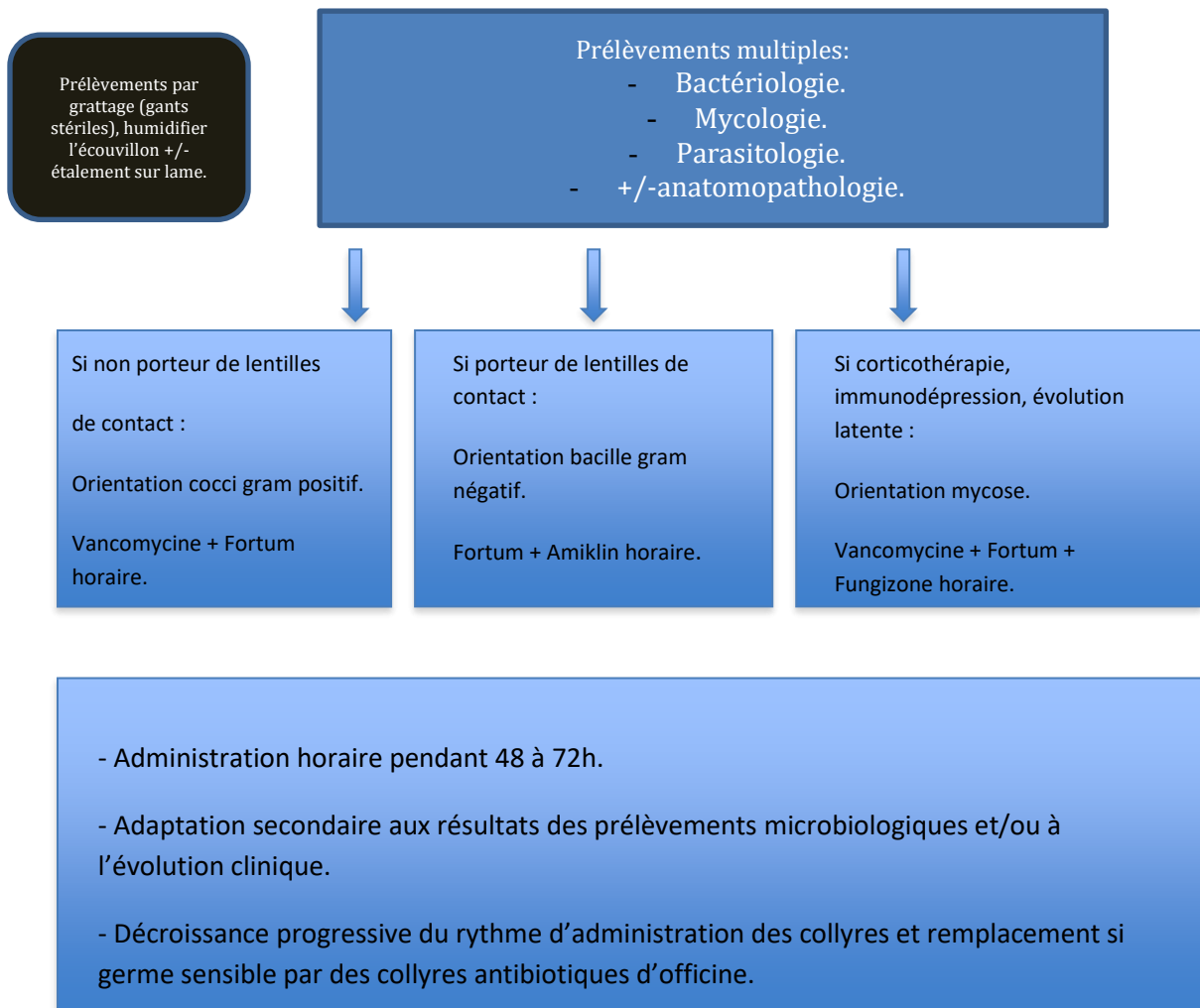
- Amikacine.
- Collyre de préparation hospitalière de la pharmacie du CHU de Nantes.
- Conditionnement en flacon, à conserver à 4°C, valable 7 jours.

Fungizone :

- Amphotéricine B.
- Collyre de préparation hospitalière de la pharmacie du CHU de Nantes.
- Conditionnement en flacon, à conserver à 4°C, valable 7 jours.

2.3.2 Administration

Pour tous les patients participant à l'étude :



2.3.2.1 Adaptation de la posologie

En cas d'effets indésirables graves, le collyre antibiotique mis en cause sera immédiatement arrêté et remplacé par un collyre d'une autre famille d'antibiotiques à laquelle le germe est sensible.

2.4 Médicaments et traitements autorisés et interdits

2.4.1 Traitements autorisés

Tous sauf AINS

2.4.2 Traitements non autorisés

Les AINS ne sont pas autorisés du fait de leur potentiel favorisant sur les infections.

2.4.3 Traitement d'urgence

Un traitement d'urgence peut s'imposer en cas d'évolution défavorable à type de descemetocèle ou de perforation cornéenne, dans ces deux cas un traitement chirurgical est nécessaire à type de kératoplastie par greffe de membrane amniotique ou par kératoplastie lamellaire ou transfixiante à chaud.

3 Méthodologie et conception de la recherche

3.1 Description de la conception de la recherche et description succincte de la méthodologie

- Lieu de l'étude : Service de clinique ophtalmologique, CHU de Nantes, France.
- Un centre
- Etude randomisée contrôlée ouverte.
- Schéma récapitulatif : voir en 2.3.2.

3.2 Description des personnes se prêtant à la recherche

3.2.1 Critères d'inclusion

Pour qu'un sujet puisse entrer dans l'étude il devait réunir les critères suivants :

- Présenter une kératite infectieuse répondant aux critères d'hospitalisation : infiltrat supérieur à 2mm, à moins de 3mm de l'axe visuel ou avec réaction de chambre antérieure.
- Etre majeur responsable.
- Consentir par écrit pour participer à l'étude.
- Etre affilié à un régime de sécurité sociale.

3.2.2 Critères d'exclusion

Critères liés à la pathologie :

- Présenter une kératite infectieuse ne répondant pas aux critères d'hospitalisation.
- Atteinte herpétique ou amibienne supposée.
- Etat pré-perforatif (descemetocèle), perforation.
- Patients dont l'épaisseur de la cornée au point le plus mince est inférieure à 400µm
- Patients ayant une hypersensibilité aux composants de Ricrolin

Critères généraux :

- Femme enceinte.
- Mineurs.
- Majeurs sous tutelle.
- Sérologie positive au VIH
- Patient ne pouvant pas être suivi durant les 3 mois nécessaires.
- Patient ne parlant pas la langue française.
- Patient non affilié à un régime de sécurité sociale.

3.2.3 Nombre de personnes se prêtant à la recherche et leur répartition

Le protocole prévoyait l'inclusion de 38 personnes.

21 personnes ont été incluses au cours de la Recherche (voir en annexe 1 tableau récapitulatif des inclusions).

La première inclusion a eu lieu le 02/09/2014.

La date de dernière visite ou consultation d'un des sujets inclus dans l'étude est le 01/12/2016. La date de décision de fin de recherche est le 19/04/2017.

3.3 Evaluation de l'efficacité et de la sécurité

Le critère d'évaluation du critère principal est la durée de cicatrisation épithéliale complète en jours validée sur photographies.

Les critères d'évaluation secondaires sont :

- La taille de la taie cornéenne finale, estimée à partir de photographies en lampe à fente, à J90. Le critère d'évaluation est le ratio entre la taille de la taie cornéenne finale et la taille initiale de l'ulcère cornéen, exprimé en %.
- L'amincissement séquellaire, exprimé en microns et évalué par OCT (Tomographie en cohérence optique) du segment antérieur à J90. (Heidelberg)
- L'acuité visuelle, évaluée de loin par l'échelle de Monoyer ; elle est exprimée en log MAR. Le gain d'acuité visuelle correspond à la différence entre l'acuité visuelle initiale (J0) et finale (J90).
- La vitesse de cicatrisation épithéliale complète correspondant à la taille initiale de l'ulcère cornéen divisée par la durée de cicatrisation épithéliale complète. Elle est exprimée en mm/jour.

3.4 Méthodes statistiques prévues dans le protocole et détermination de la taille de l'échantillon

Des analyses descriptives sont réalisées pour l'ensemble des variables recueillies : effectifs et pourcentages pour les variables qualitatives, médianes et intervalles interquartiles pour les variables quantitatives.

Objectif principal

L'analyse statistique de l'objectif principal est faite en intention de traiter.

Pour comparer les durées de cicatrisation épithéliale complète entre les deux groupes, un test non paramétrique de Mann-Withney est réalisé.

Objectifs secondaires

Des tests non paramétriques de Mann-Withney sont réalisés pour comparer les moyennes : taille de la taie cornéenne finale, amincissement séquellaire, gain d'acuité visuelle et vitesse de cicatrisation.

Analyse intermédiaire

Une analyse intermédiaire a été effectuée lorsque 50% du nombre total de patients à 19 patients inclus. Seule une analyse descriptive a été réalisée (aucun test statistique).

Analyse de sensibilité

Une analyse de sensibilité est réalisée en excluant les patients ayant une membrane amniotique.

Des données concordantes de la littérature indiquent une durée de cicatrisation moyenne de 21 jours. (16)

Les éléments suivants ont été retenus pour cette étude :

- ❖ une durée de cicatrisation moyenne diminuée de 2 jours dans le groupe « cross-linking » par rapport au groupe contrôle semblait pertinente sur le plan clinique pour démontrer l'intérêt de l'utilisation de l'UVA thérapie augmentée par Riboflavine ;
- ❖ un écart-type de 2 jours ;
- ❖ un risque de première espèce de 5% ;
- ❖ une puissance de 80%.

→ Permettant de déterminer un nombre total de patients nécessaires de 34. Pour garantir la puissance nécessaire, en rajoutant 10% de patients supplémentaires, le nombre de patients nécessaires était alors de **38 au total**, soit **19 patients par groupe**.

4 Description des situations non conformes au protocole / difficultés techniques relatives :

4.1 Aux critères d'inclusion ou de non-inclusion et à la prise en charge des personnes

Pas de déviation au critère d'inclusion

4.2 A la conduite de la recherche

Pas de déviation

4.3 A l'évaluation des paramètres recueillis sur les personnes s'étant prêtées à la recherche

Un patient perdu de vue au cours de l'étude dans le groupe contrôle, après la visite 5. L'étude du critère de jugement principal à tout de même été possible chez ce patient du fait d'une durée de cicatrisation épithéliale complète disponible chez ce patient.

Un patient exclu du fait d'un effet indésirable grave dans le groupe cross-linking (perforation cornéenne avec kératoplastie transfixiante à chaud).

4.4 Aux méthodes statistiques prévues

La taille de l'échantillon n'était que de 21 patients contre un nombre de patients nécessaires de 34 pour une puissance statistique satisfaisante, plus 10% de patients supplémentaires, soit 38 patients au total. Cet écart s'explique d'une part par la difficulté de recrutement lié à un nombre important d'abcès chez des sujets trop âgés pour donner un consentement éclairé ou pour réaliser les visites au CHU, à des refus fréquents de participer à une étude clinique chez des sujets plus jeunes au cours de l'étude, et donc la difficulté d'obtenir le nombre de patients nécessaires au cours de la durée prévue de l'étude. D'autre part l'absence d'observation d'efficacité clinique du cross-linking (étude en simple aveugle, le praticien connaissant le bras de traitement) au cours de l'étude et donc l'impression clinique d'une non-efficacité du cross-linking dans le traitement des kératites infectieuses, semblait permettre une conclusion sur le critère de jugement principal.

5 Résultats

5.1 Analyse de la population étudiée

21 patients randomisés, les données démographiques des deux groupes étaient comparables.

- Age médian : 60 ans dans le groupe cross-linking, 54 ans dans le groupe contrôle.
 - Sexe : 5 hommes et 4 femmes dans le groupe traité, 9 hommes et 3 femmes dans le groupe contrôle.
- 4 patients étaient porteurs de lentilles de contact dans le groupe CXL, 6 dans le groupe contrôle.

5.2 Evaluation de l'efficacité

5.2.1 Description de l'échantillon des données sur lesquelles porte l'analyse de l'efficacité

21 patients ont été randomisés, 9 dans le groupe traité par cross-linking et 12 dans le groupe contrôle.

1 patient exclu de l'analyse d'efficacité pour le critère de jugement principal et les critères secondaires dans le groupe cross-linking du fait d'un effet indésirable grave (perforation cornéenne nécessitant une kératoplastie transfixiante à chaud). 1 patient perdu de vue dans le groupe contrôle après la visite 5. L'évaluation du critère de jugement principal a pu être recueilli et analysé chez ce patient, mais les critères de jugement secondaires n'ont pu être recueillis.

3 patients pour lesquels il y avait une donnée manquante (OCT à J90), 1 dans le groupe cross-linking et 2 dans le groupe contrôle : l'analyse du critère secondaire, l'amincissement séquellaire à J90, n'a pas été réalisée chez ces patients.

L'observance du traitement a été certaine car le cross-linking a été réalisé par l'équipe médicale du service.

5.2.2 Caractéristiques démographiques et autres données pertinentes par rapport à l'état initial des personnes incluses

La taille médiane de l'ulcère initial était de 3 mm dans le groupe traité et de 2,75 mm dans le groupe contrôle, sans différence statistiquement significative.

2 patients dans chaque groupe ont été traités par un traitement antifongique : une patiente dans le groupe CXL présentait une coinfection bactérienne et fongique.

Les résultats microbiologiques étaient positifs pour 4 patients dans le bras CXL (1 moraxella spp, 2 pneumocoques spp, 1 pseudomonas spp) et pour 7 patients dans le bras contrôle (1 moraxella spp, 2 proteus spp, 4 pseudomonas spp)

5.2.3 Présentation des résultats individuels

Cf résultats en annexe 2

5.2.4 Analyse statistique et/ou descriptive des données

Le critère de jugement principal : la durée de cicatrisation épithéliale médiane n'était pas significativement différente entre les deux groupes. Elle était de 18.5 jours [9.0;33.5] pour le groupe traité et de 9.5 jours [5.0;32.5] pour le groupe contrôle (p=0,62).

Les critères de jugement secondaires :

- Le ratio entre la taille de la taie cornéenne finale et la taille initiale de l'ulcère cornéen n'était pas significativement différent entre les deux groupes : il était de 0.89 [0.70;1.0] pour le groupe traité, et de 1.14 [0.80;1.14] pour le groupe contrôle (p=0,11).
- L'amincissement séquellaire à J90 exprimé à l'aide du ratio entre la pachymétrie mesurée par OCT au niveau de la zone saine et de la pachymétrie au niveau de la zone infectée n'était pas significativement différent entre les deux groupes : il était de 0.05 [0.02;0.10] pour le groupe traité, et de 0.06 [-0.19 ;1.13] pour le groupe contrôle (p=0,68).
- La différence entre l'acuité visuelle initiale (J0) et finale (J90) n'était pas significativement différente entre les deux groupes : elle était de -0.50 [-1.65 ; -0.30] pour le groupe traité, et de -0.60 [-2.00;-0.30] pour le groupe contrôle (p=0,84)
- La vitesse de cicatrisation épithéliale complète n'était pas significativement différente entre les deux groupes : elle était de 0.16 mm/jour [0.11;0.24] pour le groupe traité et de 0.21 mm/ jour [0.13;0.45] pour le groupe contrôle (p=0,52).

5.2.5 Conclusions sur l'efficacité

L'étude n'a pas permis de mettre en évidence de supériorité statistiquement significative sur la durée de la cicatrisation cornéenne entre le cross-linking en adjonction du traitement standard par rapport à un traitement standard seul par anti-microbiens locaux. Nous ne pouvons également pas conclure sur une différence significative sur les critères de jugement secondaires : la taille de la taie cornéenne finale, l'amincissement séquellaire, l'acuité visuelle finale et la vitesse de cicatrisation épithéliale.

5.3 Présentation et évaluation des données relatives à la sécurité

5.3.1 Liste, description et analyse des décès, autres événements et/ou effets indésirables graves et incidents graves

Décès :

Aucun décès en lien avec le produit expérimental ou la recherche n'a été observé.

Effet indésirable inattendu

Aucun effet indésirable inattendu n'a été signalé.

Evènements et effets indésirables attendus

Trois notifications ont été reçues par le promoteur, un dans le bras expérimental et deux dans le bras traitement de référence.

Groupe du dispositif expérimental :

La notification décrit deux EIG chez le patient 04 inclus dans le bras « Ricrolin® » :

- CHUNT201500010 : la patiente 04, une femme de 75 ans, diabétique, a été incluse le 10/11/2014 et a été traitée le 12 novembre par Ricrolin® et Emetteur UV-A. Elle a reçu aussi les anti-infectieux protocolaire.

Le 24 novembre, à J12, elle a présenté une nécrose de sa cornée avec perforation nécessitant une conjunctivo-kératoplastie avec greffe de membrane à J14, puis à une kératoplastie transfixiante à J16. Ces complications ont été considérées comme sévères. L'évolution a été jugée favorable avec séquelles à type d'opacité cornéenne totale le 21 avril 2015.

Dans un premier temps, le rôle du dispositif ou de sa procédure d'utilisation avait été suspecté, l'investigateur rejette désormais cette hypothèse et considère qu'il s'agit d'une évolution de la pathologie initiale. Toutefois une imputabilité douteuse persiste sur le CRF. Le promoteur considère qu'aucun lien ne peut raisonnablement être retenu pour le DM, mais qu'il est impossible d'exclure totalement la procédure, favorisée par le terrain diabétique, même si l'évolution de la pathologie reste la cause la plus probable.

Groupe du comparateur

Deux notifications ont été transmises dans le bras « référence » :

- CHUNT201400087 : le patient 01, un homme de 58 ans, a été inclus le 02/09/2014 et traité dans le bras de référence. Il a présenté à J10 une collection enkystée de la chambre antérieure, nécessitant une prise en charge chirurgicale. L'évolution a été jugée favorable le 13 novembre soit à 2 mois.

L'investigateur et le promoteur ont jugé que l'EVIg n'avait aucun lien avec le DM et la recherche et était dû à la progression de la maladie initiale.

- CHUNT201500036 : le patient 07, un homme âgé de 63 ans, a été inclus dans le bras de référence le 31 mars. Ce patient a présenté une persistance de l'ulcère initial après une semaine malgré le traitement anti-infectieux administré. Une greffe de membrane amniotique a été effectuée le 14 avril en traitement de cette complication ; L'évolution a été favorable avec séquelles (taie cornéenne) le 21 mai 2015. Aucun lien avec la recherche n'a été retenu.

Eye disorders (10015919) [3]		
Body system / ADR Term	Reference	RICROLIN UV
Anterior chamber disorder	1	
Corneal perforation		1
Ulcerative keratitis	1	1
Subtotal	2	2
TOTAL	2	2

Tab : 2. répartition des EIG et EVIG par bras

Evènements et Effets non graves

Sur la période du rapport, aucun nouvel Evl n'a été enregistré dans le CRF. Ainsi, au cours du suivi protocolaire, 9 Evl non graves ont été observés chez 6 patients.

L'évolution est favorable la majorité des cas, mais des séquelles persistent pour un patient du groupe Ricrolin® ; un Evl du groupe comparateur reste en cours

Une seule complication, progression de la kératite chez le patient 04 du bras Ricrolin®, a été jugée potentiellement en lien avec le traitement protocolaire (relation jugée « douteuse »).

Groupe du dispositif expérimental

- Pour la patiente 4, une femme de 75 ans, incluse le 10/11/2014 dans le bras « Ricrolin® », une progression de la kératite a été mentionnée comme un Evl d'intensité modérée à partir du 20 novembre 2014 ; cet Evl est devenu grave à compter du 24 novembre, notée comme date de fin avec séquelles de l'Evl non grave (CHUNT201500010). Cette kératite a été suspectée d'être liée au traitement dans sa globalité.
- Pour le patient 17, un homme de 35 ans, inclus le 15 avril 2016, un retard de cicatrisation a nécessité une greffe de membrane amniotique, avec cependant initialement la persistance d'une photophobie, persistante jusqu'en septembre 2016. Aucun lien avec le traitement protocolaire n'a été retenu.
- Pour le patient 19 un homme âgé de 60 ans, inclus dans l'étude le 28 mai 2016, la persistance de l'inflammation a nécessité une fenêtre thérapeutique des traitements concomitants, avec arrêt des administrations oculaires de la tobramycine, de la rifamycine, de la ciprofloxacine, de l'atropine, de la vitamine A. La tobramycine, la rifamycine et l'atropine ont été réintroduites sans réapparition de l'inflammation. Le traitement protocolaire n'est pas suspecté ; Si tous les traitements concomitants sont suspects, la ciprofloxacine et la vitamine A, non réintroduites restent au premier plan.

Groupe du comparateur

- Pour le patient 01, un homme de 58 ans inclus le 02 septembre 2014 dans le groupe « référence » : il s'agit d'un entropion et d'un trichiasis de l'œil gauche, observé à J20, d'évolution favorable après canthopexie. Ces Evl ont été considérés sans lien avec la recherche.
- Pour le patient 5, un homme de 54 ans inclus le 26 février 2015 dans le bras référence, des céphalées ont été notées le 26 mars puis une baisse d'acuité visuelle signalée le 7 avril. Les céphalées ont persisté jusqu'au 3 juin 2015. La baisse d'acuité visuelle persiste. Ces Evl ont été considérés sans lien avec la recherche
- Pour le patient 20, un homme âgé de 88 ans, inclus dans le bras de référence le 09 juin 2016, un retard de cicatrisation a nécessité une greffe de membrane amniotique, l'évolution est favorable. Aucun lien avec le traitement protocolaire n'a été retenu.

AEv SOC PT terms/ grade	CROSS-LINKING		REFERENCE			Total
Eye disorders	Moderate	subtotal	Mild	Moderate	subtotal	
Entropion			1		1	1
Eye inflammation	1	1				1
Photophobia	1	1				1
Trichiasis			1		1	1
Ulcerative keratitis	1	1				1
Visual acuity reduced				1	1	1
Subtotal	3	3	2	1	3	6
General disorders and administration site conditions	Moderate	subtotal	Mild	Moderate	subtotal	Total
Impaired healing	1	1		1	1	2
Subtotal	1	1		1	1	2
Nervous system disorders	Moderate	subtotal	Mild	Moderate	subtotal	Total
Headache			1		1	1
Subtotal			1		1	1
Total	4	4	3	2	5	9

Tab 3 : répartition des Evl non graves par bras/intensité

Aev SOC PT terms/ Evolution	CROSS-LINKING			REFERENCE			Total
Eye disorders	Sequels	Resolved	Subtotal	Ongoing	Resolved	Subtotal	
Entropion					1	1	1
Eye inflammation		1	1				1
Photophobia		1	1				1
Trichiasis					1	1	1
Ulcerative keratitis	1		1				1
Visual acuity reduced				1		1	1
Subtotal	1	2	3	1	2	3	6
General disorders and administration site conditions	Sequels	Resolved	Subtotal	Ongoing	Resolved	Subtotal	
Impaired healing		1	1		1	1	2
Subtotal		1	1		1	1	2
Nervous system disorders	Sequels	Resolved	Subtotal	Ongoing	Resolved	Subtotal	
Headache					1	1	1
Subtotal					1	1	1
Total	1	3	4	1	4	5	9

Tab 4 : Evolution des Evl non graves

5.3.2 Conclusions sur la sécurité des produits sur lesquels porte la recherche

Aucune alerte concernant le dispositif ou la participation à l'étude n'a été identifiée. Un EIG d'imputabilité douteuse pour la procédure d'utilisation du DM a été suspecté dans le bras Ricrolin®. Les EvIG et EvI non graves observés correspondent majoritairement au profil de complications de la pathologie. A l'issue de l'analyse, l'information destinée aux participants ne nécessite pas de modification.

6 Discussion et conclusions générales sur les résultats d'efficacité et de sécurité

Objectif de l'étude : démontrer que l'utilisation de l'UVA thérapie augmentée par Riboflavine réduit la durée de cicatrisation épithéliale complète dans les kératites infectieuses.

De nombreuses études concluent sur une efficacité du cross-linking dans le traitement des kératites infectieuses, mais ces études ne sont pas randomisées contrôlées (suivi de cohorte sans groupe contrôle) et ne permettent donc pas de conclure à une supériorité par rapport aux traitements antibiotiques topiques classiques, mais montrent uniquement une cicatrisation de kératites infectieuses compliquées de nécrose, une tendance à la réduction des complications à type de perforation cornéenne et une absence d'effet indésirable spécifique au CXL.

En revanche par rapport aux récents essais randomisés, les résultats de notre étude vont dans le sens de ceux-ci, c'est-à-dire une absence de supériorité du cross-linking associé au traitement standard par rapport au traitement standard seul dans le traitement des kératites infectieuses à la phase aiguë.

Cet essai se distingue sur plusieurs points :

- Sa population : c'est le premier essai randomisé contrôlé étudiant l'effet du cross-linking réalisé dans une population différente d'un pays en voie de développement. De ce fait le profil des kératites est différent (moins de kératite fongique et plus de porteurs de lentille de contact avec infection bactérienne à gram négatif). Or les kératites fongiques semblent moins répondre au CXL que les kératites bactériennes. Dans les pays en développement les études conduites n'ont pas montré de supériorité du cxl en traitement additionnel au traitement anti microbien standard mais il y a plus de kératite fongique dans leurs études et le CXL semble être moins efficaces sur les kératites fongiques, ce qui pourraient expliquer leurs résultats Dans notre étude il y a plus de kératites bactériennes, pourtant le CXL n'a pas apporté une efficacité supplémentaire.
- Son design : il s'agit d'un essai étudiant l'effet du cross-linking réalisé à la phase précoce de la kératite infectieuse. De nombreuses études ont montré une efficacité du cross-linking à la phase plus tardive de l'infection, au stade de nécrose cornéenne.

- Ses critères de jugement : il s'agit du seul essai étudiant l'effet sur l'amincissement cornéen et prenant en compte la vitesse de cicatrisation pour limiter le biais de la taille initiale de l'ulcère dans les résultats. Sur ces 2 critères, le CXL n'a pas montré d'effet favorable par rapport au traitement conventionnel seul. Comme les autres études portant sur le crosslinking, il n'y a pas d'effets secondaires spécifiques au crosslinking mis en évidence : l'évolution défavorable avec une perforation cornéenne ou un retard de cicatrisation cornéenne sont liés à l'évolution de la maladie.

CONCLUSION

Au total, l'étude confirme la tendance actuelle sur l'absence de supériorité réelle, statistiquement significative, du cross-linking en adjonction au traitement conventionnel par rapport à un traitement antimicrobien seul bien conduit dans la prise en charge des kératites infectieuses. L'analyse des critères secondaires ne montrent pas non plus d'intérêt du crosslinking sur la qualité de cicatrisation cornéenne : pas de diminution de l'amincissement cornéen ni de la taille de la cicatrice finale.

Le Promoteur	L'investigateur coordonnateur
NOM prénom et fonction :	NOM et prénom :
Anne-Claire DE REBOUL, Directrice des Affaires Médicales et de la Recherche	
Date :	Date :
Signature :	Signature :

Ce rapport est archivé dans le dossier de l'étude du promoteur et tenu à disposition de l'ANSM. Une copie de la version finale est conservée par l'investigateur coordonnateur. Après la fin de la recherche, si le promoteur a connaissance d'un fait nouveau susceptible d'avoir un impact significatif sur la sécurité des personnes qui se sont prêtées à la recherche, il en informe sans délai l'autorité compétente et précise les mesures appropriées qu'il envisage de mettre en place. Si l'autorité compétente estime les mesures envisagées insuffisantes, elle peut prescrire au promoteur les mesures appropriées. **(selon l'article R1123-60 du code de la santé Publique)**

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1. Tableau récapitulatif des inclusions

ANNEXE 2. Tables, figures et graphiques mentionnés dans le texte

ANNEXE 1 : TABLEAU DES INCLUSIONS

	Initiale Nom	Initial prénom	Date consentement	Date naissance	Bras de randomisation
01	M	M	02/09/2014	sept-56	Placebo
02	S	R	23/09/2014	sept-60	Cross-Linking
03	L	M	08/10/2014	févr-60	Placebo
04	L	G	10/11/2014	nov-14	Cross-Linking
05	G	D	26/02/2015	juil-60	Placebo
06	L	L	05/03/2015	oct-62	Placebo
07	M	H	31/03/2015	août-51	Placebo
08	M	B	31/03/2015	mars-47	Cross-Linking
09	N	F	15/05/2015	juin-80	Cross-Linking
10	P	D	20/05/2015	avr-51	Cross-Linking
11	P	M	28/07/2015	oct-91	Placebo
12	B	F	25/09/2015	oct-91	Placebo
13	B	T	15/10/2015	août-91	Placebo
14	T	M	22/02/2016	nov-51	Cross-Linking
15	S	M	02/03/2016	nov-40	Placebo
16	Z	C	14/03/2016	août-95	Cross-Linking
17	L	N	15/04/2016	juil-80	Cross-Linking
18	P	J	28/04/2016	déc-51	Placebo
19	C	V	28/05/2016	août-55	Cross-Linking
20	R	R	09/06/2016	mai-28	Placebo
21	B	A	05/09/2016	sept-74	Placebo

Annexe 2 : Tables, figures et graphiques mentionnés dans le texte

VISITE D'INCLUSION Démographie

		CROSS-LINKING N=9	PLACEBO N=12	Total N=21
AGE	N	9	12	21
	Min-Max	[20.00;75.00]	[23.00;88.00]	[20.00;88.00]
	Moyenne	52.67	51.67	52.10
	Ecart-type	18.62	20.67	19.34
	Médiane	60.00	54.00	54.00
	Q1-Q3	[35.00;64.00]	[33.00;63.50]	[35.00;64.00]
SEXE	HOMME	5 (55.56%)	9 (75.00%)	14 (66.67%)
	FEMME	4 (44.44%)	3 (25.00%)	7 (33.33%)

Examen clinique

		CROSS-LINKING N=9	PLACEBO N=12	Total N=21
ACUITE VISUELLE (/10)	N	5	5	10
	Min-Max	[0.50;7.00]	[2.00;8.00]	[0.50;8.00]
	Moyenne	3.60	5.66	4.63
	Ecart-type	2.38	2.32	2.47
	Médiane	4.00	6.30	4.50
	Q1-Q3	[2.50;4.00]	[5.00;7.00]	[2.50;7.00]
ACUITE VISUELLE (logMAR)	N	9	12	21
	Min-Max	[0.20;2.60]	[0.10;2.60]	[0.10;2.60]
	Moyenne	1.34	1.52	1.44
	Ecart-type	0.97	1.09	1.02
	Médiane	1.30	2.30	2.00
	Q1-Q3	[0.40;2.30]	[0.25;2.30]	[0.40;2.30]
LENTILLE DE CONTACT	NON	5 (55.56%)	6 (50.00%)	11 (52.38%)
	OUI	4 (44.44%)	6 (50.00%)	10 (47.62%)
PACHY JUSTALESIONNEL ZONE SAINE (microns)	N	9	11	20
	Min-Max	[588.00;1222.00]	[629.00;845.00]	[588.00;1222.00]
	Moyenne	816.22	733.18	770.55
	Ecart-type	205.58	63.21	147.29
	Médiane	827.00	713.00	748.00
	Q1-Q3	[665.00;887.00]	[695.00;775.00]	[683.00;828.00]

PACHY MINIMALE EN ZONE INFECTEE (microns)	N	9	11	20
	Min-Max	[656.00;1067.00]	[405.00;957.00]	[405.00;1067.00]
	Moyenne	849.67	815.00	830.60
	Ecart-type	146.02	149.09	144.88
	Médiane	855.00	843.00	849.00
	Q1-Q3	[722.00;970.00]	[790.00;910.00]	[773.50;917.00]
PHOTOS	NON	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
	OUI	9 (100.0%)	12 (100.0%)	21 (100.0%)
TAILLE DE L'INFILTRAT	N	9	12	21
	Min-Max	[1.50;5.50]	[1.00;3.50]	[1.00;5.50]
	Moyenne	3.17	2.23	2.63
	Ecart-type	1.49	0.84	1.23
	Médiane	3.00	2.10	2.50
	Q1-Q3	[1.60;4.00]	[1.75;2.75]	[1.60;3.50]
TAILLE DE L'ULCERE (mm)	N	9	12	21
	Min-Max	[1.00;8.00]	[1.00;6.00]	[1.00;8.00]
	Moyenne	3.43	2.87	3.11
	Ecart-type	2.26	1.43	1.80
	Médiane	3.00	2.75	3.00
	Q1-Q3	[1.60;4.80]	[1.75;3.90]	[1.60;4.00]

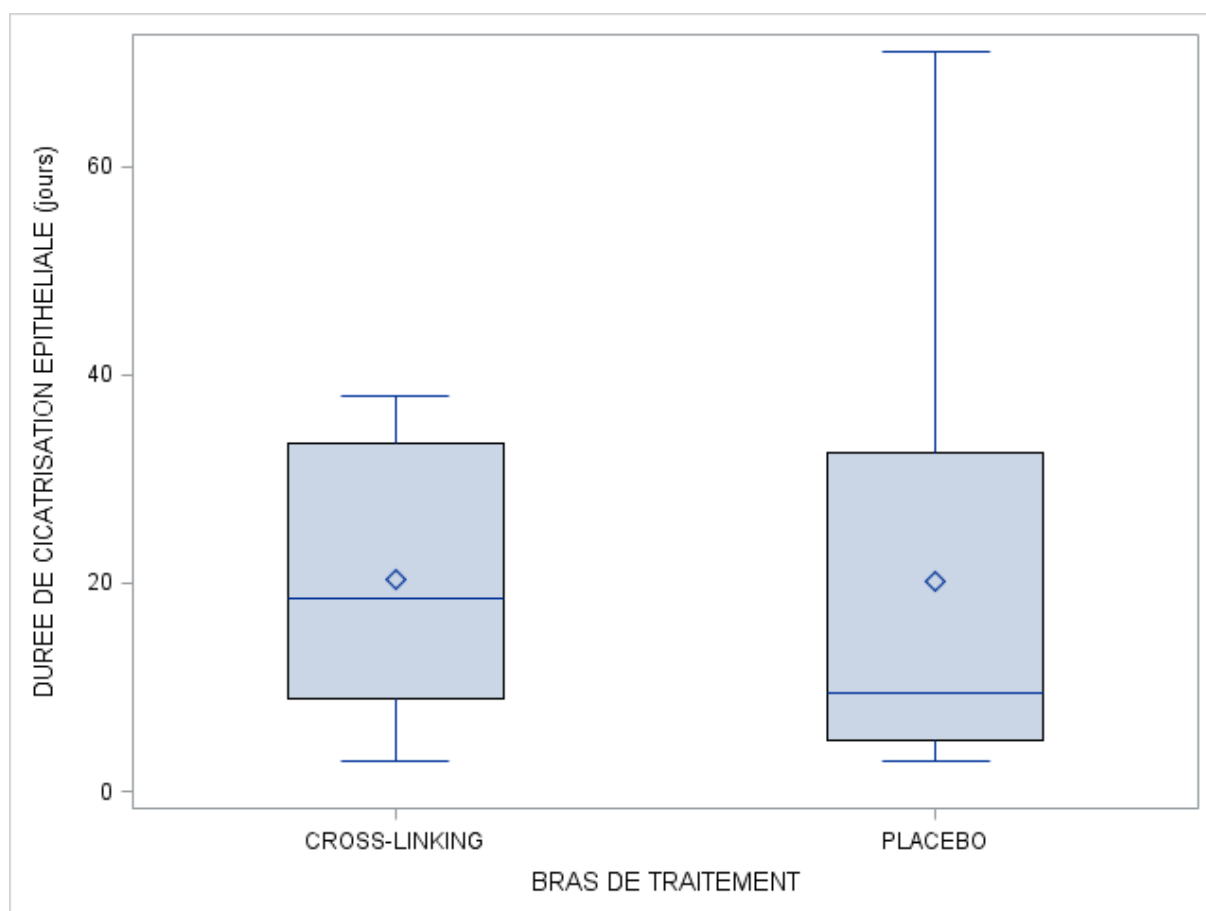
Prélèvements

		CROSS-LINKING N=9	PLACEBO N=12	Total N=21
PRELEVEMENTS	NON	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
	OUI	9 (100.0%)	12 (100.0%)	21 (100.0%)
PRELEVEMENTS ANATOMOPATHOLOGIE	NON	7 (77.78%)	8 (66.67%)	15 (71.43%)
	OUI	2 (22.22%)	4 (33.33%)	6 (28.57%)
PRELEVEMENTS BACTERIOLOGIE	NON	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
	OUI	9 (100.0%)	12 (100.0%)	21 (100.0%)
PRELEVEMENTS MYCOLOGIE	NON	2 (22.22%)	2 (16.67%)	4 (19.05%)
	OUI	7 (77.78%)	10 (83.33%)	17 (80.95%)

CRITERE D'EVALUATION PRINCIPAL

La durée de cicatrisation épithéliale complète en jour validée sur photographies.

		CROSS-LINKING N=9	PLACEBO N=12	Total N=21	p-value
DUREE DE CICATRISATION EPITHELIALE (jours)	N	8	12	20	0.6198
	Min-Max	[3.00;38.00]	[3.00;71.00]	[3.00;71.00]	
	Moyenne	20.38	20.17	20.25	
	Ecart-type	13.48	22.35	18.87	
	Médiane	18.50	9.50	13.50	
	Q1-Q3	[9.00;33.50]	[5.00;32.50]	[5.00;33.50]	



CRITERE D'EVALUATION SECONDAIRE N°1

La taille de la taie cornéenne finale est estimée à partir de photographies en lampe à fente, à J90. Le critère d'évaluation est le ratio entre la taille de la taie cornéenne finale et la taille initiale de l'ulcère cornéen

		CROSS-LINKING	PLACEBO	Total	p-value
		N=9	N=12	N=21	
RATIO TAILLE TAIE CORNEENNE FINALE / TAILLE INITIALE DE L'ULCERE CORNEEN	N	8	11	19	0.1149
	Min-Max	[0.47;1.07]	[0.67;2.00]	[0.47;2.00]	
	Moyenne	0.84	1.21	1.06	
	Ecart-type	0.21	0.48	0.43	
	Médiane	0.89	1.14	1.00	
	Q1-Q3	[0.70;1.00]	[0.80;1.50]	[0.73;1.20]	

CRITERE D'EVALUATION SECONDAIRE N°2

L'amincissement séquellaire est évalué par OCT (Tomographie en cohérence optique) du segment antérieur à J90 (Heidelberg).

			CROSS-LINKING N=9	PLACEBO N=12	Total N=21	p-value
PACHY JUSTALESIONNEL ZONE Saine (microns)	N		7	9	16	0.9171
	Min-Max		[514.00;796.00]	[285.00;628.00]	[285.00;796.00]	
	Moyenne		597.14	529.11	558.88	
	Ecart-type		98.77	113.48	109.48	
	Médiane		547.00	553.00	552.00	
	Q1-Q3		[538.00;650.00]	[542.00;600.00]	[539.00;613.50]	
PACHY MINIMALE EN ZONE INFECTEE (microns)	N		7	9	16	0.6780
	Min-Max		[427.00;753.00]	[413.00;712.00]	[413.00;753.00]	
	Moyenne		562.14	549.56	555.06	
	Ecart-type		100.64	100.43	97.33	
	Médiane		552.00	521.00	540.00	
	Q1-Q3		[502.00;588.00]	[480.00;595.00]	[481.00;591.50]	
TAUX D'AMINCISSEMENT SEQUELLAIRE	N		7	9	16	0.6780
	Min-Max		[-0.07 ;0.22]	[-0.69;0.24]	[-0.69;0.24]	
	Moyenne		0.06	-0.09	-0.02	
	Ecart-type		0.09	0.31	0.25	
	Médiane		0.05	0.06	0.06	
	Q1-Q3		[0.02;0.10]	[-0.19;0.13]	[-0.08;0.11]	

CRITERE D'EVALUATION SECONDAIRE N°3

L'acuité visuelle est évaluée de loin par l'échelle de Monoyer. Le gain d'acuité visuelle correspond à la différence entre l'acuité visuelle initiale (J0) et finale (J90).

		CROSS-LINKING	PLACEBO	Total	p-value
		N=9	N=12	N=21	
GAIN ACUITE VISUELLE (logMAR)	N	8	11	19	0.8386
	Min-Max	[-2.10;0.20]	[-2.40;-0.10]	[-2.40;0.20]	
	Moyenne	-0.85	-1.05	-0.96	
	Ecart-type	0.85	0.91	0.86	
	Médiane	-0.50	-0.60	-0.60	
	Q1-Q3	[-1.65;-0.30]	[-2.00;-0.30]	[-2.00;-0.30]	

CRITERE D'EVALUATION SECONDAIRE N°4

La vitesse de cicatrisation épithéliale complète correspond à la taille initiale de l'ulcère cornéen divisée par la durée de cicatrisation épithéliale complète.

				CROSS-LINKING	PLACEBO	Total	
				N=9	N=12	N=21	p-value
VITESSE DE CICATRISATION	DE	EPITHELIALE COMPLETE	(mm/jour)				
			N	8	12	20	0.5194
			Min-Max	[0.07;0.67]	[0.06;0.80]	[0.06;0.80]	
			Moyenne	0.22	0.29	0.26	
			Ecart-type	0.19	0.22	0.21	
			Médiane	0.16	0.21	0.20	
			Q1-Q3	[0.11;0.24]	[0.13;0.45]	[0.11;0.33]	

BIBLIOGRAPHY:

1. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol*. 2012 May;96(5):614–8.
2. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ*. 2001;79(3):214–21.
3. Vision impairment and blindness [Internet]. World Health Organization. [cited 2018 Nov 27]. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blindness-and-visual-impairment>
4. Austin A, Lietman T, Rose-Nussbaumer J. Update on the Management of Infectious Keratitis. *Ophthalmology*. 2017 Nov;124(11):1678–89.
5. Bourcier T, Thomas F, Borderie V, Chaumeil C, Laroche L. Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. *Br J Ophthalmol*. 2003 Jul;87(7):834–8.
6. Green M, Apel A, Stapleton F. Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea*. 2008 Jan;27(1):22–7.
7. Dart JK, Stapleton F, Minassian D. Contact lenses and other risk factors in microbial keratitis. *Lancet Lond Engl*. 1991 Sep 14;338(8768):650–3.
8. Bourcier T, Sauer A. Kératites infectieuses. In: *Urgences en ophtalmologie*. Elsevier Masson; 2018. p. 327–33.
9. Yildiz EH, Abdalla YF, Elsahn AF, Rapuano CJ, Hammersmith KM, Laibson PR, et al. Update on fungal keratitis from 1999 to 2008. *Cornea*. 2010 Dec;29(12):1406–11.
10. Bourcier T, Sauer A, Dory A, Denis J, Sabou M. Fungal keratitis. *J Fr Ophtalmol*. 2017 Nov;40(9):e307–13.
11. Gaujoux T, Borsali E, Goldschmidt P, Chaumeil C, Baudouin C, Nordmann JP, et al. Fungal keratitis in France. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 2011 Mar;89(2):e215-216.

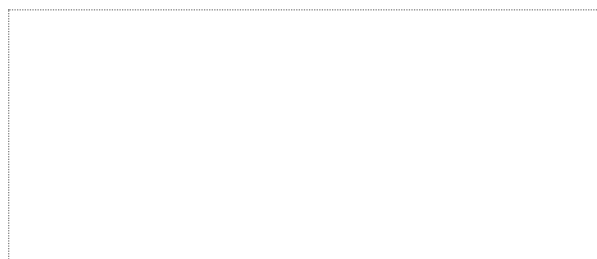
12. Ong HS, Fung SSM, Macleod D, Dart JKG, Tuft SJ, Burton MJ. Altered Patterns of Fungal Keratitis at a London Ophthalmic Referral Hospital: An Eight-Year Retrospective Observational Study. *Am J Ophthalmol*. 2016 Aug;168:227–36.
13. Knauf HP, Silvany R, Southern PM, Risser RC, Wilson SE. Susceptibility of corneal and conjunctival pathogens to ciprofloxacin. *Cornea*. 1996 Jan;15(1):66–71.
14. Garg P, Sharma S, Rao GN. Ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas* keratitis. *Ophthalmology*. 1999 Jul;106(7):1319–23.
15. Goldstein MH, Kowalski RP, Gordon YJ. Emerging fluoroquinolone resistance in bacterial keratitis: a 5-year review. *Ophthalmology*. 1999 Jul;106(7):1313–8.
16. Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol*. 2006 Aug;17(4):356–60.
17. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003 May;135(5):620–7.
18. Tsugita A, Okada Y, Uehara K. Photosensitized inactivation of ribonucleic acids in the presence of riboflavin. *Biochim Biophys Acta*. 1965 Jun 8;103(2):360–3.
19. Goodrich RP. The use of riboflavin for the inactivation of pathogens in blood products. *Vox Sang*. 2000;78 Suppl 2:211–5.
20. AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, Taylor H, Whitley P, Li J, et al. Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction. *Transfusion (Paris)*. 2005 Aug;45(8):1335–41.
21. Kumar V, Lockerbie O, Keil SD, Ruane PH, Platz MS, Martin CB, et al. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. *Photochem Photobiol*. 2004 Aug;80:15–21.
22. Martins SAR, Combs JC, Noguera G, Camacho W, Wittmann P, Walther 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*. 2008 Aug;49(8):3402–8.

23. Sauer A, Letscher-Bru V, Speeg-Schatz C, Touboul D, Colin J, Candolfi E, et al. In vitro efficacy of antifungal treatment using riboflavin/UV-A (365 nm) combination and amphotericin B. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Aug;51(8):3950–3.
24. Schrier A, Greebel G, Attia H, Trokel S, Smith EF. In vitro antimicrobial efficacy of riboflavin and ultraviolet light on *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Refract Surg Thorofare NJ* 1995. 2009 Sep;25(9):S799-802.
25. Iseli HP, Thiel MA, Hafezi F, Kampmeier J, Seiler T. Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea*. 2008 Jun;27(5):590–4.
26. Makdoui K, Mortensen J, Crafoord S. Infectious keratitis treated with corneal crosslinking. *Cornea*. 2010 Dec;29(12):1353–8.
27. Panda A, Krishna SN, Kumar S. Photo-activated riboflavin therapy of refractory corneal ulcers. *Cornea*. 2012 Oct;31(10):1210–3.
28. Yeh DL, Stinnett SS, Afshari NA. Analysis of bacterial cultures in infectious keratitis, 1997 to 2004. *Am J Ophthalmol*. 2006 Dec;142(6):1066–8.
29. Kheirkhah A, Syed ZA, Satitpitakul V, Goyal S, Müller R, Tu EY, et al. Sensitivity and Specificity of Laser-scanning In Vivo Confocal Microscopy for Filamentous Fungal Keratitis: Role of Observer Experience. *Am J Ophthalmol*. 2017 Apr 23;
30. Chidambaram JD, Prajna NV, Larke N, Macleod D, Srikanthi P, Lanjewar S, et al. In vivo confocal microscopy appearance of *Fusarium* and *Aspergillus* species in fungal keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2017 Jan 2;bjophthalmol-2016-309656.
31. Avunduk AM, Beuerman RW, Varnell ED, Kaufman HE. Confocal microscopy of *Aspergillus fumigatus* keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2003 Apr;87(4):409–10.
32. Vaddavalli PK, Garg P, Sharma S, Sangwan VS, Rao GN, Thomas R. Role of confocal microscopy in the diagnosis of fungal and *acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology*. 2011 Jan;118(1):29–35.

33. Soliman W, Fathalla AM, El-Sebaity DM, Al-Hussaini AK. Spectral domain anterior segment optical coherence tomography in microbial keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 2013 Feb;251(2):549–53.
34. Vital MC, Belloso M, Prager TC, Lanier JD. Classifying the severity of corneal ulcers by using the ‘1, 2, 3’ rule. *Cornea*. 2007 Jan;26(1):16–20.
35. Gelender H, Rettich C. Gentamicin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* corneal ulcers. *Cornea*. 1984;3(1):21–6.
36. Said DG, Elalfy MS, Gatzoufas Z, El-Zakzouk ES, Hassan MA, Saif MY, et al. Collagen cross-linking with photoactivated riboflavin (PACK-CXL) for the treatment of advanced infectious keratitis with corneal melting. *Ophthalmology*. 2014 Jul;121(7):1377–82.
37. Vajpayee RB, Shafi SN, Maharana PK, Sharma N, Jhanji V. Evaluation of corneal collagen cross-linking as an additional therapy in mycotic keratitis. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2015 Mar;43(2):103–7.
38. Kasetsuwan N, Reinprayoon U, Satitpitakul V. Photoactivated Chromophore for Moderate to Severe Infectious Keratitis as an Adjunct Therapy: A Randomized Controlled Trial. *Am J Ophthalmol*. 2016 May;165:94–9.
39. Bamdad S, Malekhosseini H, Khosravi A. Ultraviolet A/riboflavin collagen cross-linking for treatment of moderate bacterial corneal ulcers. *Cornea*. 2015 Apr;34(4):402–6.
40. Richoz O, Kling S, Hoogewoud F, Hammer A, Tabibian D, Francois P, et al. Antibacterial efficacy of accelerated photoactivated chromophore for keratitis-corneal collagen cross-linking (PACK-CXL). *J Refract Surg Thorofare NJ 1995*. 2014 Dec;30(12):850–4.
41. Tabibian D, Richoz O, Riat A, Schrenzel J, Hafezi F. Accelerated photoactivated chromophore for keratitis-corneal collagen cross-linking as a first-line and sole treatment in early fungal keratitis. *J Refract Surg Thorofare NJ 1995*. 2014 Dec;30(12):855–7.
42. Knyazer B, Krakauer Y, Baumfeld Y, Lifshitz T, Kling S, Hafezi F. Accelerated Corneal Cross-Linking With Photoactivated Chromophore for Moderate Therapy-Resistant Infectious Keratitis. *Cornea*. 2018 Apr;37(4):528–31.

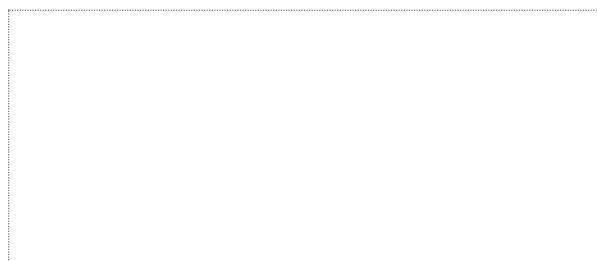
43. Konstantopoulos A, Kuo J, Anderson D, Hossain P. Assessment of the use of anterior segment optical coherence tomography in microbial keratitis. *Am J Ophthalmol*. 2008 Oct;146(4):534–42.
44. Abbouda A, Estrada AV, Rodriguez AE, Alió JL. Anterior segment optical coherence tomography in evaluation of severe fungal keratitis infections treated by corneal crosslinking. *Eur J Ophthalmol*. 2014 Jan 22;24(3):320–4.
45. Konstantopoulos A, Yadegarfar G, Fievez M, Anderson DF, Hossain P. In vivo quantification of bacterial keratitis with optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Feb 25;52(2):1093–7.
46. Thomas PA, Kaliamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Mar 1;19(3):210–20.
47. Thomas PA. Fungal infections of the cornea. *Eye Lond Engl*. 2003 Nov;17(8):852–62.
48. Dahlgren MA, Lingappan A, Wilhelmus KR. The clinical diagnosis of microbial keratitis. *Am J Ophthalmol*. 2007 Jun;143(6):940–4.
49. Dalmon C, Porco TC, Lietman TM, Prajna NV, Prajna L, Das MR, et al. The Clinical Differentiation of Bacterial and Fungal Keratitis: A Photographic Survey. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Apr;53(4):1787–91.

Vu, le Président du Jury,



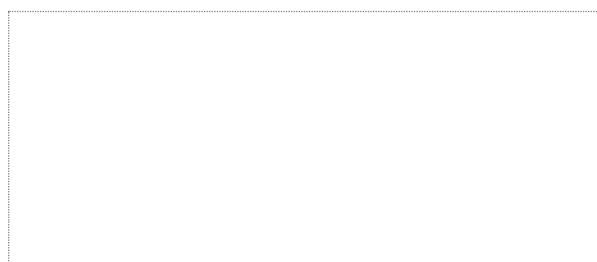
Professeur Michel WEBER

Vu, le Directeur de Thèse,



Docteur Isabelle ORIGNAC

Vu, le Doyen de la Faculté,



Professeur Pascale JOLLIET

NOM : COEURU

PRENOM : Dimitri

TITRE DE THESE : Evaluation du Cross-linking du collagène cornéen dans le traitement des kératites infectieuses : une étude prospective, randomisée de 21 patients.

Collagen cross-linking evaluation for treatment of infectious keratitis: a randomized, controlled trial with 21 patients.

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to evaluate the efficacy of Photoactivated Chromophore for infectious Keratitis Corneal cross-linking (PACK-CXL) with UV-A and riboflavin in severe infectious keratitis as an adjunction to standard antimicrobial treatment.

Methods: This was a prospective, randomised and controlled study. 21 patients hospitalised for infectious keratitis were recruited at the University Hospital of Nantes, France. Nine patients received PACK-CXL as adjunction of standard treatment and 12 enrolled in the control group received antimicrobial therapy alone. The primary outcome was the time to epithelial healing.

Results: The median [IQR] duration of corneal healing was 18.5 days [9.0-33.5] in the PACK-CXL group and 9.5 days [5.0-32.5] in the control group ($P = 0.62$). The ratios between the size of the final stromal scar and the size of the initial ulcer were 0.89 [0.70-1.0] in the PACK-CXL group, and 1.14 [0.80-1.14] in the control group ($P = 0.11$). The ratios between the minimal pachymetry in the infected area and pachymetry in the healthy area were 0.05 [0.02-0.10] and 0.06 [-0.19 to 1.13] in the PACK-CXL group and the control group respectively ($P = 0.68$). The best corrected visual acuity and the speed of corneal healing were comparable between both groups (respectively $P = 0.84$ and $P = 0.52$).

Conclusions: In our study, PACK-CXL as additional treatment for infectious keratitis, performed at the initial stage of the infection, did not improve the duration of healing or clinical evolution compared with standard treatment alone.

Key words: corneal cross-linking, microbial keratitis, PACK-CXL, riboflavin.

NOM : COEURU

PRENOM : Dimitri

TITRE DE THESE : Evaluation du Cross-linking du collagène cornéen dans le traitement des kératites infectieuses : une étude prospective, randomisée de 21 patients.

Collagen cross-linking evaluation for treatment of infectious keratitis: a randomized, controlled trial with 21 patients.

RÉSUMÉ

Objectif : Le but de cette étude était d'évaluer l'efficacité du cross-linking du collagène cornéen dans les kératites infectieuses (PACK-CXL) utilisant l'UV-A et la riboflavine en complément du traitement antimicrobien standard.

Méthodes : Il s'agissait d'une étude prospective, randomisée et contrôlée. 21 patients hospitalisés pour une kératite infectieuse ont été recrutés au Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes, France. 9 patients ont été inclus dans le groupe PACK-CXL, bénéficiant du cross-linking en complément du traitement antimicrobien standard, et 12 ont été inclus dans le groupe témoin et ont reçu un traitement antimicrobien seul. Le critère de jugement principal était la durée de cicatrisation épithéliale.

Résultats : La durée de cicatrisation épithéliale médiane [IQR] était de 18,5 jours [9,0 à 33,5] dans le groupe PACK-CXL et de 9,5 jours [5,0 à 32,5] dans le groupe témoin ($p = 0,62$). Les rapports entre la taille de la cicatrice stromale finale et la taille de l'ulcère initial étaient de 0,89 [0,70-1,0] dans le groupe PACK-CXL et de 1,14 [0,80-1,14] dans le groupe témoin ($p = 0,11$). Les rapports entre la pachymétrie minimale dans la zone infectée et la pachymétrie dans la zone saine étaient respectivement de 0,05 [0,02-0,10] et 0,06 [-0,19 à 1,13] dans le groupe PACK-CXL et dans le groupe témoin ($p = 0,68$). La meilleure acuité visuelle corrigée et la vitesse de cicatrisation cornéenne étaient comparables entre les deux groupes (respectivement $p = 0,84$ et $p = 0,52$).

Conclusion : Dans notre étude, le PACK-CXL en tant que traitement adjuvant en cas de kératite infectieuse, réalisé au stade précoce de l'infection, n'a pas amélioré la durée de cicatrisation épithéliale ou l'évolution clinique par rapport au traitement standard seul.

Mots clés: cross-linking cornéen, kératite infectieuse, PACK-CXL, riboflavine.