



HAL
open science

Contribution à l'amélioration de la conservation cornéenne en bioréacteur

Anne-Sophie Gauthier

► **To cite this version:**

Anne-Sophie Gauthier. Contribution à l'amélioration de la conservation cornéenne en bioréacteur. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCE011 . tel-03224330

HAL Id: tel-03224330

<https://theses.hal.science/tel-03224330>

Submitted on 11 May 2021

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

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

Ecole doctorale Environnements-Santé et Carnot Pasteur
Université de Bourgogne Franche-Comté
Année Universitaire 2017-2018

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ Bourgogne Franche-Comté
Discipline : Médecine, biophysique et imagerie médicale

**Contribution à l'amélioration de la conservation
cornéenne en bioréacteur**

Présentée et soutenue publiquement par

Madame Anne-Sophie Gauthier

A Besançon, le 28 septembre 2018

Directeur de thèse : Pr Delbosc Bernard

Co-directeur : Pr Gilles THURET

Président du jury : Pr Delbosc Bernard

Membres du Jury

Pr Bernard DELBOSC	(Université de Bourgogne Franche-Comté)	Directeur de thèse
Pr Gilles THURET	(Université Jean Monnet Saint-Étienne)	Co-directeur
Pr Philippe GAIN	(Université Jean Monnet Saint-Étienne)	Invité
Pr Karine ANGIOI	(Université de Lorraine Nancy)	Rapporteur
Pr Tristan BOURCIER	(Université de Strasbourg)	Rapporteur

Président du jury : Pr Delbosc Bernard

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse ; ces opinions doivent être considérées comme propres à leur auteur.

« La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance »

Claude Bernard (1813 – 1878)

Remerciements

Une thèse est l'aboutissement de trois années de collaboration, d'échange, d'ouverture au monde de la recherche. Ces trois années passées entre Besançon et Saint-Etienne m'ont permis de poursuivre les travaux qui avaient initiés lors de mon master 2 et de contribuer à la poursuite de cet ambitieux projet Bioréacteur débuté en 2010. À ce titre, je souhaite remercier en quelques lignes les différentes personnes qui ont participé à l'aboutissement de ce travail de thèse.

A Monsieur le Pr. Bernard Delbosc, directeur de ce projet. Vous m'avez accueillie dans votre service durant toute ma formation, j'ai eu la chance de profiter de votre encadrement pédagogique, de vos qualités chirurgicales, de vos nombreux avis médicaux pour les cas difficiles voire désespérés et surtout j'ai découvert le goût de la recherche. Je vous remercie de votre soutien renouvelé chaque jour pour l'avancée de mes projets universitaires.

A Messieurs les Pr Philippe Gain et Pr Gilles Thuret, duo complémentaires de chirurgiens-chercheurs ou chirurgiens-trouveurs, votre énergie, votre sens de la perfection et votre motivation sont contagieuses. Je tiens à vous remercier chaleureusement pour la confiance et le soutien que vous m'avez offert durant mes années d'études et pour celle que vous m'accordez pour le futur.

A Madame le Pr Karine Angioi et Monsieur le Pr Tristan Bourcier, mes deux rapporteurs pour leur temps ô combien précieux qu'ils m'offrent afin de relire et corriger ce manuscrit, mais aussi pour venir m'écouter le jour de ma soutenance de thèse.

A Monsieur Thibaud Garcin, interne au CHU de Saint-Etienne inscrit en seconde année de thèse de science. Thibaud, sans toi aucune manip ni aucun comptage cellulaire n'auraient été possibles. Tu as été déterminant dans l'avancée et le soutien de ce projet qui est également ton projet. Tu as une belle année de recherche devant toi et bien d'autres encore.

Merci à toute l'équipe du laboratoire BIIGC passée et présente pour leur bonne humeur, leur conseil et leur aide indispensable au bon déroulement de mes travaux.

Merci à toute l'équipe médicale du CHU de Besançon qui m'a permis d'aménager mon emploi du temps pour réaliser ce travail de recherche. Merci à mes collègues chefs de cliniques et internes pour leur soutien (particulièrement ces derniers mois), leur permanente bonne humeur et leur humour au quotidien.

Un grand merci à mes parents et à ma sœur Aline qui nous a offert un merveilleux petit Achille pour compléter la famille. Vous croyez en moi et me soutenez depuis tellement d'années. Vous m'avez donné le goût du travail, de la réussite, de l'indépendance. Je suis extrêmement fière de pouvoir vous montrer l'aboutissement de ces années de travail et de sacrifices. Sans vous, je n'en serais pas là. MERCI !

À mes grands-parents et mon oncle, merci de votre soutien sans faille.

À mes amis : Anne, Antoine, Alix-Anne, Sayana, Caro, Elise, votre amitié est précieuse.

A Nicolas, tu es mon meilleur ami depuis 10 ans et j'ai failli ne pas m'apercevoir que tu étais bien plus que cela...Tu partages désormais ma vie et nous profitons chaque jour du bonheur d'être ensemble. Pleins de magnifiques projets nous attendent et j'ai hâte de les découvrir avec toi...

Un grand merci également à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à ces travaux et que j'aurais oublié de citer.

A mon grand-père...

Table des matières

AVANT-PROPOS	11
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	16
Chapitre I : Tissu cornéen	17
1. Généralité	17
2. Histologie	19
a) L'épithélium cornéen	19
b) Le stroma cornéen	20
c) La membrane de Descemet	21
d) L'endothélium cornéen	22
Chapitre II : Conservation des greffons cornéens: état de l'art et optimisations	25
1. Historique	25
2. Techniques chirurgicales et indication des greffes de cornée (chapitre d'ouvrage, bulletin de la société française d'ophtalmologie : Innovation et greffes de cornées)	26
3. Prélèvements de cornées (136)	34
a) Aspects réglementaires et sélection des donneurs	34
b) Contrôles de sécurités microbiologiques	37
c) Technique de prélèvement	38
d) Transport des prélèvements	40
e) Conservation des greffons cornéens : Techniques actuelles de conservation	41
f) Modifications cornéennes post-mortem et induites par la conservation	48
g) Contrôle de qualité	52
4. Les chiffres clés de la conservation des greffons cornéens :	57
Chapitre III : Développement et validation d'un nouveau système de conservation : le bioréacteur cornéen	60
1. Objectifs du bioréacteur cornéen	61
2. Première version du Bioréacteur : Preuve de concept	63
3. Evolutions et optimisation des prototypes	66
4. Dernier prototype : bioréacteur version 12 PEEK (BR V12 PEEK) (Master 2, Garcin T)	69
5. Méthodes de contrôle qualité développées autour du BR (Mémoire de master 2 Garcin T)	72
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	73

PARTIE EXPERIMENTALE	91
Publication 1: (chapitre d'ouvrage, bulletin de la société française d'ophtalmologie) eye banking : hier, aujourd'hui, demain	93
Publication 2: (Published in european journal of ophthalmology) Corneal transplantation trends in France from 2004 to 2015: A 12-year review	104
Publication 3: (published in british journal of ophtalmology) Very early endothelial cell loss after penetrating keratoplasty with organ-cultured cornea	111
Publication 4: (soumis) Innovative corneal bioreactor for long-term eye banking	118
CONCLUSION GENERALE	159
Publications et communications scientifiques	161
Curriculum vitae	169

Principales abréviations

BR = Bioréacteur cornéen, dispositif destiné à la conservation et la caractérisation des greffons cornéens.

BSS = Balanced Salt Solution, solution saline de pH physiologique servant au rinçage des tissus et cellules.

CE(s) = Cellule(s) endothéliale(s), cellule non régénérative située sur la face interne de la cornée et permettant le maintien de la transparence cornéenne.

DMEK = Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty, technique de greffe cornéenne lamellaire postérieure manuelle.

DSAEK = Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty, technique de greffe cornéenne lamellaire postérieure avec découpe automatisée

DCE = Densité Cellulaire Endothéliale, densité de cellules de l'endothélium cornéen, généralement exprimée en cellules/mm².

HEC = Coloration Hoescht – Ethidium – Calcéine, coloration cellulaire permettant une estimation de la densité cellulaire viable d'un endothélium cornéen.

LASIK = LAsEr in SItu Keratomileusis, chirurgie réfractive cornéenne consistant à remodeler la forme de la cornée à l'aide d'un laser excimer afin d'améliorer la vision.

OCT = Optical Coherent Tomography, technique d'imagerie basée sur le principe d'interférométrie pouvant réaliser une image en coupe de tissus transparents, sans contact.

PIO = pression intra-oculaire

AVANT-PROPOS

La cornée est le premier et plus puissant dioptré oculaire, elle permet, avec le cristallin, l'obtention d'une image ponctuelle rétinienne. Elle est composée de trois principales structures : l'épithélium (en contact avec l'extérieur), le stroma (fibres de collagène composant 90% de l'épaisseur de la cornée) et l'endothélium (monocouche de cellules hexagonales régulant l'hydratation de la cornée) (1). Elle est le principal dioptré oculaire, dont les deux propriétés essentielles sont la sphéricité et la transparence.

En cas de perte totale de transparence cornéenne, il existe une baisse d'acuité visuelle importante et le seul traitement envisageable est alors la greffe de cornée ou kératoplastie. Avec près de 200 000 personnes opérées chaque année dans le monde, la greffe de cornée (kératoplastie transfixiante, lamellaire antérieure et postérieure) est la greffe la plus fréquemment pratiquée au monde (2). Néanmoins, la pénurie de donneurs reste immense puisque les besoins mondiaux sont 70 fois plus importants (3).

En effet, il existe actuellement peu d'alternatives thérapeutiques à la greffe de cornées issues de donneurs pour traiter les affections cornéennes responsables d'un handicap visuel. Les xéno greffes présentent un grand risque de rejet et rencontrent des obstacles éthiques et sécuritaires importants ; les cornées artificielles sont en échec depuis 40 ans et celles qui existent, malgré tout actuellement, ne concernent que quelques milliers de cas désespérés dans le monde ; les cornées entières bio-ingéniérées en laboratoire sont encore du domaine de la recherche (4-7). Toutes les techniques de greffes actuelles sont donc totalement dépendantes des prélèvements effectués sur donneurs décédés puis conservés (Mémoire de master 2 Garcin T).

Tout processus susceptible d'augmenter le nombre et la qualité des greffes disponibles mérite donc d'être exploré.

Durant les 70 années qui ont suivi la première kératoplastie réalisée au début du 20^{ème} siècle, la cornée prélevée était immédiatement greffée dans les heures suivant la mort du donneur. Avec ces greffes dites fraîches, le délai très court entre la mort et la transplantation permettait de préserver la viabilité du tissu cornéen et surtout de son endothélium, une couche monocellulaire située à l'intérieur de la cornée, dépourvue de capacité de prolifération et nécessaire au maintien de la transparence cornéenne par effet de barrière et de pompage de l'eau du stroma cornéen. La greffe fraîche, en revanche, ne permettait aucune flexibilité organisationnelle, restait limitée à l'échelle d'un service hospitalier et surtout n'assurait pas de sécurité microbiologique satisfaisante.

Pour surmonter ces inconvénients majeurs bloquant la propagation de la transplantation, les banques de cornées ont été développées dans les années 1970, d'abord aux États-Unis.

Dès lors, La conservation des greffons cornéens s'effectue selon 2 techniques dans le monde : hypothermie (HT) à court terme à 4°C (5-10 jours), aux USA principalement, et organoculture (OC) à +31°C (jusqu'à 35 jours) en Europe (8, 9). Ces 2 techniques que tout ou presque oppose, donnent des résultats cliniques équivalents (10, 11).

Ces deux techniques de conservation, développées dans les années 70 et n'ayant fait l'objet d'aucune amélioration significative depuis sont des techniques de conservations dites passives. Elles consistent simplement à immerger la cornée, isolée du reste du globe oculaire, dans un liquide de conservation dérivé de la biologie cellulaire. Le milieu d'organoculture contient du sérum de veau fœtal pour assurer la survie des cellules au fil du temps, mais le milieu de conservation hypothermique ne le fait pas en raison des activités métaboliques réduites dues au froid. Aucune de ces deux techniques ne tient compte de la physiologie cornéenne et en particulier du rôle critique de la pression intra-oculaire qui permet le maintien du stroma cornéen dans un état de déturgescence. Ainsi, l'un des inconvénients majeurs de la conservation en organoculture est donc l'apparition d'un important œdème de cornée (12-15) qui nécessite de réaliser avant la greffe une phase de déturgescence pourvoyeuse d'une mortalité cellulaire endothéliale importante (16-18).

Malgré l'immense service rendu depuis des années et encore aujourd'hui par ces deux techniques de conservation, il existe une altération irréversible de l'endothélium cornéen pendant la période de conservation, avec en particulier une perte de cellules endothéliales accrue, cent fois plus rapide que *in vivo*.

Cette perte cellulaire endothéliale accélérée pendant la conservation a plusieurs conséquences:

- Elle réduit pour le receveur le capital cellulaire disponible, alors qu'il s'agit d'un des facteurs déterminant la survie du greffon.
- Pour les banques de cornées, cela implique l'existence d'une limite de durée de conservation : au-delà, le risque est trop élevé d'avoir une greffe de mauvaise qualité entraînant une survie anormalement courte chez le receveur ou, dans les cas les plus extrêmes, un échec primaire de greffe défaillance primaire.
- L'œdème induit lors de la conservation trouble et plisse la cornée et les banques de cornées ne sont en mesure ni de réaliser le comptage des cellules endothéliales en

microscopie spéculaire non invasive ni de caractériser les qualités optiques du tissu cornéen de façon pertinente, données pourtant primordiales pour le résultat visuel. Ce contrôle tissulaire est devenu indispensable et devrait porter sur trois points essentiels : la transparence afin de détecter un défaut localisé ou global, l'épaisseur centrale de la cornée (importante en vue de découpe des greffons endothéliaux directement par les banques de cornées.) et enfin, la détection d'une interface séquellaire de chirurgie réfractive (découpe laser femto seconde intra-cornéenne correctrice des défauts réfractifs).

- Enfin, il est également responsable d'une partie de la destruction des greffes par les banques de cornées lorsque leur qualité devient insuffisante. Ainsi, 34% des 40894 cornées conservées en organoculture en Europe en 2016 (EEBA, 2018) et 39% des 136318 cornées conservées en hypothermie aux États-Unis en 2016 (EBAA, 2017) n'ont pas été utilisées pour la kératoplastie. La dégradation de la qualité cellulaire représente une cause fréquente de non-conformité des greffons cornéens, mais les données des deux registres cités ne nous permettent pas de la quantifier avec précision. Par expérience, on l'estime entre 10 et 20%.

C'est dans ce contexte que dès 2010, le laboratoire BiiGC, Biologie, ingénierie et imagerie de la Greffe de Cornée (BiiGC, EA 2521), en collaboration avec l'Etablissement Français du Sang de St-Etienne, a conçu un bioréacteur (BR) cornéen totalement novateur, destiné à améliorer la conservation des greffons cornéens, diminuer le taux de non-conformité cellulaires en rétablissant, dès le prélèvement, des conditions physiologiques de « PIO » et de circulation de liquide au même rythme que l'humeur aqueuse baignant naturellement l'endothélium.

En reconstituant un environnement cornéen plus physiologique, le BR rompt le cercle vicieux hypotonie / œdème cornéen / lésions endothéliales et définit ainsi la notion de conservation active.

Ce BR comporte une partie stérilisable en « version laboratoire » ou jetable en « version industrielle future »- destinée à recevoir la cornée et une unité de contrôle réutilisable qui assure la régulation des 2 paramètres (PIO et débit). Parallèlement au développement d'un bioréacteur destiné à la conservation cornéenne humaine, un bioréacteur « recherche » a été développé dans le but d'obtenir une modélisation de la conservation cornéenne humaine et animale. Ce modèle de conservation permet d'obtenir des greffons de grandes qualités (19) cellulaires et le développement de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques.

J'ai rejoint l'équipe de recherche du laboratoire BiiGC lors de mon année recherche en 2012-2013 et nous avons pu montrer dans un premier temps qu'il était possible d'intégrer des instruments de contrôle de qualité cellulaire et tissulaire sur des cornées humaines conservées en BR.

L'objectif de ce travail de thèse était, dans un second temps, de quantifier la viabilité cellulaire endothéliale des cornées conservées en BR dès le prélèvement, avant l'apparition des plis endothéliaux les plus importants et des lésions cellulaires irréversibles et de comparer la conservation en BR à la conservation standard en organoculture.

La première partie de notre thèse constitue une synthèse bibliographique concernant : (1) l'anatomie, (2) la conservation et l'évaluation des greffons cornéens ; (3) le développement et la validation du bioréacteur cornéen.

La seconde partie de notre thèse présente quatre articles originaux rédigés à partir d'études cliniques et épidémiologiques réalisées en partenariat avec le CHU de Besançon et des résultats expérimentaux obtenus tout au long de ces trois années de doctorat. L'ensemble de ces articles a pour objectif de montrer l'évolution de la greffe de cornée en France et de ses moyens de conservation. Les limitations actuelles de la greffe de cornée en matière de perte cellulaire endothéliale post-opératoire et enfin les apports du BR.

Le premier article, intitulé « Eye banking : hier, aujourd'hui, demain » est un chapitre d'ouvrage et a été publié dans le bulletin de la société française d'ophtalmologie. Cet article met en avant l'évolution des méthodes de conservation des greffons cornéens.

Un second article, intitulé « Corneal transplantation trends in France from 2004 to 2015: A 12-year review » publié dans l'European journal of ophthalmology, présente l'évolution de la greffe de cornée en France et évalue 12 ans d'indications et de techniques chirurgicales.

Un troisième article, intitulé "Very early endothelial cell loss after penetrating keratoplasty with organ-cultured cornea" publié dans le british journal of ophthalmology évalue la perte cellulaire endothéliale ultra précoce des greffes transfixiantes issues de greffons conservés en organoculture et met en avant les limitations connues de cette technique de conservation actuellement référence en Europe.

Un quatrième article, intitulé « Innovative corneal bioreactor for long-term eye banking », en cours de publication est une étude pré-clinique soutenue par l'Agence de la Biomédecine. Cette étude a permis de comparer la conservation des cornées en bioréacteur versus en organoculture.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : TISSU CORNEEN

1. Généralité

La cornée, tissu avasculaire et transparent est la partie la plus antérieure de la paroi du globe oculaire, en contact direct avec le monde extérieur. Sa face antérieure est recouverte du film lacrymal et sa face postérieure baigne dans l'humeur aqueuse de la chambre antérieure de l'œil. Elle est en continuité avec la sclère, la zone de transition cornée-sclère constituant le limbe, structure richement vascularisée, source de cellules souches épithéliale.

La cornée est convexe et asphérique lui conférant un pouvoir réfractif correspondant aux deux tiers du pouvoir réfractif de l'œil. Ses propriétés optiques dépendent de son anatomie à savoir sa forme, sa courbure (puissance), son épaisseur (transparence), de la régularité de la surface oculaire, et de la composition de chaque couche. La lumière est transformée en énergie chimique et électrique au niveau de la rétine puis transmise au cerveau par l'intermédiaire du nerf optique avec analyse et interprétation de l'information dans le cortex visuel.

La cornée mesure en moyenne à l'âge adulte 11.5 mm de diamètre et possède une épaisseur centrale moyenne de $536 \mu\text{m} \pm 31 \mu\text{m}$ (intervalles de confiance à 95% : 474 à 596 μm) (20).

De forme prolate, son rayon de courbure (analysable en topographie cornéenne) est variable ; 7,8 mm horizontalement, 7,7 mm verticalement à la face antérieure de la cornée, alors qu'au niveau interne, elle est de 6,6 mm en vertical et de 6,2 en horizontal. La cornée est asymétriquement asphérique (*asphérotorique*), la portion nasale étant plus plate que la portion temporale.

Histologiquement, elle est composée de 5 couches (Figure 1) composées, de l'extérieur vers l'intérieur de l'œil de:

- l'épithélium (environ 50 μm d'épaisseur), comprenant 5 à 7 couches de cellules dans sa partie centrale. Il possède un rôle de barrière.
- la couche de Bowman, couche acellulaire de 8 à 14 μm d'épaisseur composée de fibres de collagènes non-organisées, réparties aléatoirement dans une matrice de substance fondamentale. Son rôle concerne l'échange de substances nutritionnelles, l'imperméabilité et la structure de soutien du tissu cornéen.

- le stroma (90% de l'épaisseur cornéenne), est principalement composé de lamelles de collagène très organisées spatialement. Les kératocytes responsables de la sécrétion de ce collagène, représentent 3 à 5% du volume stromal.
- la membrane de Descemet, membrane basale de l'endothélium cornéen, amorphe résistante et élastique mesurant de 8 à 12 μm d'épaisseur chez l'adulte.
- l'endothélium, couche la plus profonde de la cornée en contact avec l'humeur aqueuse. C'est une monocouche de cellules non-régénératives majoritairement hexagonales ayant pour rôle le contrôle et la régulation de l'hydratation de la cornée.

A l'état normal, la cornée est transparente grâce au parfait arrangement -unique dans le mode du vivant de ses fibres de collagènes. Elle le reste grâce à la fonction de « pompe endothéliale » qui lutte en permanence contre l'hydrophilie spontanée du stroma et permet le maintien de l'hydratation de la cornée à 78% d'eau par milligramme de tissu (21).: la cornée reste ainsi en état de perpétuelle déturgescence, garde une épaisseur constante et une organisation stable de son stroma. Le rôle de l'endothélium, qui ne représente que 2% de l'épaisseur d'une cornée adulte est donc tout à fait essentiel à la fonction visuelle. Ainsi, la perte des cellules endothéliales (CEs) entraîne la formation d'un œdème cornéen et la perte de la vision.

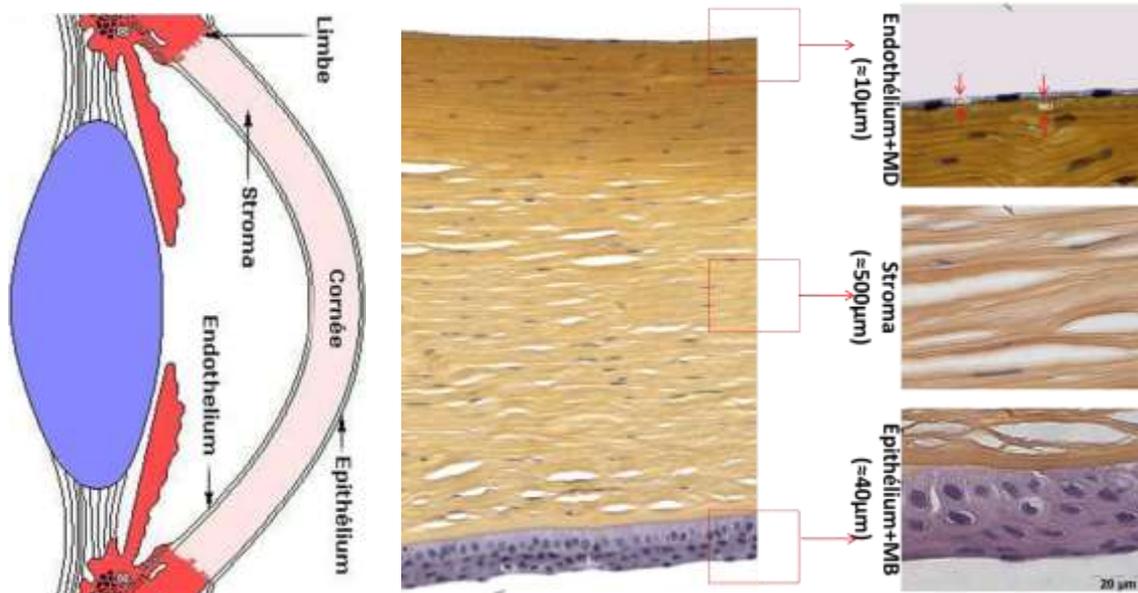


Figure 1. Histologie de la cornée humaine en coupe transversale en microscopie optique. (Images de BiiGC/He et Dumollard)

2. Histologie

a) L'Épithélium cornéen

L'épithélium cornéen (Figure 2 A-D) est malpighien pavimenteux stratifié non kératinisé, d'une épaisseur de 30 à 50 μm . Il est composé de trois types de cellules épithéliales (cellules superficielles, intermédiaires et basales) reposant sur la membrane basale (composée de la lamina lucida et de la lamina densa). Il a des capacités d'hyper ou d'hypoplasie pour compenser un creux ou un aplatissement de la courbure cornéenne.

Il repose sur la membrane de Bowman, structure acellulaire de 12 μm , correspondant à une condensation de fibres de collagènes et de protéoglycanes.

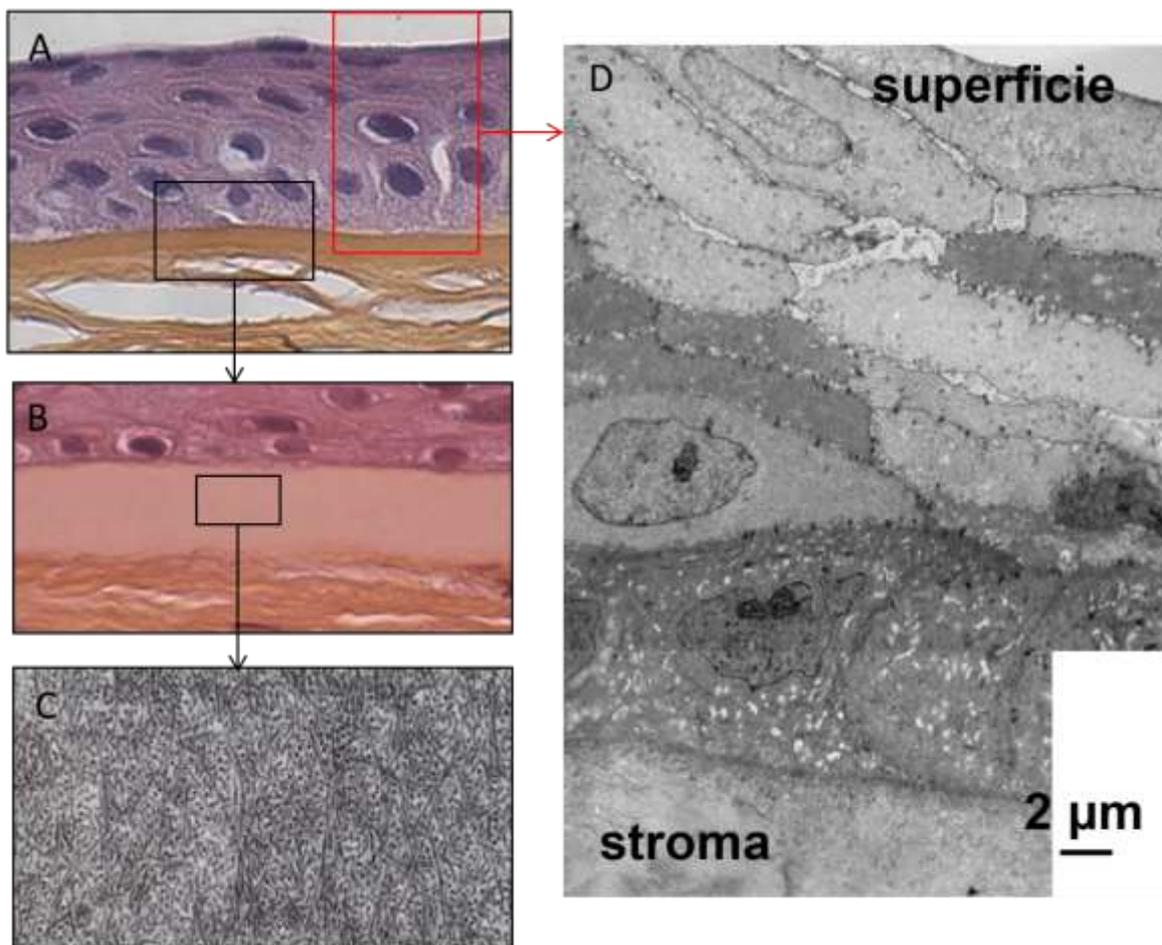


Figure 2 : Épithélium cornéen et membrane de Bowman (EA 2521 BiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne)

2A : Épithélium cornéen en microscopie optique coloration hématoxiline, éosine, safran

2B : Membrane de Bowman en microscopie optique coloration hématoxiline, éosine, safran

2C : Membrane de Bowman en microscopie électronique à balayage

2D : Épithélium cornéen et membrane de Bowman en microscopie électronique à balayage

b) Le stroma cornéen

Structure avasculaire représentant 90% de l'épaisseur cornéenne, il est composé d'une matrice extracellulaire, de fibrocytes ou kératocytes et de fibres nerveuses. Les cellules n'en constituent que 1 à 2%. Les molécules de collagène du stroma s'organisent en fibres disposées en 250 à 300 lamelles superposées. Les lamelles s'étendent sans interruption de limbe à limbe (22). Au centre de la cornée, environ 60% des fibres sont orientées orthogonalement et 40% obliquement (23-25). Ces directions orthogonales préférentielles sont encore plus prononcées à la périphérie cornéenne (24, 26-28) et varie également du stroma antérieur (lamelles très enlacées) au stroma postérieur (lamelle plus lâche) (28-30).

Au niveau microscopique (Figure 3), il existe une régularité du diamètre des fibres de collagène (de 22,5 à 35 nm) (31, 32) et de l'espacement des fibrilles de collagène entre elles (57 nm en centro-cornéen et en moyenne jusqu'à 67nm au niveau limbique) (33) permettant d'assurer la transparence cornéenne. L'organisation des fibres de collagène est maintenue par des protéoglycanes associés aux fibres de collagène (34).

Les kératocytes sont organisés en feuillets denses entre les lamelles de collagène (35). Ils sont à l'origine de la synthèse de protéines structurales et régulatrices.

Le stroma confère à la cornée la majorité de ses caractéristiques (solidité, stabilité de forme et transparence), attribuables à ses différentes propriétés anatomiques, biochimiques et biomécaniques.

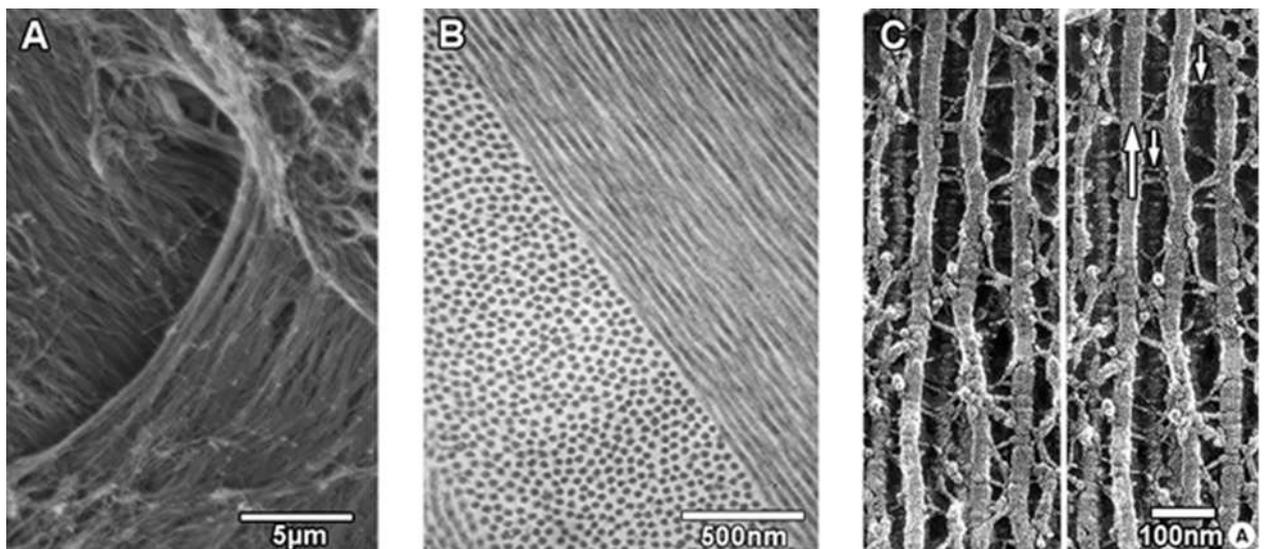


Figure 3 : (A) Image en microscopie électronique à balayage d'un entrelacement de lamelles de collagène du stroma moyen. (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne) ; (B) Image du stroma cornéen humain sain en microscopie électronique à transmission par coupe ultrafine (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne); (C) Structure en 3-D du collagène par la technique de congélation ultrarapide/gravure. Grande flèche : fibre de collagène, petite flèche : pont reliant deux fibres entre elles. (d'après Hirsch, Exp. Eye Res, 2000)

c) La membrane de Descemet

Elle correspond à la lame basale de l'endothélium. Elle est formée de deux feuillets

- Un feuillet antérieur d'origine embryonnaire situé au contact du stroma antérieur, appelé « partie striée » ou « partie embryonnaire ». Il se caractérise par une structure striée produit par les cellules endothéliales (CE) immatures avant la naissance
- Un feuillet postérieur, « partie non striée » ou « partie adulte » situé au contact de l'endothélium et produit par des CE matures. Il se forme après la naissance et n'a pas de structure striée.

Les feuillets antérieurs et postérieurs diffèrent dans leur composition et leurs structures. Ainsi, le feuillet antérieur comprend les chaînes alpha 1 et 2 de collagène IV ainsi que de la fibronectine et joue un rôle dans l'adhésion avec le stroma. Le feuillet postérieur contient les chaînes alpha 3 et 5 de collagène IV, de l'entactine/nidogène, de la laminine-A et du perlécane (36).

Son épaisseur augmente avec l'âge (de 3µm à la naissance à 6 à 8 µm à l'âge adulte) et est fine et lisse au centre de la cornée et plus épaisse et irrégulière en périphérie cornéenne avec l'existence de corpuscules de Hassal-Henlé à l'extrémité de la membrane de descemet (Figure 4). Elle est extrêmement solide mais incapable de régénération.

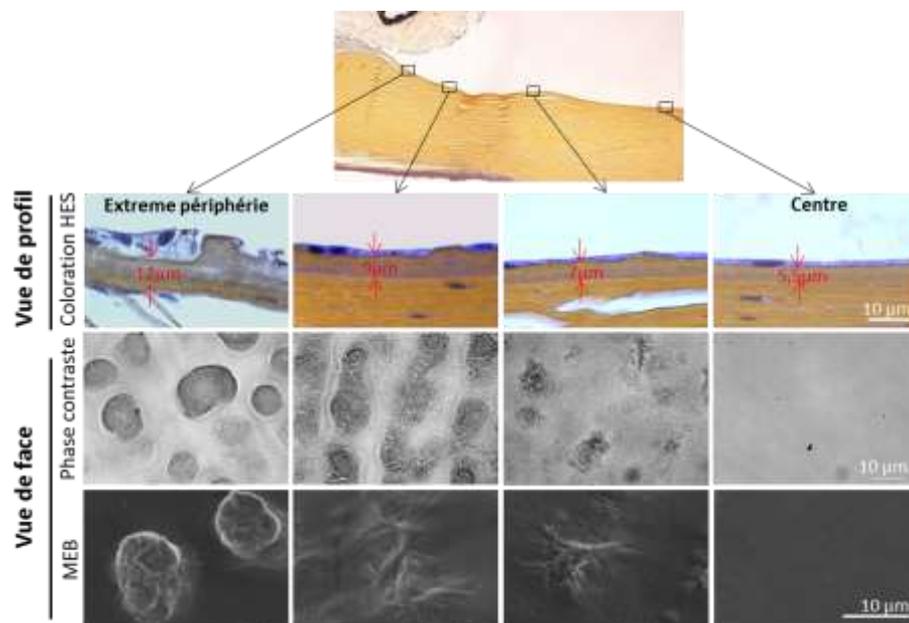


Figure 4 : Variations de l'épaisseur et de l'irrégularité de surface du centre à l'extrême périphérie de la MD. (Propre observation de BiiGC et de CMES/He, Dumollard et Thuret)

d) L'endothélium cornéen

Description

L'endothélium est une monocouche d'environ 300 à 500 000 cellules hexagonales non-régénératives (Figure 5). Le pôle apical des cellules baigne dans l'humeur aqueuse et les cellules sont agencées en nid d'abeille (37, 38). Le pôle basal adhère à la membrane de descemet et les cellules présentent de nombreuses extensions et interdigitations (39). Chez l'adulte, les CE ont un diamètre moyen de 20 à 25 μm (surface moyenne de 240 à 350 μm^2), une épaisseur de 3 à 5 μm (40).

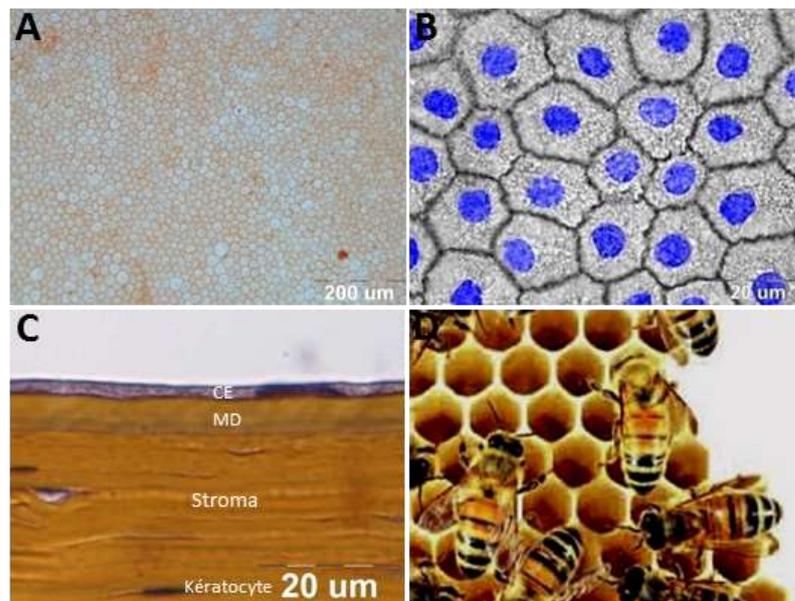


Figure 5 : Morphologie de l'endothélium cornéen humain. A) Contours cellulaires colorés par le rouge alizarine sur une cornée montée à plat; B) Contours cellulaires colorés par le rouge alizarine associés à un marquage des noyaux par Hoechst sur une cornée montée à plat; C) Histologie d'une cornée en coupe transversale utilisant la coloration HES D) Modèle « Nid d'abeille» de morphologie similaire aux CE cornéennes. (Images de BiiGC/He et Dumollard)

À la naissance la densité cellulaire endothéliale (DCE) est d'environ 6000 cellules/ mm². Il existe ensuite une décroissance cellulaire progressive avec l'âge à l'origine de polymégathisme (augmentation de la taille de ces cellules par un processus de migration élargissement) et de pléomorphisme (perte de la structure hexagonale) sans renouvellement directement observable par mitose. L'organisation anatomique des cellules endothéliales en périphérie de l'endothélium laisse supposer l'existence de niches périphérique à l'origine d'une lente migration cellulaire centripète, de la périphérie vers le centre de l'endothélium. Cette faible régénération des cellules endothéliales est cependant insuffisante pour compenser les pertes cellulaires (41). La DCE n'est pas uniforme, on peut observer une augmentation de la DCE de la périphérie de l'endothélium vers le centre (42). Le noyau des CEs est large et quasi rond au centre de la cornée, et plus oblongue à la périphérie (Figure 6). De nombreuses jonctions intercellulaires sont présentes. Les jonctions serrées sont organisées en réseaux fortement liés au cytosquelette des cellules (43, 44). La nutrition de l'endothélium est principalement assurée par l'humeur aqueuse, constamment renouvelée à un débit de 2,6 µL/min (45).

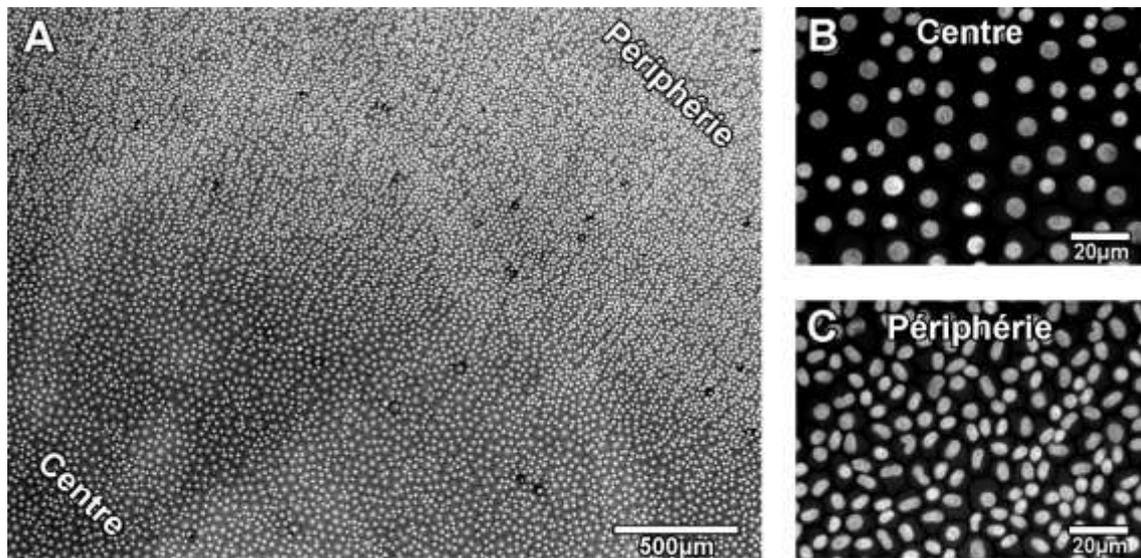


Figure 6 : Différentes DCE et morphologies nucléaires entre la périphérie et le centre de l'endothélium humain d'une cornée fraîche par coloration Hoechst. (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne, He Z.)

Fonction

L'endothélium cornéen sert de barrière partiellement étanche grâce à son réseau de jonctions serrées. Le flux d'humeur aqueuse de la chambre antérieure de l'œil vers le stroma est limité (43). Cette barrière restreint également de manière sélective la diffusion d'ions et le transport de macromolécules (46). L'intégrité de cette barrière dépend notamment de la présence de calcium (47) et du pH (tolérance de 6,8 à 8,2) (48).

La fonction essentielle de l'endothélium est de réguler l'hydratation cornéenne pour maintenir constant les 78% d'eau dans le stroma grâce aux pompes NaKATPase. Le fonctionnement de cette pompe endothéliale (Figure 7) nécessite la présence de glucose, d'oxygène et de certains ions comme le bicarbonate. Cette fonction ne peut être assurée que si le nombre de sites ATPase sodium-potassium de l'endothélium est suffisant.

La densité des sites de pompes endothéliales est de $2,1 \times 10^6$ sites par cellules chez l'homme (49) et reste constante au cours du vieillissement (49).

La fonction de pompe endothéliale génère un flux absolu d'eau du stroma vers la chambre antérieure de 5 à $7 \mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{h}$ (50, 51). Son composant actif principal est le transport d'ions bicarbonate (HCO_3^-) du stroma vers l'humeur aqueuse (52, 53).

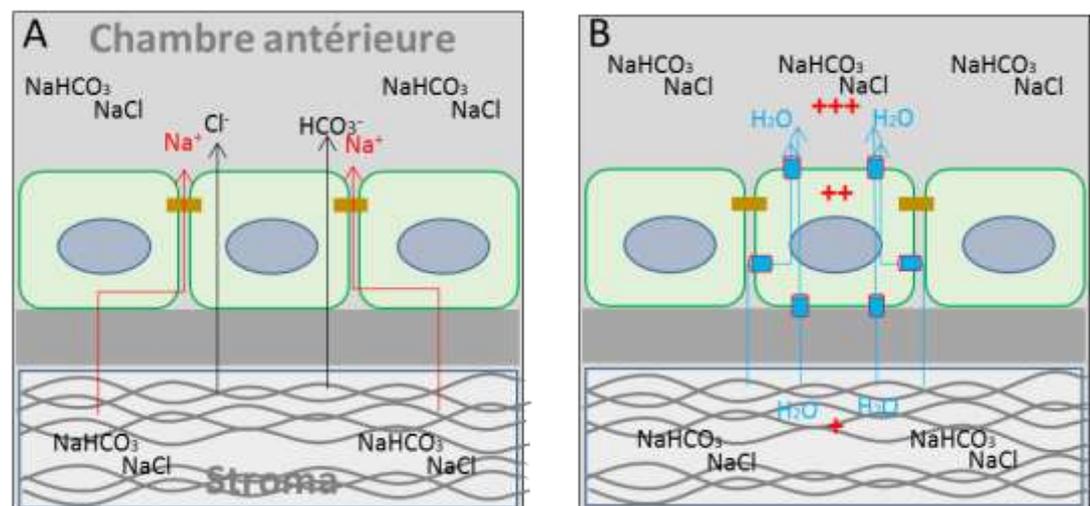


Figure 7 : Schéma de la pompe endothéliale régulant l'hydratation stromale ; A : un gradient de sel est produit par les différentes pompes ioniques, B l'eau est passivement transporté vers la chambre antérieure via le transport d'ions bicarbonates (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne).

CHAPITRE II : CONSERVATION DES GREFFONS CORNEENS: ETAT DE L'ART ET OPTIMISATIONS

1. Historique

En 1796, Erasmus Darwin est le premier à évoquer le concept de greffe de cornée dans un ouvrage intitulé *Zoonomia*. En 1824, Franz Reisinger crée le terme kératoplastie et, il est le premier à imaginer le remplacement chez l'homme de la cornée opaque par une cornée animale transparente. La première kératoplastie chez l'homme est réalisée en 1838 par Richard Kissam à partir d'une cornée porcine (54). Au cours du 19^{ me} siècle, des tentatives de xénogreffes sont répétées. Le premier succès de greffe lamellaire à partir d'une cornée humaine est rapport  en 1886 par Von Hippel (55). Mais c'est à l'ophtalmologiste allemand, Edouard Zirm que l'on doit la première greffe cornéenne de pleine épaisseur, réalisée en 1906 à partir de l'œil  nucl e d'un jeune garçon de 11 ans (56). La diffusion de la greffe de cornée à partir de cornées fraiches a été initialement difficile à développer du fait d'une pénurie de tissus prélevés, les dons étant issus essentiellement de donneurs vivants aveugles ou lors d'exécutions capitales. C'est en 1935 que Filatov introduit le concept de prélèvement sur donneurs décédés (57) et développe une chambre humide de conservation cornéenne permettant de préserver des globes oculaires  nucl es pendant 24 à 36 heures (58). Un des progrès majeur en matière de conservation cornéenne correspond à l'introduction aux Etats-Unis en 1974 du milieu de Mc Carey-Kaufman permettant de conserver des cornées de globes  nucl es jusqu'à 5 jours à +4 C (59, 60). Une augmentation de la durée de conservation a rapidement été nécessaire afin de faciliter la distribution et le contrôle des tissus. En 1976, Doughman développe à Minneapolis, Etats-Unis, une nouvelle méthode de conservation, en organoculture   +34 C permettant une conservation des cornées jusqu'à 30 jours (61). En 1979, Sperling au Danemark adapte l'organoculture en apportant des innovations, l'utilisation d'un système clos, le maintien des cornées   +31 C, l'optimisation du milieu de conservation avec l'introduction de Dextran afin de limiter l'œdème stromal induit et l'analyse des CEs (62). En 1983, Pels (Pays Bas) met en évidence que l'accumulation de Dextran dans les CEs est toxique et développe l'organoculture en 2 temps, la conservation sans Dextran jusqu'à 5 semaines suivies d'une phase de déturgescence en fin de conservation (48 à 72 heures) dans le Dextran (63). Cette technique de conservation en organoculture   +31 C a ensuite été rapportée et diffusée en France en 1985 par Delbosc (64).

Un autre tournant notable dans l'organisation de la greffe de cornée a été la mise en place des premières banques de cornées établies à New-York en 1944 (Townley Paton) et à Londres (Patrick Trevor Roper) dans les années 60 (65). C'est l'association américaine des banques de cornées (Eye Bank Association of America (EBAA)), créée en 1961, qui a défini les standards médicaux du prélèvement, de la conservation, de l'utilisation des greffons, de la formation et de la certification des techniciens ainsi que de l'accréditation des banques de cornées aux Etats-Unis et dans le monde (66).

La conservation des cornées a également bénéficié des progrès réalisés dans d'autres domaines de l'ophtalmologie avec la création de la lampe à fente par Allvar Gullstrand en 1911 (67) et du microscope spéculaire en 1968 par David Maurice (68), secondairement adapté à l'examen de l'endothélium cornéen par Ronald A Laing (69), William M Bourne et au Kaufman (70).

De nombreuses autres avancées dans le domaine de la sélection des patients, des stratégies de lutte anti microbienne, de contrôle endothéliaux, de techniques microchirurgicales et de surveillance postopératoire ont contribué à l'amélioration et au succès de la greffe de cornée, pour faire de cette intervention l'une des plus répandues du monde de la transplantation (71).

2. Techniques chirurgicales et indication des greffes de cornée (chapitre d'ouvrage, bulletin de la société française d'ophtalmologie : Innovation et greffes de cornées)

La greffe de cornée ou kératoplastie consiste à remplacer un disque central de la cornée pathologique par un disque de même diamètre découpé dans une cornée saine, transparente, prélevée sur un donneur décédé.

Plusieurs techniques existent selon que toute l'épaisseur cornéenne est remplacée (kératoplastie transfixiante) ou seulement une lamelle (kératoplastie lamellaire). En fonction de la couche tissulaire atteinte, une kératoplastie peut être lamellaire antérieure (pathologies du stroma à endothélium sain) ou postérieure (pathologies endothéliales à stroma sain). Les principales indications dans les pays à haut niveau de vie sont principalement le kératocône (déformation conique progressive de la cornée, souvent bilatérale), une dystrophie endothéliale primitive (dystrophie de Fuchs ou cornea guttata), les dystrophies endothéliales secondaires (post chirurgie de la cataracte des années 80, post traumatique, post chirurgie de myopie avec implant intra oculaire,...). Viennent ensuite de nombreuses autres indications : séquelles de

kératites infectieuses (dont herpétiques), autres dystrophies cornéennes stromales héréditaires, séquelles de traumatismes (plaies, brûlures chimiques) (72-74). Dans les pays à bas niveau de vie, les séquelles d'infection constituent la première indication de kératoplastie (75, 76).

Toutes indications confondues, dans plus de 2/3 des cas la greffe de cornée donne de bons résultats fonctionnels et anatomiques à long terme (greffon transparent et récupération d'une bonne acuité visuelle, stable dans le temps).

Les indications de greffe sont relativement constantes dans le temps et d'un pays à l'autre. Une récente revue de la littérature a analysé 141 publications issues de 37 pays et incluant 180 865 kératoplasties transfixiantes. La décompensation endothéliale secondaire représentait la principale indication de greffes transfixiantes aux USA (28% des indications), alors qu'elle représentait 20,6% des indications en Europe, 21,1% des indications en Australie. Le kératocône reste la principale indication de greffe transfixiante en Europe (24,2%), en Australie (33,2%) alors qu'elle ne représente que la troisième indication de greffe aux USA (14,2%). En Asie la principale indication de greffe est la kératite (32,3%) (77).

Depuis 10 ans, l'essor des techniques chirurgicales de greffes endothéliales a considérablement modifié le paysage de la greffe de cornée dans plusieurs pays. La démonstration de leurs avantages sur la greffe perforante (moindre fragilisation du globe, moindre dépendance à l'expérience chirurgicale, moindre immunogénicité) a largement contribué à leur diffusion auprès des chirurgiens. Elles augmentent par contre le besoin en greffon cornéen pour plusieurs raisons : extension des indications de greffe désormais proposée à des stades plus précoces de la dystrophie de Fuchs (71), perte accrue de greffons et durée de vie plus courte au moins pendant la courbe d'apprentissage (78).

La greffe endothéliale selon la technique de préparation du greffon est appelée Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK) ou Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK).

Concernant la DSAEK, la préparation du greffon endothélial a été initialement proposée par MA Terry aux USA en tant que kératoplastie lamellaire profonde (Deep lamellar endothelial keratoplasty ou DLEK) (79-81). De réalisation initialement difficile, elle a été reprise, modifiée par Gerrit Melles (82), adoptée et démocratisée par MO Price (83) puis automatisée par MS Gorovoy (Floride) qui a décrit l'automatisation de la découpe en utilisant un microkératome sur un greffon monté sur une chambre antérieure artificielle (84). L'utilisation du microkératome rend la technique reproductible et limite le risque de perforation et de gaspillage de greffon. Il

s'agit de la Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK), technique désormais la plus couramment utilisée (85). Le stroma antérieur est retiré et le greffon endothélial est simplement trépané au diamètre désiré. Son épaisseur est déterminée par la quantité de stroma antérieur retirée par le microkératome dont il est possible de choisir la tête de découpe en fonction de l'épaisseur cornéenne de départ. Bénéficiant de son expérience dans les microkératomes de chirurgie réfractive (LASIK), l'industriel français Moria a été déterminant dans le développement d'une instrumentation spécifique pour la découpe des greffons endothéliaux. D'autres l'ont ensuite suivi. L'utilisation du microkératome pour la découpe du greffon a l'avantage d'être reproductible après une courbe d'apprentissage acceptable. Récemment, la motorisation de l'avance du microkératome (jusqu'alors manuelle), et la régulation de la pression dans la chambre antérieure artificielle a encore permis de simplifier la procédure. Les résultats visuels rapportés depuis environ 10 ans pour les DSAEK montrent qu'un patient sur deux recouvre une acuité visuelle corrigée supérieure à 5/10^e à 2 mois et qu'à trois mois, tous les patients avec un potentiel normal d'acuité visuelle retrouvent une acuité visuelle de 5/10^e ; certains récupèrent même 10/10^e (86).

Dans le détail, la DSAEK commence par la préparation du greffon. Le greffon est placé sur une chambre antérieure artificielle re-stérilisable ou jetable (Figure 8A), et la découpe est réalisée à l'aide d'un microkératome rotatif ou linéaire (Figure 8B). L'utilisation de greffons déturgés améliorent la qualité de l'interface (87). Dans la DSAEK standard, l'objectif est de laisser une épaisseur résiduelle de stroma postérieur de 150 à 250 μm . Depuis 2013, il est possible de découper des greffons ultra fins (Ultra thin-DSAEK, UT-DSAEK) permettant une récupération visuelle plus rapide et meilleure, sans perte cellulaire endothéliale accrue et sans augmentations du risque de complications (88-92). Deux techniques sont utilisées : 1/ double découpe avec réalisation d'un premier passage du microkératome à une profondeur de 300 μm suivi d'un second passage adaptée à l'épaisseur résiduelle pour obtenir un greffon final de 100 μm ou moins (91) ; 2/ simple découpe grâce au développement plus récent de sabots de microkératome allant de 250 à 450 μ (92-95). Des sabots re-stérilisables ou jetables sont disponibles. Dans tous les cas, la lame vibrante est à usage unique mais peut servir dans certains cas pour découper les 2 cornées du même donneur. La découpe du greffon par laser femtoseconde de chirurgie réfractive a été évaluée à plusieurs reprises mais elle obtenait de moins bons résultats visuels (interface donneur receveur jugée moins bonne) et plus d'échecs chirurgicaux (défaut d'adhérence des greffons, irrégularité de l'interface, acuité visuelle post-opératoire moins bonne) (96-98). La découpe a été envisagée en aplanant le greffon par la face

épithéliale ou endothéliale (99). L'association d'une première découpe au laser femtoseconde suivie d'une découpe au microkératome améliorerait les résultats fonctionnels post-opératoires (100, 101) ainsi que l'utilisation combinée des laser femtoseconde et excimer (102) ou microkératome et excimer (103). Le coût d'utilisation du laser étant nettement supérieur, les découpes au microkératome restent largement majoritaires. Un marquage du greffon coté stromal par un F ou un S réalisé au violet de Cresyl peut servir de détrompeur pour assurer le déroulement dans le bon sens. Dans tous les cas, le greffon est enfin trépané à la dernière minute par le chirurgien au diamètre choisi, en général 8mm, par un trépan mécanique standard (punch), coté endothélial.

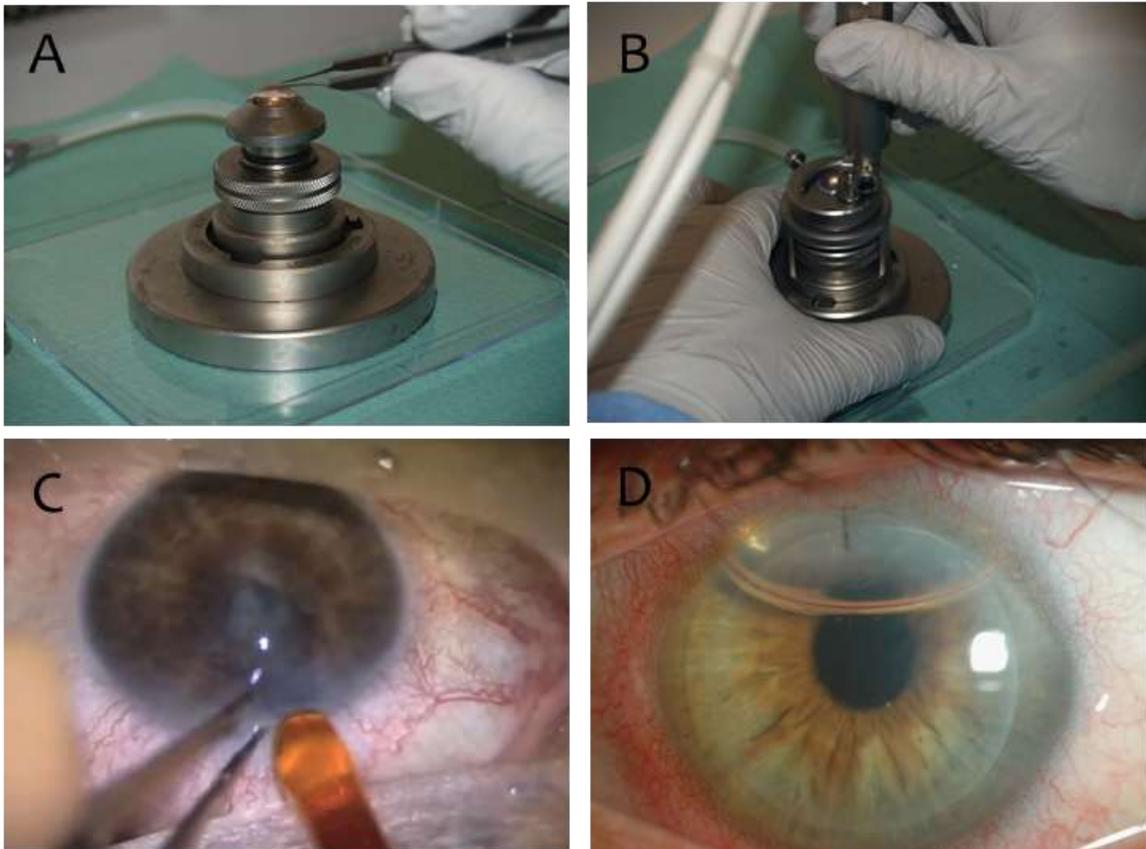


Figure 8 : Prédécoupe à la banque de cornée d'un greffon de type DSAEK (Banque de cornée de Saint-Étienne, France) et insertion chirurgicale (Dr AS Gauthier, CHU Besançon, France). A. Le greffon est placé sur une chambre antérieure artificielle MORIA. B. Découpe du greffon à l'aide d'un microkératome rotatif. C. Insertion du greffon en chambre antérieure, ici à l'aide d'un dispositif médical à usage unique Endosaver (Ocular system Inc. Winston-Salem, Caroline du Nord). D. Résultat postopératoire à J1. Persistance d'une bulle d'air qui permet de plaquer le greffon contre le dôme cornéen receveur.

Chez le receveur, la chirurgie débute par une incision limbique de 3 à 5 mm et plusieurs paracenthèses. L'endothélio-descemet pathologique est colorée au bleu trypan puis retirée sous air, eau ou substance visco-élastique à l'aide d'un crochet inversé de Simskey ou à l'aide d'une pince à capsulorexhis (descemetorhexis). Son retrait complet est contrôlé en étalant la membrane sur la cornée. Le greffon est introduit dans la chambre antérieure à l'aide d'un instrument spécifique qui lui permet de s'enrouler sur lui-même (endothélium à l'intérieur du rouleau) (Figure 8C). Si besoin le volume la chambre antérieure peut être maintenu par une infusion de Balanced Salt Solution (BSS). Plusieurs dispositifs jetables ont été développés pour faciliter l'enroulement et l'injection. Le greffon peut ensuite être saisi par une micropince ou une aiguille introduite par une paracenthèse réalisée en face de l'incision principale. Après suture de l'incision principale, le greffon est déroulé par injection d'une bulle d'air qui le plaque contre le dôme cornéen receveur (Figure 8D). En complément du marquage coloré (F ou S) la tomographie par cohérence optique (OCT) de certains microscopes opératoires récents facilite le repérage du sens de déroulement et du plaquage du greffon en bonne place.

En parallèle de la découpe automatisée, une technique manuelle a été décrite au même moment (2006), à nouveau par Gerrit Melles. Considérant que l'apposition d'un greffon comportant une épaisseur de stroma ne respectait pas complètement la physiologie cornéenne et était associé à la création d'une interface potentiellement problématique sur le plan optique, G Melles a montré qu'il était possible de prélever, par pelage manuel, uniquement la membrane de Descemet (104). Cette technique baptisée Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK) permet une récupération visuelle plus rapide et plus élevée (105-107) et réduit le risque de rejet immunitaire (108). Cependant, chaque étape est plus difficile que pour la DSAEK et explique que la technique soit plus lentement adoptée : la dissection, entièrement manuelle, peut échouer ou provoquer d'importantes lésions endothéliales au moins durant la phase d'apprentissage; l'introduction dans la chambre antérieure au moyen d'un introducteur et son déploiement dans le bon sens peuvent s'avérer très complexe. Les phases d'apprentissages (découpe et chirurgie) sont plus longues que pour la DSAEK. La DMEK permet une récupération visuelle rapide mais nécessite une courbe d'apprentissage qui limite la qualité des résultats initiaux (78, 109-111).

Il existe plusieurs techniques de préparation du greffon dont 3 classiquement utilisées :

La technique « no touch » initialement décrite par G Melles (112, 113) (

Figure 9A-F). La couche endothéliale est délicatement pelée du stroma postérieur de la cornée donneuse après avoir réalisé un stripping périphérique de l'endothélio-descemet à l'aide d'une lame. L'endothélio-descemet est ensuite séparée du stroma par dissection à l'aide de spatule puis soulevé à la pince. Le geste est réalisé en évitant tout contact entre les instruments chirurgicaux et l'endothélium dans les 9 mm centraux. Puis, un trépan de 7 à 9 mm est utilisé pour obtenir le greffon endothélial final qui s'enroule alors instantanément sur lui-même, cellules endothéliales exposées vers l'extérieur (112, 114-117). La trépanation finale en dedans de la zone où la pince a touché l'endothélium garanti l'absence de lésion directe.

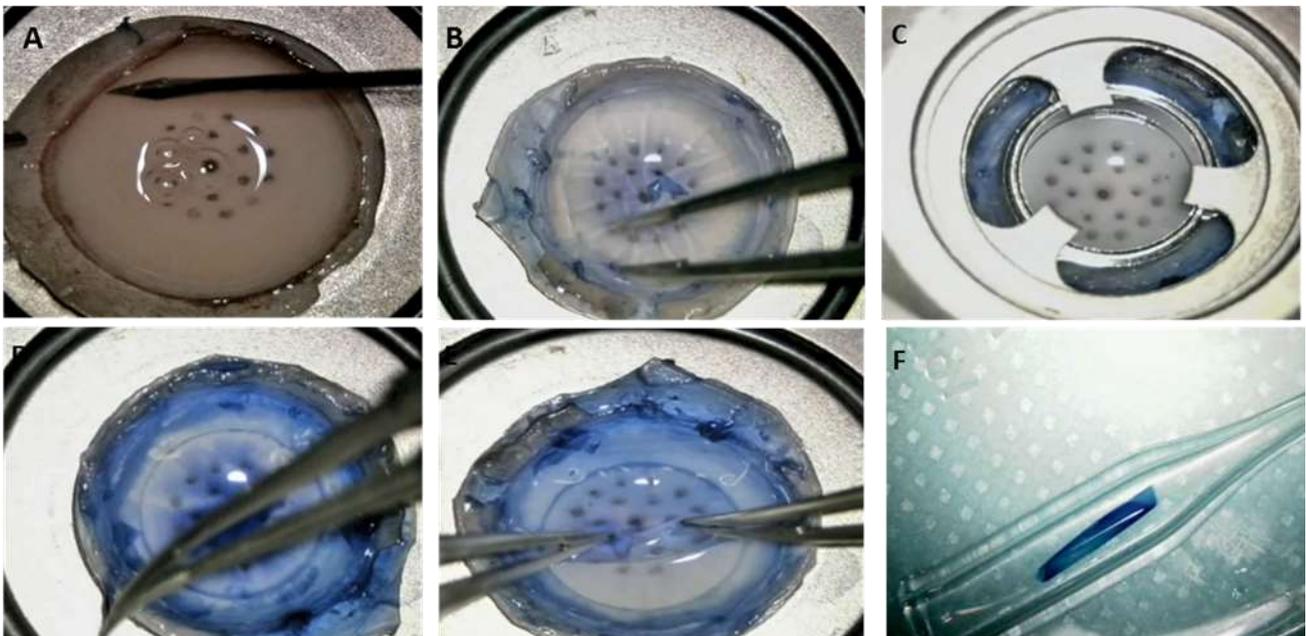


Figure 9 : Préparation d'un greffon de type DMEK selon la technique no touch (Dr R Montard, CHU Besançon). A. Stripping périphérique de l'endothélio-Descemet. B. Clivage périphérique sur 360° de l'endothélio-Descemet qui est séparée du stroma cornéen postérieur. C. Trépanation du greffon sur un diamètre de 7 à 9 mm. D. Ablation de la collerette périphérique d'endothélium. E. Soulèvement du greffon qui est complètement séparé du stroma postérieur. F. Insertion du greffon enroulé sur lui-même cellules endothéliales vers l'extérieur dans un injecteur en verre Gueuder.

La technique de dissection par injection d'une bulle d'air (118, 119) ou d'eau (120) sous l'endothélio-descemet afin de faciliter le clivage des plans de dissection.

Dans ces 2 techniques, le greffon libre dans le liquide de conservation forme un rouleau unique ou un double rouleau avec les cellules endothéliales tournées à l'extérieur. Il est aspiré dans une cartouche en verre (Dorc ou Geuder) à travers une large ouverture, rincé,

éventuellement recoloré au bleu trypan, puis injecté dans l'œil en passant par l'extrémité fine de la cartouche.

La technique de trépanation par punch incomplet de M Muraine (121). L'endothéliodescemet est trépané par un trépan qui préserve 2 zones opposées non découpées. La collerette endothéliale périphérique est supprimée sauf au niveau des 2 zones qui servent d'amorce pour hydrodisséquer la membrane sur un greffon monté sur chambre antérieure artificielle endothélium inversé vers le haut. Le greffon est placé dans une cartouche plastique servant habituellement pour injecter les implants cristalliniens lors de chirurgie de cataracte. Il est replié endothélium à l'intérieur protégé par une goutte de viscoélastique.

Dans tous les cas, le greffon est coloré au bleu trypan (concentration variable selon les auteurs, de 0,03 à 0,4%) qui colore temporairement la membrane de Descemet et aide à sa visualisation pendant la dissection et pendant l'insertion chez le receveur. La préparation du greffon est une étape clé de la chirurgie. Plusieurs paramètres ont été étudiés pour sélectionner au mieux les greffons permettant une préparation plus facile. La difficulté de préparation des greffons serait équivalente que les greffons soient préalablement déturgés ou pas (122) cependant le dextran jouerait un rôle important dans la préservation des cellules endothéliales avant et après préparation des greffons, un rôle dans l'adhérence des greffons au stroma au moment de la préparation (123, 124) et un rôle dans l'adhérence des greffons à la cornée receveuse (125). L'utilisation de donneurs de plus de 50 ans (126-128) permet de faciliter la dissection Descemetique et de former un rouleau moins serré, plus facile à dérouler. En cas d'échec d'une dissection il est prudent d'exclure le greffon apparié (126, 129). Les greffons d'yeux opérés de cataracte peuvent être utilisés mais l'adhérence Descemetique au niveau de l'incision chirurgicale oblige à la contourner pour éviter une déchirure du greffon. Une densité cellulaire endothéliale minimale de 2000 cellules/mm² a été déterminée pour obtenir de meilleurs taux de survie de la greffe (130, 131). Le sens du greffon peut être indiqué par plusieurs moyens pour permettre un déroulement dans le bon sens dans la chambre antérieure. Un F ou un S peuvent être réalisés sur la face stromale de la Descemet avec la pointe d'un feutre chirurgical ou avec un marqueur métallique. La toxicité du colorant et/ou de la pression du marqueur paraît limitée. D'autres auteurs ont proposé une découpe asymétrique de 3 petites marques en périphérie du greffon. Là aussi l'OCT du microscope opératoire aide à vérifier le déroulement du greffon dans le bon sens. Les techniques d'insertion sont variées et font toutes appel à l'injection de bulles d'air au-dessus et ou au-dessous du greffons. Une fois déplié dans

le bon sens il est maintenu en place par une grosse bulle d'air ou de gaz inerte (SF₆) quelques heures, jusqu'à ce qu'il adhère spontanément.

Ces greffes endothéliales s'adressent à des patients atteints de pathologies endothéliales irréversibles qui représente la seconde indication de greffe de cornée dans les pays à haut niveau de vie et la seconde ou troisième dans le reste du monde après les pathologies infectieuses (132). Trois grands groupes de patients en bénéficient : les dystrophies endothéliales primitives (dystrophie de Fuchs, atteignant 4% de la population des USA (133) et d'Europe), les dystrophies iatrogènes (après chirurgie de la cataracte des années 80-90 et désormais de la myopie avec implant retro-cornéen... malheureusement très largement utilisé dans le monde) et les patients déjà greffés de la cornée et chez qui le capital cellulaire endothélial décroît lentement mais irrémédiablement après une décennie (72).

En ophtalmologie, le déséquilibre entre l'offre en greffons et les besoins (71) poussent les chercheurs à développer des méthodes de bio ingénierie cornéenne (134). Ainsi, la greffe de cornée est ainsi en train de devenir aussi un enjeu mondial pour les industries de biotechnologies (135).

Depuis plusieurs années, la bio-ingénierie tissulaire connaît un véritable essor et apparait comme une solution prometteuse à la pénurie d'organes actuelle.

La mission des banques de cornées (eye-bank) d'aujourd'hui consiste à préserver la viabilité des greffons cornéens et à sélectionner les meilleurs d'entre eux sur des critères de qualité cellulaire (comptage des CE, déterminantes pour la survie du greffon chez le receveur) et de sécurité microbiologique (absence de transmission d'agents pathogènes du donneur au receveur). Cette mission doit idéalement s'effectuer avec une certaine efficacité médico-économique. Une nouvelle mission émerge, celle de préparer des « produits cornéens » de demain en prédécoupant les greffons destinés aux nouvelles greffes endothéliales. Désormais très répandue aux USA, cette pratique n'est pas encore développée en Europe.

3. Prélèvements de cornées (136)

a) Aspects réglementaires et sélection des donneurs

En France, la sélection clinique du donneur est légalement sous la responsabilité du médecin préleveur. L'activité de prélèvement de tissus doit respecter les Lois de Bioéthiques du 29 juillet 1994 (revues en 2004, 2014 et 2015) et répondre à des critères de sécurité sanitaire et de traçabilité spécifique. L'équipe de coordination hospitalière est le premier maillon de la chaîne du prélèvement de cornée. Elle veille à la sélection des donneurs, s'assure de l'absence de contre-indications médicale au prélèvement de cornée, l'absence de refus du don, principal obstacle au prélèvement (137) (consultation systématique du registre national des refus, recueil du témoignage des proches du défunt pouvant être réalisé par téléphone (138, 139)). Elle réalise l'examen du dossier médical du donneur et fournit une fiche opérationnelle de prélèvement de tissus à visée thérapeutique sur donneur décédé.

Lorsque le cadavre est conservé en chambre réfrigérée dans les 4 heures suivant le décès, le prélèvement peut être réalisé dans les 24 à 48 heures suivant le décès du donneur. La cornée est ensuite conservée dans le laboratoire d'une Banque de Cornées.

Le respect des contre-indications médicales au prélèvement selon les critères proposés par les associations européennes (European Eye Bank Association [EEBA]) (140) et américaine (Eye Bank Association of America [EBAA]) des banques d'yeux constitue le premier critère de sélection des donneurs et de sécurité de la greffe. L'objectif est d'éviter tout risque de transmission de pathologies infectieuses, dégénératives ou néoplasiques au receveur via la greffe de cornée (71). Seule la rage, l'herpès virus simplex, les bactéries et champignon ainsi que le rétinoblastome ont été formellement démontrés comme transmissibles via la cornée mais un ensemble d'autres pathologies contre-indiquent le prélèvement de cornée par respect du principe de précaution.

Les *contres indications* générales au prélèvement (Tableau 1) à but thérapeutique comportent les affections neurologiques potentiellement transmissibles ou pour lesquelles la physiopathologie n'est pas clairement établie : rage et contage rabique suspectés ou avérés, encéphalopathies spongiformes avérées ou suspectées (maladie de Creutzfeldt-Jacob sporadique, familiale, iatrogène ou nouvelle variante, syndrome de Gerstmann-Strausler-Scheinker, insomnie fatale familiale, kuru), antécédents familiaux d'encéphalopathie spongiforme, traitement par des hormones hypophysaires extractives avant 1987, intervention chirurgicale comportant l'utilisation de la dure-mère d'origine humaine ou intervention

neurochirurgicale non documentée sur ce point, sclérose en plaque, sclérose latérale amyotrophique, maladie d'Alzheimer et autres démences, maladie de Parkinson et syndromes parkinsoniens, encéphalite sclérosante subaiguë, rubéole congénitale, syndrome de Reye, para parésie spastique tropicale et encéphalite virale aiguë d'origine inconnue, infection à VIH, donneurs à haut risque de contamination par le VIH1,2, HTLV1 ou 2, infections herpétiques actives, infections chroniques par le virus de l'hépatite B ou C, septicémies fongiques, hépatites virales et ictères d'origine inconnue, syphilis, tuberculose active, lèpre, maladies parasitaires actives exposant à un risque potentiel de transmission par les tissus (comme le paludisme, la leishmaniose, la trypanosomiase et l'échinococcose), hémopathies malignes actives, tumeurs malignes oculaires primitives ou secondaires, immunosuppressions chroniques, et les décès de cause inconnue. Le respect de ces contre-indications est sous la responsabilité du médecin préleveur.

Certaines pathologies locales sont des contre-indications à la greffe : infections oculaires herpétiques actives ou latentes, inflammations oculaires aiguës, opacités cornéennes, chirurgie réfractive cornéenne, implant de chambre antérieure, chirurgie fistulisante, greffe de cornée. La présence d'un implant de chambre postérieure n'est pas une contre-indication au prélèvement car la qualité de l'endothélium est proche de celui des yeux phaqes (141).

En termes de pronostic de la greffe, il n'y a aucune raison pour mettre une limite supérieure à l'âge des donneurs. De nombreuses études ont montré que la survie du greffon ne diminue pas avec l'âge du donneur (16, 142-145) mais dépend essentiellement de la qualité du greffon (DCE, transparence). Afin de limiter le risque de non-conformité par faible DCE certains pays comme les USA, limitent à 75 ans l'âge des donneurs. Par ailleurs, la démocratisation des greffes lamellaires oblige depuis une dizaine d'années à adapter le type de greffon au type de greffe réalisée. Les greffons de donneurs jeunes sont réservés pour les kératoplasties lamellaires antérieures profondes (KLAP), les greffons plus âgés et à forte DCE pour les greffes endothéliales. En effet, les cornées de donneurs âgés sont habituellement moins transparentes et la greffe bien que possible (146) entraîneraient des résultats fonctionnels moins intéressants en termes d'acuité visuelle dans les KLAP (147). A l'inverse pour les greffes endothéliales manuelles (DMEK), l'utilisation de donneurs de plus de 50 ans (126-128) permet de faciliter la dissection descemetique et de former un rouleau moins serré, plus facile à dérouler. En cas d'échec d'une dissection il est prudent d'exclure le greffon apparié (126, 129).

Types	Pathologies
Pathologies infectieuse	<p>SIDA</p> <p>Hépatites virales actives A, B, C</p> <p>Séropositivité : VIH, Ag HBs, VHC, syphilis (syphilis active ; infection ancienne avec séropositivité pas de contre-indication absolue)</p> <p>Comportements à haut risque pour les virus VIH et hépatites (homosexualité, prostitution, hémophilie,...) ; ainsi qu'examen général évoquant toxicomanie ou risque de maladies transmissibles</p> <p>Encéphalites virales ou d'origine inconnue</p> <p>Rage ou post exposition au vaccin contre la rage pendant les 12 premiers mois</p> <p>Rubéole congénitale</p> <p>Syndrome de Reye</p> <p>Tuberculose active ou pendant les 6 premiers mois de traitement</p> <p>Leuco-encéphalopathie multifocale progressive</p> <p>Ictères d'origine inconnue</p> <p>Infection HTVL 1et 2</p> <p>Paludisme actif</p> <p>Patient ayant un organe transplanté</p> <p>Antécédent de vaccination récente (<12mois) au moyen d'un vaccin vivant atténué</p> <p>Hémodialyse</p>
Pathologie du système nerveux central d'origine inconnue	<p>Maladie de Creutzfeldt-Jacob (CJ) et groupes à risques :</p> <ul style="list-style-type: none"> - antécédents familiaux de CJ, receveur de greffe de dure mère avant 1992 ou d'hormones pituitaires d'origine humaine - Maladie du système nerveux central de cause inconnue (sclérose en plaque, Alzheimer...) - Panencéphalite sclérosante sub-aïgue <p>Syndrome d'asthénie chronique</p> <p>Décès de cause inconnue</p>
Pathologies néoplasiques	<p>Toute hémopathie maligne</p> <p>Tumeur primitive cérébrale métastasiant</p>
Maladies oculaires	<p>Inflammation oculaire</p> <p>Anomalies congénitales ou acquises de l'œil ou antécédent de chirurgies oculaires susceptibles de retentir sur l'évolution de la greffe</p> <p>Rétinoblastome, Tumeurs malignes du segment antérieur</p> <p>Receveur d'une greffe de cornée, de sclère, de limbe</p>
Traitements pouvant modifier les résultats de qualification biologique des donneurs	<p>Hémodilution (si le volume administré de plasma et colloïde dans les 48h pré-mortem est supérieur à 50% du volume plasmatique du donneur)</p> <p>Traitement à base d'agent immunosuppresseur par voie générale</p>

Tableau 1 : Contre-indications générales et locales au prélèvement de cornée (136)

b) Contrôles de sécurités microbiologiques

Afin d'éviter tout risque de transmission de pathologies infectieuses du donneur au receveur, plusieurs étapes de contrôle sont réalisées du prélèvement à la cession du greffon. La première étape permettant de garantir la sécurité microbiologique de la greffe est le respect des contre-indications médicales au don (Tableau 1) assurée par le médecin préleveur assisté de la coordination hospitalière des prélèvements.

La seconde étape consiste à vérifier le statut sérologique du donneur par un prélèvement sanguin réalisé au moment du prélèvement. Cela permet ainsi d'éliminer les greffons de donneurs positifs pour les virus HTLV 1 et 2, VIH 1 et 2, Hépatites B et C.

Lors de la conservation en Optisol-GS, aucune autre étape de contrôle n'est réalisée. La conservation à 4°C suffit à limiter le développement de micro-organismes. Le système est entièrement clos et la cornée n'est pas manipulée durant l'étape de conservation.

En organoculture en revanche, il existe d'autres étapes de contrôle pendant la phase de conservation. Les greffons sont placés dans des milieux de conservation contenant antibiotiques et antifongiques afin de garantir la stérilité bactérienne et fongique du greffon. Classiquement le milieu de conservation contient de la pénicilline, streptomycine et amphotéricibe B (148) à dose suffisantes pour réduire la charge microbienne tout en préservant l'intégrité cellulaire endothéliale du greffon. Du rouge phénol est également ajouté au milieu nutritif. Cet indicateur de pH permet de détecter une infection précoce par modification de son coloris en présence de microorganismes acidifiant le milieu. Une première étape de conservation en étuve à +31°C est réalisée quelques jours afin d'assurer une quarantaine microbiologique et de détecter les contaminations les plus importantes (149). Des tests microbiologiques (flacons d'hémocultures type Bactec, Becton-Dickinson Franklin Lakes, New Jersey ou Bactalert, Biomérieux, Craponne, France) sont également réalisés en début et en fin de conservation sur le liquide de conservation afin de détecter toute contamination et de délivrer un greffon considéré comme stérile (150-152). Cette technique a été validé et est utilisée en routine en France et en Europe (153, 154). Un ultime test est réalisé par envoi systématique par le chirurgien d'un échantillon du liquide de conservation réalisé le jour de la chirurgie. L'envoi systématique de la collerette après trépanation n'est plus recommandé car aucune corrélation n'a été faite entre son taux de contamination et les suites post-greffe (155-157).

c) Technique de prélèvement

Lorsque l'ensemble des éléments du cadre réglementaire sont validés, le prélèvement des cornées est réalisé au bloc opératoire s'il s'agit d'un prélèvement multi-organes (15% des prélèvements en France) ou à la chambre mortuaire s'il s'agit d'un prélèvement à cœur arrêté. Il est réalisé par excision in situ, le plus souvent ou beaucoup plus rarement par énucléation. Le prélèvement par énucléation n'est en effet autorisé que lors du prélèvement multi-organes.

Il s'accompagne d'une ponction de sang faite par voie sous-clavière ou intracardiaque pour la réalisation des sérologies obligatoires et de la sérothèque.

Le prélèvement par excision in situ suit les règles d'asepsie chirurgicale habituelles (décontamination cutanée et de la surface oculaire et conjonctivale à la polyvidone iodée (Bétadine® 5 %, utilisation de gants stériles, champ opératoire et instruments stériles, suivie d'un rinçage au sérum physiologique).

La conjonctive est désinsérée au limbe et réclinée sur 360 degrés (Figure 10A). La cornée est prélevée avec une collerette sclérale de 2 à 3 mm par trépanation (trépan de 17 à 19 mm) ou dissection au bistouri et aux ciseaux de microchirurgie (Figure 10 B et C). Il est important de ne pas effondrer la chambre antérieure lors de la dissection afin de ne pas léser l'endothélium cornéen. La cornée est directement placée dans un flacon rempli de milieu de transport (Figure 11). La restauration des téguments (conformateur ou prothèse oculaire de la couleur des yeux du donneur, fermeture des paupières par une suture ou après instillation d'une goutte de colle cyanoacrylate sous les paupières) doit être réalisée avec soin.

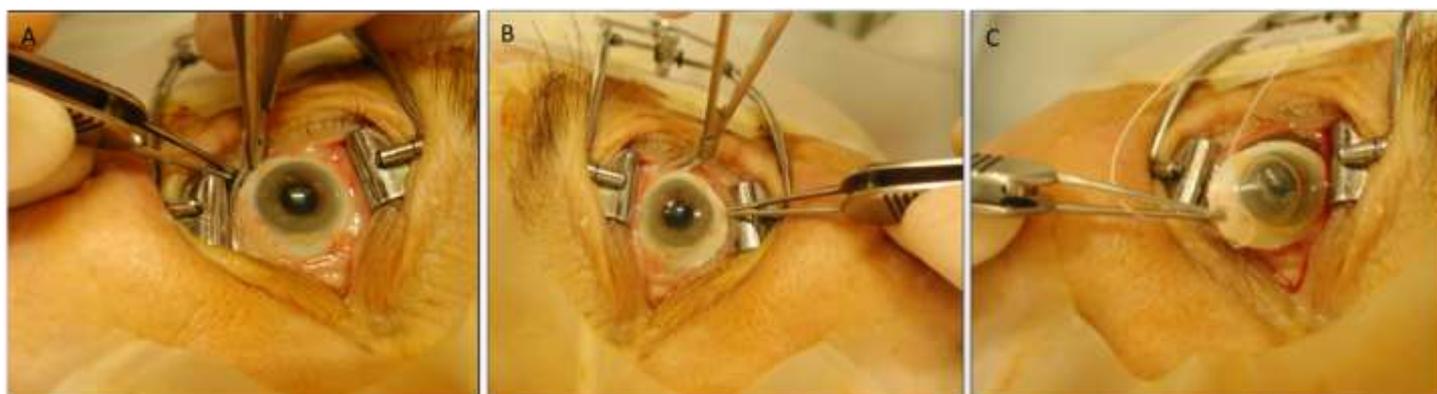


Figure 10 : technique de prélèvement par excision in situ (cliché service ophtalmologie CHU Besançon)

A : désinsertion conjonctivale limbique sur 360 degrés

B, C : Prélèvement de cornée avec collerette sclérale



Figure 11 : Technique de prélèvement par excision in situ, mise en milieu de conservation CorneaMax® (cliché service ophtalmologie CHU Besançon).

Le prélèvement par énucléation (Figure 12) répond aux mêmes règles d'asepsie, de décontamination et de restauration tégumentaire. La technique opératoire est la même que celle pratiquée dans une énucléation classique (désinsertion conjonctivale, crochetage des muscles droits et section ensuite de ces muscles et du nerf optique au ciseau) suivie ensuite d'une restauration tégumentaire (par boule de coton ou conformateur).

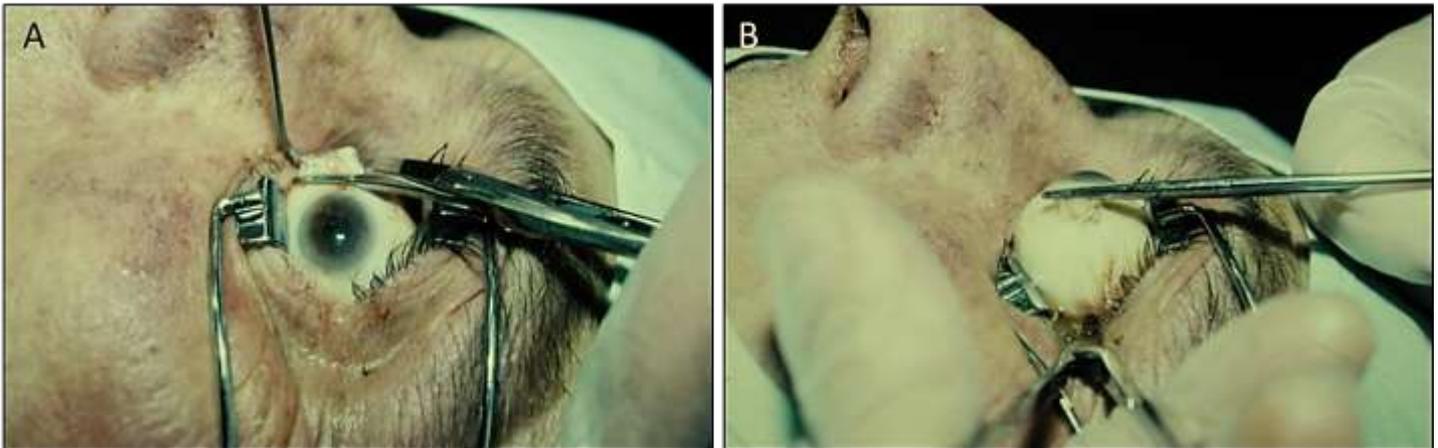


Figure 12A et B : Technique de prélèvement par énucléation :désinsertion des muscles oculomoteurs (cliché service ophtalmologie CHU Besançon)

d) Transport des prélèvements

En cas d'excision in situ, le tissu prélevé est placé dans un flacon de milieu de transport (20 ml), après dissection. Le milieu est un milieu de conservation à +4 °C ou un milieu d'organoculture (transport à température ambiante). Le flacon hermétiquement clos est ensuite placé dans la zone de conservation (étuve à 31 °C pour la conservation en organoculture, réfrigérateur à 4 °C pour la conservation en hypothermie). En cas de prélèvement par énucléation, le globe oculaire est transporté dans une chambre humide réfrigérée à +4 °C, cornée dirigée vers le haut. Les flacons ainsi que les tubes de sang doivent être étiquetés (identification précise du donneur, mentions légales), et accompagnés d'une fiche opérationnelle de prélèvement remplie par le médecin préleveur après lecture du dossier médical du donneur.

e) Conservation des greffons cornéens : Techniques actuelles de conservation

Les deux objectifs principaux de la conservation des greffons cornéens sont de préserver la viabilité cellulaire endothéliale et d'assurer un délai de conservation suffisamment long afin de pouvoir réaliser les contrôles de qualité de greffon.

Il existe 4 méthodes de conservation classées en fonction de leur durée :

- conservation à court terme en chambre humide et milieu M-K (2 à 4 jours)
- conservation intermédiaire dans un milieu dérivé du M-K (jusqu'à 15 jours)
- conservation à long terme en organoculture (jusqu'à 5 semaines)
- conservation à très long en cryoconservation (durée illimitée)

Elle est réalisée par des banques de cornées autorisées. Celles-ci prennent en charge la conservation, le contrôle de qualité et le contrôle de stérilité du greffon et gèrent la réalisation des contrôles sérologiques du donneur. Les prélèvements par énucléation subissent une décontamination rigoureuse à la banque, avant que la cornée soit disséquée avec une collerette sclérale de 2 à 3 mm.

Conservation hypothermique en chambre humide

Cette technique a été décrite la première fois en 1935 par Filatov en utilisant des yeux de cadavres (58). Immédiatement après énucléation les yeux sont placés, cornée vers le haut dans un flacon de verre, sur une compresse imbibée de sérum physiologique et d'antibiotiques. Les globes sont ensuite conservés à 4°C pour une durée maximale de 24 heures. On parle alors de « greffe fraîches ». Cette technique a été utilisée pendant des décennies et reste utilisée dans certains pays (158), mais a été le plus souvent délaissée du fait de la très courte durée de conservation liée à une rapide dégradation de l'endothélium. Cette dégradation endothéliale est liée à l'accumulation de déchets métaboliques post-mortem en chambre antérieure. C'est pour cela que le concept d'excision de la cornée a été développé.

Conservation hypothermique en milieu M-K medium et dérivés

La conservation de la cornée à court terme en milieu liquide à 4°C est la technique de référence aux Etats Unis est la technique la plus utilisée dans le monde (71). Le tout premier milieu a été développé aux Etats-Unis en 1974 par McCarey et Kaufman (60). Ils avaient mis en évidence que des cornées de lapins New Zeland White placées dans un milieu de culture cellulaire (TC199) supplémenté en Dextran et antibiotiques restaient viables pendant 14 jours.

Des modifications successives ont été apportées au milieu M-K, avec notamment le remplacement des antibiotiques par la gentamycine (milieu M-K modifié) (159), la suppression du SVF et l'ajout d'un tampon stable (HEPES) et 2,5% de Chondroïtine sulfate (K-sol) (160). Suite à une contamination bactérienne mettant en cause le milieu, la fabrication du K-sol a finalement été stoppée en 1989 (161). Un autre milieu contenant de la chondroïtine sulfate, le CSM, a été mis au point (162, 163) et retiré du fait d'une importante toxicité épithéliale. D'autres milieux ont ensuite été développés, Dexsol (164) (composé de Chondroïtine sulfate et dextran), Optisol combinant les caractéristiques du K-sol et Dexsol (165). Depuis peu, d'autres laboratoires proposent également de nouveaux milieux (Cornea-cold d'Eurobio, les Ulis, France, Eusol-C d'Alchimia, Padoue, Italie en Europe, Cornisol d'Aurolab, Madurai, Inde).

Actuellement le milieu de conservation principalement utilisé aux Etats-Unis est l'Optisol GS (Gentamycine-Streptomycine) (Baush & Lomb) (165).

La cornée est ainsi conservée au réfrigérateur à +4°C dans un flacon contenant 20ml de milieu, face endothéliale vers le haut.

Ces milieux maintiennent une activité métabolique minimale permettant la survie des cellules. Les contrôles de la qualité endothéliale du greffon (biomicroscopie, microscopie spéculaire) et de la stérilité du milieu (prélèvement bactériologique, virage de l'indicateur coloré, transparence du milieu) sont possibles pendant la durée de conservation. En revanche cette technique ne comporte pas de contrôle microbiologique. La conservation théorique autorisée est de 14 jours maximum. En pratique, aux Etats-Unis les cornées sont greffées dans les 5 jours.

Les conséquences de la conservation à 4°C sont une perte cellulaire endothéliale qui augmente avec la durée de conservation, des modifications des structures cellulaires, un œdème cornéen, un pléomorphisme et un polymégathisme endothélial. Nelson a prouvé que la conservation en hypothermie induit une apoptose des cellules épithéliales, stromales et

endothéliales du greffon (166). Ainsi, Means (167) retrouve en moyenne 9,5% à 16% de lésions cellulaires endothéliales pour une durée de conservation de 4 à 21 jours.

Les résultats cliniques sont bons : le taux de survie du greffon va de 92 à 100 % à un an. La densité endothéliale moyenne à 12 mois est comprise entre 2000 et 2400 cellules par mm² (163, 168, 169). Cependant plusieurs décompensations endothéliales primaires ont été publiées avec ces techniques de conservation.

La conservation à moyen terme à +31°C, en organoculture

Elle a été proposée par Doughman et Lindstrom aux USA vers 1975 (170, 171), puis modifiée par Sperling (62), Pels (8, 63) et Ehlers en Europe du Nord et introduite en France par Delbosc et Hervé (64). Elle constitue actuellement la méthode de conservation standard de la plupart des banques de cornées européennes (68% des cornées prélevées en Europe et 17% des cornées prélevées dans le monde) (172). Cette technique préserve l'intégrité endothéliale et autorise une conservation qui peut être longue (173, 174) mais la durée optimale retenue est de 5 semaines. Les avantages de la longue durée de conservation sont nombreux. Il est ainsi possible de programmer la greffe et de minimiser les pertes de greffons par défaut de disponibilité des patients receveurs (17). Il est possible de réaliser les contrôles qualité du greffon assurant la sécurité des patients (contrôle sérologique des donneurs, contrôle microbiologiques sur la cornée et le milieu de conservation, de faciliter l'éventuel typage tissulaire HLA lors de demande de greffons appariés, de réaliser une évaluation de la qualité cellulaire endothéliale) et ainsi de minimiser le risque d'échec primaire (175).

L'organoculture permet de stimuler l'activité métabolique des cellules. La cornée est conservée à l'étuve (air 100%) à une température ambiante proche de la température physiologique de la cornée in vivo (31 à 37°), dans un flacon hermétique contenant 50 à 100 mL de milieu. Ces milieux sont produits localement par les banques de cornées, les pharmacies hospitalières ou commercialisés par des industriels selon la réglementation de chaque pays.

Ces milieux comportent un milieu nutritif (milieu essentiel minimum de Dulbecco), du sérum de veau fœtal 2%, des tampons, des antioxydants, des antibiotiques et antifongiques et un indicateur coloré de virage de pH (rouge phénol). Même si la durée de conservation autorisée est de cinq semaines, il est préférable d'utiliser le greffon dès la fin de la période de quarantaine microbiologique car des études ont prouvé que la densité endothéliale est d'autant plus élevée que la durée d'organoculture est courte (16, 17). La période de quarantaine est habituellement

fixée à deux semaines. En France, ces milieux ont un statut juridique particulier, ni médicament ni dispositif médical, celui de produit thérapeutique annexe (PTA). Deux gammes de PTA sont autorisées par l'AFSSAPS en 2010 : CorneaPrep/Max/Jet® (Eurobio, Les Ulis, France) et StemAlpha 1,2,3 (Stem Alpha, la chenavatière, France).

L'organoculture est une méthode de conservation qui s'accompagne de l'apparition d'un œdème stromal avec une augmentation de volume du stroma qui double d'épaisseur durant la conservation et s'accompagne d'une diminution de transparence et de la formation de plis endothéliaux. Il est nécessaire avant la réalisation de la greffe de procéder à une étape de déturgescence du greffon d'une durée de un à quatre jours. Cette étape consiste à placer les greffons dans le même milieu additionné de Dextran T-500, une macromolécule rendant le milieu hyperosmolaire et permettant ainsi de réduire l'œdème stromal induit par la conservation.

Une durée de déturgescence de deux ou trois jours est préférable à une durée de 24 heures car on obtient une densité endothéliale plus élevée (16).

La température de conservation peut être de +31, +34 ou +37°C. Sperling a montré que le nombre de figures de reformations observées sur la mosaïque cellulaire endothéliale après 24 heures est plus faible lorsqu'on utilise une température de +31°C (62).

L'organoculture présente cependant plusieurs inconvénients qui n'ont pas été remis en cause depuis plus de 30 ans. Elle s'accompagne d'une perte cellulaire endothéliale par apoptose qui augmente avec la durée de la conservation et avec le pourcentage de cellules non viables avant conservation (15, 18). On observe aussi des modifications des structures cellulaires, un œdème coréen, un pléomorphisme et un polymégathisme endothélial (13-15, 18, 176). La perte cellulaire endothéliale moyenne est comprise entre 11 et 20% pour une durée moyenne de conservation d'une à trois semaines (177-181). Elle augmente avec la durée de conservation (7,5% après 10 jours et 18% après 30 jours) et avec la densité endothéliale avant conservation (182, 183). Globalement, on retient 1% de perte par jour de conservation. Cette perte n'est pas significativement influencée par l'âge du donneur, ni par le délai post mortem de prélèvement (179, 182). La phase finale de déturgescence en Dextran est pourvoyeuse d'une toxicité cellulaire épithéliale (184-186) et d'une perte cellulaire endothéliale supplémentaire (jusqu'à 8%) moindre en poloxamer (187-191).

Les changements morphologiques des cellules endothéliales sont un polymégathisme, un pléomorphisme, des figures de rosette et de reformation, et une excentration des noyaux (13,

64, 177, 186, 192). Les tight junctions et le cytosquelette d'actine des cellules endothéliales ne sont pas lésées par l'organo-culture (14).

Sur les kératocytes, l'organo-culture provoque la formation de vacuoles sans lésion des organites intracellulaires et crée ainsi un œdème stromal. Concernant l'épithélium, les lésions sont plus sévères et, dès le 7^{ème} jour de conservation, il ne persiste plus que la couche basale de l'épithélium cornéen central.

En conséquence, le pourcentage de greffons clairs varie entre 80 et 100% suivant les études après un suivi d'un à cinq ans. Dans l'étude de Volker-Dieben, qui porte sur des effectifs importants, et après ajustement sur le degré de néovascularisation, la survie sans opacification des greffons est statistiquement meilleure dans le groupe 31°C que dans le groupe 4°C (181).

L'épaisseur cornéenne centrale est normale dans les diverses études sur un suivi de 2 à 60 mois (178, 193-196).

Concernant la perte cellulaire, Sperling trouve une perte cellulaire endothéliale moyenne, un an après la greffe, de 40% après la conservation à 31°C et de 47% après celle à 4°C (différence non significative) (195). Dans une étude prospective, Frueh ne retrouve pas de différence significative entre les deux techniques de conservation en termes de densité endothéliale à 12 mois de la greffe (10).

Des cas de contamination ont également été rapportés au décours de la conservation (130, 149, 155, 197) ou pendant la phase de déturgescence (157) mais c'est également le cas lors de la conservation hypothermique (198-201). Cependant, une sélection efficace des greffons est réalisée grâce aux contrôles microbiologiques et d'éliminer les cornées contaminées (130, 149). Cette sélection est efficace et permet de réduire le taux de positivité des cultures sur les résidus opératoires à 0,5 à 5% après organoculture (149, 157, 202, 203) versus 12-39% après conservation en hypothermie (204-208).

L'utilisation des techniques microbiologiques modernes et rapides par flacons à hémoculture placés en automate permet d'optimiser la sélection des greffons (151, 157) et de réduire sans risque la période de quarantaine.

La conservation de la cornée à long terme : cryoconservation et vitrification

Le premier succès de greffe de cornée réalisée à partir d'une cornée congelée et préservée en alcool et carboglace après pré-traitement dans une solution contenant 15% de glycérol a été décrit en 1954 par Eastcott et al (209). La cryoconservation est actuellement pratiquée dans de rares centres à l'aide de la technique décrite par Mueller (210), Capella et Kaufman (211) ou de protocoles issus de celle-ci. Celle-ci consiste à conserver la cornée vitrifiée (212) ou conservée dans une solution contenant un cryoprotecteur, (DMSO (213-215) (diméthylsulfoxyde), dextran (216, 217), CS (211)) dans une cuve d'azote liquide (-196 °C). La congélation se fait par un programme de descente en température progressive (2 °C par minute jusqu'à -14 °C, suivi d'un transfert de chaleur entraînant une remontée en température à -9 °C, puis 3 °C par minute jusqu'à -80 °C), après cryoprotection par des bains de concentration croissante en DMSO (2, 4, 6 puis 7,5 %) et sucrose (2,5, 5, 7,5 puis 10 %) à +4 °C. La décongélation est réalisée à l'aide d'un bain-marie et suivie d'une dilution du cryoprotecteur.

La cryoconservation peut être utilisée pour conserver l'architecture du tissu cornéen (lamelles de collagène), sans conservation de la viabilité cellulaire. Cette cryoconservation permet d'avoir à disposition en permanence des greffons cornéens destinés à des greffes architectoniques utilisables éventuellement en urgence. Le greffon est placé directement à basse température dans un tube à congélation sans programme de descente en température progressif. La température de conservation peut être -40 °C ou -80 °C pour une durée de 1 an. Avant utilisation, le greffon est incubé à température ambiante dans un flacon de milieu de déturgescence permettant de disposer d'un tissu suturable lors de l'intervention.

Bien que des succès aient été rapportés avec cette technique à court (218, 219) et long terme (220, 221) (jusqu'à 16 ans), cette méthode entraîne une grande perte cellulaire endothéliale (222) au décours des étapes de congélation (223) et décongélation (224) ainsi qu'une difficulté de manipulation des tissus cassants et reste très peu utilisée. Les conséquences de la cryoconservation sur l'endothélium cornéen sont assez sévères : perte cellulaire, cellules multinucléées, clivage entre endothélium et membrane de Descemet, polymorphisme et pléomorphisme sévères, cytolyse.

Les résultats cliniques sont moins bons que ceux des autres méthodes mais la durée de conservation est théoriquement illimitée. La plupart des densités endothéliales postopératoires sont inférieures à 1 000 cellules/mm².

En pratique, les 2 principales techniques de conservation habituellement utilisées sont l'hypothermie à 4°C à court terme et l'organoculture à 31°C à long terme (Figure 13).

	Hypothermie	Organoculture
température	2-6°C	31-37°C
principe	structures et fonctions « figées »	activité métaboliques maintenues
durée	Mac Carey Kaufman : 48 heures Optisol GS (B&Lomb) : 5-10 jours	jusqu'à 5 semaines
déturgescence	non car dextran + chondroïtine	oui : dextran 48-72H avant greffe
antibiotiques	Genta + Strepto...inactifs à +4°C	Peni + Strepto actifs
microbiologie	aucun	2 à 3 contrôles
endothélium	Avant ou pendant : spéculaire	Microscopie optique 1 ou 2 fois
transport	réfrigéré	température ambiante
coût	Faible, « 1 frigo suffit »	Très élevé



4°C



31°C

Figure 13 : Synthèse des 2 principales techniques de conservation gold standards (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne).

f) Modifications cornéennes post-mortem et induites par la conservation

Modifications épithéliales

Lors de la greffe, une mauvaise qualité épithéliale en fin de chirurgie favorise les retard de cicatrisation (225). Lors du prélèvement de nombreux facteurs (cause du décès du donneur, antécédent généraux et locaux, traitement médicamenteux, antécédents de chirurgie oculaire, mauvaise occlusion palpébrale post-mortem, température de conservation du corps...) peuvent influencer la qualité de l'épithélium cornéen.

Lorsque les cornées sont conservées à +4°C, l'épithélium reste intact les 48 premières heures. Entre le 2^{ème} et le 5^{ème} jour de conservation survient une desquamation des couches épithéliales superficielles du centre vers la périphérie cornéenne jusqu'à la mise à nu de la membrane basal entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour de conservation (226). La conservation en Optisol-GS permet le maintien de la couche épithéliale pendant 6 jours avant desquamation progressive entre le 6^{ème} et le 10^{ème} jour et apparitions de lésions étendues au-delà de 10 jours (227, 228).

En organoculture, l'intégrité des jonctions intercellulaire et du cytosquelette d'actine est préservé ce qui assure la survie épithéliale jusqu'à 2-3 semaines (13, 14, 229, 230). Cependant, il existe une desquamation progressive des couches épithéliales superficielles tout au long de la période de conservation (13, 14).

Modifications stromales

Dès les 24 premières heures post-mortem survient un gonflement stromal (231) qui est réduit au court de la conservation à +4°C par l'ajout d'une macromolécule (Dextran) aux propriétés osmotiques et hydrophiles dans le milieu de conservation (Dexsol ou Optisol-GS). L'accumulation de Dextran dans la cornée est dépendante de la durée de conservation et de l'intégrité de l'endothélium de la cornée conservée (232). Après kératoplastie, le Dextran est éliminé de la cornée en 12 heures (233).

Lors de la conservation en organoculture, il existe également un gonflement stromal qui augmente avec la durée de conservation et qui est d'autant plus important que l'âge du donneur est jeune. Comme pour la conservation à +4°C, ce gonflement stromal est totalement réversible après greffe. L'épaisseur maximale des cornées conservées en organoculture 3 semaines est de 900 à 1000 µm (63).

Il existe une diminution de densité des kératocytes initiale de 18%. Cette densité ne diminue plus les 3 premières semaines de conservation (234). La morphologie des kératocytes est surtout modifiée dans le stroma postérieur (cellules élargies et irrégulières, présence de noyaux encochés et de multiples vacuoles) alors qu'elle est préservée dans le stroma antérieur (234). Les fibres de collagènes du stroma subissent également des modifications lors de la conservation (diminution de la densité des fibres et modification de leur agencement, augmentation de l'espace entre les fibres de collagène sans modification de leur diamètre) (234).

Modifications endothéliales

La transparence cornéenne est maintenue grâce à l'agencement parfait des fibrilles de collagènes organisées en une superposition de 300 lamelles et à la régulation précise de l'hydratation stromale. L'agencement des fibrilles de collagène dépend en effet très étroitement de l'hydratation stromale maintenue à 3,04 mg d'eau/mg de tissu sec dans le stroma antérieur et 3,85 mg d'eau/mg de tissu sec dans le stroma postérieur. L'épaisseur stromale est linéairement liée à l'hydratation selon la formule suivante : Hydratation en mg d'eau/mg de tissu sec = 8 x épaisseur en mm-0,7.

L'hydratation stromale (235) dépend quant à elle de facteurs limitants l'entrée d'eau dans la cornée (barrières mécaniques et pompe endothéliale Na^+/K^+) et de facteurs favorisant cette entrée d'eau (pression de la matrice extracellulaire stromale et pression intra-oculaire (PIO)).

Il existe spontanément une accumulation d'eau dans le stroma liée aux charges négatives des protéoglycannes branchés sur les fibrilles de collagènes leur conférant une hydrophilie. Cette hydrophilie est responsable d'une pression dite de gonflement (PG) du stroma d'environ 55 mmHg. Plus l'hydratation augmente plus la PG diminue de manière exponentielle, expliquant que l'œdème s'autolimité lorsque la PG s'annule. Lorsque l'endothélium est intact, la PIO joue un rôle considérable en luttant contre cette pression de gonflement. La pression d'imbibition (PI) est la différence $\text{PIO} - \text{PG}$. Lorsque la PIO est normale (env 15 mmHg), PI est négative (-40 mmHg) et correspond à l'aspiration qu'il faut exercer à l'intérieur du stroma pour empêcher toute modification de l'hydratation. Le signe négatif indique une sortie d'eau du stroma. En situation physiologique, c'est la fonction de pompe ionique des cellules endothéliales qui exerce très précisément cette «aspiration» considérable. L'endothélium fonctionne comme une pompe active grâce à la pompe Na^+/K^+ ATPase qui expulse le Na^+

dans l'humeur aqueuse et libère le K^+ dans la cellule endothéliale créant ainsi un gradient osmotique assurant la déturgescence du stroma, l'eau suivant l'ion sodium. Les mouvements ioniques entraîne la création d'une différence de potentiel de 500mV entre les milieux intra et extracellulaire endothélial. Les mouvements de l'ion bicarbonate entraîne une polarisation négative de la face endothéliale postérieure et intervient ainsi également dans la déturgescence. De l'autre côté de la cornée, la barrière épithéliale empêche l'imbibition du stroma à partir des larmes (Figure 14).

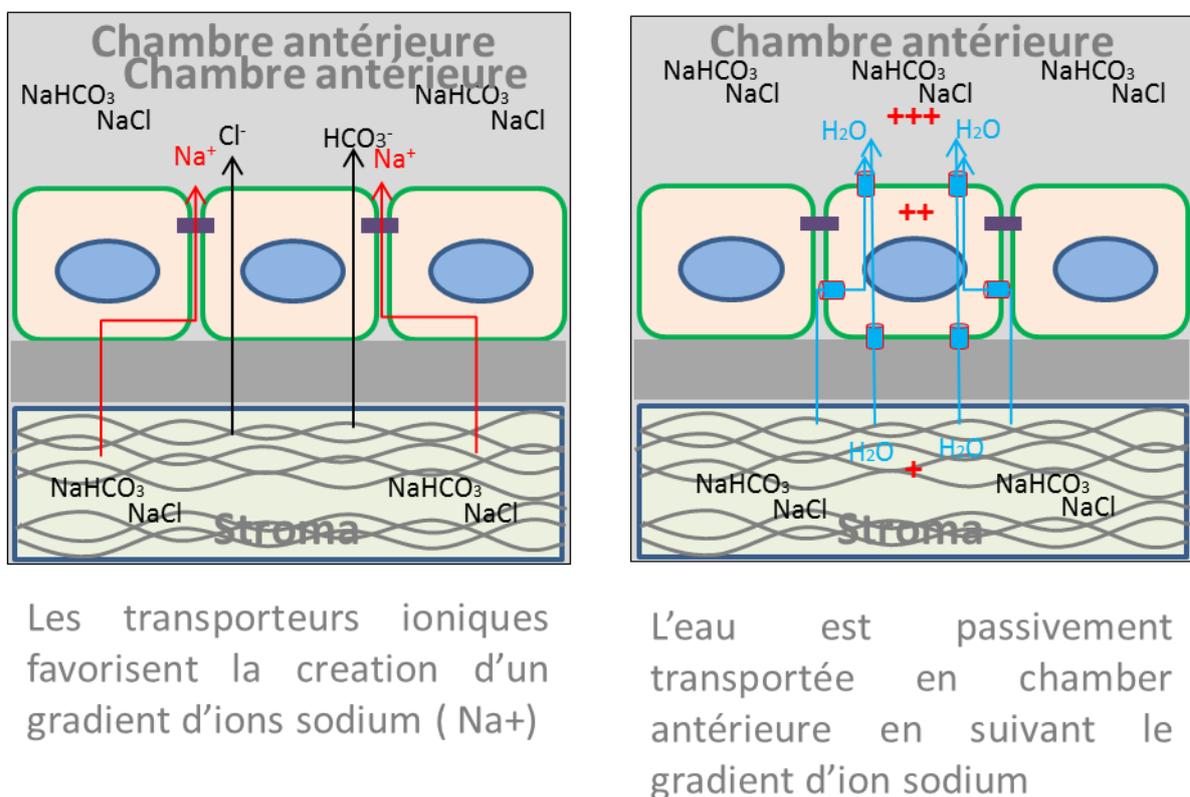


Figure 14 : Mécanisme de déturgescence du stroma cornéen par la pompe endothéliale (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne).

Dès le prélèvement post-mortem puis de lors la conservation, la PIO devient nulle par définition et l'endothélium cornéen moins fonctionnel. La PG s'exerçant seule, l'œdème apparaît rapidement et est responsable du doublement de l'épaisseur de la cornée qui passe de 520 à 1000 μm et plus (64, 235). Cet œdème est responsable de l'installation d'un cercle vicieux : l'œdème provoque un plissement endothélial majeur où les cellules endothéliales meurent de façon accélérée, altérant un peu plus la fonction de pompe endothéliale. C'est pourquoi, lors de

la conservation, il est indispensable d'ajouter au milieu de conservation une macromolécule augmentant l'osmolarité ou la pression oncotique du milieu et provoquant un mouvement d'eau depuis la cornée vers le milieu. Lors de la conservation à très court terme +4°C (USA, 2-5 jours), la cornée est transparente tout au long de la conservation car le milieu contient de la chondroïtine sulfate. En organoculture à 31°C (Europe, 2-5 semaines), en raison de sa toxicité, la déturgescence est réalisée uniquement dans les 48-72 dernières heures par l'ajout de Dextran T500 hyperosmolaire.

Dans le détail, la fonction de barrière endothéliale disparaît rapidement en 3 jours lors de la conservation en chambre humide. Les lésions endothéliales débutent après 48 heures de conservation avec une perte cellulaire massive notée à 5 jours (236, 237). Il n'y aurait pas de différence significative de succès de greffe entre conservation du globe en chambre humide (24-48 heures) versus conservation en milieu M-K (2 à 4 jours) (238, 239). Le réchauffement du globe à température ambiante favorise la mortalité cellulaire endothéliale qui peut être réduite par le transfert de la cornée en milieu M-K maintenant la viabilité cellulaire endothéliale jusqu'à 9 jours (240, 241).

La conservation des cornées en milieu M-K assure une viabilité cellulaire endothéliale supérieure aux cornées conservées en chambres humides ou cryoconservées (223). Il a été démontré que la viabilité cellulaire endothéliale et l'intégrité de structure de cellules endothéliales étaient maintenues constantes 3-4 jours en milieu M-K (59, 242) et jusqu'à 10 jours en K-Sol (243, 244). La perte cellulaire maximale d'environ 30% est mesurée après 2 jours en M-K et 10 jours en K-Sol (245). L'Optisol préserve morphologie cellulaire et épaisseur cornéenne 2 semaines en préservant les jonctions cellulaires et la fonction de barrière (246, 247). En Optisol la perte cellulaire endothéliale est de $0,57\% \pm 0,30\%$ par jour de conservation avec une moyenne de perte de 9,5% à 4 jours de conservation en Optisol-GS et 16% à 21 jours (167).

En organoculture prolongée, la perte cellulaire est estimée à 8-9% après 7 à 10 jours de conservation, 12% à 3 semaines, 18% à 4 semaines et 30% à 5-6 semaines (13, 64) avec une mortalité cellulaire endothéliale prédominant dans les plis endothéliaux (15). Histologiquement, les modifications endothéliales présentées sont la présence de figures de rosette, une augmentation du pléiomorphisme et du polymégathisme, une augmentation de l'excentricité des noyaux et l'apparition de cellules multinuclées. Ces lésions résultent de l'élongation et de l'élargissement des cellules pour couvrir les zones de descemet dénudées (179, 248). D'autres modifications ultrastructurales telles que la présence de nombreuses

vacuoles, un gonflement des mitochondries et une augmentation globale de l'épaisseur des cellules sont réversibles (13). Au niveau cellulaire endothélial, les cellules présentent une augmentation de leur coefficient de variation de surface sans modification de l'hexagonalité (13).

Pour les cornées conservées par cryoconservation, il a été rapporté une préservation de l'épithélium et du stroma mais une perte cellulaire de 27 à 38% en présence de Dextran (216, 217). Les modifications endothéliales sont représentées par la présence de grandes cellules multinuclées, une augmentation du polymorphisme, la desquamation de cellules par rupture des structures d'adhésion et par altération du cytosquelette (213, 249, 250). La viabilité cellulaire endothéliale dépend des paramètres physiques de congélation et décongélation et de la concentration et du type de cryoprotecteur (251). Pour évaluer l'étendue des lésions latentes induites par la congélation –décongélation, il conviendrait de placer la cornée en organoculture au moins 24 heures avant utilisation ce qui complexifie et limite l'utilisation en routine de cette technique (211, 224). Deux études comparant à long terme des patients ayant reçu d'un côté un greffon cryoconservé et de l'autre un greffon non cryoconservé sont discordantes, l'une ne rapportant aucune différence en terme de survie et morphologie cellulaire (219), l'autre mettant en avant une plus grande incidence d'échecs primaires de greffes et de basse densité cellulaire endothéliale (221) .

g) Contrôle de qualité

Parallèlement aux contrôles de sécurités microbiologiques est réalisé le contrôle qualité du greffon, étape cruciale visant à céder un greffon dont la transparence et l'épaisseur soient optimale tout en maintenant un pool de cellules endothéliales le plus élevé possible. Cette étape de contrôle qualité est réalisée le plus tôt possible après réception du greffon en banque de cornée lors de la conservation à 4°C. En organoculture, la qualité endothéliale, la transparence et la pachymétrie cornéenne sont contrôlées après réception et mise en quarantaine de la cornée et avant cession pour greffe.

Qualité endothéliale

La qualité endothéliale est un facteur déterminant de la survie du greffon (252). Une DCE élevée reste le paramètre le plus important en matière de qualité du greffon. Dans les séries de patients greffés depuis plus de 15 ans, une DCE élevée au moment de la greffe est le seul facteur retardant significativement l'épuisement endothélial et l'échec de greffe (253, 254).

Les critères de qualité classiquement utilisés pour accepter une cornée pour la greffe sont ceux décrits par Pels (183) (8):

- DCE supérieure à 2000 cellules / mm². Plus la densité du greffon est basse, plus le coefficient de variation est élevé et plus la densité endothéliale postopératoire mesurée lors de la deuxième année postopératoire est basse la survie du greffon à long terme

- mosaïque cellulaire continue ;

- absence de cellules mortes après conservation ;

- perte cellulaire au cours de la conservation inférieure à 20%, polymorphisme modéré ;

- polymégathisme modéré

- absence de gouttes groupées ou nombreuses et un coefficient de variation de la surface cellulaire endothéliale normal ou modérément augmenté faisant suspecter une cornea guttata (255).

Une DCE basse, un fort polymorphisme et fort polymégathisme sont associés à un endothélium fragilisé et limitent la survie des greffons à long terme (16).

Le contrôle de la qualité endothéliale doit être réalisé systématiquement à la fin de la période de conservation.

Lors de la conservation en Optisol-GS à 4°C, ce contrôle est réalisé par microscopie spéculaire sur le greffon laissé en place dans sa chambre de conservation. L'observation est réalisée au tout début de la phase de conservation lorsque la cornée est la plus transparente (256, 257). La conservation à +4°C inactive la pompe endothéliale et favorise donc l'œdème stromal entraînant une diminution de la transparence malgré la présence des molécules de déturgescence (Dextran, CS) dans le milieu. Afin de faciliter l'observation des cellules endothéliales, la cornée est réchauffée à température ambiante pendant 45 minutes à 2 heures selon l'efficacité du redémarrage de la pompe endothéliale. La répétition des cycles refroidissement/ réchauffement/ refroidissement est cependant néfaste car elle provoque une perte cellulaire supplémentaire et des modifications morphologiques (258). La visualisation des cellules et la mise au point sur les bordures des cellules endothéliales en microscopie cellulaire requièrent un technicien expérimenté.

Lors de la conservation en organoculture, le contrôle endothélial est réalisé en début et fin de conservation (2-3 jours avant la greffe et avant déturgescence du greffon) selon un protocole spécifique décrit par Sperling (180).

Ce contrôle s'effectue sous hotte à flux laminaire, à l'aide d'une coloration vitale (Figure 15) par le bleu trypan 0,3% pendant une minute suivie d'une dilatation des espaces intercellulaires par un bain dans un sérum physiologique ou de sucrose pendant deux à quatre minutes. Le bleu trypan colore en bleu le noyau des cellules mortes (259). Ce colorant entre passivement dans les cellules et reste piégé uniquement dans les cellules mortes incapables d'exclure le colorant qui s'accumule alors dans le noyau qui apparaît coloré en bleu. Cependant la coloration au bleu trypan ne représente qu'une mesure instantanée sans préjuger de la dynamique de la mort endothéliale au cours de la conservation. Le taux de mortalité mesuré en bleu trypan à la fin de la conservation n'est pas corrélé avec la perte cellulaire en cours d'organoculture (180). Ainsi, certaines cellules non viables mais ayant encore une membrane intacte (cellules apoptotiques par exemple) restent négatives en bleu trypan (15). Dans la plupart des banques, la coloration au bleu trypan est surtout utilisée pour repérer des grandes plages de nécrose endothéliale qui font suspecter une prolifération de virus herpétique et éliminer les deux cornées appariées.

Une fois préparé, le greffon est ensuite placé dans une boîte de pétri stérile hermétique et observé en microscopie optique (63, 260) (objectif x10 ou x20) avec prise d'au moins 3 photographies de bonne qualité.

La mesure de la DCE à proprement parler est le point le plus crucial de l'évaluation de la qualité du greffon. Elle peut être effectuée de deux façons : manuellement ou informatiquement. En France et dans la plupart des banques de cornées européennes, l'évaluation endothéliale est encore majoritairement réalisée à la main (63, 260).

Le comptage manuel est fastidieux, peu standardisé et variable selon le technicien de banque. Il est réalisé soit en direct en observant les cellules visibles dans un réticule placé dans l'oculaire du microscope et en actionnant à la main un compteur. Une technique plus fiable consiste à calculer la DCE à l'aide d'une grille calibrée placée dans l'un des objectifs du microscope ou d'un appareil d'analyse d'image (Figure 16). En cas de mosaïque uniforme et de DCE élevée, cette stratégie de comptage est relativement fiable (261) alors qu'elle devient approximative en cas de mosaïque hétérogène et nécessite alors de compter dans plusieurs zones distinctes pour minimiser les erreurs.

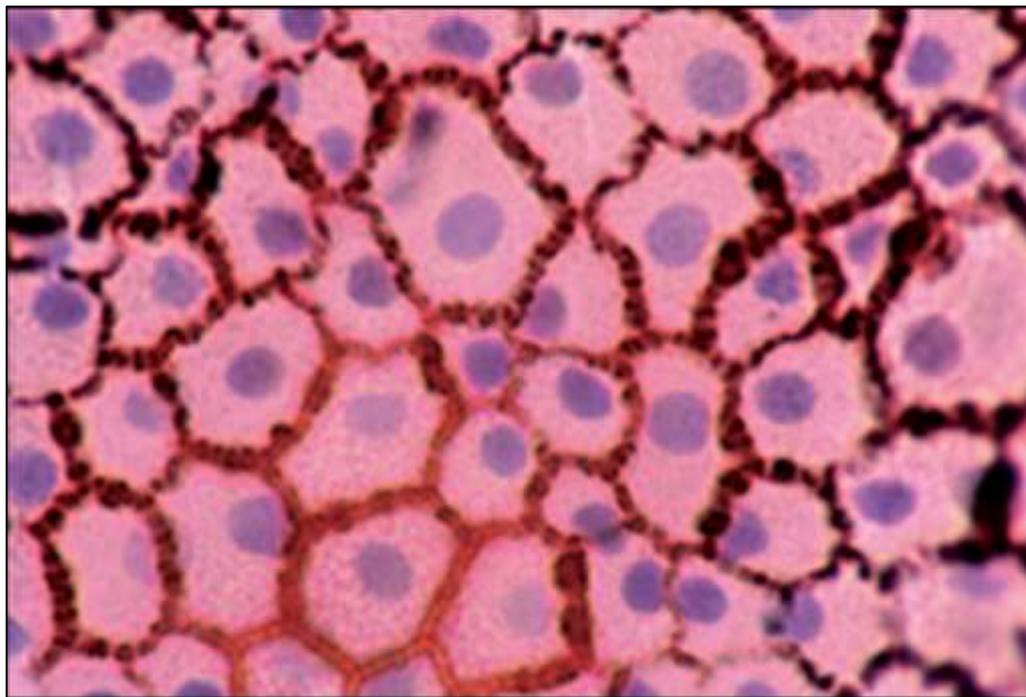


Figure 15 : Morphologie de l'endothélium cornéen humain en organo-culture : double coloration par le bleu trypan et le rouge alizarine. On observe un pléomorphisme (diminution du pourcentage de cellules hexagonales), un polymégathisme (anisocytose), une excentration des noyaux et des phénomènes de rosettes et de figures de reformation (cliché service ophtalmologie CHU Besançon-Banque de cornée de Besançon).

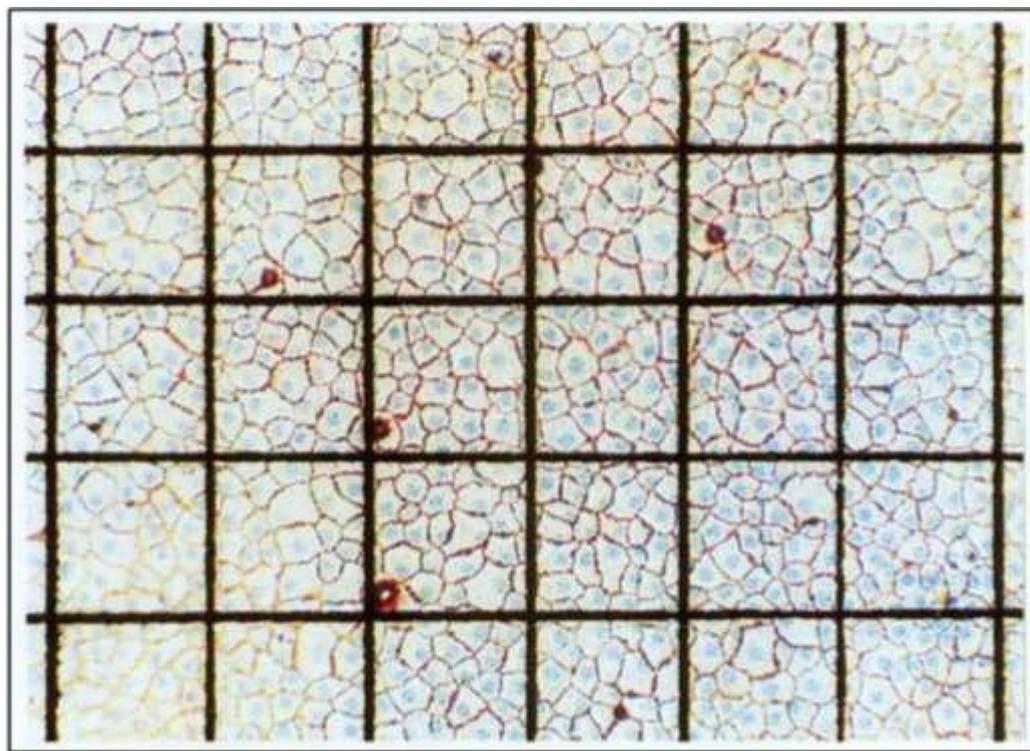


Figure 16 : Comptage endothélial manuel (cliché service ophtalmologie CHU Besançon-Banque de cornée de Besançon).

Les méthodes de comptage assistées par ordinateur (automatisée) sont de plus en plus répandues. Les logiciels d'analyse d'image donnent des résultats fiables et reproductibles sur des cellules pouvant être difficilement visibles en microscopie optique (262, 263). La préparation préalable de l'endothélium reste inchangée. Les images de microscopie optique de l'endothélium sont acquises et numérisées afin d'être analysées par différents algorithmes.

Transparence

En cas de prélèvement par énucléation, la transparence du tissu cornéen est vérifiée à la lampe à fente avant la conservation. Cette vérification n'est malheureusement pas réalisable en cas de prélèvement par excision in situ. Le greffon doit donc être examiné macroscopiquement avec la plus grande attention à toutes les étapes de la conservation pour rechercher une éventuelle taie cornéenne dont la visualisation est rendue difficile par l'œdème cornéen. Son évaluation reste donc très subjective. Plusieurs prototypes de mesure de la transparence ont été publiés dans les années 2000 mais jamais utilisés en routine (264). Depuis quelques années plusieurs dispositifs d'analyse d'image ont été développés pour évaluer la transparence et équiper certaines banques de cornées (265, 266) .

Epaisseur cornéenne

La mesure de l'épaisseur cornéenne est une étape devenue incontournable avec le développement des greffes endothéliales. La tomographie à cohérence optique (OCT) (267) a progressivement remplacé la pachymétrie ultrasonique moins adaptée aux nouvelles exigences des banques. Les OCT Spectral Domain haute résolution (268, 269) et plein champ pourrait également permettre de mieux détecter les opacités du greffons (270, 271) .

Cession du greffon

L'analyse endothéliale détaillée, manuelle ou assistée par informatique comme permet de valider ou d'éliminer une cornée pour la greffe. Le critère minimal absolu est une DCE > 2000 cellules/mm². Les deux critères additionnels de mortalité cellulaire < 2% et de perte cellulaire < 20% entre l'analyse initiale et l'analyse finale sont laissés à l'appréciation du responsable médical et scientifique de la banque car la détermination de la mortalité est peu reproductible et la perte cellulaire dépend de la durée de conservation (16, 17, 142). Malgré l'importance croissante prise par l'analyse morphologique de l'endothélium dans la détermination de la qualité d'un greffon, ces paramètres ne constituent pas encore de critères permettant de rejeter certains greffons.

4. Les chiffres clés de la conservation des greffons cornéens :

En France (Agence de la Biomédecine, Rapport d'activité 2016) (272)

D'après les registres de l'Agence de la Biomédecine, 16 banques se partagent en 2016 la responsabilité de la conservation et de la délivrance de greffons cornéens. Cent quatre-vingt-dix-neuf établissements de santé préleveurs participent au prélèvement de tissus sur donneurs décédés, dont 152 sont autorisés à la fois au prélèvement de tissus au bloc opératoire sur donneur d'organe, et au prélèvement de tissus en chambre mortuaire; 38 sont autorisés uniquement au prélèvement de tissu en chambre mortuaire et 9 au prélèvement de tissus seulement au bloc opératoire sur donneur d'organe.

En 2016, l'activité de prélèvement de cornée a diminué mais les taux d'élimination également ce qui a permis de maintenir stable le nombre de cornées distribuées et le nombre de greffes déclarées :

- Diminution de 2% du nombre de donneurs (5 601 en 2016 vs 5717 en 2015) et de 2% du nombre de cornées réceptionnées par les banques (11136 vs 11 392),
- Augmentation de 0,8% du nombre de greffons cornéens distribués (4 979 vs 4 941) et diminution de 1% des greffes déclarées (4 459 vs 4 505)
- Diminution de 1,3% du taux d'élimination des cornées
- Diminution des exportations de cornées (178 vs 254 en 2015)

Si la baisse des prélèvements peut sembler mineure, elle doit toutefois être lue en parallèle de trois autres indicateurs:

- Augmentation de 4,3% du nombre de patients nouvellement inscrits sur liste d'attente de greffe de cornée en 2016, (5 912 en 2016 vs 5 667 en 2015)
- Augmentation de 12,3% du nombre de patients en attente de greffe au 1er janvier de l'année (2 910 en 2016 vs 2 592 en 2015)
- Diminution de 4,8% du nombre de patients inscrits et greffés la même année exprimé par millions d'habitants.

Il y a donc plus d'inscrits chaque année, cette augmentation est plus rapide que celle du nombre de greffe chaque année. Progressivement le nombre de patients en attente à l'instant t augmente. En 2016, pour la première fois, les chiffres de prélèvement ont baissé. Toutefois

l'activité de greffe reste relativement stable grâce au taux d'élimination qui s'est amélioré et a permis aux banques de distribuer plus de cornées que l'an dernier. Mais l'ensemble de ces indicateurs doivent nous alerter : les besoins en cornées augmentent. Si la France a réussi depuis plusieurs années à revendiquer sur ce seul tissu une relative autosuffisance, il faut garder à l'esprit que l'effort au prélèvement doit être maintenu en réponse aux besoins des banques et des greffeurs avec des taux d'élimination qu'il faut tendre encore à diminuer au maximum.

Parmi les cornées prélevées, plus de la moitié sont considérées impropres à la greffe. Ces cornées sont alors utilisées pour la recherche scientifique ou détruites. Le taux d'élimination national a diminué à 52,9% en 2016 (versus 54,2% en 2015). Un total de 5 866 cornées ont été non qualifiées en raison de :

- contre-indications médicales de sélection clinique (2,5%)
- marqueurs positifs d'infection virologique ou syphilitique du donneur (16,9%)
- contamination du tissu (bactériologie, mycologie) (11,1%)
- qualité du tissu insuffisante (nombre de cellules endothéliales insuffisant, défaut de transparence, nombre de cellules mortes trop important, mauvaise découpe) (62%)
- 2% non greffées dans les délais de 30 jours post prélèvement et périmées

Le prélèvement de cornées en France a atteint en 2016 le chiffre de 11 139 cornées prélevées (-233 par rapport à l'an dernier ce qui représente au niveau national un taux de 166,7 cornées prélevées par million d'habitants (+15,6 cornées prélevées pmh depuis 2012).

En 2016, le taux de cornées greffées (traduisant l'accès à la greffe) est de 66,7 pmh tandis que le taux de nouveaux inscrits (traduisant les besoins) est de 88,5 pmh. A certaines périodes de l'année, les excédents conduisent à des exportations et/ou des péremptions

Concernant le délai d'attente de greffe, 33,5% des patients sont greffés dans le mois suivant leur inscription sur liste d'attente, 54,5% dans les 2 mois, 76,5% dans les 4 mois, 86,0% dans les 6 mois et 91,0% des patients ont été greffés 8 mois après leur inscription. A l'issue d'une période de 2 ans, après information du patient et de son équipe de greffe il est effectué une désinscription systématique. Il faut toutefois noter une grande disparité dans la répartition géographique des greffons cornéens, certaines banques étant excédentaires tandis que d'autres sont en pénurie. Ainsi, l'objectif du BR que nous développerons est d'améliorer les conditions de conservation des cornées en banques (diminuer la perte cellulaire endothéliale) pour in fine limiter le nombre de greffons recusés pour défaut de qualité.

En Europe

L'European Eye Bank Association (EEBA) a été fondée en 1989. Dans son rapport 2017, elle regroupait 68 banques de cornées réparties dans 22 pays. En 2015, ces 68 banques ont reçu 39 525 cornées ; 66 % des cornées reçues ont été délivrées pour la greffe. Le pourcentage de cornées délivrées est de 55 % après conservation en organoculture.

Aux USA (EBAA, European Bank Association of America, 2010)

Aux Etats unis, 78 banques de cornées sont habilitées pour la conservation et la délivrance de greffons cornéens. 107000 ont été reçues en 2009 et 60000 ont été délivrées pour greffe, soit 56% des greffons reçus. Parmi les greffons délivrés, 43000 ont été distribués aux Etats Unis et 17000 ont été exportés à titre lucratif à travers le monde (notamment dans les pays en voie de développement).

Au total, environ 284 000 cornées sont prélevées chaque année dans le monde et 185 000 sont greffées, toutes techniques confondues alors que les besoins de la population mondiale sont plus proches de 12 millions. Le ratio donneurs/patients en attente de greffe de cornée est estimé à 1/70 (3). La pénurie est donc immense et toutes les pistes susceptibles d'améliorer le nombre, la qualité et la sécurité des greffons doivent être explorées.

Il n'y a actuellement aucune alternative à la greffe de cornées issues de donneurs pour traiter les affections cornéennes. Les xénogreffes sont rejetées systématiquement et rencontrent des obstacles éthiques et sécuritaires insurmontables ; les cornées artificielles sont en échec depuis 40 ans et celles qui existent, malgré tout actuellement, ne concernent que quelques milliers de cas désespérés dans le monde ; les cornées entières bioingéniérées en laboratoire sont encore du domaine du rêve (4-7). Toutes les techniques de greffes actuelles sont donc totalement dépendantes des prélèvements effectués sur donneurs décédés et donc de la conservation.

CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UN NOUVEAU SYSTEME DE CONSERVATION : LE BIOREACTEUR CORNEEN

La conservation des greffons cornéens s'effectue actuellement selon 2 principales techniques dans le monde : hypothermie à court terme à 4°C (5-10 jours), aux USA principalement, et organoculture à +31°C (jusqu'à 35 jours) en Europe (8, 9). Ces 2 techniques bien que très différentes donnent des résultats cliniques équivalents (10, 11). Développées dans les années 70 elles n'ont fait l'objet d'aucune amélioration significative depuis.

Depuis les années 70, plusieurs équipes de recherches ont tenté de développer un dispositif alternatif aux techniques de conservations usuelles permettant la conservation et l'étude des greffons cornéens au plus proche des conditions physiologiques. Le premier de ces dispositifs a été décrit en 1973 par McCarey (273). Il est constitué d'un anneau assurant le blocage de la cornée au niveau de la sclère et d'un système de perfusion maintenant une pression endothéliale de 15 mmHg. Ce dispositif a été conçu pour la conservation et l'étude de cornées de lapin et autorisait la mesure de la pachymétrie cornéenne et de la DCE par microscopie spéculaire. La durée maximale d'étude était d'une dizaine d'heures.

En 1989, Brunette propose un bioréacteur (BR) proche de celui de McCarey sur le principe. Ce BR permettait la conservation de l'intégrité de l'endothélium de greffons cornéens humains jusqu'à 3 semaines (274) grâce la mise en place d'un flux constant de milieu nutritif au niveau endothélial et par la conservation des BR en étuve à CO₂ afin d'éviter l'oxydation et la contamination du milieu nutritif. D'autres équipes proposeront ensuite des modèles de bioréacteurs basés sur le même principe (275-277). En 1996, Foreman propose un BR cornéen innovant composé d'une simple boîte de pétri conservée jusqu'à 3 semaines en étuve à CO₂. La cornée était placée sur un gel nutritif d'Agar/collagène (278). Extrêmement simple, ce système ne permet néanmoins que l'étude de l'épithélium cornéen. Ce principe sera repris et breveté par Fu-Shin X. Yu quelques années plus tard (279, 280). Quatre autres BR cornéens ont été brevetés à l'heure actuelle, mais n'ont à ce jour pas débouchés sur des publications scientifiques ou sur une commercialisation (281-284). Bien que de nombreux BR cornéens aient été étudiés, testés et brevetés, aucun système ne s'est imposé et n'a débouché sur une commercialisation, obligeant chaque laboratoire à développer son propre BR cornéen.

1. Objectifs du bioréacteur cornéen

Comparativement aux différents dispositifs déjà conçus, les deux principaux objectifs qui ont guidé la conception de notre BR cornéen étaient la possibilité de caractériser le greffon cornéen en cours de conservation, sans rompre la stérilité du dispositif et son utilisation pour la conservation en routine des greffons cornéens en banque de cornées.

Le concept était de développer un BR cornéen totalement novateur, destiné à améliorer la conservation des greffons cornéens en rétablissant, dès le prélèvement, des conditions physiologiques de « pression intra-oculaire » et de circulation de liquide au même rythme que l'humeur aqueuse baignant naturellement l'endothélium. Le principal avantage attendu de la conservation de greffons cornéens en BR était donc l'absence d'œdème cornéen induit et donc l'absence de nécessité d'une phase de déturgescence ou d'utilisation de macromolécules altérant l'endothélium (177). Le maintien de la transparence est obtenu via le renouvellement constant du milieu de culture de l'endothélium et l'application d'une pression constante équivalente à la pression intra-oculaire physiologique (entre 15 et 20 mmHg) (274) dans la chambre endothéliale. Le maintien de la transparence apporte de nombreux avantages :

- diminution de la perte cellulaire endothéliale dans les zones de plissements cornéens (285)
- diminution de la perte cellulaire causée par l'étape finale de déturgescence en OC (286)
- possibilité de proposer une caractérisation jusque-là inédite du greffon cornéen (épaisseur, transparence, détection d'interfaces enfouies de chirurgie réfractive, puissance optique du greffon)
- possibilité de proposer la préparation de greffons endothéliaux par une découpe au laser Femtoseconde
- possibilité de délivrer un greffon cornéen de qualité en urgence, sans attendre les 48 h de déturgescence

Le système clos permet quant à lui le maintien de la stérilité tout au long du processus de conservation avec la possibilité, contrairement à la conservation en hypothermie, de réaliser des contrôles microbiologiques. Tous les contrôles peuvent être effectués stérilement, sans nécessiter de disposer d'une salle blanche.

Le Tableau 2 compare les techniques de conservation actuelles (hypothermie et OC) avec les résultats attendus d'une conservation en BR cornéen.

Tableau 2 : Comparaison des techniques de conservation en hypothermie et OC des greffons cornéens par rapport aux résultats attendus d'une conservation en BR

	Conservation 4 °	Conservation OC	Conservation Bioréacteur
Pays utilisateur (Nb de banques)	USA (78) et reste du monde (estimé 50)	Europe (dont France) (150)	Europe puis pays émergents (USA ?)
Nb cornées / an	100 000	100 000	?
Durée conservation habituelle (Maximum)	3 – 4J (max 10J)	2-3 sem. (max 5 sem.)	2 – 5 sem. (max 3 mois)
% perte endothéliale / J de conservation	0.5% / J les 5 premiers jours	1 à 2 % / j	<-0,5%/J (moins de plis, circulation du milieu)
+/- déturgescence	Déturgescence permanente	Déturgescence de 2J = -7 à 14%	Pas de déturgescence.
Transparence au long de la conservation	Oui	Non	Oui
Temps de déturgescence	Permanente	2 à 3 J	Aucun (pas d'œdème)
Milieu de conservation usuel	Sans SVF (commercial)	Conservation = avec 2% SVF (commercial ou home made) Déturgescence = idem + dextran T500	Milieu de conservation usuel sans dextran.
Coût milieux	+	+++ (car 3 à 4 x 100 ml)	+
Coût container / bioréacteur	+	0	++
Coût petit matériel	+	+++	+
Déconditionnement de la cornée pour contrôles qualité	Non	Oui	Non
Contrôles microbiologiques	Non	Oui	Oui
Coût infrastructure	+	+++	0 à ++ (selon normes du pays)
Coût technicien	+	+++	+ à ++ (selon automatisation des contrôles)
% destruction des greffons durant conservation	5%	25%	12%
% destruction des greffons pour autre motif	25%	25%	25%
% total de destruction de greffon	30%	50%	37%
Perspective « contrôles qualité demain »	0	+	+++
Perspective « extension durée conservation »	+ (nouveau milieu ?)	+ (nouveau milieu ?)	+++
Perspective « découpes laser par les banques »	+	0 à +	+++ (greffon transparent et bioréacteur compatible laser)
Perspective « intégration de thérapie cellulaire cornéenne par les banques »	Non	+	+++ (conditions de culture ajustables aux besoins spécifiques)

2. Première version du Bioréacteur : Preuve de concept

Le BR a, dès sa conception en 2011, été pensé pour pouvoir intégrer les instruments de contrôles cellulaires ou tissulaires présents (ou futurs). Pour cela :

- Il est transparent de part en part permettant l'intégration de différents instruments : microscopes, macroscopie, OCT, biomètre, laser, banc de mesure optique...
- Il est doté d'un couvercle épithélial ouvrable si un contact direct avec le dôme cornéen était nécessaire pour réaliser certains contrôles (manipulation réalisée sous poste de sécurité microbiologique). L'ouverture du couvercle épithélial ne perturbe pas la pression coté endothélial ni la circulation de milieu du conservation dans le compartiment endothélial, la cornée reste ainsi transparente.
- Il est réalisé dans un matériau biocompatible, stérilisable à l'oxyde d'éthylène ou en autoclave. L'ensemble du système est clos et stérile.

Quand il est couplé avec un système de régulation (Figure 17), perfusé par du milieu de conservation CorneaMax, dans une étuve à CO₂, à 31°C, il permet de restaurer le gradient de pression entre l'épithélium et l'endothélium, de renouveler en continu le milieu nutritif, et de monitorer des paramètres physicochimiques

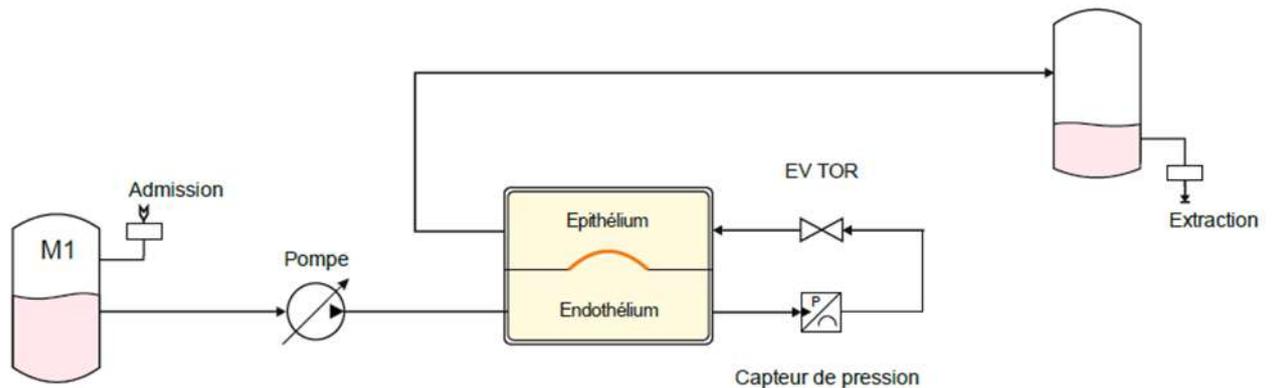


Figure 17 : Principe de base du système de régulation du bioréacteur.

Le milieu de conservation part d'une réserve M1. Une pompe péristaltique détermine le débit (proche de 3µl/min, débit physiologique de l'humeur aqueuse humaine). Le liquide passe dans la chambre endothéliale, dont la pression est mesurée en continue par un capteur de pression (P cible = PIO physiologique de l'œil humain = 15 à 20mmHg), qui pilote une électrovanne tout-ou-rien (EV TOR). L'ouverture de cette dernière est conditionnée par l'atteinte de la consigne en pression pour la chambre endothéliale. C'est un débit à modulation de pression. Il y a ensuite passage dans la chambre épithéliale puis stockage du milieu dans la poche « poubelle » (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne).

Le premier prototype de BR cornéen a été réalisé par l'équipe de chercheur du laboratoire BiiGC afin de réaliser une preuve de concept. Le prototype a été réalisé en P, matériau connu depuis de nombreuses années pour son innocuité en chambre antérieure de l'œil (implants cristalliniens). Le dispositif a été fabriqué par tournage-fraisage, selon des plans originaux conçus au laboratoire (Figure 18).

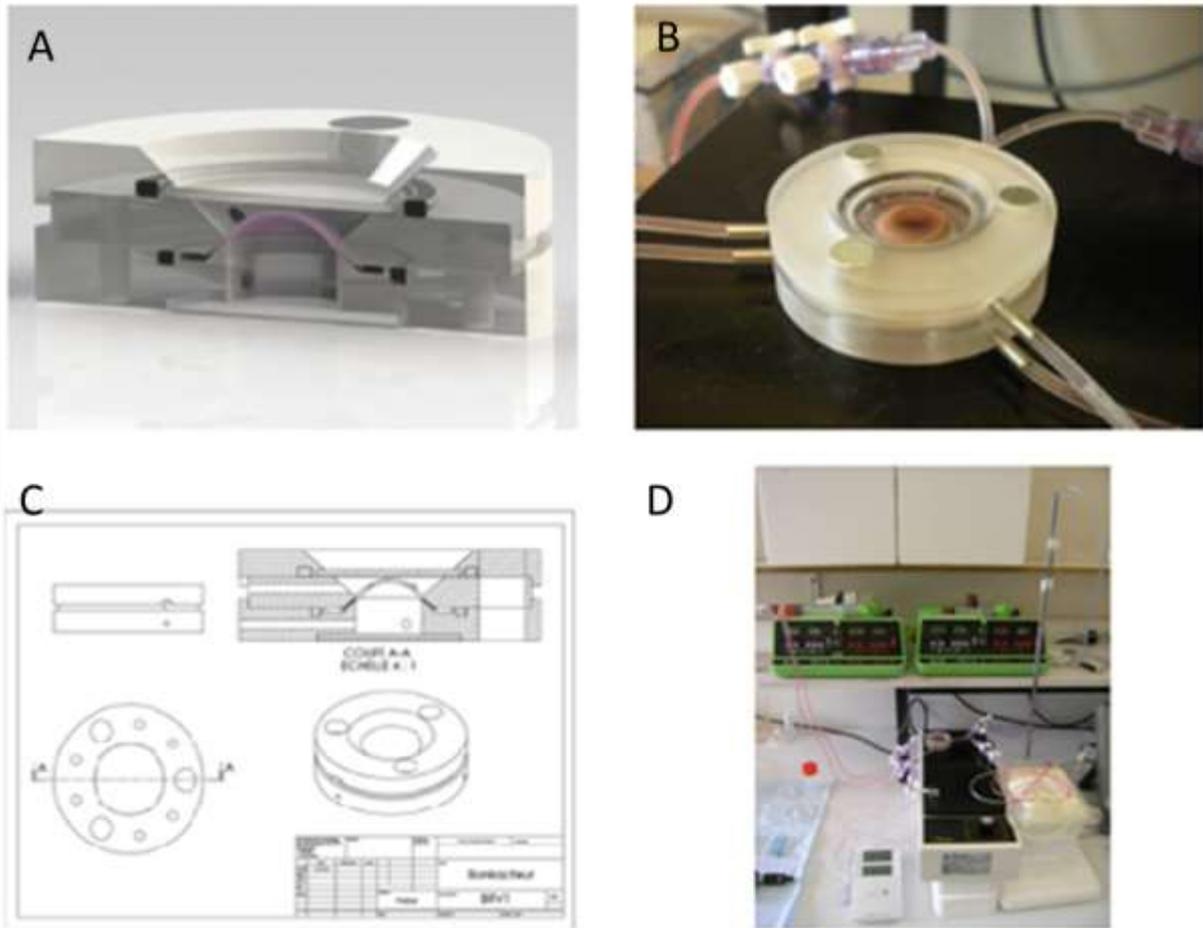


Figure 18. (A) Reproduction en 3-D d'une vue en coupe du BR. (B, D) BR en fonctionnement sur une plaque chauffante. Notez les 3 aimants néodyme permettant le verrouillage du BR. (c) schéma d'une coupe du BR (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne)

La cornée placée en BR est alimentée en chambre endothéliale par du milieu nutritif (CorneaMax) à un débit de $3,3 \mu\text{L}/\text{min}$ à l'aide d'un pousse-seringue, soit légèrement plus que le débit physiologique de $2,6 \mu\text{L}/\text{min}$. Un second pousse-seringue alimente la chambre épithéliale à un débit de $1,6 \mu\text{L}/\text{min}$. Une colonne de milieu permet de maintenir en permanence une pression de 18 mmHg en chambre endothéliale. Le BR est placé sur une plaque chauffante permettant une régulation de la température à 31°C .

Une première série d'essais incluant 10 cornées initialement conservées en OC et testées en BR sur une période de 12 h à 96 h a pu démontrer l'efficacité du système sur de courtes périodes. L'épaisseur et la transparence d'une cornée physiologiques ont pu être atteintes en un temps compris entre 6 et 24 h (Figure 19). La viabilité finale des greffons était comparable à celle des cornées témoins conservées en OC.

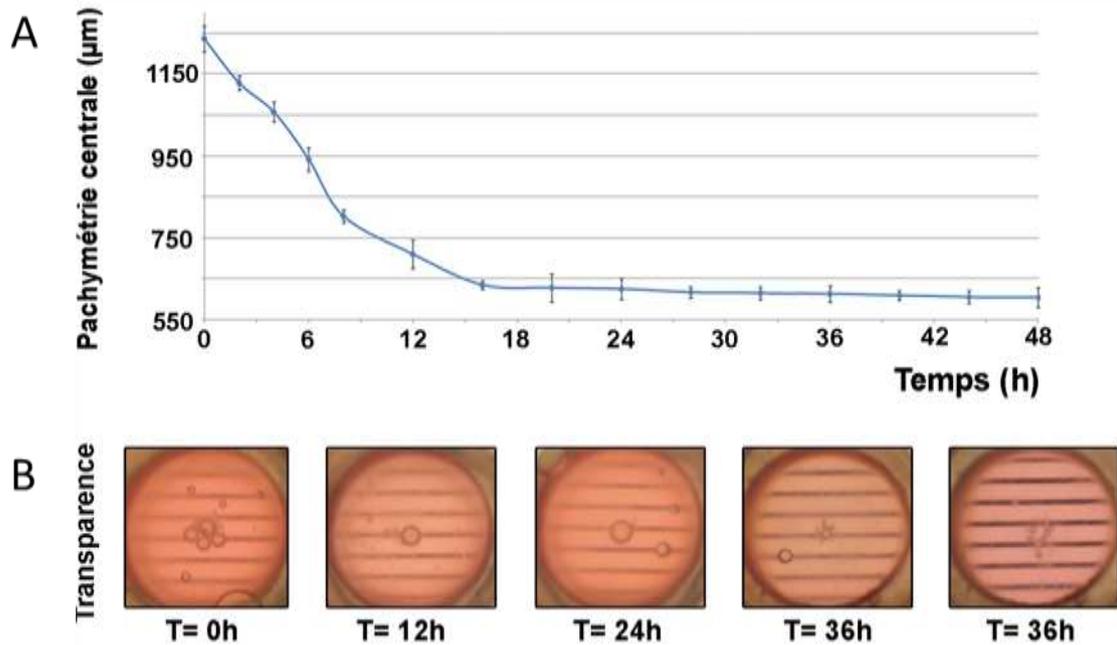


Figure 19. Exemple de résultats de déturgescence et de transparence d'un greffon cornéen humain conservé en BR. (A) suivi au pachymètre à ultrasons de l'épaisseur cornéenne sur 48h ; (B) suivi de la transparence du greffon en BR grâce à la prise en photo d'une mire à travers la cornée en conservation. De petites bulles présentes en chambre endothéliale sont visibles. (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne)

Bien que fonctionnel, les limites de ce premier dispositif sont cependant nombreuses, telles que la faible durée de vie des aimants servant à la fermeture du dispositif, les problèmes de maniabilité dus aux aimants, les problèmes de stérilités inhérents à la colonne de milieu ouverte sur l'extérieur permettant la mise sous pression de l'endothélium, ou encore l'encombrement du système d'instillation de milieu composé de deux pousses-seringues.

3. Evolutions et optimisation des prototypes

Depuis 2011, différentes versions prototypes ont été développées (Figure 20) pour mieux répondre aux exigences techniques du BR. Chaque version a permis de valider certains concepts et a soulevé de nouvelles problématiques. A titre d'exemple, le système de blocage optimal de la cornée pour séparer les 2 chambres endothéliale et épithéliale a été validé à la V8. Les distances de travail entre vitre et cornées étaient validées dès la V6... (Mémoire de master 2

).

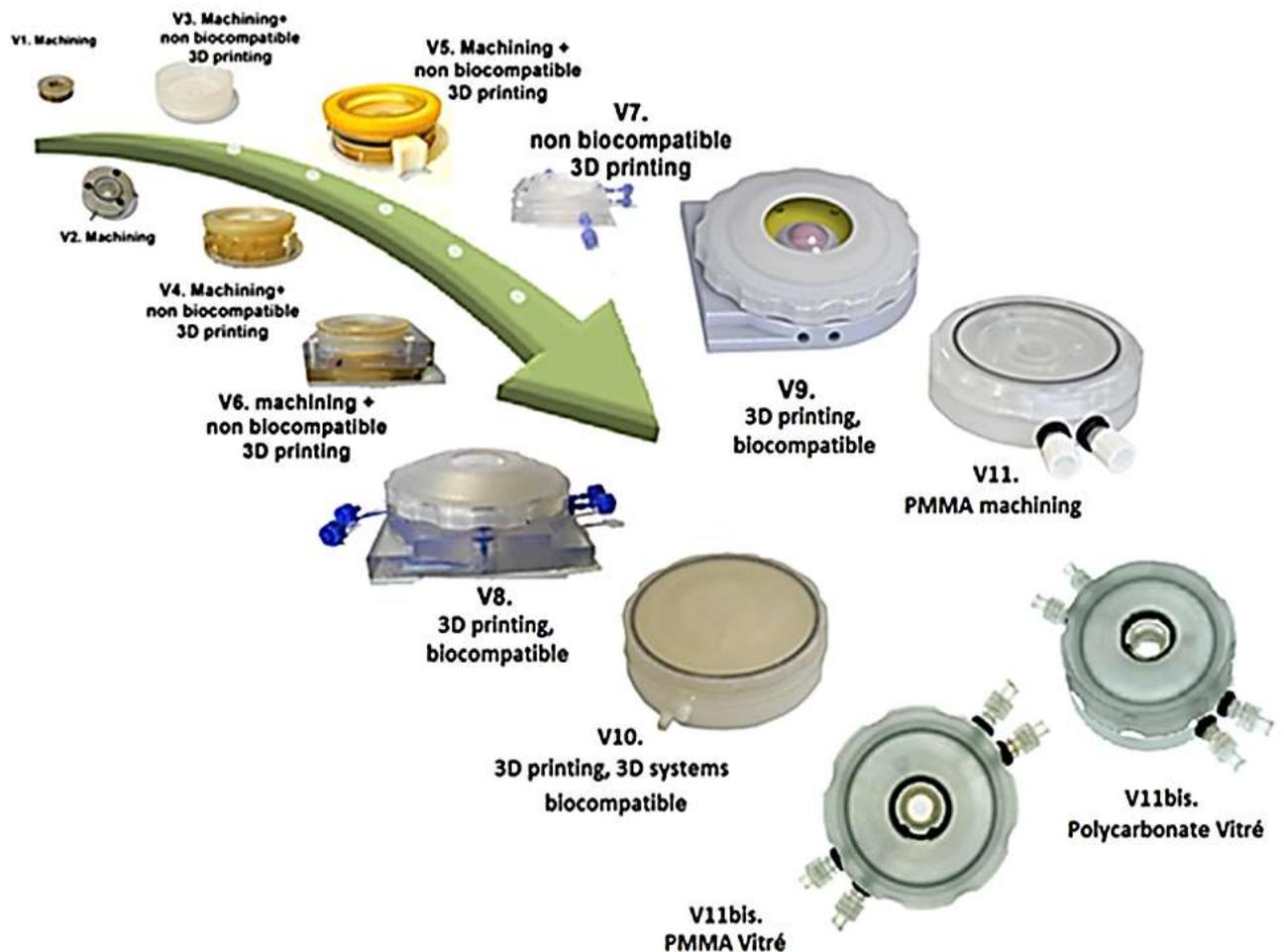


Figure 20 : Evolution des différents prototypes de bioréacteurs depuis 2011 (EA 2521 BiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne).

Après la première version du BR, l'optimisation du prototype a porté essentiellement sur 2 points principaux :

- l'amélioration du système de verrouillage du dispositif
- l'amélioration du système de régulation de débit et de pression

Après réalisation de plan en 3-D à l'aide du logiciel de conception assisté par ordinateur SolidWorks (Dassault Systèmes, Vélizy, France), les différents prototypes ont été fabriqués par impression 3-D en résine biocompatible afin de tester leur fonctionnalité.

Le verrouillage par aimant de la première version du BR avait l'avantage d'être vertical et n'entraînait pas, contrairement à un système de fermeture par vissage, de vrillage de la sclère au verrouillage. Après avoir testé sans succès un système de fermeture par clip (Figure 21A), nous nous sommes tournés vers un système de verrouillage par rampes opposées (-Figure 21B) puis par pas-de-vis, plus résistant (Figure 21C). A noter que le serrage n'est pas effectué directement sur la sclère mais sur une petite pièce intermédiaire permettant d'éviter la torsion de la cornée lors du verrouillage.



Figure 21 : Reconstruction en 3D représentant l'évolution des systèmes de verrouillage du BR. (A) verrouillage par clip (BRv3) ; (B) verrouillage par rampes opposées (Brv6); (C) verrouillage par pas-de-vis (BRv9). (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne, Bernard A.)

Le système de régulation de débit et de pression, initialement composé de deux-pousses-seringues et d'une colonne de milieu permettant le maintien de la pression, a été totalement revisité pour permettre un contrôle précis de la pression endothéliale et rendre le système transportable.

Le dispositif est désormais composé de 5 pièces principales (Figure 22) :

- un infuseur passif, contenant le liquide nutritif et permettant la diffusion à un débit constant du milieu pendant plusieurs jours
- un capteur de pression, enregistrant en permanence la pression en chambre endothéliale
- une électrovalve en sortie de la chambre endothéliale, permettant par son ouverture et sa fermeture la régulation de la pression endothéliale
- un microcontrôleur, pilotant la micro-valve en fonction des informations données par le capteur de pression
- une poche « poubelle » munie d'une valve mécanique permettant la récupération du milieu usagé. Ce système permet donc la régulation en temps réel de la pression endothéliale cornéenne pendant plusieurs semaines.

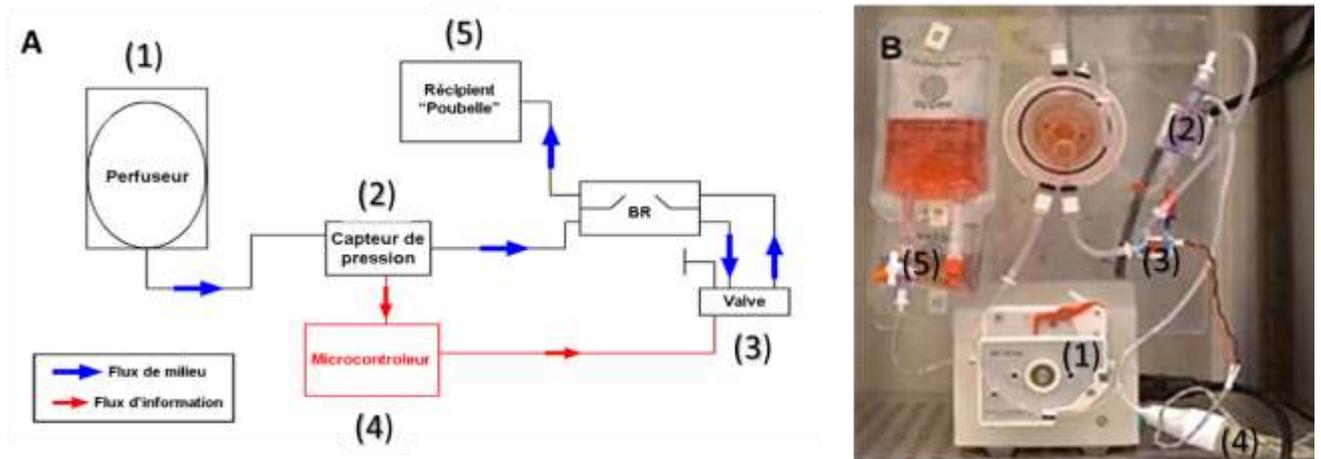


Figure 22 : Représentation schématique (A) et photographie (B) du système de régulation de pression. (1) Perfuseur ; (2) Capteur de pression ; (3) Electrovalve ; (4) Microcontrôleur ; (5) Poche poubelle. (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne, Bernard A.)

4. Dernier prototype : bioréacteur version 12 PEEK (BR V12 PEEK) (Master 2, Garcin T)

La dernière version du bioréacteur est le 13^{ème} prototype développé par le laboratoire (BR V12 PEEK). Le BR V11 avait été réalisé soit en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) stérilisable à l'oxyde d'éthylène (ETO) soit en polycarbonate (PC) (stérilisable en autoclave). Le PMMA et le PC ont montré leurs limites, notamment : transparence imparfaite, fuites entrées-sorties, problème de capot (fuite/serrage trop important). Une V11bis avec vitre en verre de qualité optique a permis de résoudre définitivement le problème de transparence, mais restait imparfaite (bulles d'air s'accumulant derrière la vitre, étanchéité imparfaite). Le polycarbonate a également montré ses limites avec notamment une dégradation non négligeable après plusieurs cycles en autoclave (déformations, craquellement, surface poreuse).

Compte tenu des limites observées sur les V11, une ultime version en PEEK a été développée en vue du projet ABM, projet évaluant en condition réelle la conservation des greffons cornéens en BR sur une durée de 28 et 82 jours. Le PEEK a l'avantage d'être biocompatible, usinable, autoclavable et très résistant (287). Etant donné qu'il n'est pas transparent, il est vitré de part en part, pour permettre les contrôles tissulaires non invasifs usuels. Le design du V12 a également été revu pour permettre de nouveaux contrôles qualité, notamment la réalisation de comptage cellulaires endothéliaux en microscopie spéculaire au travers du BR. La V12 a bénéficié d'autres modifications et notamment d'une réduction de la hauteur globale, entrées-sorties redessinées pour éviter toutes fuites, chanfreins pour diminuer la formation de bulles gênant pour les différents contrôle qualité, changement des joints à usage unique (silicone), vitres en verre durci puis saphir (car après plusieurs cycles en autoclave le verre durci fondait et perdait ses qualités optiques ; le saphir n'est pas altéré dans le temps même après test de 10 cycles). La V12 a été finalisée informatiquement et livrée en janvier 2016.

Par ailleurs, une version industrialisable est toujours en cours de développement par un ingénieur R&D (P. Herbepin). Il s'agit d'un BR repensé pour être exploité de manière hybride soit en version « laboratoire de recherche » bardée de capteurs, soit en version « banque » (moins sophistiqué, produite à « grande échelle »). Elle reprendra l'ensemble des concepts des premières versions, mais avec une interface modulable destinée à répondre à la recherche ainsi qu'à la pratique courante en banque de cornée (Figure 23).

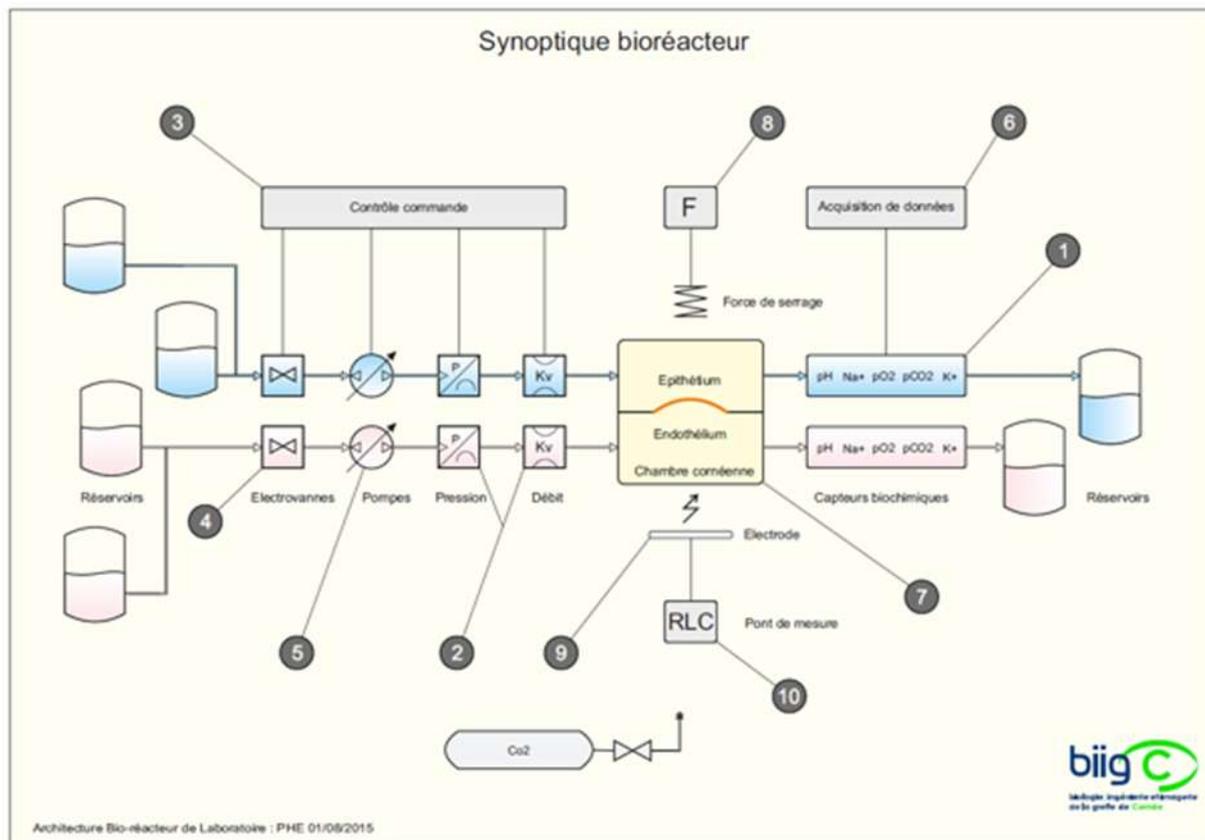


Figure 23 : Le schéma synoptique, principales fonctionnalités du BR de laboratoire (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne).

Les circuits de fluides sont indépendants pour la chambre épithéliale et endothéliale (1). Chacun des circuits étant asservi en pression, en débit (2) et équipé d'une rampe d'instrumentation biochimique avec divers capteurs(1). Ces circuits pourront prendre leurs sources dans différents réservoirs par un jeu de commutation d'électrovannes (4). Le système de pompe sera entièrement revu également (5) : des pompes à membranes piézoélectriques ou des pompes péristaltiques à billes devront être testées et paraissent mieux adaptées que l'utilisation de pompes de type péristaltique à rouleaux actuelle. Tous ces paramètres pourront être contrôlés indépendamment par boîtier « contrôle commande » (3), acquis et gérés (6). L'acheminement des fluides sera également revu (7) avec un système permettant de limiter le nombre et la longueur des tubes (concept de canaux gravés directement dans un support). Un dispositif à force d'appui constante sera utilisé pour brider la cornée dans les chambres (8) : il fera suite à une étude de la force d'appui utile (ou seuil de pression mécanique minimal à exercer) sur la cornée à partir de laquelle l'étanchéité entre les chambres Endothéliale/Epithéliale est assurée à une pression de fluide définie. Ceci solutionnera notamment la création de plis mécaniques infligés au greffon (par une force d'appui non

contrôlée quantitativement et parfois trop importante sur les versions de BR actuelles), délétères pour la DCE. Des électrodes implantées dans les chambres pourront saisir à tout moment les caractéristiques électriques (résistance, inductance, capacitance) de la cornée (9), (10) (Figure 23).

Dans l'hypothèse de l'utilisation d'un milieu de conservation nécessitant une atmosphère avec 5% de CO₂, un générateur de CO₂ judicieusement implanté dans le circuit d'acheminement des fluides, permettra au bioréacteur de fonctionner en dehors de toutes enceintes à CO₂ (concept de circuit complètement hermétique imaginé par un procédé original).

L'architecture physique répondra à un concept modulaire regroupant tous les organes par fonction. Tous les modules seront biocompatibles, démontables et autoclavables (pour réutilisation si utilisé à des fins de recherche, usage unique à terme pour une version complètement industrialisable). La chambre épithéliale sera équipée d'un capteur de niveau de liquide pour faciliter –si nécessaire, en fonction des protocoles de recherche souhaités- la fonction d'air lifting (concept développé pour reproduire les conditions physiologiques d'exposition de l'épithélium au monde extérieur et aux mouvements de paupières périodiques). Différents modes de configuration du bioréacteur de laboratoire seront ainsi possibles. Aussi, la banque de cornée de demain pourrait être vue ainsi (Figure 24).



Figure 24 : Avenir des banques de cornées? (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne).

5. Méthodes de contrôle qualité développées autour du BR (Mémoire de master 2 Garcin T)

Toutes les méthodes de mesure développées autour du BR ont pour rôle de contrôler la qualité du greffon cornéen tout au long de la conservation. Elles doivent être simples, reproductibles, fiables, non invasives et limiter les manipulations pour ne pas risquer de détériorer l'endothélium. Ainsi le BR est un système protecteur pour le greffon tout en permettant de réaliser les contrôles qualité aujourd'hui obligatoires, ainsi que les nouveaux contrôles de demain.

Trois paramètres fondamentaux sont contrôlés durant la conservation en BR (Figure 25) :

- la cartographie d'épaisseur en tomographie par cohérence optique (OCT) centro-cornéenne et moyenne globale par intégration de plusieurs mesures ;
- la transparence (dispositif original du laboratoire BiiGC et utilisé à la banque de cornée de St Etienne en pratique courante) ;
- la densité cellulaire endothéliale (DCE, exprimée en cellules/mm²) : soit DCE « classique » par Microscopie Optique (après préparation au Bleu Trypan et NaCl 0,9%) ou par Microscopie Spéculaire (Non Contact ou Contact sans préparation) ; soit DCE viable par triple coloration Hoechst33342, Ethidium homodimère, Calcéine-AM (HEC) obligatoirement en fin d'étude car la méthode est destructive (toxicité cellulaire des réactifs).

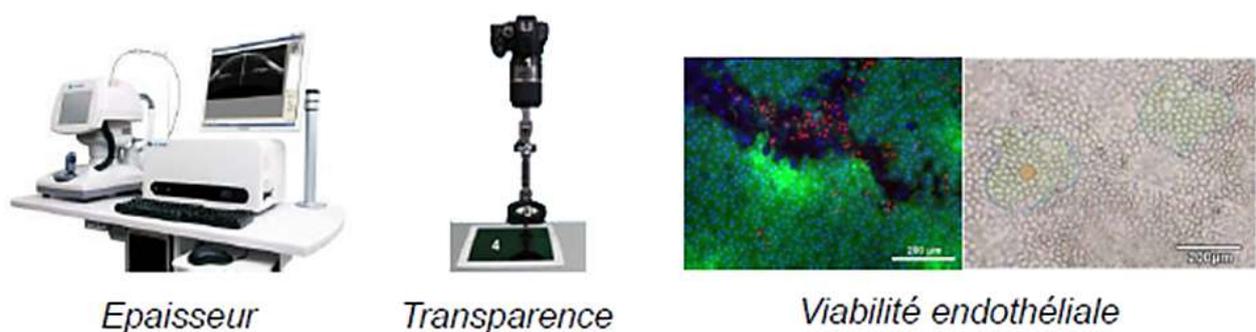


Figure 25 : Méthodes de mesures actuellement disponibles au BiiGC pour les contrôles qualité du greffon (EA 2521 BiiGC, Université Jean Monnet, Saint Etienne).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg.* 2011;37(3):588-98.
2. Gain P TG. La greffe de cornée, un enjeu mondial. *Biofutur.* 2012(332:43-47).
3. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmol.* 2016;134:167-173
4. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med.* 2010;363(2):147-55.
5. Proulx S, Brunette I. Methods being developed for preparation, delivery and transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 2012;95(1):68-75.
6. Mimura T, Yamagami S, Amano S. Corneal endothelial regeneration and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res.* 2013;35:1-17.
7. Zavala J, Lopez Jaime GR, Rodriguez Barrientos CA, Valdez-Garcia J. Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. *Eye (Lond).* 2013;27(5):579-88.
8. Pels L. Organ culture: the method of choice for preservation of human donor corneas. *Br J Ophthalmol.* 1997;81(7):523-5.
9. Delbosc B, Naegelen J, Herve P, Carbillet JP, Montard M. Conservation des cornées humaines en milieu de culture enrichi a +37 degrés C : analyses histologiques et biochimiques. *J Fr Ophtalmol.* 1987;10(10):547-9, 51-5.
10. Frueh BE, Bohnke M. Prospective, randomized clinical evaluation of Optisol vs organ culture corneal storage media. *Arch Ophthalmol.* 2000;118(6):757-60.
11. Rijneveld WJ, Remeijer L, van Rij G, Beekhuis H, Pels E. Prospective clinical evaluation of McCarey-Kaufman and organ culture cornea preservation media: 14-year follow-up. *Cornea.* 2008;27(9):996-1000.
12. Borderie V, Kantelip B, Delbosc B, Carbillet JP, Piquot X, Montard M, et al. Ultrastructural study of human cornea preserved in organ culture media at +31 degrees C. *J Fr Ophtalmol.* 1993;16(2):80-6.
13. Borderie VM, Kantelip BM, Delbosc BY, Oppermann MT, Laroche L. Morphology, histology, and ultrastructure of human C31 organ-cultured corneas. *Cornea.* 1995;14(3):300-10.
14. Crewe JM, Armitage WJ. Integrity of epithelium and endothelium in organ-cultured human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(8):1757-61.
15. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Dumollard JM, Mosnier JF, Burillon C, et al. Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium: trypan blue versus TUNEL technique. *Br J Ophthalmol.* 2002;86(3):306-10.
16. Borderie VM, Scheer S, Touzeau O, Védie F, Carvajal-Gonzalez S, Laroche L. Donor organ cultured corneal tissue selection before penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol.* 1998;82(4):382-8.
17. Thuret G, Chiquet C, Bernal F, Acquart S, Romanet JP, Mouillon M, et al. Prospective, randomized clinical and endothelial evaluation of 2 storage times for cornea donor tissue in organ culture at 31 degrees C. *Arch Ophthalmol.* 2003;121(4):442-50.
18. Albon J, Tullo AB, Aktar S, Boulton ME. Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(10):2887-93.

19. Guindolet D, Crouzet E, He Z, Herbein P, Jumelle C, Perrache C, et al. Storage of Porcine Cornea in an Innovative Bioreactor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(13):5907-17.
20. Doughty MJ, Zaman ML. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach. *Surv Ophthalmol.* 2000;44(5):367-408.
21. Edelhauser HF, Geroski DH, Stern ME. Glucose metabolism in the cornea and lens in elasmobranchs, teleosts and mammals: response to thiol-oxidation. *Fed Proc.* 1980;39(14):3213-21.
22. Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol.* 1957;136(2):263-86.
23. Daxer A, Fratzl P. Collagen fibril orientation in the human corneal stroma and its implication in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(1):121-9.
24. Newton RH, Meek KM. The integration of the corneal and limbal fibrils in the human eye. *Biophys J.* 1998;75(5):2508-12.
25. Boote C, Hayes S, Abahussin M, Meek KM. Mapping collagen organization in the human cornea: left and right eyes are structurally distinct. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(3):901-8.
26. Kikkawa Y. Elastic double system and selective permeability to cations in the stroma of the rabbit cornea. *Jpn J Physiol.* 1956;6(4):300-12.
27. Komai Y, Ushiki T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32(8):2244-58.
28. Muller LJ, Pels E, Vrensen GF. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(4):437-43.
29. Morishige N, Takagi Y, Chikama T, Takahara A, Nishida T. Three-dimensional analysis of collagen lamellae in the anterior stroma of the human cornea visualized by second harmonic generation imaging microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(2):911-5.
30. Morishige N, Petroll WM, Nishida T, Kenney MC, Jester JV. Noninvasive corneal stromal collagen imaging using two-photon-generated second-harmonic signals. *J Cataract Refract Surg.* 2006;32(11):1784-91.
31. Freund DE, McCally RL, Farrell RA, Cristol SM, L'Hernault NL, Edelhauser HF. Ultrastructure in anterior and posterior stroma of perfused human and rabbit corneas. Relation to transparency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(8):1508-23.
32. Sayers Z, Koch MH, Whitburn SB, Meek KM, Elliott GF, Harmsen A. Synchrotron x-ray diffraction study of corneal stroma. *J Mol Biol.* 1982;160(4):593-607.
33. Boote C, Dennis S, Newton RH, Puri H, Meek KM. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(7):2941-8.
34. Scott JE. Proteoglycan: collagen interactions in connective tissues. Ultrastructural, biochemical, functional and evolutionary aspects. *Int J Biol Macromol.* 1991;13(3):157-61.
35. Muller LJ, Pels L, Vrensen GF. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(13):2557-67.

36. Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Michael AF, Sun TT, Kenney MC. Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms. *Lab Invest.* 1995;72(4):461-73.
37. Rao GN, Lohman LE, Aquavella JV. Cell size-shape relationships in corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982;22(2):271-4.
38. Honda H. Geometrical models for cells in tissues. *Int Rev Cytol.* 1983;81:191-248.
39. Ringvold A, Davanger M, Olsen EG. On the spatial organization of the cornea endothelium. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1984;62(6):911-8.
40. Waring GO, 3rd, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology.* 1982;89(6):531-90.
41. He Z, Campolmi N, Gain P, Ha Thi BM, Dumollard JM, Duband S, et al. Revisited microanatomy of the corneal endothelial periphery: new evidence for continuous centripetal migration of endothelial cells in humans. *Stem Cells.* 2012;30(11):2523-34.
42. Amann J, Holley GP, Lee SB, Edelhauser HF. Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *Am J Ophthalmol.* 2003;135(5):584-90.
43. Ottersen OP, Vegge T. Ultrastructure and distribution of intercellular junctions in corneal endothelium. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1977;55(1):69-78.
44. Petroll WM, Hsu JK, Bean J, Cavanagh HD, Jester JV. The spatial organization of apical junctional complex-associated proteins in feline and human corneal endothelium. *Curr Eye Res.* 1999;18(1):10-9.
45. Carlson KH, Bourne WM, McLaren JW, Brubaker RF. Variations in human corneal endothelial cell morphology and permeability to fluorescein with age. *Exp Eye Res.* 1988;47(1):27-41.
46. Watsky MA, McDermott ML, Edelhauser HF. In vitro corneal endothelial permeability in rabbit and human: the effects of age, cataract surgery and diabetes. *Exp Eye Res.* 1989;49(5):751-67.
47. Araie M, Hamano K, Eguchi S, Matsumoto S. Effect of calcium ion concentration on the permeability of the corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31(10):2191-3.
48. Gonnering R, Edelhauser HF, Van Horn DL, Durant W. The pH tolerance of rabbit and human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1979;18(4):373-90.
49. Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata. *Ophthalmology.* 1985;92(6):759-63.
50. Maurice DM. The location of the fluid pump in the cornea. *J Physiol.* 1972;221(1):43-54.
51. Kuang KY, Xu M, Koniarek JP, Fischbarg J. Effects of ambient bicarbonate, phosphate and carbonic anhydrase inhibitors on fluid transport across rabbit corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 1990;50(5):487-93.
52. Barfort P, Maurice D. Electrical potential and fluid transport across the corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 1974;19(1):11-9.
53. Hodson S, Miller F. The bicarbonate ion pump in the endothelium which regulates the hydration of rabbit cornea. *J Physiol.* 1976;263(3):563-77.

54. Kissam R. Ceratoplastice in man. *N Y J Med.* 1844;2:281-282.
55. Von Hippel A. Ein neue methode der hornhauttransplantation. *Albrecht v Graefes Arch Ophthalmol* 1888;34: 108-130.
56. Zirm EK. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). 1906. *Refract Corneal Surg.* 1989;5(4):258-61.
57. Filatov VP. Transplantation of the cornea. *Arch Ophthalmol* 1935;13:321-347.
58. Filatov VP. Transplantation of the cornea from preserved cadaver's eyes. *Lancet* 1937;1:1395-1397.
59. Bigar F, Kaufman HE, McCarey BE, Binder PS. Improved corneal storage for penetrating keratoplasties in man. *Am J Ophthalmol.* 1975;79(1):115-20.
60. McCarey BE, Kaufman HE. Improved corneal storage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1974;13(3):165-73.
61. Doughman DJ, Harris JE, Schmitt MK. Penetrating keratoplasty using 37 C organ cultured cornea. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1976;81(5):778-93.
62. Sperling S. Human corneal endothelium in organ culture. The influence of temperature and medium of incubation. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1979;57(2):269-76.
63. Pels E, Schuchard Y. Organ-culture preservation of human corneas. *Doc Ophthalmol.* 1983;56(1-2):147-53.
64. Delbosc B, Naegelen J, Herve P, Carbillet JP, Montard M. Preservation of human corneas in an enriched culture medium at +37 degrees : histological and biochemical analyses. *J Fr Ophtalmol.* 1987;10(10):547-9, 51-5.
65. Archer DB, Trevor-Roper PD. Organization and administration of Westminster-Moorfields Eye-Bank. *Br J Ophthalmol.* 1967;51(1):1-12.
66. EEBA. Medical Standards. Washington DC: Eye Bank Association of America; 2000.
67. Nordenson J. Allvar Gullstrand (1862-1930). *Documenta Ophthalmologica;* 1962:283-337.
68. Maurice DM. Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. *Experientia.* 1968;24(11):1094-5.
69. Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. *Arch Ophthalmol.* 1975;93(2):143-5.
70. Bourne WM, Kaufman HE. Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo. *Am J Ophthalmol.* 1976;81(3):319-23.
71. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol.* 2016;134(2):167-73.
72. Ghosheh FR, Cremona FA, Rapuano CJ, Cohen EJ, Ayres BD, Hammersmith KM, et al. Trends in penetrating keratoplasty in the United States 1980-2005. *Int Ophthalmol.* 2008;28(3):147-53.
73. Kim BZ, Meyer JJ, Brookes NH, Moffatt SL, Twohill HC, Pendergrast DG, et al. New Zealand trends in corneal transplantation over the 25 years 1991-2015. *Br J Ophthalmol.* 2016.
74. Park CY, Lee JK, Gore PK, Lim CY, Chuck RS. Keratoplasty in the United States: A 10-Year Review from 2005 through 2014. *Ophthalmology.* 2015;122(12):2432-42.

75. Bajracharya L, Gurung R, Demarchis EH, Oliva M, Ruit S, Tabin G. Indications for keratoplasty in Nepal: 2005 - 2010. *Nepal J Ophthalmol*. 2013;5(2):207-14.
76. Qu LJ, Xie LX. Changing indications for lamellar keratoplasty in Shandong, 1993 - 2008. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(22):3268-71.
77. Matthaei M, Sandhaeger H, Hermel M, Adler W, Jun AS, Cursiefen C, et al. Changing Indications in Penetrating Keratoplasty: A Systematic Review of 34 Years of Global Reporting. *Transplantation*. 2016.
78. Keane MC, Mills RA, Coster DJ, Williams KA. Is there evidence for a surgeon learning curve for endothelial keratoplasty in Australia? *Clin Exp Ophthalmol*. 2017.
79. Terry MA, Ousley PJ. Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients: early clinical results. *Cornea*. 2001;20(3):239-43.
80. Terry MA, Ousley PJ. Replacing the endothelium without corneal surface incisions or sutures: the first United States clinical series using the deep lamellar endothelial keratoplasty procedure. *Ophthalmology*. 2003;110(4):755-64.
81. Terry MA, Ousley PJ. Deep lamellar endothelial keratoplasty visual acuity, astigmatism, and endothelial survival in a large prospective series. *Ophthalmology*. 2005;112(9):1541-8.
82. Melles GR, Wijdh RH, Nieuwendaal CP. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea*. 2004;23(3):286-8.
83. Price FW, Jr., Price MO. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 50 eyes: a refractive neutral corneal transplant. *J Refract Surg*. 2005;21(4):339-45.
84. Gorovoy MS. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2006;25(8):886-9.
85. Anshu A, Price MO, Tan DT, Price FW, Jr. Endothelial keratoplasty: a revolution in evolution. *Surv Ophthalmol*. 2012;57(3):236-52.
86. Price MO, Price FW, Jr. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty: comparative outcomes with microkeratome-dissected and manually dissected donor tissue. *Ophthalmology*. 2006;113(11):1936-42.
87. Bucher F, Roters S, Mellein A, Hos D, Heindl LM, Cursiefen C, et al. "OSMO-UT-DSAEK" using THIN-C medium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013;251(9):2181-5.
88. Dickman MM, Kruit PJ, Remeijer L, van Rooij J, Van der Lelij A, Wijdh RH, et al. A Randomized Multicenter Clinical Trial of Ultrathin Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty (DSAEK) versus DSAEK. *Ophthalmology*. 2016;123(11):2276-84.
89. Bachmann B, Schaub F, Cursiefen C. Treatment of corneal endothelial disorders by DMEK and UT-DSAEK. Indications, complications, results and follow-up. *Ophthalmologie*. 2016;113(3):196-203.
90. Busin M, Albe E. Does thickness matter: ultrathin Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol*. 2014;25(4):312-8.
91. Busin M, Madi S, Santorum P, Scorcica V, Beltz J. Ultrathin descemet's stripping automated endothelial keratoplasty with the microkeratome double-pass technique: two-year outcomes. *Ophthalmology*. 2013;120(6):1186-94.

92. Nahum Y, Leon P, Busin M. Postoperative Graft Thickness Obtained With Single-Pass Microkeratome-Assisted Ultrathin Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Cornea*. 2015;34(11):1362-4.
93. Schaub F, Enders P, Roters S, Cursiefen C, Bachmann BO. Single-pass Ultrathin DSAEK (UT-DSAEK) with the SLc Expert Microkeratome(R). *Acta Ophthalmol*. 2016.
94. Choulakian MY, Li JY, Ramos S, Mannis MJ. Single-Pass Microkeratome System for Eye Bank DSAEK Tissue Preparation: Is Stromal Bed Thickness Predictable and Reproducible? *Cornea*. 2016;35(1):95-9.
95. Saunier V, Robinet Perrin A, Costet C, Touboul D. Reproducibility of single-pass donor DSAEK tissue preparation with the MORIA single-use microkeratome. *J Fr Ophtalmol*. 2016;39(9):780-5.
96. Heinzelmann S, Maier P, Bohringer D, Auw-Hadrich C, Reinhard T. Visual outcome and histological findings following femtosecond laser-assisted versus microkeratome-assisted DSAEK. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013;251(8):1979-85.
97. Phillips PM, Phillips LJ, Saad HA, Terry MA, Stolz DB, Stoeger C, et al. "Ultrathin" DSAEK tissue prepared with a low-pulse energy, high-frequency femtosecond laser. *Cornea*. 2013;32(1):81-6.
98. Vetter JM, Butsch C, Faust M, Schmidtman I, Hoffmann EM, Sekundo W, et al. Irregularity of the posterior corneal surface after curved interface femtosecond laser-assisted versus microkeratome-assisted descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2013;32(2):118-24.
99. Bernard A, He Z, Gauthier AS, Trone MC, Baubeau E, Forest F, et al. Femtosecond laser cutting of endothelial grafts: comparison of endothelial and epithelial appplanation. *Cornea*. 2015;34(2):209-17.
100. Murta JN, Rosa AM, Quadrado MJ, Russo AD, Brito SS, Silva MF. Combined use of a femtosecond laser and a microkeratome in obtaining thin grafts for Descemet stripping automated endothelial keratoplasty: an eye bank study. *Eur J Ophthalmol*. 2013;23(4):584-9.
101. Rosa AM, Silva MF, Quadrado MJ, Costa E, Marques I, Murta JN. Femtosecond laser and microkeratome-assisted Descemet stripping endothelial keratoplasty: first clinical results. *Br J Ophthalmol*. 2013;97(9):1104-7.
102. Bonissent A, Vabres B, Orignac I, Martin E, Libeau L, Heymann D, et al. Excimer laser-assisted lamellar endothelial keratoplasty (ExALEK): Technique and results. *J Fr Ophtalmol*. 2016;39(2):178-86.
103. Thannhauser CL, Palka K, Herbst H, Schroeter J, Pham DT. Microkeratome and excimer laser-assisted endothelial keratoplasty (MELEK). *Klin Monbl Augenheilkd*. 2014;231(10):1008-11.
104. Melles GR. Posterior lamellar keratoplasty: DLEK to DSEK to DMEK. *Cornea*. 2006;25(8):879-81.
105. Droutsas K, Lazaridis A, Papaconstantinou D, Brouzas D, Moschos MM, Schulze S, et al. Visual Outcomes After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Versus Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty-Comparison of Specific Matched Pairs. *Cornea*. 2016;35(6):765-71.

106. Phillips PM, Phillips LJ, Muthappan V, Maloney CM, Carver CN. Experienced DSAEK Surgeon's Transition to DMEK: Outcomes Comparing the Last 100 DSAEK Surgeries With the First 100 DMEK Surgeries Exclusively Using Previously Published Techniques. *Cornea*. 2017 Mar;36(3):275-279.
107. van Dijk K, Rodriguez-Calvo-de-Mora M, van Esch H, Frank L, Dapena I, Baydoun L, et al. Two-Year Refractive Outcomes After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea*. 2016 Dec;35(12):1548-15552016.
108. Price MO, Price FW, Jr. Descemet's membrane endothelial keratoplasty surgery: update on the evidence and hurdles to acceptance. *Curr Opin Ophthalmol*. 2013;24(4):329-35.
109. Rose-Nussbaumer J, Alloju S, Chamberlain W. Clinical Outcomes of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty During the Surgeon Learning Curve Versus Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty Performed at the Same Time. *J Clin Exp Ophthalmol*. 2016;7(5).
110. Schaub F, Enders P, Bluhm C, Bachmann BO, Cursiefen C, Heindl LM. Two-Year Course of Corneal Densitometry after Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Am J Ophthalmol*. 2017 Mar;175:60-67
111. Williams KAK, Miriam C; Galettis, Rachel A; Jones, Victoria J; Mills, Richard Arthur; Coster, Douglas John The Australian Corneal Graft Registry 2015 Report. 2015.
112. Melles GR, Lander F, Rietveld FJ. Transplantation of Descemet's membrane carrying viable endothelium through a small scleral incision. *Cornea*. 2002;21(4):415-8.
113. Dapena I, Moutsouris K, Droutsas K, Ham L, van Dijk K, Melles GR. Standardized "no-touch" technique for descemet membrane endothelial keratoplasty. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(1):88-94.
114. Saad A, Guilbert E, Grise-Dulac A, Sabatier P, Gatinel D. Intraoperative OCT-Assisted DMEK: 14 Consecutive Cases. *Cornea*. 2015;34(7):802-7.
115. Kruse FE, Laaser K, Cursiefen C, Heindl LM, Schlotzer-Schrehardt U, Riss S, et al. A stepwise approach to donor preparation and insertion increases safety and outcome of Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2011;30(5):580-7.
116. Ignacio TS, Nguyen TT, Sarayba MA, Sweet PM, Piovanetti O, Chuck RS, et al. A technique to harvest Descemet's membrane with viable endothelial cells for selective transplantation. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(2):325-30.
117. Sharma A, Woodman A. Comment on transplantation of Descemet's membrane carrying viable endothelium through a small scleral incision. *Cornea*. 2002;21(8):840; author reply
118. Feizi S, Javadi MA. DMEK lenticule preparation using an air dissection technique: central versus peripheral injection. *Eur J Ophthalmol*. 2016;26(1):6-11.
119. Anwar M, Teichmann KD. Big-bubble technique to bare Descemet's membrane in anterior lamellar keratoplasty. *J Cataract Refract Surg*. 2002;28(3):398-403.
120. Szurman P, Januschowski K, Rickmann A, Damm LJ, Boden KT, Opitz N. Novel liquid bubble dissection technique for DMEK lenticule preparation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016;254(9):1819-23.
121. Muraine M, Gueudry J, He Z, Piselli S, Lefevre S, Toubeau D. Novel technique for the preparation of corneal grafts for descemet membrane endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2013;156(5):851-9.

122. Yoeruek E, Hofmann J, Bartz-Schmidt KU. Comparison of swollen and dextran deswollen organ-cultured corneas for Descemet membrane dissection preparation: histological and ultrastructural findings. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(13):8036-40.
123. Parekh M, Ruzza A. Preservation of Preloaded DMEK Lenticules in Dextran and Non-Dextran-Based Organ Culture Medium. *J Ophthalmol.* 2016;2016:5830835.
124. Parekh M, Ruzza A, Di Mundo R, Ferrari S, Recchia G, Elbadawy H, et al. Role of dextran in maintaining adhesive and stiffness properties of prestripped DMEK lenticules. *Eur J Ophthalmol.* 2016:0.
125. Heinzelmann S, Bohringer D, Eberwein P, Reinhard T, Maier P. Graft dislocation and graft failure following Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK) using precut tissue: a retrospective cohort study. *J Ophthalmol.* 2017;255(1):127-33.
126. Tenkman LR, Price FW, Price MO. Descemet membrane endothelial keratoplasty donor preparation: navigating challenges and improving efficiency. *Cornea.* 2014;33(3):319-25.
127. Heinzelmann S, Huther S, Bohringer D, Eberwein P, Reinhard T, Maier P. Influence of donor characteristics on descemet membrane endothelial keratoplasty. *Cornea.* 2014;33(6):644-8.
128. Schaub F, Enders P, Zachewicz J, Heindl LM, Stanzel TP, Cursiefen C, et al. Impact of Donor Age on Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Outcome: Evaluation of Donors Aged 17-55 Years. *Am J Ophthalmol.* 2016;170:119-27.
129. Gorovoy IR, Cui QN, Gorovoy MS. Donor tissue characteristics in preparation of DMEK grafts. *Cornea.* 2014;33(7):683-5.
130. Armitage WJ, Easty DL. Factors influencing the suitability of organ-cultured corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(1):16-24.
131. Technical guidelines for ocular tissue. 2017. Available at : <http://www.europeaneyebanks.org/article/Technical%2BGuidelines%2B%2528Rev7%2529/5/>
132. Price FW, Jr., Feng MT, Price MO. Evolution of Endothelial Keratoplasty: Where Are We Headed? *Cornea.* 2015;34 Suppl 10:S41-7.
133. Afshari NA, Li YJ, Pericak-Vance MA, Gregory S, Klintworth GK. Genome-wide linkage scan in fuchs endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(3):1093-7.
134. Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M, Kageyama T, Takashiba K, Fujioka T, et al. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium. *PLoS One.* 2012;7(9):e45435.
135. Gain P TG. La greffe de cornée, un enjeu mondial. *Biofutur.* 2012(332):43-47).
136. GarcinT GA, Trone MC, Acquart S, Pugnet JL, Peyragrosse T, Rogues F, Delbosc B, Thuret G, Gain P Prélèvement et conservation des greffons cornéens, *EMC Ophtalmologie* 2017.
137. Muraine M, Menguy E, Eupherte L, Martin J, Pouille P, Sadorge T, et al. An important step in cornea procurement: interview with the family of donors. *J Fr Ophtalmol.* 1997;20(1):25-30.
138. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Pugnet JL, Rizzi P, Tchapyguine F, et al. Cornea donation consent by telephone. *J Fr Ophtalmol.* 2002;25(6):577-83.

139. Gain P, Thuret G, Loup Pugnet J, Rizzi P, Acquart S, Le Petit JC, et al. Obtaining cornea donation consent by telephone. *Transplantation*. 2002;73(6):926-9.
140. Agence de la biomédecine. Rapport d'activité 2015.
141. Meier FM, Tschanz SA, Ganzfried R, Epstein D. A comparative assessment of endothelium from pseudophakic and phakic donor corneas stored in organ culture. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(4):400-3.
142. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Rizzi P, Pugnet JL, Acquart S, et al. Cornea procurement from very old donors: post organ culture cornea outcome and recipient graft outcome. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(4):404-11.
143. Chang SD, Pecego JG, Zadnik K, Danneffel MB, Mutti DO, Mannis MJ. Factors influencing graft clarity. *Cornea*. 1996;15(6):577-81.
144. Williams KA, Muehlberg SM, Lewis RF, Coster DJ. Influence of advanced recipient and donor age on the outcome of corneal transplantation. Australian Corneal Graft Registry. *Br J Ophthalmol*. 1997;81(10):835-9.
145. Hofmann N, Derks M, Borgel M, Engelmann K. Influence of the donor age on graft survival : Is the demographic change also important for corneal tissue donation. *Ophthalmologe*. 2017;114(5):440-4.
146. Schaub F, Enders P, Adler W, Bachmann BO, Cursiefen C, Heindl LM. Impact of donor graft quality on deep anterior lamellar Keratoplasty (DALK). *BMC Ophthalmol*. 2017;17(1):204.
147. Feizi S, Javadi MA, Kanavi MR, Javadi F. Effect of donor graft quality on clinical outcomes after deep anterior lamellar keratoplasty. *Cornea*. 2014;33(8):795-800.
148. EEBA. *Minimum Medical Standars (MMS), recommandations 2015*. 2015, *European Eye Bank Association*.
149. Borderie VM, Laroche L. Microbiologic study of organ-cultured donor corneas. *Transplantation*. 1998;66(1):120-3.
150. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Vautrin AC, Carricajo A, Tchapyguine F, et al. Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media. *J Fr Ophthalmol*. 2002;25(4):367-73.
151. Thuret G, Carricajo A, Chiquet C, Vautrin AC, Celle N, Boureille M, et al. Sensitivity and rapidity of blood culture bottles in the detection of cornea organ culture media contamination by bacteria and fungi. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(12):1422-7.
152. Thuret G, Carricajo A, Vautrin AC, Raberin H, Acquart S, Garraud O, et al. Efficiency of blood culture bottles for the fungal sterility testing of corneal organ culture media. *Br J Ophthalmol*. 2005;89(5):586-90.
153. Hermel M, Salla S, Hamsley N, Steinfeld A, Walter P. Detection of contamination during organ culture of the human cornea. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010;248(1):117-26.
154. Utheim TP, Raeder S, Utheim OA, de la Paz M, Roald B, Lyberg T. Sterility control and long-term eye-bank storage of cultured human limbal epithelial cells for transplantation. *Br J Ophthalmol*. 2009;93(7):980-3.
155. Albon J, Armstrong M, Tullo AB. Bacterial contamination of human organ-cultured corneas. *Cornea*. 2001;20(3):260-3.

156. Kiatos E, Armstrong JJ, Hutnik CM, Tsioros SM, Malvankar-Mehta MS, Hodge WG. The value of corneoscleral rim cultures in keratoplasty: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Clinicoecon Outcomes Res.* 2017;9:459-74.
157. Zanetti E, Bruni A, Mucignat G, Camposampiero D, Frigo AC, Ponzin D. Bacterial contamination of human organ-cultured corneas. *Cornea.* 2005;24(5):603-7.
158. Jadeja JN, Patel BD, Shanbhag SS. The grave necessity to make eye bank specular microscopy mandatory in all eye banks in the subcontinent to improve utilization of scarce donor corneas. *Indian J Ophthalmol.* 2013;61(12):711-7.
159. Waltman SR, Palmberg PF. Modified M-K medium for human penetrating keratoplasty. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 1979;99(1):205-6.
160. Kaufman HE, Varnell ED, Kaufman S, Beuerman RW, Barron BA. K-Sol corneal preservation. *Am J Ophthalmol.* 1985;100(2):299-304.
161. Sieck EA, Enzenauer RW, Cornell FM, Butler C. Contamination of K-Sol corneal storage medium with *Propionibacterium acnes*. *Arch Ophthalmol.* 1989;107(7):1023-4.
162. Lindstrom RL, Doughman DJ, Skelnik DL, Mindrup EA. Corneal preservation at 4 degrees C with chondroitin sulfate containing medium. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1987;85:332-49.
163. Lass JH, Reinhart WJ, Bruner WE, Kachmer ML, Lomeo MD, Morgan KM, et al. Comparison of corneal storage in K-Sol and chondroitin sulfate corneal storage medium in human corneal transplantation. *Ophthalmology.* 1989;96(5):688-97.
164. Kaufman HE, Beuerman RW, Steinemann TL, Thompson HW, Varnell ED. Optisol corneal storage medium. *Arch Ophthalmol.* 1991;109(6):864-8.
165. Smith TM, Popplewell J, Nakamura T, Trousdale MD. Efficacy and safety of gentamicin and streptomycin in Optisol-GS, a preservation medium for donor corneas. *Cornea.* 1995;14(1):49-55.
166. Nelson LR, Hodge DO, Bourne WM. In vitro comparison of Chen medium and Optisol-GS medium for human corneal storage. *Cornea.* 2000;19(6):782-7.
167. Means TL, Geroski DH, Hadley A, Lynn MJ, Edelhauser HF. Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. *Arch Ophthalmol.* 1995;113(6):805-9.
168. Lass JH, Musch DC, Gordon JF, Laing RA. Epidermal growth factor and insulin use in corneal preservation. Results of a multi-center trial. The Corneal Preservation Study Group. *Ophthalmology.* 1994;101(2):352-9.
169. Lass JH, Putman SC, Bruner WE, Cano DB, Greiner JV, Glonek T. The effect of hEGF and insulin on corneal metabolism during Optisol storage. *Cornea.* 1994;13(3):243-9.
170. Doughman DJ, Van Horn D, Harris JE, Miller GE, Lindstrom R, Summerlin W, et al. Endothelium of the human organ cultured cornea: an electron microscopic study. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1973;71:304-24; discussion 25-8.
171. Summerlin WT, Miller GE, Harris JE, Good RA. The organ-cultured cornea: an in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1973;12(3):176-80.
172. EEBA. European Eye Bank Association Directory. Fourteenth Edition. 2006. Amsterdam, Netherlands: European Eye Bank Association; 2006.
173. Frueh BE, Bohnke M. Corneal grafting of donor tissue preserved for longer than 4 weeks in organ-culture medium. *Cornea.* 1995;14(5):463-6.

174. Ehlers H, Ehlers N, Hjortdal JO. Corneal transplantation with donor tissue kept in organ culture for 7 weeks. *Acta Ophthalmol Scand.* 1999;77(3):277-8.
175. Bohnke M. [Donor tissue for keratoplasty. Report of experiences by the Hamburg cornea bank]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 1991;198(6):562-71.
176. Borderie V, Kantelip B, Delbosc B, Carbillet JP, Piquot X, Montard M, et al. Ultrastructural study of human cornea preserved in organ culture media at +31 degrees C. *J Fr Ophtalmol.* 1993;16(2):80-6.
177. Pels E, Schuchard Y. The effects of high molecular weight dextran on the preservation of human corneas. *Cornea.* 1984;3(3):219-27.
178. Piquot X, Delbosc B, Herve P, Montard M, Royer J. Medium-term preservation of human corneas in an enriched culture medium at +37 degrees Centigrade. *J Fr Ophtalmol.* 1989;12(5):353-60.
179. Sperling S. Early morphological changes in organ cultured human corneal endothelium. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1978;56(5):785-92.
180. Sperling S. Evaluation of the endothelium of human donor corneas by induced dilation of intercellular spaces and trypan blue. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1986;224(5):428-34.
181. Brightbill F. *Corneal surgery; Theory, technique and tissue* Saint-Louis: Mosby Co, 1993.
182. Laroche L, Borderie V, Lopez M, Saraux H. Microbiological safety and endothelial quality control during preservation of corneal grafts at +31 degree C. *J Fr Ophtalmol.* 1994;17(5):314-20.
183. Pels E, Schuchard Y. *Organ culture in the Netherlands.* Saint-Louis: Mosby Co; 1993.
184. Spelsberg H, Reinhard T, Sundmacher R. Epithelial damage of corneal grafts after prolonged storage in dextran-containing organ culture medium - a prospective study. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2002;219(6):417-21.
185. Lin CP, Bohnke M, Draeger J. Effect of dextran on predamaged corneal endothelium: an organ culture study. *Ophthalmic Res.* 1992;24(3):125-8.
186. Borderie VM, Baudrimont M, Lopez M, Carvajal S, Laroche L. Evaluation of the deswelling period in dextran-containing medium after corneal organ culture. *Cornea.* 1997;16(2):215-23.
187. Thuret G, Manissolle C, Campos-Guyotat L, Guyotat D, Gain P. Animal compound-free medium and poloxamer for human corneal organ culture and deswelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(3):816-22.
188. Zhao M, Thuret G, Piselli S, Pipparelli A, Acquart S, Peoc'h M, et al. Use of poloxamers for deswelling of organ-cultured corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(2):550-9.
189. Moller-Pedersen T, Hartmann U, Ehlers N, Engelmann K. Evaluation of potential organ culture media for eye banking using a human corneal endothelial cell growth assay. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001;239(10):778-82.
190. Hempel B, Bednarz J, Engelmann K. Use of a serum-free medium for long-term storage of human corneas. Influence on endothelial cell density and corneal metabolism. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2001;239(10):801-5.

191. Bednarz J, Doubilei V, Wollnik PC, Engelmann K. Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(12):1416-20.
192. Doughman DJ, Van Horn D, Harris JE, Miller GE, Lindstrom R, Good RA. The ultrastructure of human organ-cultured cornea. I. Endothelium. *Arch Ophthalmol.* 1974;92(6):516-23.
193. Moll AC, Van Rij G, Beekhuis WH, Reneradel de Lavalette JH, Hermans J, Pels E, et al. Effect of donor cornea preservation in tissue culture and in McCarey-Kaufmann medium on corneal graft rejection and visual acuity. *Doc Ophthalmol.* 1991;78(3-4):273-8.
194. Rijneveld WJ, Beekhuis WH, van Rij G, Rinkel-van Driel B, Pels E. Clinical comparison of grafts stored in McCarey-Kaufman medium at 4 degrees C and in corneal organ culture at 31 degrees C. *Arch Ophthalmol.* 1992;110(2):203-5.
195. Sperling S, Olsen T, Ehlers N. Fresh and cultured corneal grafts compared by post-operative thickness and endothelial cell density. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1981;59(4):566-75.
196. Borderie VM, Touzeau O, Allouch C, Scheer S, Carvajal-Gonzalez S, Laroche L. The results of successful penetrating keratoplasty using donor organ-cultured corneal tissue. *Transplantation.* 1999;67(11):1433-8.
197. Nelson JD, Mindrup EA, Chung CK, Lindstrom RL, Doughman DJ. Fungal contamination in organ culture. *Arch Ophthalmol.* 1983;101(2):280-3.
198. Farrell PL, Fan JT, Smith RE, Trousdale MD. Donor cornea bacterial contamination. *Cornea.* 1991;10(5):381-6.
199. Gopinathan U, Agrawal V, Sharma S, Rao GN. Donor corneal rim contamination by gentamicin-resistant organisms. *Indian J Ophthalmol.* 1994;42(2):71-4.
200. Varner AC, Rich LF, Crow BL, MacRae S. Survival of streptococcus in optisol-GS medium. *J Refract Surg.* 1995;11(3):207-9.
201. Merchant A, Zacks CM, Wilhelmus K, Durand M, Dohlman CH. Candidal endophthalmitis after keratoplasty. *Cornea.* 2001;20(2):226-9.
202. Cameron JA, Antonios SR, Cotter JB, Habash NR. Endophthalmitis from contaminated donor corneas following penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol.* 1991;109(1):54-9.
203. Hagenah M, Bohnke M, Engelmann K, Winter R. Incidence of bacterial and fungal contamination of donor corneas preserved by organ culture. *Cornea.* 1995;14(4):423-6.
204. Leveille AS, McMullan FD, Cavanagh HD. Endophthalmitis following penetrating keratoplasty. *Ophthalmology.* 1983;90(1):38-9.
205. Poole TG, Inslar MS. Contamination of donor cornea by gentamicin-resistant organisms. *Am J Ophthalmol.* 1984;97(5):560-4.
206. Mathers WD, Lemp MA. Corneal rim cultures. *Cornea.* 1987;6(3):231-3.
207. Kloess PM, Stulting RD, Waring GO, 3rd, Wilson LA. Bacterial and fungal endophthalmitis after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol.* 1993;115(3):309-16.
208. Antonios SR, Cameron JA, Badr IA, Habash NR, Cotter JB. Contamination of donor cornea: postpenetrating keratoplasty endophthalmitis. *Cornea.* 1991;10(3):217-20.

209. Eastcott HH, Cross AG, Leigh AG, North DP. Preservation of corneal grafts by freezing. *Lancet*. 1954;266(6805):237-9.
210. Mueller FO, Casey TA, Trevor-Roper PD. Use of deep-frozen human cornea in full-thickness grafts. *Br Med J*. 1964;2(5407):473-5.
211. Hagenah M, Bohnke M. Corneal cryopreservation with chondroitin sulfate. *Cryobiology*. 1993;30(4):396-406.
212. Armitage WJ, Rich SJ. Vitrification of organized tissues. *Cryobiology*. 1990;27(5):483-91.
213. Wusteman MC, Boylan S, Pegg DE. Cryopreservation of rabbit corneas in dimethyl sulfoxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(10):1934-43.
214. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Comparison of three methods for human corneal cryopreservation that utilize dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*. 1999;39(1):47-57.
215. Wusteman MC, Armitage JW, Wang LH, Busza AL, Pegg DE. Cryopreservation studies with porcine corneas. *Curr Eye Res*. 1999;19(3):228-33.
216. Halberstadt M, Athmann S, Hagenah M. Corneal cryopreservation with dextran. *Cryobiology*. 2001;43(1):71-80.
217. Halberstadt M, Bohnke M, Athmann S, Hagenah M. Cryopreservation of human donor corneas with dextran. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(12):5110-5.
218. Ehlers N, Sperling S, Olsen T. Post-operative thickness and endothelial cell density in cultivated, cryopreserved human corneal grafts. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1982;60(6):935-44.
219. Kaufman HE, Escapini H, Capella JA, Robbins JE, Kaplan M. Living preserved corneal tissue for penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol*. 1966;76(4):471-6.
220. Schultz RO, Matsuda M, Yee RW, Glasser DB, Sabin SM, Edelhauser HF. Long-term survival of cryopreserved corneal endothelium. *Ophthalmology*. 1985;92(12):1663-7.
221. Brunette I, Le Francois M, Tremblay MC, Guertin MC. Corneal transplant tolerance of cryopreservation. *Cornea*. 2001;20(6):590-6.
222. Sperling S. Cryopreservation of human cadaver corneas regenerated at 31 degrees C in a modified tissue culture medium. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1981;59(1):142-8.
223. Ruusuvaara P. Effects of corneal preservation, donor age, cadaver time and postoperative period on the graft endothelium. A specular microscopic study. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1979;57(5):868-81.
224. Hagenah M, Bohnke M. Latent endothelial cell damage after experimental corneal cryopreservation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1993;31(9):529-32.
225. Meyer RF, Bobb KC. Corneal epithelium in penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 1980;90(2):142-7.
226. Slettedal JK, Lyberg T, Ramstad H, Nicolaisen B. Donor corneas for transplantation: a scanning electron microscopic study of the epithelium. *Acta Ophthalmol Scand*. 2006;84(4):516-21.
227. Soni NG, Hoover CK, Da Silva H, Jeng BH. Preservation of the Corneal Epithelium in Different Corneal Storage Media. *Cornea*. 2015;34(11):1400-3.

228. Means TL, Geroski DH, L'Hernault N, Grossniklaus HE, Kim T, Edelhauser HF. The corneal epithelium after optisol-GS storage. *Cornea*. 1996;15(6):599-605.
229. Zagon IS, Sassani JW, Ruth TB, McLaughlin PJ. Epithelial adhesion complexes and organ culture of the human cornea. *Brain Res*. 2001;900(2):205-13.
230. Van Horn DL, Doughman DJ, Harris JE, Miller GE, Lindstrom R, Good RA. Ultrastructure of human organ-cultured cornea. II. Stroma and epithelium. *Arch Ophthalmol*. 1975;93(4):275-7.
231. Aakre BM, Doughty MJ. In vitro hydration kinetics of recent post-mortem tissue versus pre-dried corneal stromal tissue. *Exp Eye Res*. 1997;65(1):127-33.
232. Breslin CW, Kaufman HE, Centifanto YM. Dextran flux in M-K medium-stored human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977;16(8):752-6.
233. Hull DS, Green K, Bowman K. Dextran uptake into, and loss from, corneas stored in intermediate-term preservative. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1976;15(8):663-6.
234. Muller LJ, Pels E, Vrensen GF. The effects of organ-culture on the density of keratocytes and collagen fibers in human corneas. *Cornea*. 2001;20(1):86-95.
235. Delbosc B, Piquot X, Erbezci M. Physiology of the cornea: stromal hydration and its regulation. *J Fr Ophtalmol*. 1993;16(2):129-36.
236. Geeraets R, McLester WD, McMullan FD. Corneal endothelium under various storage conditions. *Am J Ophthalmol*. 1977;83(2):206-12.
237. Kim KS, Edelhauser HF, Holley GP, Geroski DH, Lynn M, Walsh GE. Corneal endothelial permeability of human tissue after storage in Optisol. *Am J Ophthalmol*. 1994;117(3):385-93.
238. Stainer GA, Brightbill FS, Calkins B. A comparison of corneal storage in moist chamber and McCarey-Kaufman medium in human keratoplasty. *Ophthalmology*. 1981;88(1):46-9.
239. McCarey BE, Meyer RF, Kaufman HE. Improved corneal storage for penetrating keratoplasties in humans. *Ann Ophthalmol*. 1976;8(12):1488-92, 95.
240. Binder PS, Wickham MG. M-K medium and postmortem cytologic damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1978;17(2):159-70.
241. Sachs U, Goldman K, Valenti J, Kaufman HE. Corneal storage at room temperature. *Arch Ophthalmol*. 1978;96(6):1075-7.
242. Aquavella JV, Van Horn DL, Haggerty CJ. Corneal preservation using M-K medium. *Am J Ophthalmol*. 1975;80(5):791-9.
243. Farge EJ, Fort RA, Wilhelmus KR, Gilbert ML, Mehta RS, Kretzer FL. Morphologic changes of K-Sol preserved human corneas. *Cornea*. 1989;8(3):159-69.
244. Keates RH, Rabin B. Extending corneal storage with 2.5% chondroitin sulfate (K-Sol). *Ophthalmic Surg*. 1988;19(11):817-20.
245. Bourne WM. Endothelial cell survival on transplanted human corneas preserved at 4 C in 2.5% chondroitin sulfate for one to 13 days. *Am J Ophthalmol*. 1986;102(3):382-6.
246. Lass JH, Bourne WM, Musch DC, Sugar A, Gordon JF, Reinhart WJ, et al. A randomized, prospective, double-masked clinical trial of Optisol vs DexSol corneal storage media. *Arch Ophthalmol*. 1992;110(10):1404-8.

247. Lindstrom RL, Kaufman HE, Skelnik DL, Laing RA, Lass JH, Musch DC, et al. Optisol corneal storage medium. *Am J Ophthalmol*. 1992;114(3):345-56.
248. Doughman DJ, Van Horn D, Rodman WP, Byrnes P, Lindstrom RL. Human corneal endothelial layer repair during organ culture. *Arch Ophthalmol*. 1976;94(10):1791-6.
249. Erdmann L, Ehlers N. Long-term results with organ cultured, cryopreserved human corneal grafts. Re-examination of 17 patients. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1993;71(5):703-6.
250. Van Horn DL, Hanna C, Schultz RO. Corneal cryopreservation. II. Ultrastructural and viability changes. *Arch Ophthalmol*. 1970;84(5):655-67.
251. Delbosc B, Herve P, Carbillet JP, Montard M. Corneal cryopreservation in man: a proposal for an original technic. *J Fr Ophtalmol*. 1984;7(4):321-31.
252. Boisjoly HM, Tourigny R, Bazin R, Laughrea PA, Dube I, Chamberland G, et al. Risk factors of corneal graft failure. *Ophthalmology*. 1993;100(11):1728-35.
253. Patel SV, Hodge DO, Bourne WM. Corneal endothelium and postoperative outcomes 15 years after penetrating keratoplasty. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2004;102:57-65; discussion -6.
254. Patel SV, Hodge DO, Bourne WM. Corneal endothelium and postoperative outcomes 15 years after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(2):311-9.
255. Borderie VM, Sabolic V, Touzeau O, Scheer S, Carvajal-Gonzalez S, Laroche L. Screening human donor corneas during organ culture for the presence of guttae. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(3):272-6.
256. Bourne WM. Examination and Photography of donor corneal endothelium. *Arch Ophthalmol*. 1976;94(10):1799-800.
257. Nesburn AB, Mandelbaum S, Willey DE, Trousdale MD, Maguen E, Ward DE. A specular microscopic viewing system for donor corneas. *Ophthalmology*. 1983;90(6):686-91.
258. Rootman DS, Hasany SM, Basu PK. A morphometric study of endothelial cells of human corneas stored in MK media and warmed at 37 degrees C. *Br J Ophthalmol*. 1988;72(7):545-9.
259. Singh G, Bohnke M, von-Domarus D, Draeger J, Lindstrom RL, Doughman DJ. Vital staining of corneal endothelium. *Cornea*. 1985;4(2):80-91.
260. Maas-Reijs J, Pels E, Tullo AB. Eye banking in Europe 1991-1995. *Acta Ophthalmol Scand*. 1997;75(5):541-3.
261. Gundersen HJ. Estimators of the number of objects per area unbiased by edge effects. *Microsc Acta*. 1978;81(2):107-17.
262. Gain P, Thuret G, Kodjikian L, Gavet Y, Turc PH, Theillere C, et al. Automated tri-image analysis of stored corneal endothelium. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(7):801-8.
263. Deb-Joardar N, Thuret G, Gavet Y, Acquart S, Garraud O, Egelhoffer H, et al. Reproducibility of endothelial assessment during corneal organ culture: comparison of a computer-assisted analyzer with manual methods. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(5):2062-7.
264. Ventura L, Jesus GT, Oliveira GC, Sousa SJ. Portable light transmission measuring system for preserved corneas. *Biomed Eng Online*. 2005;4:70.

265. Parekh M, Ferrari S, Ruzza A, Pugliese M, Ponzin D, Salvalaio G. A portable device for measuring donor corneal transparency in eye banks. *Cell Tissue Bank*. 2014;15(1):7-13.
266. Acquart S, Campolmi N, He Z, Pataia G, Jullienne R, Garraud O, et al. Non-invasive measurement of transparency, arcus senilis, and scleral rim diameter of corneas during eye banking. *Cell Tissue Bank*. 2014;15(3):471-82.
267. Amato D, Lombardo M, Oddone F, Nubile M, Colabelli Gisoldi RA, Villani CM, et al. Evaluation of a new method for the measurement of corneal thickness in eye bank posterior corneal lenticules using Anterior Segment Optical Coherence Tomography. *Br J Ophthalmol*. 2011;95(4):580-4.
268. Bald MR, Stoeger C, Galloway J, Tang M, Holiman J, Huang D. Use of fourier-domain optical coherence tomography to evaluate anterior stromal opacities in donor corneas. *J Ophthalmol*. 2013;2013:397680.
269. Brown JS, Wang D, Li X, Baluyot F, Iliakis B, Lindquist TD, et al. In situ ultrahigh-resolution optical coherence tomography characterization of eye bank corneal tissue processed for lamellar keratoplasty. *Cornea*. 2008;27(7):802-10.
270. Borderie M, Grieve K, Irsch K, Ghoubay D, Georgeon C, De Sousa C, et al. New parameters in assessment of human donor corneal stroma. *Acta Ophthalmol*. 2017;95(4):e297-e306.
271. Ghouali W, Grieve K, Bellefqih S, Sandali O, Harms F, Laroche L, et al. Full-field optical coherence tomography of human donor and pathological corneas. *Curr Eye Res*. 2015;40(5):526-34.
272. Agence de la biomédecine : rapport d'activité, 2016.
273. McCarey BE, Edelhauser HF, Van Horn DL. Functional and structural changes in the corneal endothelium during in vitro perfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1973;12(6):410-7.
274. Brunette I, Nelson LR, Bourne WM. A system for long-term corneal perfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989;30(8):1813-22.
275. Tanelian DL, Bisla K. A new in vitro corneal preparation to study epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33(11):3024-8.
276. Thiel MA, Morlet N, Schulz D, Edelhauser HF, Dart JK, Coster DJ, et al. A simple corneal perfusion chamber for drug penetration and toxicity studies. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(4):450-3.
277. Zhao B, Cooper LJ, Brahma A, MacNeil S, Rimmer S, Fullwood NJ. Development of a Three-Dimensional Organ Culture Model for Corneal Wound Healing and Corneal Transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(7):2840-6.
278. Foreman DM, Pancholi S, Jarvis-Evans J, McLeod D, Boulton ME. A simple organ culture model for assessing the effects of growth factors on corneal re-epithelialization. *Experimental Eye Research*. 1996;62(5):555-64.
279. Yu F-S, X., inventor Corneal organ culture system for chemical toxicity tests of consumer products. USA1999.
280. Xu KP, Li XF, Yu FS. Corneal organ culture model for assessing epithelial responses to surfactants. *Toxicol Sci*. 2000;58(2):306-14.
281. Stofac RL, inventor Apparatus for preserving and testing living tissues. USA1991.

282. Abdulrazik M, inventor Diffusion cell for ex-vivo pressure-controlled transcorneal drug penetration studies. Israel 1998.
283. Schmidt RAS, David B. ; Pauley, Richard, C., inventor Apparatus and method for in vitro storage of a cornea. USA 2006.
284. Pericoi Marc PF, inventor Chambre de perfusion pour cornée. France 2010.
285. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Dumollard JM, Mosnier JF, Burillon C, et al. Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium: trypan blue versus TUNEL technique. *Br J Ophthalmol.* 2002;86(3):306-10.
286. Zhao M, Thuret G, Piselli S, Pipparelli A, Acquart S, Peoc'h M, et al. Use of poloxamers for deswelling of organ-cultured corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(2):550-9.
287. Orwin E, Shah A, Voorhees A, Ravi V. Bioreactor design for cornea tissue engineering: Material-cell interactions. *Acta Biomater.* 2007;3(6):1041-9.

PARTIE EXPERIMENTALE

Depuis l'abandon des greffes fraîches dont la longévité dépassait deux décennies, dans les années 70-80 pour des raisons logistiques et de sécurité sanitaire, la greffe de cornée s'est organisée autour de deux principales techniques d'eye banking: hypothermie aux USA et organoculture en Europe (dont Besançon fut pionnière pour la France) permettant une conservation respectivement à court et moyen terme. L'œdème stromal inéluctable lié à ces techniques passives engendre une perte cellulaire endothéliale importante qui réduit la longévité des greffons, limite les contrôles qualités de plus en plus exigeants et obère les développements futurs tels les prédécoupes des greffons ou le bioingéniering endothélial.

Le laboratoire « Biologie, imagerie et ingénierie de la Greffe de Cornée (BiiGC, EA 2521, Université Jean Monnet de St-Etienne) a développé depuis 2010 une technologie de conservation active en bioréacteur qui limite l'œdème cornéen en restituant le gradient de pression de part et d'autre de la cornée et la circulation de milieu nutritif. Le BR permet ainsi de pallier aux inconvénients majeurs de la conservation cornéenne standard et de mettre en œuvre les développements du futur.

La partie expérimentale de notre thèse présente quatre articles originaux rédigés à partir d'études cliniques et épidémiologiques réalisées en partenariat avec le CHU de Besançon et des résultats expérimentaux obtenus tout au long de ces trois années de doctorat.

L'ensemble de ces articles 1/ retrace les évolutions des techniques de conservation et de contrôle des greffons ; 2/ dresse le bilan de l'évolution des techniques/indications de greffes en France; 3/ documente la perte cellulaire endothéliale précoce liée à la conservation passive en organoculture ; 4/ la compare avec la technologie active de conservation en bioréacteur.

PUBLICATION 1: (CHAPITRE D'OUVRAGE, RAPPORT ANNUEL DES SOCIETES D'OPHTALMOLOGIE DE FRANCE, BULLETIN DE LA SOCIETE FRANÇAISE D'OPHTALMOLOGIE) EYE BANKING : HIER, AUJOURD'HUI, DEMAIN

EYE BANKING : HIER, AUJOURD'HUI, DEMAIN

T GARCIN, AS GAUTHIER, G THURET, P. HERBEPIN, C JUELLE, E COURRIER, S ACQUART, B DELBOSC, P GAIN

EYE BANKING : HIER, AUJOURD'HUI, DEMAIN

La cornée à la particularité de pouvoir survivre longtemps après le décès du donneur. Dans un environnement favorable, elle conserve, *ex-vivo*, une transparence et une viabilité suffisante pour pouvoir être greffée plusieurs semaines après son prélèvement et assurer son rôle chez le receveur pendant des décennies. Ce délai *ex-vivo* est mis à profit par les banques de cornée pour vérifier la qualité intrinsèque du tissu, l'absence de risque microbiologique et optimiser l'organisation de la greffe. En plus de leurs rôles réglementaires, les banques de cornées jouent donc un rôle crucial dans l'utilisation optimale d'une ressource par définition limitée.

Rappelons que, si en France le nombre de prélèvement est depuis plusieurs années suffisant pour satisfaire les besoins de la population, cette équilibre est très loin d'être atteint dans le monde où 70 greffons sont nécessaires pour un seul disponible¹. Si l'augmentation du nombre de prélèvements est une solution indispensable sur le long terme, l'amélioration des méthodes de conservation est la perspective importante et réaliste à ce jour pour augmenter sans délai le nombre et la qualité des greffons disponibles.

EYE BANKING D'HIER

La première trace, chez l'homme, d'une greffe de cornée (kératoplastie), est une xéno greffe rapportée par Kissam en 1838². La première allogreffe est réalisée par Zirm en 1906 en actuelle République Tchèque, à partir d'un œil énucléé³. La très grande rareté des globes énucléés chez les vivants, amène le Russe Filatov à introduire dès 1935, la greffe dite « fraîche », simple conservation à froid des globes oculaires de cadavre dans une chambre humide pendant 24-36 heures^{4, 5}. Il démontre ainsi que la cornée survit après la mort du donneur et survit parfaitement chez le receveur durant 20 ou 25 ans. Ce progrès considérable, qui a fait référence dans le monde entier, ne permettait cependant pas de réaliser de contrôle qualité (simple inspection visuelle de la transparence de la cornée) et sa souplesse logistique était nulle : les receveurs en tête de liste d'attente devaient rester à jeun tous les matins dans

l'espoir d'un prélèvement. Cette greffe « fraîche », référence jusque dans les années quatre-vingt, a été progressivement remplacée au profit une technique de conservation développée par McCarey et Kaufman aux USA, en 1974^{6, 7}. Dans cette technique, la collerette cornéosclérale est découpée dès que possible après le décès, immergée en milieu liquide contenant du Dextran (polymère de glucose destiné à augmenter l'osmolarité du milieu et conserver ainsi la cornée déshydratée, fine et transparente) et des antibiotiques, et conservée à 4°C pendant 3 à 4 jours. Parallèlement, au même moment également aux USA, Summerlin en 1973⁸, puis Doughman en 1976^{9, 10} développent une tout autre technique de conservation entre 34 °C et 37 °C, dite en organo-culture (OC), basée sur les techniques de culture cellulaire et de conservation de la peau et qui permet une conservation longue durée jusqu'à 30 jours. Cependant, la survenue d'une endophtalmie fongique post greffe à partir d'un greffon en OC a arrêté le développement de cette technique aux USA (contamination à cause d'une conservation dans une boîte de Pétri non étanche dans une étuve à CO₂ de culture cellulaire). Les deux techniques vont dès lors évoluer en parallèle, 4 °C aux USA et OC en Europe. Pour l'hypothermie la composition des milieux évolue avec adjonction de chondroïtine sulfate en 1988 et commercialisation successive-ment des milieux CSM, K-Sol, DexSol, Optisol-GS (1991), dont seul le dernier persiste encore (Baush & Lomb). Le contrôle qualité endothélial utilise un microscope spéculaire mis au point dans les années soixante-dix et est réalisable au travers du flacon ou de la chambre de conservation sans déconditionner ni manipuler la cornée ce qui est un point très intéressant et sécurisant. Pour l'OC, trois innovations sont apportées par Sperling fin des années soixante-dix au Danemark¹¹⁻¹⁴ : 1/contrôle microscopique de la qualité cellulaire endothéliale, nécessitant la sortie de la cornée puis sa manipulation qui consiste à exposer l'endothélium à du chlorure de sodium isotonique (NaCl 0,9 %) pour visualiser les cellules et, plus accessoirement, colorer au bleu Trypan les noyaux des cellules mortes et qui n'ont pas encore desquamé ; 2/ milieu contenant du Dextran durant toute la durée de conservation minimisant l'œdème stromal ; 3/système en flacon scellé pour éviter les contaminations dans les étuves de conservation.

L'observation par Pels, en 1983 au Pays-Bas, d'une accumulation de Dextran dans les kératocytes, a finalement conduit à organiser l'OC en deux phases¹⁵ : une phase de conservation sans Dextran jusqu'à 5 semaines, suivie d'une phase de déturgescence en fin de conservation pendant 48-72 heures avec du Dextran T500. Cette dernière étape permet au greffon de retrouver une épaisseur et une transparence satisfaisante. Depuis le milieu des années quatre-vingt, les 2 techniques n'ont pas connu de modifications.

Enfin plus anecdotique, la cryoconservation décrite par Mueller¹⁶ dans les années soixante, puis Capella et Kaufman¹⁷ dans les années quatre-vingt-dix, permet en théorie une conservation sans limite de temps. Cependant, la lourdeur de l'infrastructure nécessaire pour garantir la température extrême et la perte endothéliale massive aux différentes étapes de conservation a conduit à son abandon¹⁸⁻²⁰. La lyophilisation proposée par King en 1957, puis reprise par Payrau en 1958, et Stocker en 1960, tout comme la silico-dessiccation par Payrau et Pouliquen en 1960, sont quant à elles, oubliées.

EYE BANKING D'AUJOURD'HUI

En pratique, seules l'hypothermie à court terme et l'OC à long terme se sont pérennisées, offrant des résultats cliniques similaires²¹⁻²³, alors que tout les oppose ou presque. Elles ne permettent cependant pas d'atteindre les résultats de la greffe fraîche, ni en termes de vitesse de réhabilitation visuelle post-opératoire, ni en termes de survie du greffon à long terme chez le receveur (autrefois rappelons de l'ordre de 20-25 ans contre 10-12 ans actuellement).

Hypothermie à court terme

Méthode de référence aux USA (100 % des cornées), elle est également majoritaire dans le monde (83 % des cornées au monde¹). L'immersion de la collerette cornéosclérale se fait dans un flacon en verre ou dans une chambre de visualisation en polycarbonate (chambre de Krolman, Boston, Massachusetts / chambre de Baush&Lomb, Irvine, Californie). Le tout premier milieu, le milieu McCarey et Kaufman⁶ permettaient une conservation de 1 à 3 jours. Il est encore utilisé dans certains pays, de manière anecdotique. Depuis le début des années quatre-vingt-dix, le milieu de conservation principal est l'Optisol-GS (Gentamycine-Streptomycine) (Baush & Lomb). Depuis peu, d'autres laboratoires

proposent, sur le même principe, d'autres milieux (Cornea-cold d'Eurobio, les Ulis, France ; Eusol-C d'Alchimia, Padoue, Italie ; Cornisol d'Aurolab, Madurai, Inde...). Point important, aucun de ces milieux ne contient de sérum de veau fœtal. La conservation en Optisol-GS peut se faire en théorie jusqu'à 14 jours, mais en pratique aux USA, l'objectif est que les cornées soient greffées dans les 5 jours, car au-delà la survie endothéliale diminue fortement et rapidement. L'Optisol-GS contient du Dextran et de la chondroïtine sulfate, deux macromolécules qui limitent fortement l'œdème stromal et la formation des plis postérieurs dans le stroma. Il faut noter que cette technique, dont l'avantage est d'être en vase clos, ne comporte pas de contrôle microbiologique. Le contrôle endothélial est réalisé en microscopie spéculaire avec comptage d'un nombre limité de cellules endothéliales (autour de 50), n'est réalisé qu'une seule fois (le plus souvent en tout début de conservation) et les cellules ne sont visibles qu'après réchauffement du flacon à température ambiante plusieurs heures avant l'examen. La dégradation rapide de la qualité endothéliale en quelques jours impose aux banques une organisation logistique très rigoureuse, avec du personnel dédié pour proposer très vite les greffons au travers le monde et organiser les transports en conséquence.

Organoculture à moyen terme

L'OC à une température variant entre 31-37 °C selon les pays et les banques (31 °C classiquement en France), dans un milieu nutritif contenant des antibiotiques actifs à ces températures, permet d'étendre la conservation jusqu'à cinq semaines si besoin. Elle est la méthode la plus utilisée en Europe depuis les années 80^{24, 25} (68 % des cornées prélevées en Europe, 17 % des cornées prélevées dans le monde¹). Cette technique a été inventée par William T Summerlin (NY, USA), puis Donald J Doughman et Richard L Lindstrom (Minnesota, USA) dans les années soixante-dix, combinant un milieu de culture avec 10 % de sérum de veau fœtal et des antibiotiques. Elle a été introduite en France grâce à Bernard Delbosc et Patrick Hervé (Besançon). Ses avantages sont la durée de conservation de l'ordre de 5 semaines permettant ainsi une grande souplesse dans l'allocation des greffons, la quarantaine microbiologique (encore optimisée par l'utilisation de flacon à hémoculture placé en automate à détection continue²⁶⁻²⁸) et la qualité des contrôles endothéliaux réalisables. Ses inconvé-

nients (et non des moindres) sont l'œdème stromal majeur qu'elle induit et le fait que le procédé soit nécessairement « ouvert » en boîte de Pétri au moment de l'évaluation de la qualité greffon (la microscopie spéculaire étant impossible à cause des plis endothéliaux et de la trop grande réflectivité du stroma œdémateux). Le Minimum Essential Medium (MEM) sert de base aux différentes versions du milieu de conservation d'organoculture. En France, ce milieu a eu pendant longtemps le statut de produit thérapeutique annexe (PTA, décret 2004-829) délivré par l'ANSM. Les PTA ont disparu en janvier 2016. Les milieux sont désormais des dispositifs médicaux de type III. Les anciens PTA devront se mettre en conformité pour 2019. Ces milieux peuvent être vendus ailleurs en Europe avec un marquage CE. Ils contiennent 2 % de sérum de veau fœtal, indispensable à la survie des cellules endothéliales au-delà de plusieurs jours. Dans de nombreux pays, le milieu est fabriqué et conditionné par les pharmacies hospitalières ou les banques de cornées elles-mêmes.

L'OC se déroule obligatoirement en 2 phases : durant la première phase, la perte du contrôle de l'hydratation cornéenne engendre très rapidement un œdème stromal majeur accompagné de nombreux plis endothéliaux responsables d'une mortalité endothéliale spécifique par apoptose^{29, 30}. Cet œdème (autour de 1000-1100 μm) réduit également la transparence et rend impossible la suture dans le lit receveur. Une étape de déturgescence cornéenne est donc indispensable. L'extraction de l'eau en excès dans la cornée est obtenue par immersion dans un milieu hyperosmolaire. L'addition d'une macromolécule (Dextran T500 le plus souvent) dans le milieu de conservation permet d'en augmenter l'osmolarité. Cette phase de déturgescence en Dextran est responsable d'une surmortalité endothéliale^{31, 32} et devrait être absolument limitée à 48 heures. Elle est initiée juste avant la cession et l'expédition de la cornée vers le bloc opératoire. Dans la pratique, pour des raisons logistiques et non scientifiques, elle dure parfois entre 2 à 5 jours, et aucun moyen en routine ne permet de vérifier la perte des cellules au cours de cette période. Le dernier contrôle endothélial est en effet au mieux réalisé au moment du changement de milieu et la densité cellulaire communiquée au chirurgien ne tient pas compte de cette phase de déturgescence³³.

L'OC nécessite par ailleurs une infrastructure coûteuse comprenant au moins dans certains pays d'Europe, une salle blanche et un poste de sécurité

microbiologique, indispensable pour garantir la stérilité des greffons lors des contrôles qualité endothéliaux. En effet, à la différence de la conservation à 4 °C, la cornée doit être déconditionnée pendant plusieurs longues minutes pour être préparée puis observée sous un microscope optique à lumière transmise. Par contre, l'analyse de l'endothélium est possible sur une plus grande zone qu'en microscopie spéculaire et il est possible de colorer le noyau de cellules mortes en utilisant du bleu Trypan (coloration décriée car très peu sensible même si elle reste d'usage).

Le principal avantage de l'OC est, qu'en préservant les activités métaboliques du tissu cornéen, la durée de conservation peut être étendue. Néanmoins, même si elle est ralentie par rapport à la conservation à 4 °C, la perte endothéliale est importante : de l'ordre de 1-2 % par jour de conservation³² (contre une mortalité physiologique de 0,6 % par an, rappelez-le).

Au final, même si elles rendent de grands services à la population mondiale, aucune des deux méthodes de conservation n'est excellente. La méthode idéale devrait combiner un système clos « easy to control and ready to graft », une longue durée de conservation et une préservation de la viabilité endothéliale proche de ce que nous offrait la greffe fraîche.

AMÉLIORATIONS DE LA DERNIÈRE DÉCENNIE

Comptages endothéliaux automatisés

Les techniques de comptage manuel dans un cadre fixe (« fixed-frame ») sont les plus anciennes, les plus simples, mais elles sont les plus imprécises et prédisposent aux erreurs^{34, 35}. Elles ont été abandonnées au profit des méthodes de comptage informatisé, soit dans un cadre fixe, soit dans une forme de contours libres (« variable frame ») plus précise encore. Différentes méthodes de reconnaissance des cellules existent : soit reconnaissance automatique ou semi-automatique des bords cellulaires, soit pointage manuel des centres et reconstruction informatique de bords cellulaires. La fiabilité du comptage dépend de la bonne calibration du microscope et du logiciel utilisé. Les logiciels d'analyse d'image donnent des résultats fiables et reproductibles sur ces cellules souvent difficilement visibles en microscopie optique^{36, 37}. A ce jour, 4 logiciels de comptage ont été développés spécifiquement pour une détection automatique des cellules endothéliales conservées en OC : Endo Cell Count analysis

software (Navis EyeBank system, Nidek, Tokyo, Japon), Cell Analysis Eye-bank Software (second programme dans la suite Navis EyeBank), Endothelial Analysis System EAT (Rhinotec, Düsseldorf, Allemagne), et Sambacornea (Tribvn, Châtillon, France). Ce dernier est utilisé en pratique courante à la banque EFS Auvergne-Loire de Saint Etienne et équipe également l'ANSM : il a été validé³⁶, permet d'augmenter la taille de l'échantillon endothélial compté (plus de 300 cellules par comptage, soit plus que tout autre logiciel de comptage disponible), et fournit des données similaires à celles de la Cornea Donor Study qui a permis une certaine uniformisation dans l'évaluation des comptages endothéliaux en routine, depuis 2006³⁷⁻⁴². Mais actuellement, une grande variabilité intra et inter- banque subsiste en France³⁵ et dans le monde¹ : l'évaluation de la qualité endothéliale reste imparfaite de par la multiplicité des techniques d'acquisition, des méthodes de comptage, de l'expérience différente des banques. Ceci explique l'hétérogénéité des résultats trouvant ou non une corrélation de la densité cellulaire endothéliale (DCE) comptée en banque et celle retrouvée après kératoplastie transfixiante ou DSAEK⁴³⁻⁴⁵. Rappelons cependant que la DCE reste un des déterminants importants pour la survie du greffon chez le receveur⁴⁶.

Par ailleurs, si le comptage de la DCE en banque reste un outil de sélection pour les cornées éligibles à la greffe (>2000cell/mm²), certaines limites ne lui permettent pas de refléter très exactement le capital endothélial transmis au receveur, notamment : 1/quel que soit le mode de conservation il y a toujours un laps de temps entre le dernier comptage et la greffe, durant laquelle la viabilité cellulaire diminue sans être quantifiée ; 2/les cellules ne sont comptées, par définition, que dans les zones où elles sont visibles, et leur distribution peut être inhomogène⁴⁷ ; toutes les cellules présentes lors du comptage ne sont pas nécessairement viables ; à 4 °C il n'y a pas de coloration vitale possible et la perte cellulaire n'est pas linéaire, elle accélère en fin de conservation ; en OC la coloration au bleu Trypan 0,4 % peut être difficile à interpréter, les cellules meurent au rythme de 1 % par jour³² dans la phase de conservation, et après le dernier contrôle endothélial, le greffon est immergé dans un milieu de déturgescence responsable d'une mortalité supplémentaire estimée à 7 % par jour^{31, 48, 49}.

Dans cette perspective d'optimisation du comptage endothélial en routine, un nouvel outil permet de vérifier la calibration et la fiabilité des dispositifs de

comptages des banques : les Kératotests. Des défaillances dans la calibration sont souvent responsables d'une surestimation dans les comptages endothéliaux (et donc de la délivrance de greffons comportant souvent bien moins de cellules endothéliales que prévue...). Les micromètres étalons standards ne permettent que de valider le grandissement du système optique, c'est pourquoi le concept de Kératotest a été développé: notre équipe a développé des mosaïques microscopiques, mimant des endothéliums cornéens, pour lesquelles la DCE et la morphométrie sont exactement connues. Ces Kératotests ont pu être analysés par différentes banques avec leurs microscopes usuels (transmission ou spéculaire) et par différents techniciens dans chaque banque, afin d'estimer au mieux la variabilité intra et inter banque. Une première génération de Kératotests reproduisait l'endothélium cornéen humain coloré au rouge alizarine, fixé et monté à plat sur une grille de 1 mm² et protégé par une lamelle. Cette première génération a mis en évidence une grande variabilité intra et inter banques parmi 21 banques Françaises^{42, 50}. Cependant la production à l'identique de plusieurs lames test n'est pas possible car les lames de ces Kératotests proviennent d'endothéliums cornéens fixés. La seconde génération de Kératotests a été directement gravée par laser avec 12 mosaïques hexagonales de tailles différentes sur un verre plat³⁸: elle n'était pas destinée à la production de masse et elle a prouvé son utilité pour vérifier la fiabilité de la méthode de comptage endothéliale. La troisième génération de Kératotests utilise des techniques utilisées en micro-optique⁴⁷ : tous sont identiques et non altérables, comportant 12 mosaïques représentant les DCEs typiquement analysés en banque. Ils ont été envoyés à 50 banques volontaires dans le monde entier et comptés par plus de 130 techniciens de banque. Les Kératotests sont également utiles à la formation initiale et continue des techniciens, ainsi qu'à la validation de nouveaux logiciels de comptage.

Comptage endothélial en 3D

L'endothélium des cornées conservées forme de nombreux plis distribués au hasard et pouvant atteindre 200 µm de haut. Les zones totalement planes sont donc exceptionnelles et les images endothéliales utilisées pour compter les cellules comportent pratiquement toujours des zones en pente, même si les techniciens évitent les zones les plus plissées. Le comptage endothélial commet

donc systématiquement une erreur de parallaxe (même nombre de cellules comptées dans une surface plus petite qu'elle n'est en réalité) responsable d'une surestimation de la DCE. Pour augmenter la précision du comptage endothéliale nous avons montré que la reconstruction 3D de la surface endothéliale et la prise en compte de la pente réduisaient en moyenne la DCE de $8,1 \pm 4,5$ %⁵¹. L'acquisition d'une pile d'images séparées de 10 μm est facilement réalisée par un microscope motorisé en Z et un logiciel ad hoc. Le logiciel de reconstruction et de correction de la DCE est en cours d'industrialisation par Tribvn (Chatillon, France).

Caractérisation morphométrique améliorée

Les relations morphologies-fonctions sont étudiées depuis les débuts de la microscopie spéculaires chez les patients. Au cours de la conservation, des modifications cellulaires temporaires peuvent intervenir et altérer la mosaïque endothéliale mais ces modifications restent très peu étudiées⁵². La DCE reste ainsi le principal critère de qualité endothéliale. Le polymégéthisme (uniformité de taille), le pléiomorphisme (uniformité de forme) sont rarement bien pris en compte. Lorsqu'ils sont bien quantifiés par analyse d'image, leur influence sur la qualité du tissu endothélial reste inconnue, probablement car que les 2 paramètres étudiés (coefficient de variation de surface cellulaire et pourcentage d'hexagones) sont trop restrictifs⁵²⁻⁵⁴. Pour améliorer la précision des paramètres morphométriques, d'autres fonctions géométriques pourraient être utilisées (diamètres Feret, rayons de cercles inscrits) pour définir chaque cellule⁵⁵.

Sécurisation microbiologique améliorée

La possibilité de réaliser des tests microbiologiques est un point fort de l'OC par rapport à la conservation à 4 °C. Historiquement, les tests se basaient sur une observation macroscopique du milieu de conservation, une inoculation sur des gels d'agar standards (gélose sang, Sabouraud). Une période d'incubation trop courte faisait redouter des faux négatifs, en particulier pour les champignons, qui nécessitent du temps pour se développer. Cependant nous avons prouvé que le temps d'OC doit être limité pour mieux préserver le capital endothélial chez le receveur³². Ainsi des techniques microbiologiques (modernes flacons à hémoculture aérobies, anaérobies et fongiques) ont été validées pour permettre de réduire au maximum la période de quarantaine, sans risque^{56, 57}. D'autres études ont validé leur performance diagnostique⁵⁸. Leur utilisation a

même été extrapolée pour des tests microbiologiques de produits de thérapie cellulaire (culture de cellules-souches limniques)⁵⁹. Cette méthode permet la détection rapide de 95,5 % des agents contaminants en 24 heures, et 100 % en 48 heures (même pour les inoculé fongiques) : elle est donc fiable et plus rapide que les méthodes conventionnelles. L'utilisation des flacons à hémoculture et de système de détection automatique est devenue une méthode de référence pour de nombreuses banques⁶⁰ et pour l'ANSM dans le cadre de tests de routine.

Analyse instrumentale de la transparence

Bien que l'objectif principal d'une greffe cornéenne soit le plus souvent la restauration de la transparence globale, l'évaluation de la transparence des greffons ne dispose pas encore d'une technique fiable et précise. Différents prototypes de mesure de transparence ont été publiés dans les années 2000, mais non utilisés en pratique courante^{61, 62}. Son évaluation reste actuellement subjective, laissée à l'appréciation du préleveur (facilement faussé par les modifications post-mortem non spécifiques), du technicien de banque (à l'œil nu à travers les parois d'un flacon rond optiquement de moyenne qualité et un greffon mobile dans un liquide rouge aidé rarement d'une lampe à fente intégrée à la banque) et du chirurgien greffeur en bout de chaîne. Les Allemands ont développé un support plastique à usage unique et immergent les cornées dans un flacon de culture cellulaire à parois planes facilitant une observation en lampe à fente, mais ce dispositif n'est pas utilisé en France.

Pour pallier cet écueil, de nouveaux dispositifs ont été développés, validés et utilisés en routine par leurs développeurs. En France à la banque de St-Etienne, la transparence est mesurée par une technique d'analyse de la transmission des contrastes à travers la cornée⁶³. En Italie, à la banque de Mestre, la quantité de lumière transmise à travers la cornée est mesurée par un Luxmètre⁶⁴. Cependant, quel que soit le dispositif utilisé, ce contrôle qualité reste difficile à cause de l'œdème stromal et des plis postérieurs endothéliaux, lors de la conservation en OC. L'idéal, malheureusement impossible à mettre en œuvre, serait de pouvoir mesurer la transparence cornéenne APRES déturgescence, mais cela nécessiterait un contrôle supplémentaire (imposant une lourdeur logistique) et comporterait un risque de contamination puisque la cornée devrait une nouvelle fois être déconditionnée.

Pachymétrie fiable et non contact

La mesure de l'épaisseur cornéenne est devenue incontournable avec le développement des greffes endothéliales dans les pays à haut niveau. La pachymétrie contact par ultrasons, dont la stérilisation de la sonde est hasardeuse et ne correspond pas aux exigences des banques, a été supplantée par la tomographie par cohérence optique (OCT). Sa première utilisation en banque remonte à 2002, pour pouvoir étudier les changements sur la structure, la forme et l'épaisseur des tissus, induits par la conservation⁶⁵. L'OCT permet une mesure rapide et fiable en plusieurs points est non-contact, permettant de garder le greffon stérile et montre une bonne concordance avec la pachymétrie à ultrasons⁶⁶.

Le développement des OCT Spectral-Domain haute résolution ou ultra haute résolution pourra probablement permettre de mieux caractériser la structure, l'épaisseur du greffon, de mieux visualiser les opacités, et de détecter efficacement une ancienne chirurgie réfractive^{67, 68}. L'apport potentiel de ce nouveau contrôle qualité pour le receveur devra être validé par des études cliniques prospectives multicentriques.

Pré-découpes lamellaires par les banques

Avec l'essor des greffes endothéliales, les pratiques des banques vont significativement évoluer. Ces développements, qui n'en sont qu'à leur début avec le raffinement de certains fabricants de lasers femtoseconde, sont présentés dans un chapitre dédié :

« greffons endothéliaux et banques de tissus ».

Quantification de la viabilité endothéliale

Toute évolution dans les méthodes de conservation et de préparation des greffons cornéens nécessite, en parallèle, des avancées dans les méthodes de contrôles qualité, fiables, simples, et reproductibles. Plusieurs techniques ont été développées au fil du temps in vitro ou in vivo : historiquement, rouge Alizarine in vitro colorant les jonctions intercellulaires, bleu Trypan (test d'exclusion de colorant utilisable ex vivo, test de perméabilité membranaire, et donc colorant les noyaux des cellules mortes et non encore desquamées), détection in situ in vitro des cellules apoptotiques avec les techniques TUNEL^{29, 30, 69} (fragmentation spécifique de l'ADN). Ces techniques ne fournissent qu'une information très partielle sur la viabilité endothéliale. Nous avons mis au point pour la totalité de l'endothélium cornéen in vitro, un test de viabilité en microscopie à fluorescence. Il s'agit d'une triple

coloration dite « HEC » : le Hoechst 33342 se fixe à l'ADN de toutes les cellules vivantes et mortes et est fluorescent en bleu ; l'éthidium-homodimère se fixe uniquement à l'ADN des cellules mortes (à membrane perméable) et est fluorescent en rouge ; la Calceine-AM, non fluorescente est transformé en molécule fluorescente verte lorsqu'elle est estérifiée par les estérases ubiquitaires présentement dans les cellules vivantes. Cet HEC est quantifié précisément par un logiciel de comptage CorneaJ (Plugin d'ImageJ) spécialement dédié et gratuitement accessible^{70, 71}. Nous avons ainsi défini la notion de DCE viable, c'est-à-dire le nombre de cellules viables (Calcein +) sur l'ensemble de la surface cornéenne. Cette méthode (uniquement expérimentale car les réactifs sont toxiques) présente l'avantage de ne pas être spécifique d'espèce et est donc utilisable sur des cornées animales comme test préclinique. Elle est suffisamment simple et robuste pour quantifier la viabilité endothéliale avec une précision inégalée, pour la mise au point de tout nouveau médicament, milieu de conservation, dispositif médical cornéen, ou process d'eye banking de demain.

EYE BANKING DE DEMAIN EN BIORÉACTEUR

Aujourd'hui, avec des techniques d'eye banking bientôt quarantennaires, de nombreux besoins restent insatisfaits et constituent les challenges de l'eye banking de demain :

- amélioration du nombre de greffons disponible au travers le monde : rappelons que le ratio donneurs / patients en attente de greffe de cornée est de 1/70 dans le monde¹ contre 1/1,63 en France (rapport 2016 de l'Agence de Biomédecine)
- amélioration de la qualité endothéliale en cours de conservation (réhabilitation des cornées de qualité médiocre qui représentent jusqu'à 20 % des cornées dans les banques)
- préservation de l'épaisseur et de la transparence cornéenne normale
- comptages cellulaires endothéliaux reflétant fidèlement le capital cellulaire transmis au receveur, avec des mesures non toxiques de la réelle viabilité et de la fonctionnalité endothéliale
- quantification fiable de la transparence
- détection des chirurgies réfractives antérieure
- conservation encore plus longue sans perte de qualité, pour garder en réserve des cornées disponibles pour l'urgence

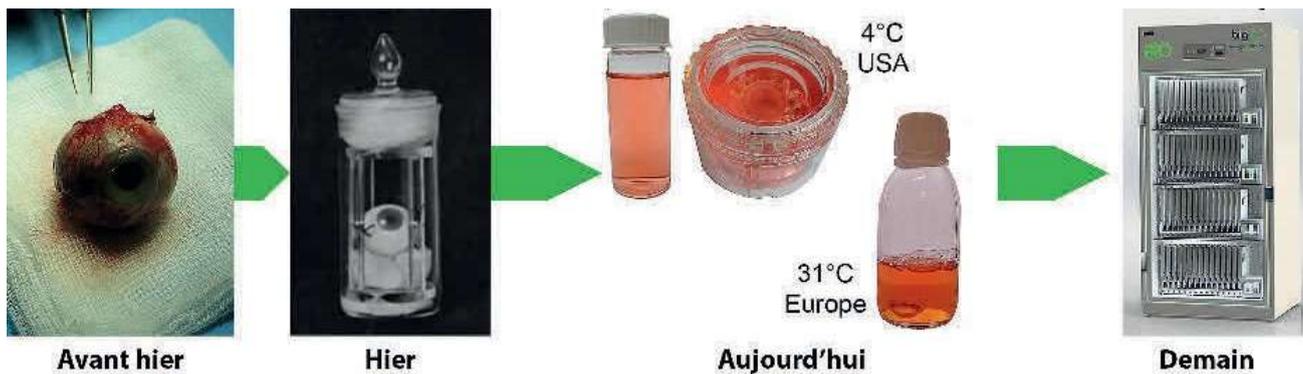


Figure 1 : Eye banking au cours du temps. Demain, la conservation des greffons pourra être effectuée dans l'environnement contrôlé de bioréacteurs placés dans un automate dimensionné en fonction du volume des banques.

L'objectif idéal est en somme de retrouver la qualité cellulaire des greffes fraîches d'hier (quasi 100 % de cellules viables et fonctionnelles), tout en gardant les contrôles de qualité et de sécurité obligatoires d'aujourd'hui tout en anticipant l'eye banking de demain : c'est ce que propose la conservation en bioréacteur

Rappelons en effet que les techniques d'eye banking (OC comme 4 °C), sont toutes deux passives et n'ont jamais connu de modification de rupture. Elles induisent de ce fait une perte endothéliale importante, qui se solde par une perte de qualité et une réduction de la survie du greffon comparée à la greffe fraîche d'autrefois.

Or, le maintien de la transparence cornéenne passe par un contrôle actif de son hydratation. Le stroma cornéen est spontanément hydrophile : la pression de gonflement (PG) correspond à l'hydrophilie naturelle du stroma. Deux mécanismes principaux empêchent la formation d'un œdème cornéen : la pression intraoculaire (PIO) et la pompe endothéliale qui exerce la pression d'imbibition (PI) permettant d'aspirer l'eau du stroma afin de maintenir le système à l'équilibre. L'équation $PI = PIO - PG$ est un modèle éprouvé qui permet de comprendre ce fonctionnement⁷². Au moment du décès et lors du prélèvement, l'hypotonie et l'arrêt du fonctionnement endothélial se traduisent rapidement par la formation d'un œdème stromal. L'œdème prédomine dans le stroma postérieur du fait d'une structure collagénique plus lâche et forme des plis endothéliaux profonds où la mortalité endothéliale est importante probablement à cause de perturbations mécaniques sur le cytosquelette⁷³. Un cercle vicieux s'installe donc très rapidement et entretient la surmortalité endothéliale : hypotonie et hypo-

fonctionnement endothélial/œdème cornéen/plis endothéliaux/mortalité endothéliale accrue/œdème cornéen.

Notre laboratoire « Biologie, imagerie et ingénierie de la Greffe de Cornée » (BiiGC EA2521, Université Jean Monnet, Saint-Etienne) a donc développé depuis plusieurs années un système de conservation active autour du concept de bioréacteur cornéen qui rétablit activement la pression intraoculaire et permet un renouvellement continu du milieu de conservation, à 31 °C. Ce système breveté se différencie des chambres antérieures développées par des physiologistes et toxicologue car il est spécialement conçu pour la conservation active de la cornée à long terme. La pression et le débit du milieu de conservation peuvent être adaptés à volonté, mimant les paramètres physiologiques (PIO et flux d'humeur aqueuse). Cette conservation active permet alors de conserver une épaisseur stromale quasi physiologique, sans plis endothéliaux et donc sans surmortalité endothéliale. A la différence de l'OC, l'étape de déturgescence en fin de conservation est inutile. Le système est clos, à usage unique, du préleveur jusqu'au chirurgien, permettant des contrôles endothéliaux fiables, simples, reproductibles, et ce à n'importe quel moment de la conservation : comptage endothélial grâce à un microscope spéculaire grand champ dédié, analyse de transparence, analyse de l'épaisseur cornéenne par OCT. La sécurité microbiologique est possible par prélèvements de milieu par de sites de prélèvement stériles à différents points du système. Le bioréacteur cornéen a été évalué en 2016 dans un large essai préclinique randomisé contrôlé autorisé par l'Agence de la Biomédecine : il permet, en comparaison avec l'OC, de délivrer à long terme (28 jours) 3,75 fois plus de greffons et de meilleure

qualité cellulaire (+25 % de cellules endothéliales viables), une meilleure structure et fonctionnalité cellulaire (meilleure activité des pompes endothéliales notamment) tout en assurant une excellente sécurité microbiologique⁷⁴. Il pourrait être une solution réaliste pour les banques de cornées de demain (Fig. 1). Il permettra probablement dans un futur proche de proposer plus de cornées greffables, et des greffons de meilleure qualité avec une DCE viable plus élevée qu'avec les méthodes de conservation actuelles.

Par ailleurs, il permettra une simplification logistique pour les banques (système clos, pas de salle blanche, pas de changement de milieu, réalisation simple, fiable et sûre des contrôles qualité), tout en garantissant une meilleure conservation que les méthodes utilisées actuellement. Il permettra également d'offrir la possibilité de faire évoluer les contrôles qualité avec le développement d'outils dédiés au dépistage de chirurgie réfractive, et de répondre aux nouveaux besoins suscités par l'augmentation des greffes lamellaires prédécoupées en banque ou au bioengineering d'après-demain...

RÉFÉRENCES

1. **Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, Thuret G.** Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol* 2016;134:167-173.
2. **Kissam SR.** Ceratoplastice in man. *N Y J Med* 1844;2:281-282.
3. **Zirm EK.** Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). 1906. *Refract Corneal Surg* 1989;5:258-261.
4. **Filatov V.** Eine erfolgreiche totale keratoplastik. *Arch Ophthalmol* 1935;13:321-347.
5. **Filatov V.** Transplantation of the cornea from preserved cadaver's eyes. *Lancet* 1937;1:1395-1397.
6. **McCarey BE, Kaufman HE.** Improved corneal storage. *Invest Ophthalmol* 1974;13:165-173.
7. **McCarey BE, Meyer RF, Kaufman HE.** Improved corneal storage for penetrating keratoplasties in humans. *Ann Ophthalmol* 1976;8:1488-1492, 1495.
8. **Summerlin WT, Miller GE, Harris JE, Good RA.** The organ-cultured cornea: an in vitro study. *Invest Ophthalmol* 1973;12:176-180.
9. **Doughman DJ, Harris JE, Schmitt MK.** Penetrating keratoplasty using 37 C organ cultured cornea. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1976;81:778-793.
10. **Doughman DJ, Van Horn D, Rodman WP, Byrnes P, Lindstrom RL.** Human corneal endothelial layer repair during organ culture. *Arch Ophthalmol* 1976;94:1791-1796.
11. **Sperling S.** Combined staining of corneal endothelium by alizarine red and trypane blue. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1977;55:573-580.
12. **Sperling S.** Early morphological changes in organ cultured human corneal endothelium. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1978;56:785-792.
13. **Sperling S.** Indirect evaluation of corneal endothelial cell density. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1978;56:445-454.
14. **Sperling S.** Human corneal endothelium in organ culture. The influence of temperature and medium of incubation. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1979;57:269-276.
15. **Pels E, Schuchard Y.** Organ-culture preservation of human corneas. *Doc Ophthalmol* 1983;56:147-153.
16. **Mueller FO, Casey TA, Trevor-Roper PD.** Use of Deep-Frozen Human Cornea in Full-Thickness Grafts. *Br Med J* 1964;2:473-475.
17. **Hagenah M, Bohnke M.** Corneal cryopreservation with chondroitin sulfate. *Cryobiology* 1993;30:396-406.
18. **Sperling S.** Cryopreservation of human cadaver corneas regenerated at 31 degrees C in a modified tissue culture medium. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1981;59:142-148.
19. **Hagenah M, Bohnke M.** Latent endothelial cell damage after experimental corneal cryopreservation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;31:529-532.
20. **Brunette I, Le Francois M, Tremblay MC, Guertin MC.** Corneal transplant tolerance of cryopreservation. *Cornea* 2001;20:590-596.
21. **Delbosc B, Naegelen J, Herve P, Carbillet JP, Montard M.** Conservation des cornées humaines en milieu de culture enrichi a +37 degrés C : analyses histologiques et biochimiques. *J Fr Ophthalmol* 1987;10:547-549, 551-545.
22. **Frueh BE, Bohnke M.** Prospective, randomized clinical evaluation of Optisol vs organ culture corneal storage media. *Arch Ophthalmol* 2000;118:757-760.
23. **Borderie V BM, Bourcier T, Laroche L, Touzeau O.** Les greffes en ophtalmologie. *Paris: Elsevier*; 2004.
24. **Delbosc B, Herve P, Carbillet JP, Montard M.** [Proposal for a medium for short-term preservation of human cornea]. *Bull Soc Ophthalmol Fr* 1983;83:217-219.
25. **Piquot X DB, Herve P, Montard M, Royer J.** Preservation of human corneas in organ culture: results of a feasibility clinical protocol. *Bull Sociétés Ophthalmol Fr* 1990;90:429-432.
26. **Thuret G, Carricajo A, Chiquet C, Vautrin AC, Celle N, Boureille M, Acquart S, Aubert G, Maugery J, Gain P.** Sensitivity and rapidity of blood culture bottles in the detection of cornea organ culture media contamination by bacteria and fungi. *Br J Ophthalmol* 2002;86:1422-1427.

27. **Thuret G, Carricajo A, Vautrin AC, Raberin H, Acquart S, Garraud O, Gain P, Aubert G.** Efficiency of blood culture bottles for the fungal sterility testing of corneal organ culture media. *Br J Ophthalmol* 2005;89:586-590.
28. **Zanetti E, Bruni A, Mucignat G, Camposampiero D, Frigo AC, Ponzin D.** Bacterial contamination of human organ-cultured corneas. *Cornea* 2005;24:603-607.
29. **Albon J, Tullo AB, Aktar S, Boulton ME.** Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2887-2893.
30. **Gain P, Thuret G, Chiquet C, Dumollard JM, Mosnier JF, Burillon C, Delbosc B, Herve P, Campos L.** Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium: trypan blue versus TUNEL technique. *Br J Ophthalmol* 2002;86:306-310.
31. **Borderie VM, Baudrimont M, Lopez M, Carvajal S, Laroche L.** Evaluation of the deswelling period in dextran-containing medium after corneal organ culture. *Cornea* 1997;16:215-223.
32. **Thuret G, Chiquet C, Bernal F, Acquart S, Romanet JP, Mouillon M, Hegelhoffer H, Burillon C, Damour O, Maugery J, Armitage WJ, Gain P.** Prospective, randomized clinical and endothelial evaluation of 2 storage times for cornea donor tissue in organ culture at 31 degrees C. *Arch Ophthalmol* 2003;121:442-450.
33. **Gauthier AS, Garcin T, Thuret G, He Z, Jullienne R, Trone MC, Nefzaoui C, Acquart S, Forest F, Peoc'h M, Delbosc B, Gain P.** Very early endothelial cell loss after penetrating keratoplasty with organ-cultured corneas. *Br J Ophthalmol* 2016.
34. **Patel SV, McLaren JW, Bachman LA, Bourne WM.** Comparison of flex-center, center, and corner methods of corneal endothelial cell analysis. *Cornea* 2010;29:1042-1047.
35. **Campolmi N, Acquart S, He Z, Gavet Y, Jullienne R, Naigeon N, Bernard A, Forest F, Peoc'h M, Thuret G, Gain P.** Inherent errors of the fixed-frame counting method for corneal endothelial cell density in eye banks. *Cell Tissue Bank* 2014;15:451-459.
36. **Gain P, Thuret G, Kodjikian L, Gavet Y, Turc PH, Theillere C, Acquart S, Le Petit JC, Maugery J, Campos L.** Automated tri-image analysis of stored corneal endothelium. *Br J Ophthalmol* 2002;86:801-808.
37. **Deb-Joardar N, Thuret G, Gavet Y, Acquart S, Garraud O, Egelhoffer H, Gain P.** Reproducibility of endothelial assessment during corneal organ culture: comparison of a computer-assisted analyzer with manual methods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2062-2067.
38. **Deb-Joardar N, Thuret G, Racine GA, Pons D, Brun G, Parriaux O, Peoc'h M, Acquart S, Gain P.** Standard microlithographic mosaics to assess endothelial cell counting methods by light microscopy in eye banks using organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4373-4377.
39. **Thuret G, Deb-Joardar N, Manissolle C, Zhao M, Peoch M, Gain P, Gavet Y.** Assessment of the human corneal endothelium: in vivo Topcon SP2000P specular microscope versus ex vivo sambacornea eye bank analyzer. *Br J Ophthalmol* 2007;91:265-266.
40. **Sugar A, Gal RL, Beck RW, Ruedy KJ, Blanton CL, Feder RS, Hardten DR, Holland EJ, Lass JH, Mannis MJ, O'Keefe MB,** Cornea Donor Study G. Baseline donor characteristics in the Cornea Donor Study. *Cornea* 2005;24:389-396.
41. **Campolmi N, He Z, Acquart S, Trone MC, Bernard A, Gauthier AS, Garraud O, Forest F, Peoc'h M, Gain P, Thuret G.** Comparison of endothelial cell density of organ cultured corneas with cornea donor study. *Cornea* 2014;33:597-603.
42. **Thuret G, Manissolle C, Acquart S, Garraud O, Campos-Guyotat L, Maugery J, Gain P.** Urgent need for normalization of corneal graft quality controls in French eye banks. *Transplantation* 2004;78:1299-1302.
43. **Terry MA, Shamie N, Chen ES, Hoar KL, Phillips PM, Friend DJ.** Endothelial keratoplasty: the influence of preoperative donor endothelial cell densities on dislocation, primary graft failure, and 1-year cell counts. *Cornea* 2008;27:1131-1137.
44. **Borderie VM, Boelle PY, Touzeau O, Allouch C, Boutboul S, Laroche L.** Predicted long-term outcome of corneal transplantation. *Ophthalmology* 2009;116:2354-2360.
45. **Lass JH, Sugar A, Benetz BA, Beck RW, Dontchev M, Gal RL, Kollman C, Gross R, Heck E, Holland EJ, Mannis MJ, Raber I, Stark W, Stulting RD,** Cornea Donor Study Investigator G. Endothelial cell density to predict endothelial graft failure after penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 2010;128:63-69.
46. **Nishimura JK, Hodge DO, Bourne WM.** Initial endothelial cell density and chronic endothelial cell loss rate in corneal transplants with late endothelial failure. *Ophthalmology* 1999;106:1962-1965.
47. **Flury M, He Z, Campolmi N, Gain P, Kress B, Thuret G.** Fabrication of optical mosaics mimicking human corneal endothelium for the training and assessment of eye bank technicians. *Opt Lett* 2012;37:22-24.
48. **Thuret G, Manissolle C, Campos-Guyotat L, Guyotat D, Gain P.** Animal compound-free medium and poloxamer for human corneal organ culture and deswelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:816-822.
49. **Nejepinska J, Juklova K, Jirsova K.** Organ culture, but not hypothermic storage, facilitates the repair of the corneal endothelium following mechanical damage. *Acta Ophthalmol* 2010;88:413-419.
50. **Thuret G, Manissolle C, Acquart S, Le Petit JC, Maugery J, Campos-Guyotat L, Doughty MJ, Gain P.** Is manual counting of corneal endothelial cell density in eye banks still acceptable? The French experience. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1481-1486.

51. **Jumelle C, Garcin T, Gauthier AS, Glasson Y, Bernard A, Gavet Y, Klossa J, He Z, Acquart S, Gain P, Thuret G.** Considering 3D topography of endothelial folds to improve cell count of organ cultured corneas. *Cell Tissue Bank* 2017.
52. **Acquart S, Gain P, Zhao M, Gavet Y, Defreyne A, Piselli S, Garraud O, Thuret G.** Endothelial morphology by image analysis of corneas organ cultured at 31 degrees C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1356-1364.
53. **Doughty MJ.** Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: a review of techniques and their application. *Optom Vis Sci* 1989;66:626-642.
54. **Doughty MJ.** Prevalence of 'non-hexagonal' cells in the corneal endothelium of young Caucasian adults, and their inter-relationships. *Ophthalmic Physiol Opt* 1998;18:415-422.
55. **Rivollier S DJ, Pinoli JC.** A comparative study of shape diagrams for 2D compact sets - Part I : analytic convex sets. *The Australian Journal of Mathematical Analysis and Applications* 2010;7:1-27.
56. **Gain P, Thuret G, Chiquet C, Vautrin AC, Carricajo A, Acquart S, Maugery J, Aubert G.** Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1158-1162.
57. **Gain P, Thuret G, Chiquet C, Vautrin AC, Carricajo A, Tchapyguine F, Rizzi P, Acquart S, Maugery J, Aubert G.** [Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media]. *J Fr Ophthalmol* 2002;25:367-373.
58. **Hermel M, Salla S, Hamsley N, Steinfeld A, Walter P.** Detection of contamination during organ culture of the human cornea. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010;248:117-126.
59. **Utheim TP, Raeder S, Utheim OA, de la Paz M, Roald B, Lyberg T.** Sterility control and long-term eye-bank storage of cultured human limbal epithelial cells for transplantation. *Br J Ophthalmol* 2009;93:980-983.
60. *Directory. Twenty first Edition.* . Amsterdam; 2013.
61. **Merin LM, Brown MF, Howdeshell LL.** Darkfield biomicrography of eye bank donor corneas. *Cornea* 2001;20:210-213.
62. **Ventura L, Jesus GT, Oliveira GC, Sousa SJ.** Portable light transmission measuring system for preserved corneas. *Biomed Eng Online* 2005;4:70.
63. **Acquart S, Campolmi N, He Z, Pataia G, Jullienne R, Garraud O, Nguyen F, Peoc'h M, Lepine T, Thuret G, Gain P.** Non-invasive measurement of transparency, arcus senilis, and scleral rim diameter of corneas during eye banking. *Cell Tissue Bank* 2014;15:471-482.
64. **Parekh M FS, Ruzza A, Pugliese M, Ponzin D, Salvalaio G.** A portable device for measuring donor corneal transparency in eye banks. *Cell Tissue Bank* 2014;7-13.
65. **Neubauer AS, Priglinger SG, Thiel MJ, May CA, Welge-Lussen UC.** Sterile structural imaging of donor cornea by optical coherence tomography. *Cornea* 2002;21:490-494.
66. **Amato D, Lombardo M, Oddone F, Nubile M, Colabelli Gisoldi RA, Villani CM, Yoo S, Parel JM, Pociobelli A.** Evaluation of a new method for the measurement of corneal thickness in eye bank posterior corneal lenticules using Anterior Segment Optical Coherence Tomography. *Br J Ophthalmol* 2011;95:580-584.
67. **Brown JS, Wang D, Li X, Baluyot F, Iliakis B, Lindquist TD, Shirakawa R, Shen TT, Li X.** In situ ultrahigh-resolution optical coherence tomography characterization of eye bank corneal tissue processed for lamellar keratoplasty. *Cornea* 2008;27:802-810.
68. **Bald MR, Stoeger C, Galloway J, Tang M, Holiman J, Huang D.** Use of fourier-domain optical coherence tomography to evaluate anterior stromal opacities in donor corneas. *J Ophthalmol* 2013;2013:397680.
69. **Komuro A, Hodge DO, Gores GJ, Bourne WM.** Cell death during corneal storage at 4 degrees C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2827-2832.
70. **Pipparelli A, Thuret G, Toubeau D, He Z, Piselli S, Lefevre S, Gain P, Muraine M.** Pan-corneal endothelial viability assessment: application to endothelial grafts predissected by eye banks. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:6018-6025.
71. **Bernard A, Campolmi N, He Z, Ha Thi BM, Piselli S, Forest F, Dumollard JM, Peoc'h M, Acquart S, Gain P, Thuret G.** CorneaJ: an imageJ Plugin for semi-automated measurement of corneal endothelial cell viability. *Cornea* 2014;33:604-609.
72. **Bryant MR, McDonnell PJ.** A triphasic analysis of corneal swelling and hydration control. *J Biomech Eng* 1998;120:370-381.
73. **He Z, Forest F, Gain P, Rageade D, Bernard A, Acquart S, Peoc'h M, Defoe DM, Thuret G.** 3D map of the human corneal endothelial cell. *Sci Rep* 2016;6:29047.
74. **Garcin T, Forest F, Pugnet JL, Peyragrosse T, Rogues F, Herbepin P, Verhoeven P, He Z, Acquart S, Cognasse F, Perrache C, Gain P, Thuret G.** Preclinical controlled study comparing long-term stored human corneas in an innovative bioreactor versus standard organ culture *European Eye Bank Association.* Prague; 2017.

PUBLICATION 2: (PUBLISHED IN EUROPEAN JOURNAL OF
OPHTHALMOLOGY) CORNEAL TRANSPLANTATION TRENDS IN FRANCE
FROM 2004 TO 2015: A 12-YEAR REVIEW

Corneal transplantation trends in France from 2004 to 2015: A 12-year review

European Journal of Ophthalmology
1–6
© The Author(s) 2018
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1120672118762224
journals.sagepub.com/home/ejo


**Guillaume Bigan¹, Marc Puyraveau², Maher Saleh¹,
Philippe Gain³, Isabelle Martinache⁴, Bernard Delbosc¹
and Anne-Sophie Gauthier¹**

Abstract

Purpose: The aim of this study was to report the 12-year longitudinal trends in indication and corneal transplantation techniques in France from 2004 to 2015.

Results: The records of all corneal transplantations performed from 2004 to 2015 in France were retrospectively reviewed. The patient indications and types of transplant performed were analyzed. A total of 46,658 corneal transplantations were performed between 2004 and 2015, with 34,187 (73.3%) penetrating keratoplasty and 10,452 (22.4%) lamellar keratoplasty. The leading surgical indications were secondary endothelial failure (24.3%), keratoconus (18.8%), regraft (13.5%), and Fuchs endothelial corneal dystrophy (15.1%). Endothelial keratoplasty became the preferred technique for endothelial diseases and deep anterior lamellar keratoplasty the preferred technique for keratoconus, surpassing penetrating keratoplasty in 2013.

Conclusion: Secondary endothelial failure is the top indication for performing a keratoplasty over the 12-year period. There was a shift from penetrating keratoplasty to endothelial keratoplasty performed for Fuchs endothelial corneal dystrophy and secondary endothelial failure, and to deep anterior lamellar keratoplasty, performed for keratoconus. This highlights an important shift in managing corneal diseases toward the application of selective and more conservative surgeries and changes in indications in corneal transplantation.

Keywords

Corneal graft, indication, evolution, 12-year review

Date received: 5 December 2017; accepted: 9 February 2018

Introduction

The new millennium has seen the emergence of new techniques resetting the indications for corneal transplantation. Most advances have come with lamellar keratoplasty (LK) techniques in the form of anterior LK (ALK) and endothelial keratoplasty (EK). Modern LK was introduced by Melles et al.¹ at the turn of the 21st century with posterior LK in Europe and was developed further by Terry and Ousley² with deep lamellar EK in the United States. Since then, various LK procedures have been fine-tuned and popularized and in the past decade, surgical centers have reported a decrease in penetrating keratoplasty (PK), which has been replaced by LK techniques.³ The reported rate of the different surgical techniques varies from one country to another, with a difference in indications.^{3–6}

In France, established by virtue of the Bioethics Law of 6 August 2004, the French Biomedicine Agency (BMA)

oversees four key areas of human biology and medicine, including procurement of corneal transplants. On a national level, the BMA provides healthcare professionals and

¹Department of Ophthalmology, University Hospital of Besançon, Besançon, France

²Clinical Trials Statistical, Faculty of Medicine, University of Franche-Comté, Besançon, France

³Department of Ophthalmology, Saint-Etienne University Hospital, France

⁴Biomedecine Agency, Paris, France

Corresponding author:

Anne-Sophie Gauthier, Department of Ophthalmology, University Hospital of Besançon, 3, boulevard A. Fleming, 25030 Besançon, France.

Email: asophiegauthier@yahoo.fr

researchers with collective answers, guarantees equity of access, ethics, and the transparency of these activities by evaluating and publishing its activities in an annual report. In 2015, corneal graft activity accounted for 11,392 cornea donations to 16 French eye banks and 4439 keratoplasties performed in 132 surgical centers. A significant change in indications and surgical techniques has also occurred. Deep ALK (DALK) and EK have been introduced and developed in France over the past 10 years.

The purpose of this study was to analyze the changes in surgical techniques for keratoplasty and to identify the indications for keratoplasty performed in France from 2004 to 2015, by analyzing the BMA data.

Materials and methods

Review of the prospectively compiled BMA's electronic database, containing all records of corneal transplantation from 2004 to 2015, at the time of surgery. The database records information about the recipient and surgical data are collected from questionnaires completed by the surgeons on the day of corneal graft surgery.

Patient data, including age, sex, and cause of death of the donor, surgical techniques, and preoperative clinical diagnosis were retrieved. The indications for keratoplasty were divided into seven diagnostic categories. Among these categories, secondary endothelial failure included aphakic, pseudophakic, phakic anterior-chamber intraocular lens for myopia, and corneal and anterior-segment endothelial surgery failure.

The frequencies and percentages were provided for each indication and type of surgery. Descriptive statistics and graphic representations of the changes in the indications and transplantation techniques were produced. The absolute values and percentages were provided for each indication. Statistical analysis was performed with the SAS software Version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Trend testing was analyzed with the Cochran-Armitage Trend Test and a p -value <0.05 was considered statistically significant.

Results

From 2004 to 2015, 46,658 corneal transplantations were performed in France in 107 public (70%) or private (30%) institutions. A mean of 3888.2 corneal grafts were performed each year, ranging from 3429 grafts in 2011 to 4439 corneal grafts in 2015. Between 2006 and 2011, the number of grafts performed each year was stable. Since 2014, the number of transplantations performed has increased.

The gender distribution of the donor showed a male preponderance in every year of the study, and overall 60.6% of donors were male and 39.4% female. The largest proportion of donors was found within the 45- to 69-year-old age

group (45.4%, $n=14,917$), followed by the 70- to 79-year-old age group (21%, $n=8,804$) and the 80- to 84-year-old age group (10.7%, $n=4926$). The most common causes of donor deaths were cardiovascular diseases (62%), followed by trauma (22%), anoxia (13%), intoxication (1%), and other causes (2%). The mean age of corneal graft recipients was 59 ± 15 years.

The indications for corneal transplantation are listed in Table 1 and Figure 1(a).

From 2004 to 2015, secondary endothelial failure was the leading indication ($n=11,339$, 24.3%) for any type of corneal transplantation, followed by keratoconus ($n=8753$, 18.8%), Fuchs endothelial dystrophy (FED; $n=7059$, 15.13%), regraft ($n=6280$, 13.5%), keratitis ($n=5003$, 10.7%), trauma ($n=1705$, 3.7%), and other causes ($n=6519$, 13.97%) including stromal dystrophy ($n=1238$, 3.3%), congenital diseases ($n=472$, 1.3%), degeneration ($n=217$, 0.6%), pterygium ($n=74$, 0.2%), tumors ($n=40$, 0.3%), other dystrophy ($n=525$, 1.4%), and other causes ($n=3316$, 9.0%).

The etiology of secondary endothelial failure was dominated by pseudophakia ($n=9067$, 79.9%), followed by anterior-segment surgery failure ($n=895$, 7.9%), aphakia ($n=880$, 7.8%), phakic anterior-chamber intraocular lens for myopia ($n=404$, 3.6%), and corneal surgery failure ($n=93$, 0.8%). Complications resulting from previous corneal (refractive) surgery fluctuated in the study period but always remained under 1% of all corneal transplantations.

The mean age at the time of the corneal transplantation was 73.2 years for patients with secondary endothelial failure, 36 years for patients with keratoconus, 64.9 years for graft failure, and 71.4 years for FED.

Secondary endothelial failure as an indication for transplantation decreased from 2004 ($n=1243$, 28.3% of all grafts performed) to 2011 ($n=760$, 21.4%) and remained constant until 2015 ($n=982$, 22.1%; Table 1, Figure 1(a)). It was the most common indication in France from 2004 to 2014 and became second in 2015 after FED. Keratoconus as an indication decreased steadily. In 2004, it was the second most common indication (24.1% of all transplantations performed) for corneal transplantation, but in 2015 it was the least common (12.8%).

From 2004 to 2015, keratoplasty for FED and regraft showed a consistent increasing trend, from 477 and 360 transplantations, respectively (10.8% and 8.9% of all grafts performed, respectively) in 2005, to 1020 and 756 grafts (22.9% and 17.1% of all grafts performed, respectively) in 2015 (Figure 1(a)).

Since the introduction of LK in 2004, there has been a statistically significant increasing trend in the number of LK procedures performed ($p < 0.005$), with a decreasing trend in the number of PKs ($p < 0.05$; Figure 1(b)).

The types of corneal transplantations performed for the four most common indications are summarized in Figure 1(a)-(f). The number of DALKs for keratoconus has

Table 1. Indications for corneal transplantation from 2004 to 2015, in France.

Diagnosis	Transplants (%)											
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Keratoconus	1057 (24.03)	946 (22.45)	812 (21.90)	700 (19.89)	741 (20.70)	695 (19.79)	639 (17.99)	683 (19.20)	689 (17.91)	614 (15.33)	607 (14.02)	570 (12.84)
FED	477 (10.85)	459 (10.89)	395 (10.65)	429 (12.19)	473 (13.21)	452 (12.87)	528 (14.86)	532 (14.96)	670 (17.42)	728 (18.18)	896 (20.70)	1020 (22.98)
Secondary endothelial failure or bullous keratopathy (aphakic/pseudophakic)	12.43 (28.26)	1142 (27.11)	990 (26.70)	938 (26.65)	951 (26.56)	841 (23.95)	876 (24.66)	760 (21.37)	822 (21.37)	837 (20.90)	957 (22.11)	982 (22.12)
Regraft	360 (8.19)	418 (9.92)	386 (10.41)	436 (12.39)	421 (11.76)	483 (13.76)	516 (14.53)	537 (15.10)	582 (15.13)	656 (16.38)	729 (16.84)	756 (17.03)
Keratitis	519 (11.80)	464 (11.01)	436 (11.76)	401 (11.39)	359 (10.03)	407 (11.59)	368 (10.36)	401 (11.27)	371 (9.64)	440 (10.99)	426 (9.84)	411 (9.26)
Traumatism	181 (4.12)	182 (4.32)	146 (3.94)	135 (3.84)	132 (3.69)	130 (3.70)	130 (3.66)	129 (3.63)	130 (3.38)	122 (3.05)	140 (3.23)	148 (3.33)
Other	561 (12.76)	602 (14.29)	543 (14.64)	481 (13.66)	503 (14.03)	503 (14.03)	495 (13.94)	515 (14.48)	583 (15.15)	607 (15.16)	574 (13.26)	552 (12.44)
Total	4398	4179	3703	3543	3602	3493	3534	3429	3689	3805	4004	4439

FED: Fuchs endothelial corneal dystrophy.

increased over the decade (Figure 1(c); 6.7% in 2004, 21.4% in 2007, and 54.4% in 2015; $p < 0.05$). The number of EKs for FED (Figure 1(d)) and bullous keratopathy (Figure 1(f)) have increased essentially since 2007 to become the preferred technique since 2013 and 2014 ($p < 0.05$), respectively. EKs for FED accounted for 0.6% of the indications in 2004, 11.4% in 2007%, and 70% in 2015. For bullous keratopathy, EKs comprised 0.4% of the indications in 2004, 7.1% in 2007%, and 53.1% in 2015.

For regraft, EKs accounted for 1.9% of the indications in 2004, 5.3% in 2007, and 26.7% in 2015 and the preferential technique was PK (Figure 1(e)).

Discussion

In this study, we reviewed BMA's annual data from the past decade and reported trends in corneal transplantation in France. Major changes were the indications for evolving surgical procedures and the popularization of minimally invasive techniques. Lamellar grafting techniques, which replace only inner or outer corneal layers, have started to increasingly replace PK, potentially maintaining corneal integrity less invasively.⁷⁻¹⁰ It may result in reduced astigmatism, increased postoperative structural stability, faster visual rehabilitation, and reduced immunological graft rejection.¹¹⁻¹³ Moreover, a single-donor specimen may be used for multiple recipients.¹⁴

Corneal transplantation surgery in France has been relatively constant over the past 10 years.

This study found that in 2015 FED was the leading indication for transplantations in France, followed by secondary endothelial failure, regraft, and keratoconus. These four indications accounted for 68%–71% of all indications.

A previous study (Table 2) showed that the proportion of secondary endothelial failures (bullous pseudophakic and aphakic keratopathies) as an indication rose over the past four decades. In France, this indication accounted for only 10.9% of transplantations from 1980 to 1999,¹⁵ when the percentage of patients on a waiting list for bullous keratopathy was 30.5% in 2000 and 2001.¹⁶ This correlates with now-known complications of closed-loop anterior-chamber intraocular lenses, which were used widely during the early 1980s.^{17,18} Pseudophakic bullous keratopathy or aphakic bullous keratopathy was the second most common indication, with 20.6%, ranking first or second in 37.3% of European studies (19/51).^{12,19-24} Different factors probably underlie these changes: the emergence of EK, with greater confidence in the success of these procedures and the benefit of reduced recovery time,^{25,26} and the large number of cataracts operated. The decreasing rate of surgery for secondary endothelial failure could be due to the improvements in phacoemulsification techniques.

On the other hand, keratoconus became the fourth indication for corneal transplantation in 2015, 12.8% of all the

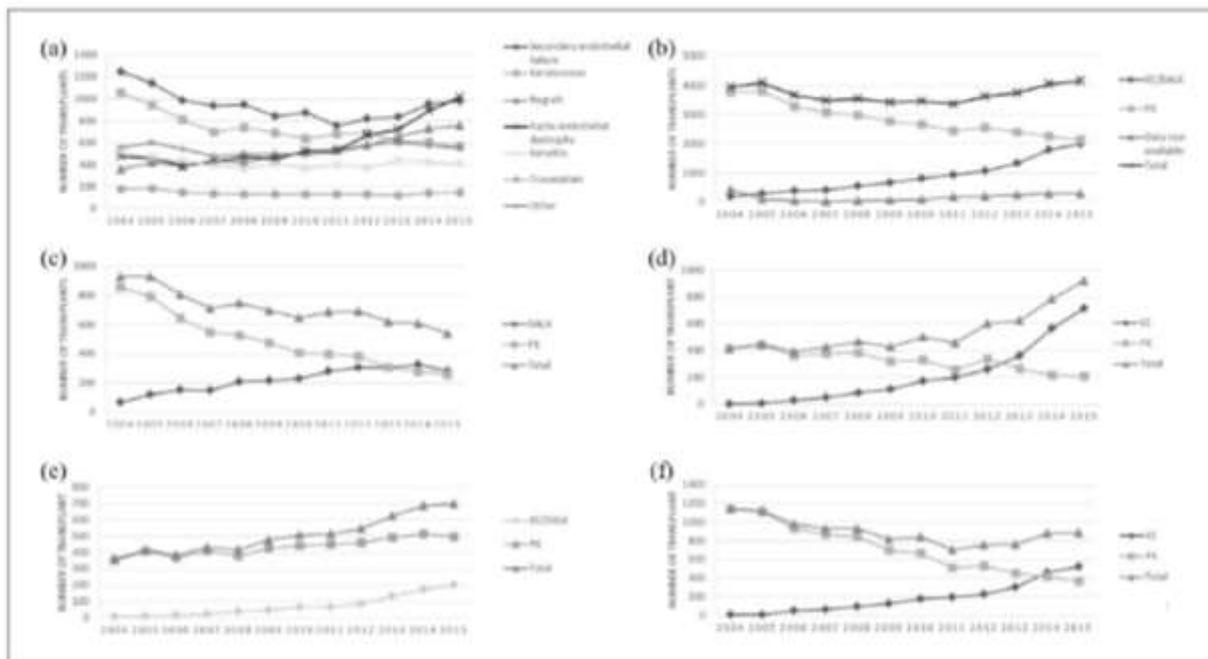


Figure 1. Trends in indications for corneal transplantation in France from 2004 to 2015. (a) Indications for transplantation. (b) Types of transplants. (c) Transplant type for keratoconus. (d) Transplant type for Fuchs endothelial corneal dystrophy. (e) Transplant type for regraft. (f) Transplant type for secondary endothelial failure.

Table 2. Indication for corneal transplantation in France compared with studies performed in the same period in other countries.

Author	Nationality	Year published	Year studied	Number of grafts	Indications (%)						Surgical techniques
					First	%	Second	%	Third	%	
Park et al. ³	USA	2015	2005–2014	45,9528	Keratoconus		Graft failure		Secondary endothelial failure		PK + LK
Kim et al. ²⁷	New Zealand	2016	1991–2015	5574	Keratoconus	41.7	Graft failure		Secondary endothelial failure	15.2	PK + LK
Tan et al. ²⁸	Canada	2014	2002–2011	4843	FED	18.9	Secondary endothelial failure		Graft failure	17.1	PK + LK
Frigo et al. ⁶	Italy	2015	2002–2008	13,173	Keratoconus	41.3	Secondary endothelial failure		FED	7.2	PK + LK
Wang et al. ⁹	Germany	2013	2001–2010	1200	Keratoconus	25.5	FED		Secondary endothelial failure	14.6	PK + LK
Ting ⁸	Scotland	2012	2001–2010	921	Keratoconus	28.7	Graft Failure		FED	13.5	PK + LK
Wang et al. ²²	China	2011	2005–2010	875	Infectious Keratitis	37.1	HSK		Keratoconus	11.2	PK
Gauthier et al.	France	Current study	2004–2015	46,658	Secondary endothelial failure	23.9	Keratoconus		Regraft	13.6	PK + LK

PK: penetrating keratoplasty; LK: lamellar keratoplasty; FED: Fuchs endothelial dystrophy; HSK: Herpes simplex keratitis.

indications in this study. However, other European and American studies situate this corneal disease as the first indication, with 25.5%–41.3% of all of their indications for

transplantation.^{3,6,8,9} In the past few decades, medical treatments (scleral contact lens) associated with the development of new surgical treatments (intracorneal ring segment

implantation³⁰ and riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking³¹) have been widely adopted in France to manage keratoconus and are an alternative therapeutic before corneal graft.

The incidence of keratoconus is low in China, which explains the low rate of surgery for this indication. Therefore, the leading cause of corneal transplantation in China is keratitis.^{17,32}

As the number of refractive corneal surgery cases has accumulated over the past two decades, complications such as iatrogenic corneal ectasia have drawn a great deal of attention.²⁹ Keratoplasty after corneal surgery remained constant, with a low annual rate of around 0.14%–0.32% of all indications. Evidence-based guidelines for preoperative screening of forme fruste keratoconus and femtosecond laser-based surgical techniques are credited with decreasing the risk of iatrogenic ectasia.^{3,33–35}

Graft failure as an indication for PK became the first indication for this procedure. This increasing trend may be due to the aging population and limited long-term graft survival.

For the first time, for FED and secondary endothelial failure in 2013 and 2014, respectively, EK was performed more commonly than PK.

This study shows a decreased annual rate for PK procedures of 6%, in accordance with the results in the United States, which had the same rate from 2004 to 2015.³ On the other hand, LK had an increased annual rate of 23%, essentially due to the success of EK in FED and secondary endothelial failure. The annual number of LK procedure trends reached the number of PK procedures and the gap between these two techniques is rapidly narrowing.

In conclusion, trends in keratoplasty in France from 2004 through 2015, as in other developed countries, reveal that surgeons' preference for keratoplasty has shifted from the conventional PK to more customized lamellar techniques. Indications for keratoplasty procedures are constantly evolving and secondary endothelial failure is now the leading indication for all corneal transplantations in France, followed by FED, graft failure, and keratoconus.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Melles GR, Eggink FA, Lander F, et al. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea* 1998; 17(6): 618–626.
- Terry MA and Ousley PJ. Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients: early clinical results. *Cornea* 2001; 20(3): 239–243.
- Park CY, Lee JK, Gore PK, et al. Keratoplasty in the United States: a 10-year review from 2005 through 2014. *Ophthalmology* 2015; 122(12): 2432–2442.
- Cunningham WJ, Brookes NH, Twobill HC, et al. Trends in the distribution of donor corneal tissue and indications for corneal transplantation: the New Zealand National Eye Bank study 2000–2009. *Clin Exp Ophthalmol* 2012; 40(2): 141–147.
- Galvis V, Tello A, Gomez AJ, et al. Corneal transplantation at an ophthalmological referral center in Colombia: indications and techniques (2004–2011). *Open Ophthalmol J* 2013; 7: 30–33.
- Frigo AC, Fasolo A, Capuzzo C, et al. Corneal transplantation activity over 7 years: changing trends for indications, patient demographics and surgical techniques from the corneal transplant epidemiological study (CORTES). *Transplant Proc* 2015; 47(2): 528–535.
- Reinhart WJ, Musch DC, Jacobs DS, et al. Deep anterior lamellar keratoplasty as an alternative to penetrating keratoplasty a report by the American academy of ophthalmology. *Ophthalmology* 2011; 118(1): 209–218.
- Ting DS, Sau CY, Srinivasan S, et al. Changing trends in keratoplasty in the West of Scotland: a 10-year review. *Br J Ophthalmol* 2012; 96(3): 405–448.
- Wang J, Hasenfus A, Schirra F, et al. Changing indications for penetrating keratoplasty in homburg/Saar from 2001 to 2010—histopathology of 1,200 corneal buttons. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013; 251(3): 797–802.
- Xie L, Qi F, Gao H, et al. Major shifts in corneal transplantation procedures in North China: 5316 eyes over 12 years. *Br J Ophthalmol* 2009; 93(10): 1291–1295.
- Anshu A, Price MO, Price FW, et al. Risk of corneal transplant rejection significantly reduced with Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Ophthalmology* 2012; 119(3): 536–540.
- Guilbert E, Bullet J, Sandali O, et al. Long-term rejection incidence and reversibility after penetrating and lamellar keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2013; 155(3): 560–569.
- Maier AK, Gundlach E, Gonnermann J, et al. Fellow eye comparison of descemet membrane endothelial keratoplasty and penetrating keratoplasty. *Cornea* 2013; 32(10): 1344–1348.
- Heindl LM, Riss S, Bachmann BO, et al. Split cornea transplantation for 2 recipients: a new strategy to reduce corneal tissue cost and shortage. *Ophthalmology* 2011; 118(2): 294–301.
- Legouis JM, Parc C, d'Hermies F, et al. Nineteen years of penetrating keratoplasty in the Hotel-Dieu Hospital in Paris. *Cornea* 2001; 20(6): 603–606.
- Poinard C, Tuppin P, Loty B, et al. The French national waiting list for keratoplasty created in 1999: patient registration, indications, characteristics, and turnover. *J Fr Ophthalmol* 2003; 26(9): 911–919.
- Ghosheh FR, Cremona FA, Rapuano CJ, et al. Trends in penetrating keratoplasty in the United States 1980–2005. *Int Ophthalmol* 2008; 28(3): 147–153.

18. Lindquist TD, McGlothlan JS, Rotkis WM, et al. Indications for penetrating keratoplasty: 1980–1988. *Cornea* 1991; 10(3): 210–216.
19. Beekhuis WH. Current clinician's opinions on risk factors in corneal grafting: results of a survey among surgeons in the eurotransplant area. *Cornea* 1995; 14(1): 39–42.
20. Borderie VM, Touzeau O, Allouch C, et al. The results of successful penetrating keratoplasty using donor organ-cultured corneal tissue. *Transplantation* 1999; 67(11): 1433–1448.
21. Claesson M, Armitage WJ, Fagerholm P, et al. Visual outcome in corneal grafts: a preliminary analysis of the Swedish corneal transplant register. *Br J Ophthalmol* 2002; 86(2): 174–180.
22. Haamann P, Jensen OM and Schmidt P. Changing indications for penetrating keratoplasty. *Acta Ophthalmol* 1994; 72(4): 443–446.
23. Konradsson A, Jonasson F, Hannesson OB, et al. Penetrating keratoplasty in Iceland 1981–1996. *Laeknabladid* 1998; 84(3): 194–200.
24. Lang GK, Wilk CM and Naumann GO. Changes in the indications status for keratoplasty (Erlangen, 1964–1986). *Fortschr Ophthalmol* 1988; 85(3): 255–258.
25. Melles GR. Posterior lamellar keratoplasty: DLEK to DSEK to DMEK. *Cornea* 2006; 25(8): 879–881.
26. Muraine M, Toubeau D, Gueudry J, et al. Impact of new lamellar techniques of keratoplasty on eye bank activity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245(1): 32–38.
27. Kim BZ et al. New Zealand trends in corneal transplantation over the 25 years 1991–2015. *Br J Ophthalmol* 2016. doi:10.1136/bjophthalmol-2016-309021
28. Tan JCH et al. Evolving indications for and trends in keratoplasty in British Columbia, Canada, from 2002 to 2011: a 10-year review. *Cornea* 2014; 33: 252–256.
29. Rabinowitz YS. Ectasia after laser in situ keratomileusis. *Curr Opin Ophthalmol* 2006; 17(5): 421–426.
30. Colin J, Cochener B, Savary G, et al. Correcting keratoconus with intracorneal rings. *J Cataract Refract Surg* 2000; 26(8): 1117–1122.
31. Wollensak G, Spoerl E and Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003; 135(5): 620–627.
32. Wang JY, Xie LX, Song XS, et al. Trends in the indications for penetrating keratoplasty in Shandong, 2005–2010. *Int J Ophthalmol* 2011; 4(5): 492–497.
33. Kymionis GD, Kankariya VP, Plaka AD, et al. Femtosecond laser technology in corneal refractive surgery: a review. *J Refract Surg* 2012; 28(12): 912–920.
34. Randleman JB, Trattler WB and Stulting RD. Validation of the Ectasia risk score system for preoperative laser in situ keratomileusis screening. *Am J Ophthalmol* 2008; 145(5): 813–818.
35. Santhiago MR, Kara-Junior N and Waring GO IV. Microkeratome versus femtosecond flaps: accuracy and complications. *Curr Opin Ophthalmol* 2014; 25(4): 270–274.

PUBLICATION 3: (PUBLISHED IN BRITISH JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY) VERY
EARLY ENDOTHELIAL CELL LOSS AFTER PENETRATING KERATOPLASTY WITH
ORGAN-CULTURED CORNEA

Very early endothelial cell loss after penetrating keratoplasty with organ-cultured corneas

Anne Sophie Gauthier,^{1,2} Thibaud Garcin,^{1,3} Gilles Thuret,^{1,2,4} Zhiguo He,¹ Remy Jullienne,³ Marie Caroline Trone,^{1,3} Chaker Nefzaoui,^{1,3} Sophie Acquart,^{1,5} Fabien Forest,^{1,6} Michel Péc'h,^{1,6} Bernard Delbosc,² Philippe Gain^{1,3}

¹Corneal Graft Biology, Engineering and Imaging Laboratory, EA 2521, Faculty of Medicine, Jean Monnet University, Saint-Etienne, France

²Department of Ophthalmology, University Hospital, Besançon, France

³Department of Ophthalmology, University Hospital, Saint-Etienne, France

⁴Institut Universitaire de France, Paris, France

⁵Eye Bank, French Blood Centre, Saint-Etienne, France

⁶Department of Pathology, University Hospital, Saint-Etienne, France

Correspondence to Professor Gilles Thuret, Corneal Graft Biology, Engineering and Imaging Laboratory, EA 2521, SFR143, Faculty of Medicine, Health and Innovation Pole, Jean Monnet University, 10, Rue de la Marandière, BP80019, Saint-Etienne 42055, France; gilles.thuret@univ-st-etienne.fr

Received 5 September 2016
Revised 8 November 2016
Accepted 19 November 2016
Published Online First
12 December 2016

ABSTRACT

Aims After keratoplasty, postoperative endothelial cell loss is calculated between the eye bank endothelial cell density (ebECD) and the postoperative specular microscopy (SM). To elucidate the very early cell loss, always described after penetrating keratoplasty (PK), we designed two complementary studies.

Methods (1) Clinical prospective study of 90 consecutive PKs (keratoconus, Fuchs' corneal dystrophy, lattice dystrophy, bullous keratopathy) with organ-cultured corneas and postoperative follow-up by SM at day 5 (D5), D15, month 1 (M1) and M3. This series provided a quantification of the difference between ebECD performed 2 days before graft and very early postoperative ECD. (2) Ten pairs of corneas with comparable ebECD in both corneas and same organ-culture (OC) duration were randomised: one cornea was grafted, and, at the same time, the viable ECD (vECD) of the other was measured after labelling with Hoechst/ethidium/calcein-AM. The relationship between vECD and very early postoperative ECD was studied.

Results vECD at the time of graft did not differ from ECD 5 days after PK, with a difference of 39 (−356; 355) cells/mm² (median (10th; 90th percentile, $p=0.799$)), whereas a significant difference of 755 (359; 1146) cells/mm², corresponding to 28% (95% CI 26 to 30) of cells, was measured between ebECD and ECD 5 days after PK ($p<0.001$).

Conclusions In OC, ebECD provided to surgeons significantly overestimate the number of viable ECs grafted to patients. The absence of difference between the vECD at D0 and ECD at D5 indicates that the very early endothelial cell loss is almost negligible in recipients.

INTRODUCTION

Penetrating keratoplasty (PK) always entails a postoperative decrease in endothelial cell density (ECD).¹ This decrease is calculated by subtracting the postoperative ECD determined in recipients by specular microscopy (SM) to the eye bank ECD (ebECD) determined a few days before grafting. The reasons for ECD decrease after corneal graft remain unclear, and possible factors are surgical trauma, centrifuge cell migration and acute and subclinical chronic immune reactions. Postoperative ECD decrease is not linear. Several decay models have been elaborated during the last years from clinical series.^{1–3} They all use different

mathematical methods and results essentially differ by their capacity to model the medium and long-term decrease. They all comprise an initial very early important EC loss. From a biological point of view, the chronic slow cell loss is supposed to be triggered mainly by a subclinical innate immune reaction, but the early decrease (during the first month) has not been fully explained. The trauma caused by the trephination itself is very limited,^{4–6} and no obvious acute immune reaction after corneal graft (no clinical sign of inflammation) is typically observed, so the large difference between ebECD and the very early postoperative cell counts is unexplained. Understanding this initial ECD decrease could allow interventions liable to extend graft survival.

We recently demonstrated, using an *in vitro* destructive test involving triple labelling with Hoechst/ethidium/calcein-AM applied to the whole endothelium followed by image analysis, that, during organ-culture (OC), ebECD overestimates the pool of living ECs carried by the cornea and thus grafted in patients.⁷ As ebECD is the only reference available to calculate postoperative ECD decrease, we postulate that the very early rapid decrease universally observed in all types of keratoplasty involving ECs may be mostly artifactual, due to this overestimation. Study of this phenomenon is limited by the fact that very early ECD determination by SM is often difficult because of the residual corneal oedema and Descemet folds, which last several weeks. Most postoperative ECD values are reported only at 3 or 6 months, when SM images become easy to obtain. Nevertheless, our team reported a prospective series of 25 PKs where SM was reliably performed as early as 5 days postgraft in 75% of cases.⁸ In addition, the usual animal corneal models (rabbit, rat) are not suitable for this study since no satisfying long-term storage in OC has ever been described.

Recently, we reported a case of bilateral simultaneous PK comprising an allograft with an OC cornea and an autograft, showing that almost no very early EC loss occurred after autograft, for which all ECs were by definition viable.⁹ In this cornea, preoperative and postoperative cell counts were reliably determined using the same SM. This case suggested that the surgical trauma is indeed minimal.

To further study the gap between preoperative and very early postoperative ECD, we designed two complementary clinical and experimental studies with very early postoperative ECD monitoring.



To cite: Gauthier AS, Garcin T, Thuret G, et al. *Br J Ophthalmol* 2017;101:1113–1118.

Clinical science

MATERIALS AND METHODS

Study design and ethics statement

This work comprised one observational clinical study and one experimental study (figure 1). All procedures conformed to the tenets of the Declaration of Helsinki for biomedical research involving human subjects. For the two studies, a total of 100 consecutive patients who underwent PK in our department were enrolled during year 2013. We previously determined the variance of the distribution of ebECD in our European donor population ($n=1591$ consecutive donors) using the same methods of ebECD counting.¹⁰ We calculated that a sample of 100 patients would allow obtaining 95% confident intervals with a $\pm 5\%$ width, which we consider as a reasonable accuracy. Patients received the usual care except for non-contact SM, which was systematically performed at day 5 (D5) postoperatively (discharge from hospital). A preliminary study (data not shown) had confirmed that SM images could be obtained by D4 in $<10\%$ of cases. The rest of the follow-up was performed as per the routine protocol in our department. Given this minor change to the usual postoperative procedure, the study belongs to a category of research on routine care, requiring that patients be informed of the research goal and protocol but not their signed consent (Ethics Committee ruled that approval was not required for this study).

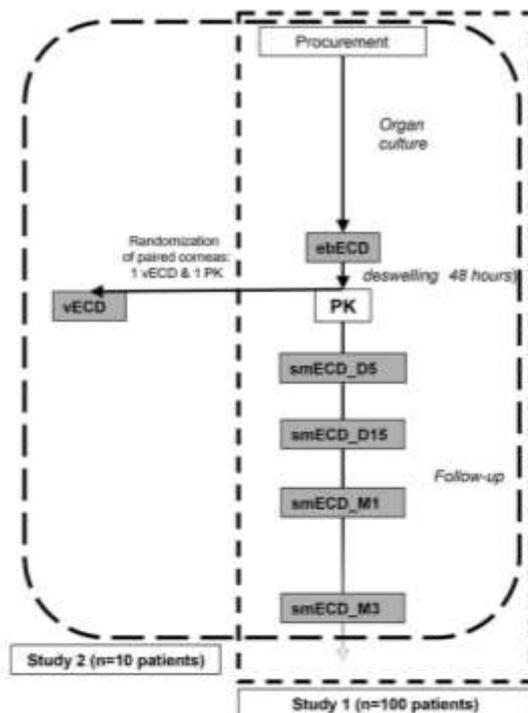


Figure 1 Study design. In study 1 (observational), very early endothelial cell density (ECD) was determined in 100 patients after penetrating keratoplasty (PK); in study 2 (experimental), 10 paired corneas with similar ECD were randomised. One cornea was grafted and the recipients were monitored (subgroup of study 1); the same day, the other cornea was sent to our laboratory for determination of its viable ECD (vECD). ebECD, eye bank ECD; smECD, specular microscopy ECD; D, day; M, month.

Patients

All PKs were performed under general anaesthesia by a senior surgeon (PG, more than 1500 PKs). Briefly, the cornea was trephined at 8.00 mm using a Vacuum trephine (Barron Radial Vacuum Trephine, Katena, Denville, New Jersey, USA) and replaced by an OC cornea, trephined at 8.25 mm with a vacuum punch on its endothelial side (Barron Vacuum Donor Cornea Punch, Katena) and sutured with intracameral viscoelastic protection (Viscoat, Alcon, Rueil Malmaison, France) by a single running suture with a 10/0 nylon monofilament. At the end of surgery, dexamethasone was injected subconjunctivally. Postoperative treatment was eye drops consisting of a fixed association of tobramycin and dexamethasone, and of indometacin, three times a day for the first month. Dexamethasone was then prescribed and was tapered over the following 8 months.

Methods of ECD determination

Three methods were used at different times to measure ECD.

Transmitted light microscopy in the eye bank

All corneas were stored at 31°C in 100 mL of commercial OC medium containing 2% of foetal calf serum (CorneaMax, Eurobio, Les Ulis, France). Preoperative ECD was determined using the standard process of our eye bank as described elsewhere,^{11 12} during transfer to the final deswelling step in dextran-containing medium (CorneaJet, Eurobio), that is, 48 hours before surgery. This storage and endothelial assessment sequence respected European eye-banking guidelines. Briefly, the cornea was handled under a laminar flow hood in a clean room, rinsed with balanced salt solution (BSS, Alcon) and the endothelial side was exposed during 1 min to 0.4% trypan blue (Eurobio). After gentle rinsing with BSS, the endothelial side was incubated at room temperature with 0.9% sodium chloride (Aguettant, Lyon, France) renewed every minute, to trigger an optimal intercellular space dilation that make cells visible under the light microscope. Finally, the cornea was placed in a sterile hermetic Petri dish and observed under a direct transmitted light microscope (Leica, Leitz Laborlux, Wetzlar, Germany) equipped with a digital camera (DXC-390P, Sony, Tokyo, Japan). Ten microscopic fields of $768 \times 576 \mu\text{m}$ were acquired in the 8 mm central area. ECs were counted in three non-overlapping fields selected at random, using the Sambacornea software (IribVn, Chatillon, France), after calibration with a certified Leitz micrometre. Cell boundaries of more than 300 cells were automatically detected, and carefully verified by a skilled technician (more than 5000 cell counts) who performed all necessary corrections. Accuracy of the analyser, based on cell boundary recognition in a variable frame, had been validated and we showed that it halves the variability of cell counts compared with manual counts done with the conventional fixed-frame technique.¹¹⁻¹⁴ We also showed that it had very high accuracy.¹⁵ This ECD is hereafter referred to as ebECD.

Fluorescence microscopy in the laboratory

For a subset of 10 pairs of corneas with similar ebECD (intra-pair difference $<5\%$), a centralised randomisation was performed. One cornea was grafted as usual. For the other, viable ECD (vECD) was determined on the same day to obtain a reliable estimation of the number of living ECs grafted in the patients. vECD was measured using a method that we recently reported, called HEC staining (for Hoechst/erhidium/calcein), and improved by the use of dedicated image analysis software (Cornea, PlugIn for imageJ). Briefly, corneas, placed endothelial

side up in a sterile Petri dish, were incubated for 45 min at room temperature with 150 mL of Hoechst 33 342 (10 mM), ethidium homodimer-1 (4 mM) and calcein-AM (2 mM) in phosphate-buffered saline, then were gently rinsed in phosphate-buffered saline. The 8.25 mm central buttons were flat-mounted under a coverslip to avoid parallax error due to corneal curvature, the whole flat endothelium was observed with an inverted fluorescent microscope (IX81, Olympus, Tokyo, Japan) and ECD was determined with CorneaJ, a specific plugin for the freeware ImageJ,¹⁶ after proper calibration using the same certified micrometre.

Postoperative SM of the patients in the ophthalmology department

All images were acquired using the same non-contact SM (SP2000R, Topcon, Tokyo, Japan). The central endothelium was observed at D5, D15, D30, D60 and D90 postoperatively. Central ECD was subsequently determined using the cell analysis module of the Imagenet software (Topcon). Cell boundaries were drawn manually on the widest area permitted by the software. In all cases, the reliability of boundary drawing was verified by two independent experts (ASG and GT) on a screen copy of the processed pictures, and corrections were made if necessary until cell recognition was considered perfect by both experts. ECD in patients is hereafter referred to as SM ECD (hereafter referred as smECD).

Statistics

Data distribution normality was tested using Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests with a threshold for non-normality set at $p < 0.05$. Non-normal data were described using their median (10th; 90th percentiles). Normal data were described using the mean and its 95% CI. Analysis was performed using IBM SPSS Statistics V23 (IBM, Armonk, New York, USA).

RESULTS

Donors' characteristics

One hundred corneas of 74 donors (40 males) were studied. Donor age was 71 (48; 87) (1h00–24h30) (1–24h30) hours. OC lasted 21 (14; 27) days. At the end of storage, ebECD, measured 2 days before surgery, was 2614 (2181; 3180) cells/mm² and was determined by counting 329 (310; 389) cells.

Recipients' characteristics

The 100 recipients were grafted for late endothelial failure on a previous PK (37%), pseudophakic bullous keratopathy (27%), stromal dystrophy (mostly, and unusually, lattice in our central French region of Auvergne Loire) (11%), keratoconus (10%), Fuchs' endothelial corneal dystrophy (FECD) (7%), postinfectious keratitis scars (6%), corneal perforation (2%). They were grouped according to their preoperative endothelial status as low (63%) or normal (30%), excluding FECD (7%) because of the frequently large peripheral endothelial reserve that may partly explain the good prognosis of PK in this subpopulation. All surgery and postoperative periods were uneventful. No rejection episode was observed during follow-up. For 87% of the patients, the first SM was possible at the fifth postoperative day. It was possible at D15 for seven more patients, at month 1 (M1) for five more patients, and only at M3 for one patient. The number of ECs able to be counted, an indicator of image quality, logically increased significantly over time: 40 (24; 59) at D5, 62 (40; 97) at D15, 71 (46; 112) at M1 and 80 (50; 107) at M3 ($p < 0.001$).

Overall postoperative ECD (study 1)

The decrease in smECD was represented in figure 2. Calculated as a percentage of ebECD, as in all papers studying postoperative cell loss, the decrease in ECD was 28% (95% CI 26 to 30) at D5, 33% (95% CI 31 to 36) at D15, 37% (95% CI 35 to 40) at M1 and 42% (95% CI 40 to 44) at M3 ($p < 0.001$, calculated over the whole series). Cell loss followed a Gaussian distribution. Between D5 and M3, ECD and postoperative time were inversely correlated with Pearson's $r = -0.305$ ($p < 0.001$), and D5 to M3 cell loss was 19% (95% CI 16 to 22) (calculated on paired data). None of the postoperative cell losses differed between recipients irrespective of endothelial status (normal, low, or FECD) (data not shown).

Direct comparison between ebECD, vECD and smECD (study 2)

For the experimental study of 10 pairs of corneas, the ebECDs were 2466 (2160; 3113) cells/mm² for the grafted corneas and did not differ from the paired corneas intended for vECD determination, with 2446 (2168; 2747) cells/mm² ($p = 0.139$, Wilcoxon non-parametric rank test). The 10 corneas were grafted after 17 (14; 29) days of OC, a duration not different from the whole series ($p = 0.587$, Mann-Whitney non-parametric test). Surgical indications did not differ ($p = 0.559$, χ^2 test). vECD was 1642 (1168; 1950) cells/mm², that is, 33% (22; 48) lower than ebECD ($p < 0.001$, Wilcoxon non-parametric rank test). vECD was comparable with smECD at D5 with 1577 (1327; 2060) cells/mm² ($p = 0.799$), and with smECD at D15 with 1490 (1128; 1847) cells/mm² ($p = 0.203$) (figure 2). The difference between endothelial image types at each time point is illustrated in figure 3.

DISCUSSION

Using a large prospective series, we show that ECD measured 5 days after PK with organ-cultured corneas in CorneaMax is approximately 30% below the ECD determined by an eye bank 2 days before surgery using an accurate endothelial analyser. Furthermore, we show that this number of cells, measured days after PK, is very similar to the number of living cells counted immediately before surgery in paired corneas having undergone exactly the same storage process. In consequence, in OC, ebECD substantially overestimate the number of living ECs.

Reliability (accuracy and reproducibility) of smECD 5 days after graft is of course lower than smECD determined later because residual stromal oedema and endothelial folds limit the number of ECs clearly visible. Nevertheless, cell counts repeated at D15, M1, M2 and M3 are in total coherence with D5 (figure 2).

Assessment of ECD in the very first days after PK has already been reported in a series of 32 grafts performed with 4°C stored corneas, with ebECD determined by SM.¹⁷ Four days after PK, ECD, determined by contact confocal microscopy, ranged from 1666 to 2548 cells/mm² (mean \pm SD, 2125 \pm 283 cells/mm²) corresponding to the difference with the ebECD, which varied from 0% to 29% (mean, 12%). The gap between ebECD and post-PK ECD, which seems smaller than in our study, is likely explained by the significant differences between 4°C storage and OC. Generally speaking, three characteristics of 4°C storage may have a particular impact: (1) limited stromal swelling due to the presence of dextran and chondroitin sulfate throughout storage and consequently few endothelial folds; (2) absence of the final deswelling step causing osmotic stress and (3) counting

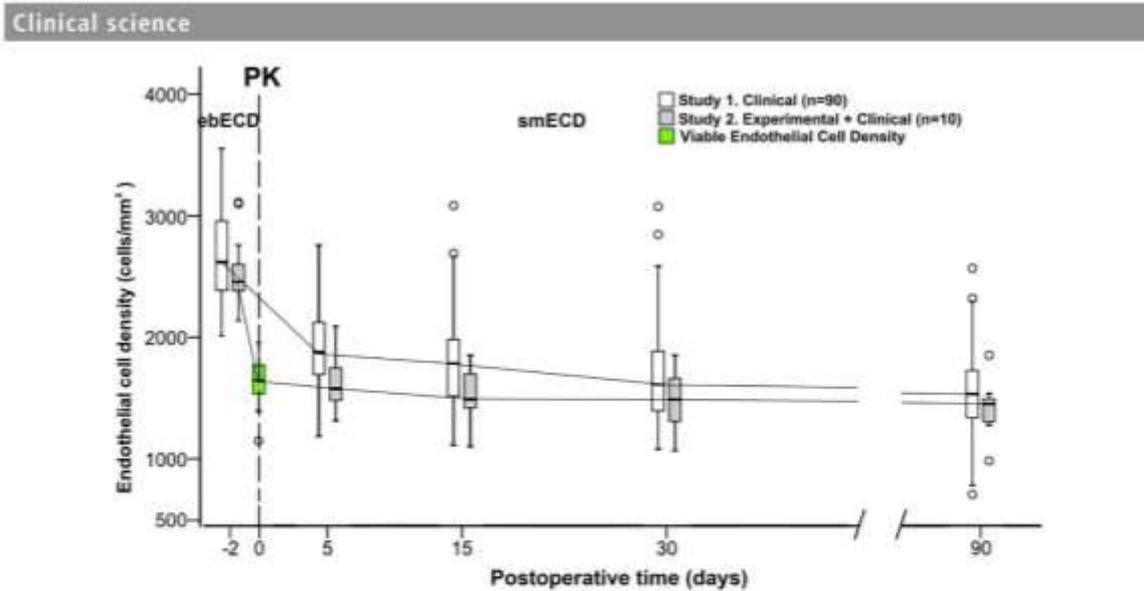


Figure 2 Box plots of endothelial cell density (ECD) over time. Study 1 was the follow-up of 90 penetrating keratoplasties (PKs), and study 2 of 10 pairs of corneas: one grafted as usual, the other with laboratory determination of its viable ECD at day 0, highlighted in green. Thick horizontal lines show the distribution median; boxes, the IQR and individual circles, the outliers. Whiskers mark the highest and lowest non-outlying values. A circle is between 1.5 and 3 times the IQR. The vertical dashed line indicates time of surgery. ebECD, eye bank ECD on grafts; smECD, specular microscopy ECD in recipients.

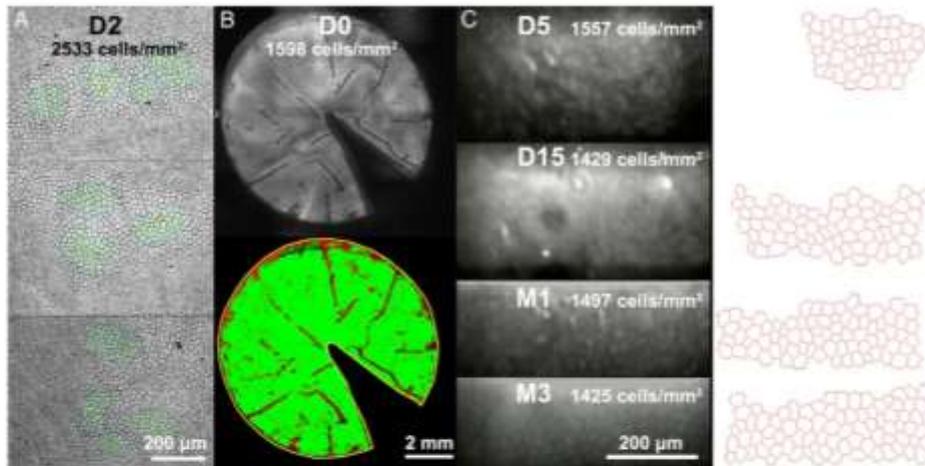


Figure 3 Representative example of the three methods of endothelial cell counting used in the study. (A) Eye bank endothelial cell density (ebECD) of the grafted cornea determined 2 days before penetrating keratoplasty with image analysis on 3 images and 325 cells counted. (B) Viable ECD (vECD) determined on the paired corneas on the day of surgery, with laboratory triple Hoechst/ethidium/calcein-AM labelling. The top image is calcein-AM staining of the 8.25 mm diameter graft after flat mounting with a radial incision. The black area revealed non-viable cells or area without cells, such as folds. The bottom image shows image analysis with the Corneal plugin for ImageJ, necessary to measure areas covered by living cells. (C) Postoperative sequence of specular microscopy showing the raw image and corresponding manual cell contours in red with, respectively, 52, 69, 76 and 81 cells counted. vECD was 37% lower than ebECD, but in noticeable agreement with postoperative smECD. D, day; M, month.

of ECs with similar specular microscopes in the eye bank and in patients.

The limitations of measuring ebECD in OC were recently discussed.⁹ The reasons for ebECD overestimation can be summarised as follows: (1) failure to take account of the areas deprived of ECs and of dying cells, especially in endothelial

folds (also called stress lines);⁷ (2) failure to take account of supplementary ECs dying between counting and graft, especially during deswelling time in OC;¹⁸⁻²¹ (3) considering too small a sample (50–100 cells is valid for SM in living patients, but probably not for stored endothelium, which is not homogeneous) and (4) failure to take account of the three-dimensional aspect

of the stored corneas, especially of folds where cell counting results in overestimation caused by parallax error. In addition, a degree of corneal shrinkage, due to absence of intraocular pressure and to tissue swelling, could also contribute to overestimating ECD (same number of ECs on a smaller area) and could also be true for 4°C stored corneas. There is thus sufficient evidence that even the most accurate ebECD overestimates vECD. This study quantifies this overestimation for PK. The rather large variation that we observed in the series of 10 corneas (median 33, with 10th and 90th percentiles, respectively, of 22% and 48%) may also reflect variation between corneas. Taking all these explanations together, the hitherto-unknown difference between standard ebECD and the vECD actually grafted in patients may be the main explanation for the absence of a relationship, noted in two studies concerning PK, between ebECD and either graft survival²² or postoperative ECD.²³ In addition, similar findings were recently described for Descemet stripping endothelial keratoplasty for which the 10-year postoperative ECD correlated with the 6-month postoperative ECD but not with the ebECD.²⁴ Although mechanisms of postoperative EC loss in PK and endothelial keratoplasty may substantially differ, this new result constitutes further argument for the limitation of ebECD value. Improving the reliability of ebECD requires a radical change of concept. The ideal non-toxic stain able to reveal functioning ECs has yet to be discovered. Meanwhile, there is clearly still room for improving storage methods to improve endothelial survival and homogeneity and thus to count cells on a small sample more representative of the whole population. We already suggested replacing dextran by less toxic molecules such as poloxamers²⁰ or poloxamines²¹ to reduce the negative impact of the deswelling step.

The dominant factor in medium- and long-term survival and in EC loss after PK is graft indication.²⁵ The main factor therein is the endothelial reserve, located at the periphery of the recipient cornea (50% of the whole endothelial area for an 8.00 mm graft).²⁶ Redistribution of ECs from high-ECD areas to lower ECD areas seems to be the mechanism involved in the excellent survival of graft in keratoconus, which has a normal periphery;

good survival in Fuchs' corneal endothelial dystrophy, where there is usually a near-normal reserve of healthy cells at the periphery and, conversely, poor prognosis in bullous keratopathy, which has no normal peripheral ECs. The dynamic of this phenomenon is relatively slow as, for instance, it takes 5 years for 40% of grafts to fail from late endothelial failure in bullous keratopathy^{25, 27} and 15 years to reach 50%.²⁷ This study demonstrates that the very short-term behaviour of the central ECD of the graft is not influenced by the recipient's endothelial status. Significant redistribution of ECs between graft and the recipient bed might take weeks, which is probably related to the wound-healing process in the trephination area.²⁸

Our study of 10 paired corneas, showing noticeable stability between vECD and very early postoperative ECD, demonstrates that the perioperative period does not trigger a high rate of EC death. The role of surgical trauma, particularly trephination, may only be a minor factor in this very early EC loss. The endothelial destruction triggered by trephination from the endothelial side (the most widespread technique) was characterised more than 35 years ago, and corresponds to a ring of 0.05–0.28 mm width⁴ (ie, a near 10% reduction in endothelium area for a standard 8.25 mm diameter keratoplasty), which is partly offset by oversizing the graft. The total number of viable EC may therefore remain the same as if trephination did not kill EC on a smaller graft. In addition, as stated above, in the very short-term, the speed of EC redistribution is not rapid enough for the central ECD to be influenced by EC death in the trephination area.

Surprisingly, we found –28% of ECs at D5, –33% at D15, reaching –42% at M3, percentages that are rather in the range of the typically accepted cell loss at 6 months (–28.8% for Bertelmann *et al*)²⁹ or even 1 year in normal-risk PK after OC (–39.4% for Harper *et al*,³⁰ or –29.7% for Borderie *et al*).² Looking ECD, instead of cell loss, of different series of PK performed with OC corneas, they were substantially and systematically lower for our patients. Table 1 summarises these comparisons and show that we reach in 1 month, ECD that are usually reported only after 1 year. Despite series are not fully comparable and ECD never reported as early as in our series,

Table 1 Earliest postpenetrating keratoplasty ECD reported in the literature compared with the present series

Author(s), journal, year	Storage method and medium	Donor age (year)	ebECD	ECD and postoperative time	Number of patients and indications
This study	OC CorneaMax/Cornealet	71 (48; 87)	2614 (2386–2958) 2 days before graft	1857 (1620–2091) at 5 days and 1594 (1392–1865) at 1 month	100 (all comers)
Hajenah <i>et al</i> , <i>Ophthalmology</i> , 1997 ³¹	OC at 31°C Homemade	46±18	2643±420	1549±410 at 1 year	30 (5 keratoconus, 10 stromal dystrophy, 5 Fuchs, 5 bullous, 4 others)
Frueth and Böhnke, <i>Archives of Ophthalmology</i> , 2000 ³²	OC at 36°C Likely homemade*	50±14	2617±395 (at retrieval)	2327±341 at 1 month	12 (8 keratoconus, 2 Fuchs, 1 Herpes, 1 bullous keratopathy)
Borderie <i>et al</i> , <i>Ophthalmology</i> , 2009 ²	OC at 31°C Commercial media (Likely Inosol, Opsia, Labège France† and CorneaMax)	70±14	2264±295	1604 at 1 year	1062 (all comers)
Patel <i>et al</i> , <i>American Journal of Ophthalmology</i> , 2005 ³³	CS in McCarey-Kaufman CS in Optisol-GS OC medium at 34°C	NA	2973±550	2467±675 at 2 months	394 (all comers)
Lass <i>et al</i> ; Cornea Donor Study, <i>Ophthalmology</i> , 2008 ³⁴	CS in Optisol-GS	Subgroup of 66–75 (n=108)	2585 (2445–2792)	2350 (2200–2800) at 6 months	60 Fuchs dystrophy and bullous keratopathy

Data are provided as media (IQR) or mean±SD depending on the original data in each article.

*Data interpreted from the corresponding European Eye Bank Association directory.

†Now discontinued.

CS, cold storage; ebECD, eye bank ECD in cells/mm²; ECD, endothelial cell density; NA, not available; OC, organ culture.

Clinical science

data suggest that differences in donor age between series may not be involved because when donors were younger, ebECD were similar. In addition, donor age has very little influence on postoperative ECD.³¹ Populations of recipients are comparable, except for the Cornea Donor Study in which only endothelial deficiencies were recruited. The only parameter that substantially differs between series is the storage medium. In consequence, we cannot rule out that EC survival in the commercial medium we used is worse than in other media. Further comparative study would be necessary to confirm these suppositions but in practice, the present medium is the only authorised in France.

In conclusion, we demonstrated that, in OC with CorneaMax/CorneaJet, ebECD determined 2 days before graft overestimates by nearly 30% the number of ECs that are viable at the time of graft, and that surgeons therefore graft fewer living cells than they think. Until we have a non-toxic method to determine vECD in eye banks, calculation and modelling of postoperative EC loss after PK should take as its reference not ebECD but smECD, measured in the recipient as soon as possible. Consequently, models of postoperative ECD decrease should be revisited because there is no high cell loss immediately after PK, and therefore no specific biological background.

Contributors ASG, GT, MP, BD and PG: design of the study. ASG, TG, ZH, RJ, MCT, CN, FF, GT, SA and PG: acquisition, analysis or interpretation of data. GT and PG: drafting of the work. ASG, TG, ZH, RJ, MCT, CN, SA, FF, MP and BD: revising the work. ASG, TG, GT, ZH, RJ, MCT, CN, SA, FF, MP, BD and PG: approval of the final version. ASG, TG, GT, ZH, RJ, MCT, CN, SA, FF, MP, BD and PG: agreement for all aspects of the work.

Funding This work was partly funded by the French Agence Nationale pour la Recherche, TecSan 2012, CORRIMO 3D.

Competing interests PG and GT are consultant for Thea laboratories and Quantel Medical.

Ethics approval Ethic committee: IRBNS62015/CHUSTE.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Armitage WJ, Dick AD, Bourne WM. Predicting endothelial cell loss and long-term corneal graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3326–31.
- Borderie VM, Boille PY, Touzeau O, et al. Predicted long-term outcome of corneal transplantation. *Ophthalmology* 2009;116:2354–60.
- Riddlesworth TD, Kollman C, Lass JH, et al. A mathematical model to predict endothelial cell density following penetrating keratoplasty with selective dropout from graft failure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:8409–15.
- Damiano RE, Van Horn DL, Schultz RO. Trepthination of donor corneal buttons: a scanning electron microscopic study. *Ann Ophthalmol* 1978;10:479–85.
- Böhrke M, Draeger J, Niesmann U. Effect of the cutting procedure on the vitality of corneal endothelium in donor material. *Ophthalmic Res* 1982;14:459–65.
- Moshirfar M, Meyer JJ, Kang PC. A comparison of three methods for trephining donor corneal buttons: endothelial cell loss and microscopic ultrastructural evaluation. *Curr Eye Res* 2009;34:939–44.
- Pipparelli A, Thuret G, Toubeau D, et al. Pan-corneal endothelial viability assessment: application to endothelial grafts pre-dissected by eye banks. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:6018–25.
- Thuret G, Chiquet C, Bernal F, et al. Prospective, randomized clinical and endothelial evaluation of 2 storage times for cornea donor tissue in organ culture at 31 degrees C. *Arch Ophthalmol* 2003;121:442–50.
- Campolmi N, Trone MC, Neltzouli C, et al. Very early endothelial cell loss after simultaneous corneal autograft and allograft. *Cornea* 2014;33:201–6.
- Campolmi N, He Z, Acquart S, et al. Comparison of endothelial cell density of organ cultured corneas with cornea donor study. *Cornea* 2014;33:597–603.
- Deb-Joardar N, Thuret G, Zhao M, et al. Comparison of two semi-automated methods for evaluating endothelial cells of eye bank corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3077–82.
- Gain P, Thuret G, Kodjikian L, et al. Automated tri-image analysis of stored corneal endothelium. *Br J Ophthalmol* 2002;86:801–8.
- Acquart S, Gain P, Zhao M, et al. Endothelial morphometry by image analysis of corneas organ cultured at 31 degrees C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1356–64.
- Deb-Joardar N, Thuret G, Gavet Y, et al. Reproducibility of endothelial assessment during corneal organ culture: comparison of a computer-assisted analyzer with manual methods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2062–7.
- Deb-Joardar N, Thuret G, Racine GA, et al. Standard microlithographic mosaics to assess endothelial cell counting methods by light microscopy in eye banks using organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4373–7.
- Bernard A, Campolmi N, He Z, et al. Corneal: an ImageJ Plugin for semi-automated measurement of corneal endothelial cell viability. *Cornea* 2014;33:604–9.
- Szaflik JP, Kaminska A, Udziała M, et al. In vivo confocal microscopy of corneal grafts shortly after penetrating keratoplasty. *Eur J Ophthalmol* 2007;17:891–6.
- Borderie VM, Baudrimont M, Lopez M, et al. Evaluation of the deswelling period in dextran-containing medium after corneal organ culture. *Cornea* 1997;16:215–23.
- Thuret G, Manissolle C, Campos-Guyotat L, et al. Animal compound-free medium and poloxamer for human corneal organ culture and deswelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:816–22.
- Zhao M, Thuret G, Piselli S, et al. Use of poloxamers for deswelling of organ-cultured corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:550–9.
- Zhao M, Campolmi N, Thuret G, et al. Poloxamines for deswelling of organ-cultured corneas. *Ophthalmic Res* 2012;48:124–33.
- Lass JH, Sugar A, Benetz BA, et al. Endothelial cell density to predict endothelial graft failure after penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 2010;128:63–9.
- Terry MA, Shamie N, Chen ES, et al. Endothelial keratoplasty: the influence of preoperative donor endothelial cell densities on dislocation, primary graft failure, and 1-year cell counts. *Cornea* 2008;27:1131–7.
- Price MO, Calhoun P, Kollman C, et al. Descemet stripping endothelial keratoplasty: ten-year endothelial cell loss compared with penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 2016;123:1421–7.
- Armitage WJ, Jones MN, Zambrano I, et al. The suitability of corneas stored by organ culture for penetrating keratoplasty and influence of donor and recipient factors on 5-year graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:784–91.
- Böhringer D, Böhringer S, Poxleitner K, et al. Long-term graft survival in penetrating keratoplasty: the biexponential model of chronic endothelial cell loss revisited. *Cornea* 2010;29:1113–17.
- Patel SV, Hodge DO, Bourne WM. Corneal endothelium and postoperative outcomes 15 years after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2005;139:311–19.
- Regis-Pacheco LF, Binder PS. What happens to the corneal transplant endothelium after penetrating keratoplasty? *Cornea* 2014;33:587–96.
- Bertelmann E, Pleyer U, Rieck P. Risk factors for endothelial cell loss post-keratoplasty. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84:766–70.
- Harper CL, Boulton ME, Marczyniak B, et al. Endothelial viability of organ-cultured corneas following penetrating keratoplasty. *Eye (Lond)* 1998;12(Pt 5):834–8.
- Hagenah M, Carstens D, Böhrke M, et al. Development of endothelium cell density using fresh and organ cultured tissue. 5 years after penetrating keratoplasty. *Ophthalmologie* 1997;94:90–3.
- Frueh BE, Böhrke M. Prospective, randomized clinical evaluation of Optisol vs organ culture corneal storage media. *Arch Ophthalmol* 2000;118:757–60.
- Lass JH, Gal RL, Dontchev M, et al. Cornea Donor Study Investigator Group. Donor age and corneal endothelial cell loss 5 years after successful corneal transplantation. Specular microscopy ancillary study results. *Ophthalmology* 2008;115:627–32.e8.

PUBLICATION 4: (SOUMISE) INNOVATIVE CORNEAL BIOREACTOR
FOR LONG-TERM EYE BANKING

Innovative corneal bioreactor for long-term eye banking

Thibaud Garcin,^{1,2} Anne-Sophie Gauthier, MD,¹ Emmanuel Crouzet, PhD,¹ Zhiguo He, PhD,¹ Pascal Herbepin,¹ Chantal Perrache,¹ Sophie Acquart PhD,³ Fabrice Cognasse PhD,³ Fabien Forest, MD, PhD,^{1,4} Gilles Thuret, MD, PhD,^{1,2,5} Philippe Gain, MD, PhD,^{1,2}

1. Laboratory Biology, Engineering and Imaging of Corneal Grafts, BiiGC, EA2521, Federative Institute of Research in Sciences and Health Engineering, Faculty of Medicine, Jean Monnet University, Saint-Etienne, France
2. Ophthalmology Department, University Hospital, Saint-Etienne, France
3. Eye bank, French Blood center, Saint-Etienne, France
4. Pathology Department, University Hospital, Saint-Etienne, France
5. Institut Universitaire de France, Boulevard Saint-Michel, Paris, France

Correspondence and address for reprints:

Professor Gilles Thuret, MD, PhD

Corneal Graft Biology, Engineering and Imaging Laboratory, EA 2521

Faculty of Medicine, Jean Monnet University

10, Rue de la Marandière,

F-42055 Saint-Etienne Cedex 2, France.

Tel: +33 (0)4 77 12 77 93 Fax: +33 (0)4 77 12 09 95

E-mail: gilles.thuret@univ-st-etienne.fr

Financial Support:

Agence Nationale de la Sécurité du Médicament (ANSM) : research grant 2012 BANCO; EFS 2012 research grant; research grant from the University Jean Monnet 2014, Fondation de France Bourse Berthe Fouassier 2016, Fondation Université Jean Monnet 2017, Fondation de l'Avenir 2017 Leg Deroche, Agence de la Biomédecine research grant 2017.

Abstract

Optimal ex vivo corneal storage in eye banks is crucial both to increase the number of corneas suitable for graft and their intrinsic quality, mainly their number of viable endothelial cells (EC) that governs graft survival in recipients. In both passive storage methods in use worldwide (short-term cold storage in the USA and long-term organ culture (OC) in Europe), a significant EC loss is inevitable. Here we show that, with an active storage in an innovative bioreactor that restores the intra ocular pressure and medium renewal, two fundamental physiologic parameters, EC survival is improved by 23% compared with OC, after a 4 week-storage. A 4-fold higher expression of Na⁺/K⁺ ATPase that supports one of the major EC pumping functions is also observed in the bioreactor. In addition, corneas remain thin and transparent, making them suitable for surgery at any time. This new active method of eye banking may contribute to reduce the huge scarcity for donor corneas worldwide.

Key words: cornea, human, bioreactor, long-term storage, endothelium, eye banking, viability, intra ocular pressure

Introduction

With nearly 200,000 people operated on each year in the world, corneal transplantation (keratoplasty) is the most frequent transplantation. Nevertheless, the shortage of donors remains immense since global needs are 70 times greater (*Gain et al., 2016*). Any process likely to increase the number and quality of transplants available therefore deserves to be explored.

For 70 years after the first keratoplasty in the early 20th century, the cornea had to be transplanted within hours of the donor's death. With these so-called fresh grafts, the very short delay between death and transplantation enabled to preserve the viability of the corneal tissue and especially of its endothelium, a monocellular layer situated at the inner part of the cornea, deprived of proliferating capacity and necessary for maintenance of corneal transparency by effect of barrier and of pumping of water of the corneal stroma. Fresh grafting, on the other hand, did not allow any organizational flexibility, remained limited to the scale of a hospital department and did not ensure satisfactory microbiological safety because of the reduced delay.

To overcome these major disadvantages blocking the spread of transplantation, eye banking was developed in the 1970s, first in the USA, with two main techniques that persist today: short-term storage in hypothermia (up to 10 days) and long-term storage at physiological temperature called organoculture (OC) (up to 5 weeks) (*L. Pels, 1997*).

Importantly, both techniques are passive, consisting simply of immersing the cornea, isolated from the rest of the eyeball, in a storage liquid derived from cell biology. The OC medium contains fetal calf serum to ensure cell survival over time but the hypothermic storage medium does not because of the reduced metabolic activities due to cold. Neither of these two techniques takes into account corneal physiology and in particular the critical role of intraocular pressure (IOP) shown in *Figure 1*. In spite of the immense service rendered for years and still today by the two storage techniques, it is undoubted that corneas undergo irreversible alteration during storage ((*Albon, Tullo, Aktar, & Boulton, 2000; Gain et al., 2002; Komuro, Hodge, Gores, & Bourne, 1999*), especially an endothelial cell loss hundreds of times faster than during the donor life, in OC (*Thuret et al., 2003*) like in cold storage (*Kitazawa et al., 2017*).

This accelerated cell loss during storage has several consequences: 1/ for the recipient, it reduces the available cell capital whereas it is obviously one of the factors determining the survival of the graft (*Armitage, Dick, & Bourne, 2003; Nishimura, Hodge, & Bourne, 1999*); 2/ for the bank, it explains the existence of a storage limit: beyond that, the risk is too high of having a graft of poor quality leading to abnormally short survival in the recipient or, in the

extreme, primary failure; 3/ finally, it is also responsible for part of the destruction of grafts by banks when their quality becomes insufficient. As such, 34% of the 40894 corneas preserved in OC in Europe in 2016 (*EEBA, 2018*) and 39% of the 136318 corneas preserved in hypothermia in the USA in 2016 (*EBAA, 2017*) were not used for keratoplasty. The degradation of cellular quality is an important part of the reasons for non-compliance, but the data from the two registers cited do not allow us to quantify it precisely. By experience, we estimate it between 10 and 20%.

In order to reconstitute a more physiological corneal environment and break the vicious circle of hypotonia/corneal edema/endothelial lesions, we have developed a bioreactor that reconstitutes a transcorneal pressure gradient equivalent to IOP and a renewal of the nutrient medium, thus defining the notion of active conservation (*Guindolet et al., 2017*). This work compares passive OC storage with active storage in the bioreactor.

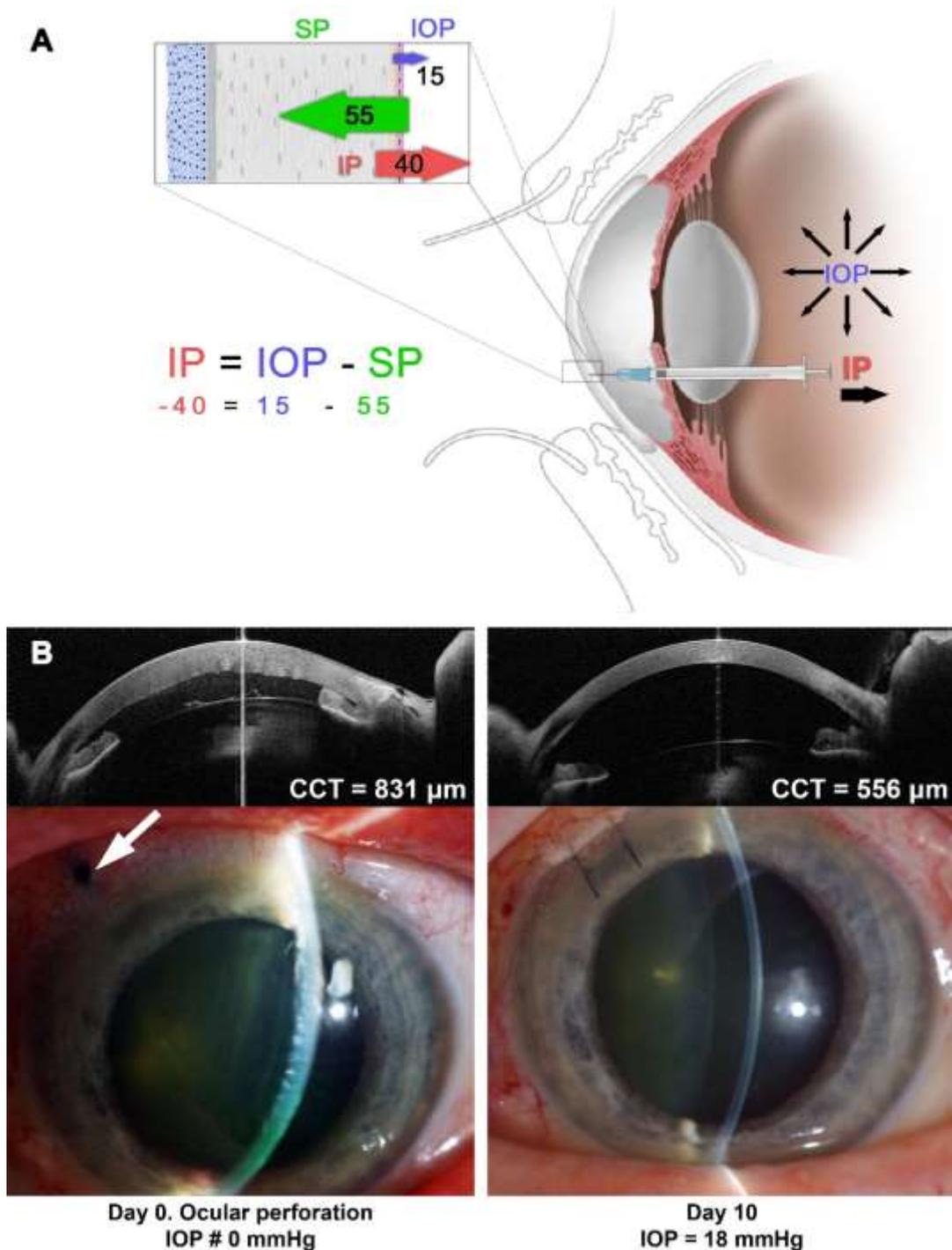


Figure 1. Role for intra ocular pressure in corneal physiology.

(A) The control of corneal shape, transparency and thickness requires the functioning of the endothelial pump, and the presence of a normal intra ocular pressure (IOP). The biochemical composition of the stromal extracellular matrix explains its natural swelling when immersed in water. This swelling pressure (SP) (of 55 mmHg in humans) is counterbalanced by the IOP (15 \pm 5 mmHg) that constantly push forward the posterior corneal surface and by the constant water efflux exerted by the endothelial pump. The latter is assimilated to the imbibition pressure (IP) and the equilibrium can be summarize with the equation $IP=IOP-SP$ (Bryant & McDonnell, 1998). After donor's death and even more after corneal excision, the loss of IOP associated with the

progressive loss of endothelial pumping functions explain the rapid swelling of the cornea that almost double in thickness, reaching 1000-1100 μm . The posterior part of the cornea becomes more edematous than the anterior part because of a different arrangement of its collagen fibers, and forms numerous folds reaching 200 μm of depth. A vicious circle arises: the edematous stroma forms endothelial folds responsible for a major EC stress and cell death (*Albon et al., 2000; Gain et al., 2002; Komuro et al., 1999*); the damaged endothelium is incapable of pumping the excess water; the stroma keeps swelling until reaching a new steady state. During passive storage, the edema is only partially reversed with osmotic molecules (e.g. dextran in OC or chondroitine sulfate in cold storage) (*E. Pels & Schuchard, 1983*) added to the storage media. **(B)** Clinical illustration of the close relationship between IOP and corneal thickness. Ocular hypotonia was caused by a penetrating wound in the iridocorneal angle (white arrow). With IOP close to zero, the cornea spontaneously swelled and presented posterior folds despite normal endothelial cells. After surgical repair with a scleral patch, IOP and thickness regained normal values and folds disappeared. CCT = central corneal thickness. Color: slit lamp images of the anterior segment. Black and white: sagittal cross section obtained by optical coherence tomography.

Results

Baseline donor characteristics are similar to the usual donor population

A total of 98 donors were screened between March 1, 2016 and November 24, 2016. The nurses of the hospital coordination for organ and tissue recovery collected the absence of opposition to a scientific donation for 60 of them. Of the 60 pairs of corneas that were enrolled and randomized to be stored in the BR vs in OC, 8 did not meet the inclusion criteria at D2 and 52 continued the protocol. Donors were 24 females and 28 males. Their mean age was 79 \pm 12 years old (from 49 to 97). Time between death and procurement was 16 \pm 4 hrs (from 4.30 to 24.00 hrs). Twenty nine percent of eye had benefited from a cataract surgery with intraocular lens implantation (same number in both groups).

The rate of microbiological contamination is low and comparable in both groups

Only one cornea in each group (from 2 different donors) was found contaminated, both positive on the day(D)2 tests. A *Staphylococcus haemolyticus* was found in the OC cornea (detected 17 hrs after sample inoculation in the blood bottle) and a *Enterococcus Faecium* (detected 3 hrs after sample inoculation in the blood bottle) in the BR. The other cornea of each pair remained sterile, continued the storage but was not included in the pairwise analysis thus leaving 50 pairs in the statistical analysis.

Endothelial cell density is higher after storage in the bioreactor

Large numbers of ECs were counted in order to obtain a large sampling and increase cell count reliability. At D2, a mean of 1008 \pm 426 (with specular microscopy) versus 1879 \pm 595 (with light microscopy) cells were numbered for the BR and OC respectively ($P<0.001$) and at D26, 1437 \pm 415 versus 1856 \pm 571 ($P<0.001$). In order to quantify the final endothelial assessment with the triple Hoechst/Ethidium/Calcein-AM staining, 23844 \pm 8846 versus 18643 \pm 8015 cells were analysed for the BR and OC respectively ($P<0.001$).

Corneas of both groups had similar ECD at retrieval (D2) with 2607 \pm 340 versus 2577 \pm 357 cells/mm² respectively for the BR and for OC ($P=0.243$). At D26, ECD was significantly higher in the BR with 2350 \pm 322 vs 2061 \pm 412 cells/mm² in OC ($P<0.001$). The mean difference was of 290 cells/mm², 95%CI (198-382), corresponding to 12% more EC in the BR. We calculated daily EC loss, assuming that the rate of decay (λ) was constant over time for the

26 days (with $ECD_{t2}=ECD_{t1}*e^{\lambda*(t2-t1)}$). It was of 0.44% per storage-day $_{95\%CI}(0.44-0.45)$ for the BR and 0.93% $_{95\%CI}(0.86-1.01)$ for OC. In addition, the cell loss was also calculated from the individual data of each cornea. It was of 0.41% per storage-day $_{95\%CI}(0.32-0.50)$ for the BR and 0.85% $_{95\%CI}(0.73-0.97)$ for OC ($P<0.001$).

When the viable ECD were compared at D28, the difference was also significant and higher in size: 2188 ± 379 in the BR versus 1687 ± 389 cells/mm² in OC ($P<0.001$). The mean difference of 501 cells/mm² $_{95\%CI}(429-572)$ corresponded to 23% more viable cells in the BR. Results are represented **Figure 2A**.

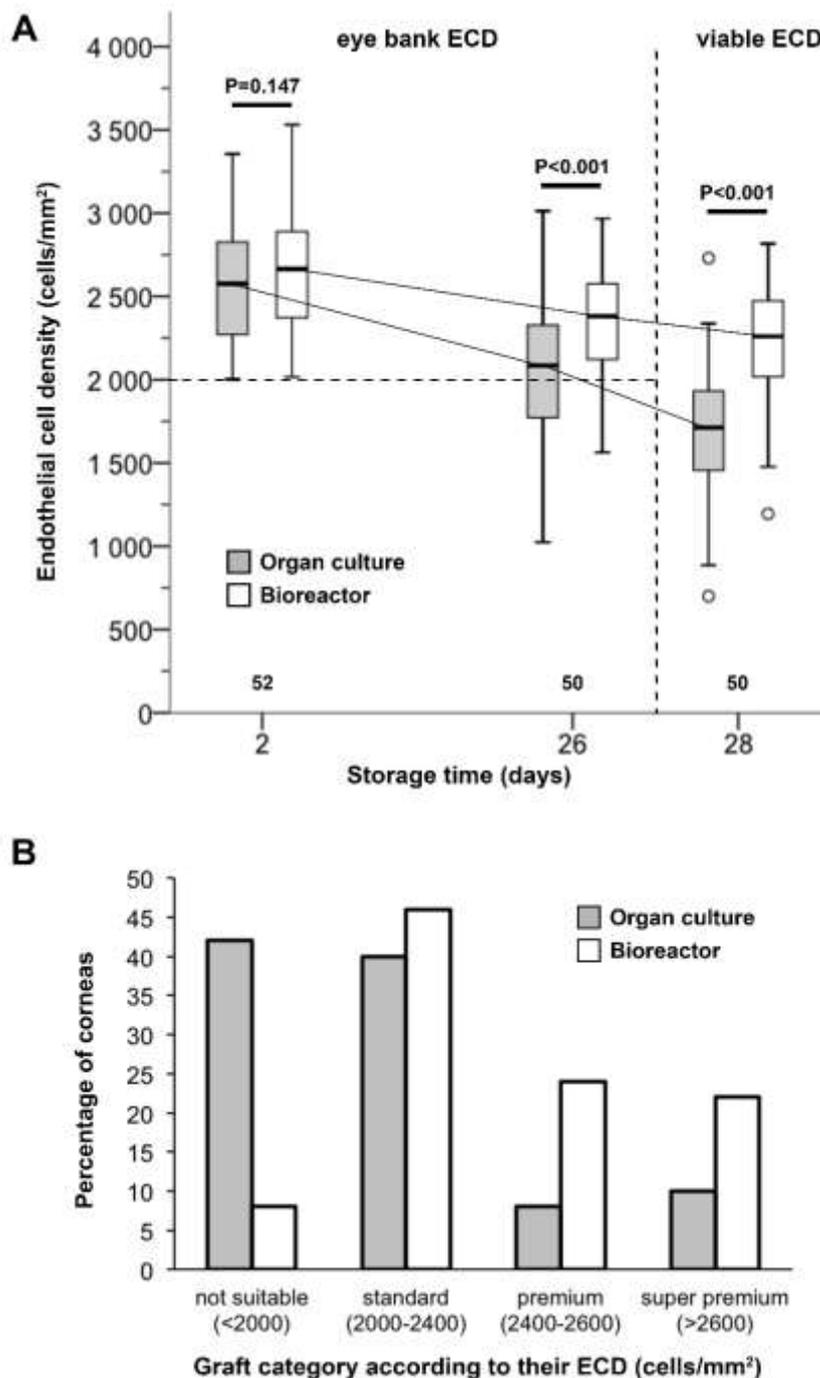


Figure 2. Endothelial quality during storage in the bioreactor versus in organ culture.

(A) Box plots of the endothelial cell density (ECD) over time. Thick horizontal lines show the distribution median; boxes, the interquartile range (IQR); and individual circles, the outliers between 1.5 and 3 times the IQR. Whiskers mark the highest and lowest non-outlying values. The number of pairs of corneas remaining at each time point is given under the boxes. The horizontal hatched bar represented the usually accepted ECD threshold for non-suitability of corneas, based on the eye bank cell count. (B) Graft quality at the end of the 4 week-storage. The 3 categories (standard, premium and superpremium) schematically corresponded to 3 specific surgical techniques requiring increasing ECD: penetrating keratoplasty (PK), Descemet Stripping Automated endothelial keratoplasty (DSAEK) and Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK).

In a pragmatic way, we defined 3 groups of increasing ECD corresponding to 3 categories of corneas used in numerous eye banks worldwide. Because the number of ECs transferred to the recipient's eye is the only cellular parameter that can be quantified by eye banks and because there is a strong biologic background on the role of EC in graft survival, it is admitted that the higher the ECD the higher the probability of prolonged survival. In addition, since 10 years, new surgical techniques of corneal grafts called endothelial keratoplasty (EK) have become the method of choice for treating a category of frequent corneal diseases called endothelial dystrophies, because they allow selective replacement of the endothelium. EK require a specific preparation of the tissue and specific techniques of implantation, both steps known to kill a significant number of ECs. Furthermore, in endothelial dystrophies, the recipient's endothelium is, by definition, severely impaired and post-operatively, transparency of the cornea relies only on the donor ECs carried by the graft. For these two reasons, EK require the use of donor cornea with high ECD. Corneas having more than 2600 cells/mm² were named superpremium, premium was used for corneas between 2400 and 2600 cells/mm² and standard for those between 2000 and 2400 cells/mm². The superpremium corneas are theoretically best suited for Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK, a technique requiring the manual dissection of the endothelium of the donor cornea), the premium corneas for Descemet Stripping Automated Endothelial keratoplasty (DSAEK, another EK technique comprising the lamellar cutting of the donor cornea with a microkeratome or a femtosecond laser) and the standard corneas for penetrating grafts. The latter is the reference corneal graft technique, applicable for all corneal diseases and still the most frequently used worldwide (*Gain et al., 2016*). Although the definitions of these ECD thresholds were not established from clinical trials, they correspond to the reality in the world of eye banking. At retrieval, the distribution of corneas in the 3 categories (standard, premium, superpremium) did not differ between the BR and OC with respectively 16 standard, 12 premium, 22 superpremium in OC and 14 standard, 8 premium, 28 superpremium in BR ($P=0.438$). After a 4 week-storage, there quality was significantly decreased in OC (**Figure 2B**) compared to the BR. In particular, in OC 87.5% of the standard corneas became not suitable for graft because their ECD fell below 2000 cells/mm² (threshold for non-suitability for most of the eyebanks worldwide), compared to 29.0% only in the BR ($P<0.001$). Thirteen percents of the superpremium corneas and 33% of the premium corneas in the OC groups also became not suitable for graft versus none in the BR group ($P<0.001$). Furthermore, in the superpremium group, 46% were downgraded to standard graft in the OC group versus 32% in the BR group ($P<0.001$).

Corneas stored in the bioreactor are thinner and more transparent than in organ culture

Restoration of the IOP allowed a rapid decrease of corneal thickness, resulting in thinner corneas at D2. This reduction continued at a lower rate during storage in the BR, contrary to OC where corneal thickness kept increasing. Notably, the distribution of thickness between the different corneas was narrower in the BR than in OC whatever the time point. After 48hrs deswelling, the OC corneas were significantly thinner than the BR corneas (608 ± 53 versus 684 ± 52 μm $P < 0.001$) (**Figure 3A**). Cross section OCT (**Figure 3B**) clearly showed that the BR contributed to an almost complete disappearance of posterior folds that remained marked in OC corneas until the final deswelling step.

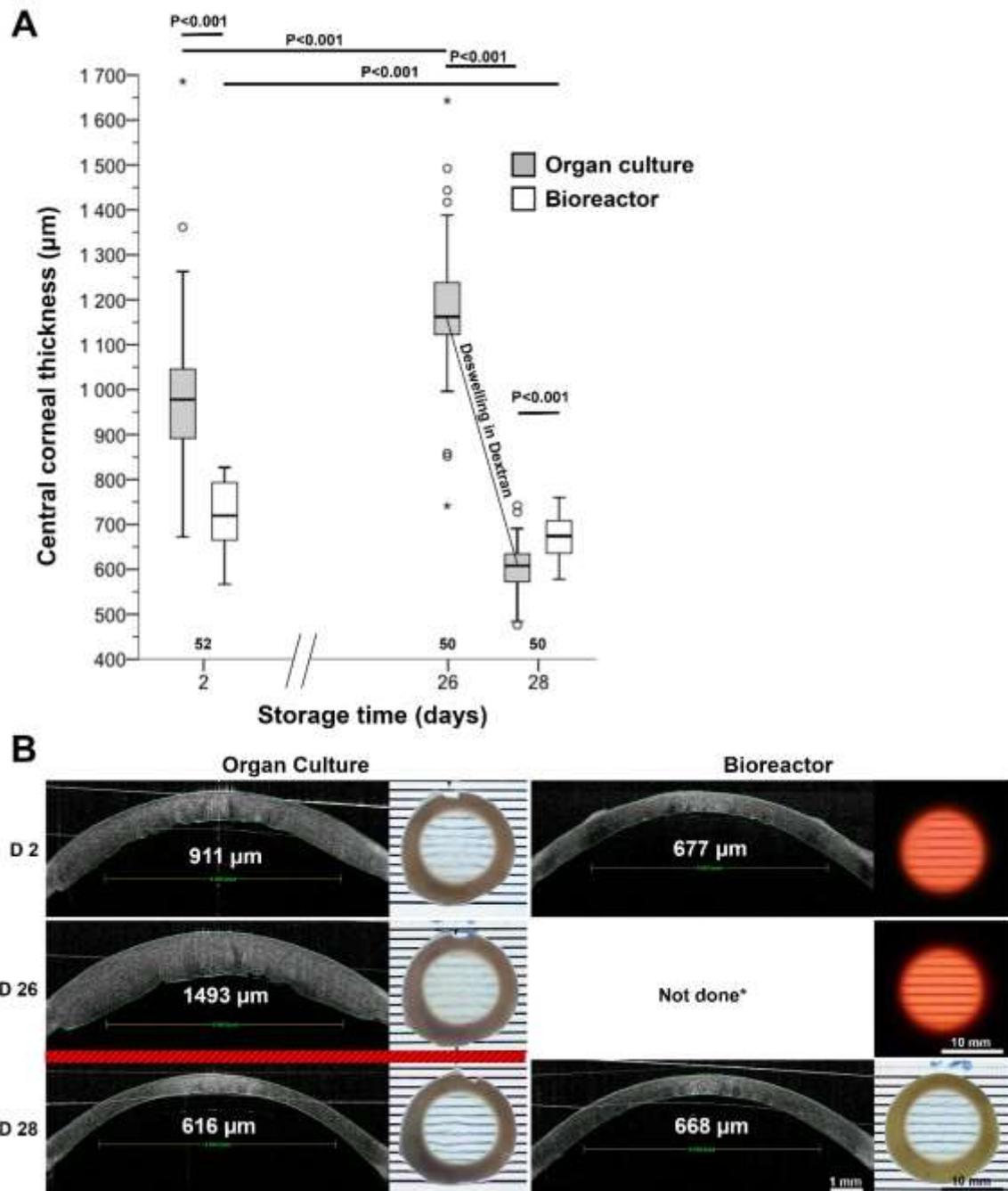


Figure 3. Evolution of corneal thickness and transparency during storage

(A) Box plots of the central corneal thickness over time. Thick horizontal lines show the distribution median; boxes, the interquartile range (IQR); and individual circles, the outliers between 1.5 and 3 times the IQR. Whiskers mark the highest and lowest non-outlying values. The number of pairs of corneas remaining at each time point is given under the boxes. Note that organ cultured (OC) corneas were immersed at D26 for 2 days in a Dextran-containing medium to allow rapid deswelling according to the procedure routinely used in eye banks. Corneas stored in the bioreactor (BR) did not require deswelling. (B) Representative example of the evolution over time of thickness and transparency of a pair of corneas stored in OC and in the BR. *For thickness, the measurement was not repeated in

the BR at D26 in order to avoid a supplementary manipulation (the epithelial chamber must be emptied to allow performing OCT), but as no change occurred in the functioning of the BR during the whole storage, thickness at D26 was very likely similar as at D28. The red bar represents the 2 day-deswelling step in Dextran-containing medium necessary for OC corneas only. The orange color in the BR was due to the color of storage medium.

Expression of Na⁺/K⁺-ATPase in ECs is significantly higher after storage in the bioreactor.

A stronger staining of Na⁺/K⁺ ATPase was observed in ECs of corneas stored in the BR than in OC (n=17 pairs). On the contrary, the staining of mitochondria by COX IV seemed not different (n=16 pairs). After proteins quantification by western blot, the expression of Na⁺/K⁺ ATPase was 3.8±1.4 (1.6, 6.0) times higher in the BR than in OC (P<0.001, n=14 pairs) whereas the expression of COX IV was not significantly higher in the BR than in OC (ratio = 1.2±0.4 (0.7, 1.8), P=0.110, n=11 pairs).

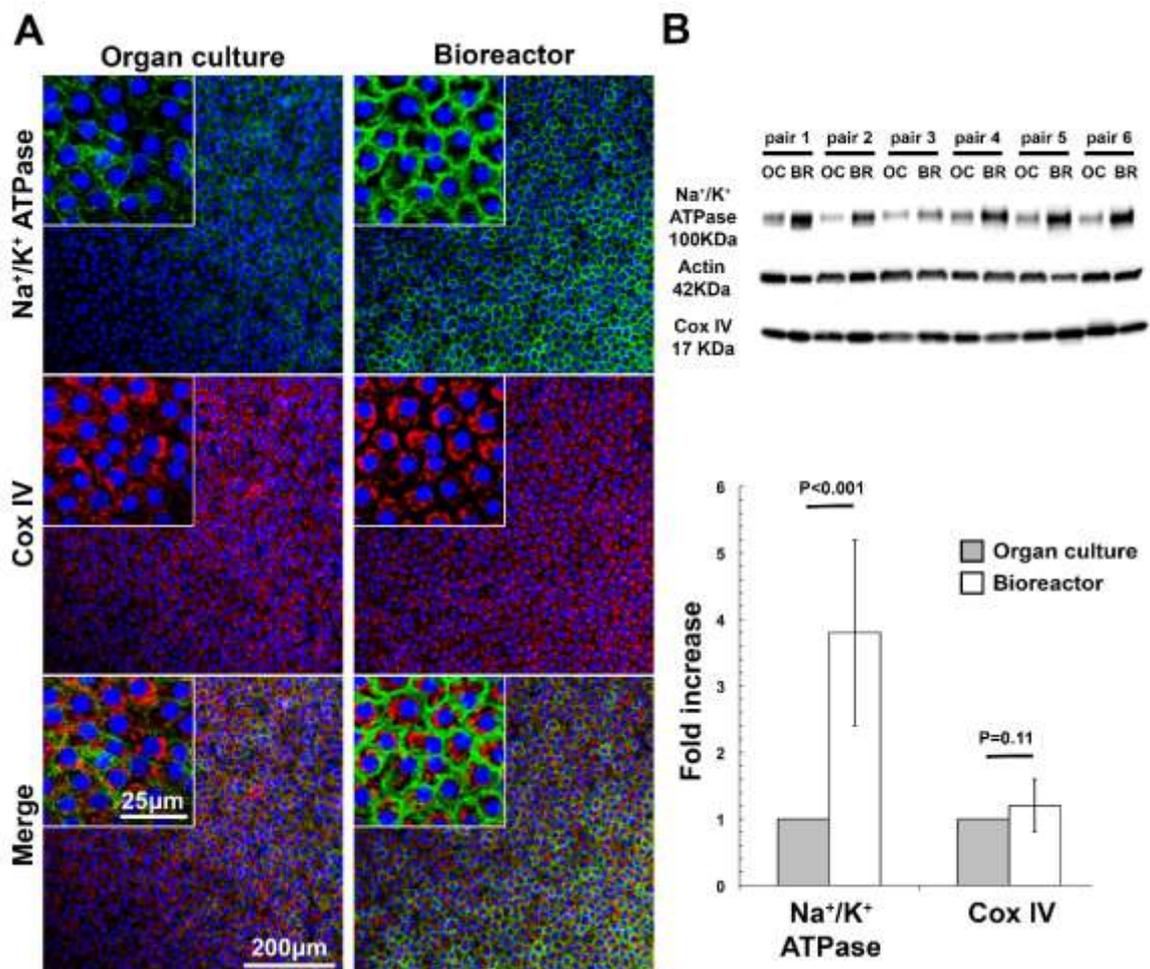


Figure 4. Expression of Na⁺/K⁺ ATPase and COX IV in endothelial cells after 28 days of storage in organ culture and in the bioreactor.

(A) low (for staining homogeneity) and high (for subcellular location) magnification of immunostaining for Na⁺/K⁺ ATPase (n=17 pairs) and COX IV (n=16 pairs) on flat mounted whole corneas. The nuclei were counterstained in blue using To-Pro-3. (B) Western blot for Na⁺/K⁺ ATPase (n=14 pairs) and COX IV (n=11 pairs) and quantitative results. A representative example of the WB is provided for 6 different pairs.

Subcellular structures of ECs are better preserved in the bioreactor than in organ culture

For all the pairs of corneas studied, the hexagonal organization of the apical surface of ECs, perfectly outlined by ZO-1 expression, appeared more regular in the BR than in OC. In addition, ECs of corneas stored in the BR presented more complex interdigitation of their lateral membranes as revealed by N-CAM expression. These two features were characteristic of normal ECs in vivo (*Figure 5*).

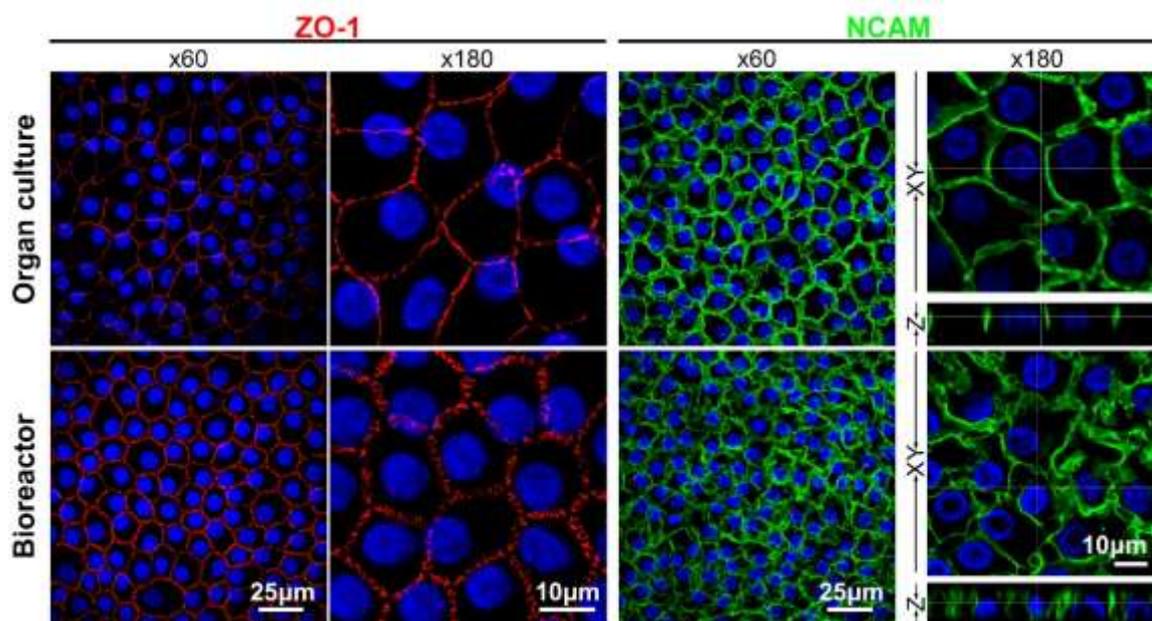


Figure 5. Assessment of subcellular structures of endothelial cells. In addition to an higher endothelial cell density, visible on the pictures, the endothelial cells of corneas stored in the bioreactor presented morphological features closer with cells of in vivo corneas than corneas stored in organ culture. The apical surface was revealed by labeling ZO-1 of the tight-junctions and the lateral membranes by labeling N-CAM. The nuclei were counterstained in blue using To-Pro-3.

The epithelium remains multilayered in the bioreactor

For all the pairs of corneas studied, the labeling of CK3+12 and of E-cadherin showed a better organization of the epithelium in the BR than in OC, with more numerous fully differentiated superficial K3K12+ cells and well defined E-cadherin expression in plasma membranes of superficial and wing cells (intermediate epithelial layers). Δ Np63+ cells were found in the basal cell layer in both groups and seemed comparable (**Figure 6**). On confocal images, the epithelial thickness was $15\pm 8 \mu\text{m}$ (0, 33) in BR versus $7\pm 6 \mu\text{m}$ (0, 22) in OC ($P<0.01$), corresponding with was 3.3 ± 1.5 (0, 6) cell layers in BR versus 1.6 ± 0.9 (0, 4) in OC ($P<0.01$). This was consistent with the HES stained cross sections that showed a better-preserved epithelium in the BR than in OC.

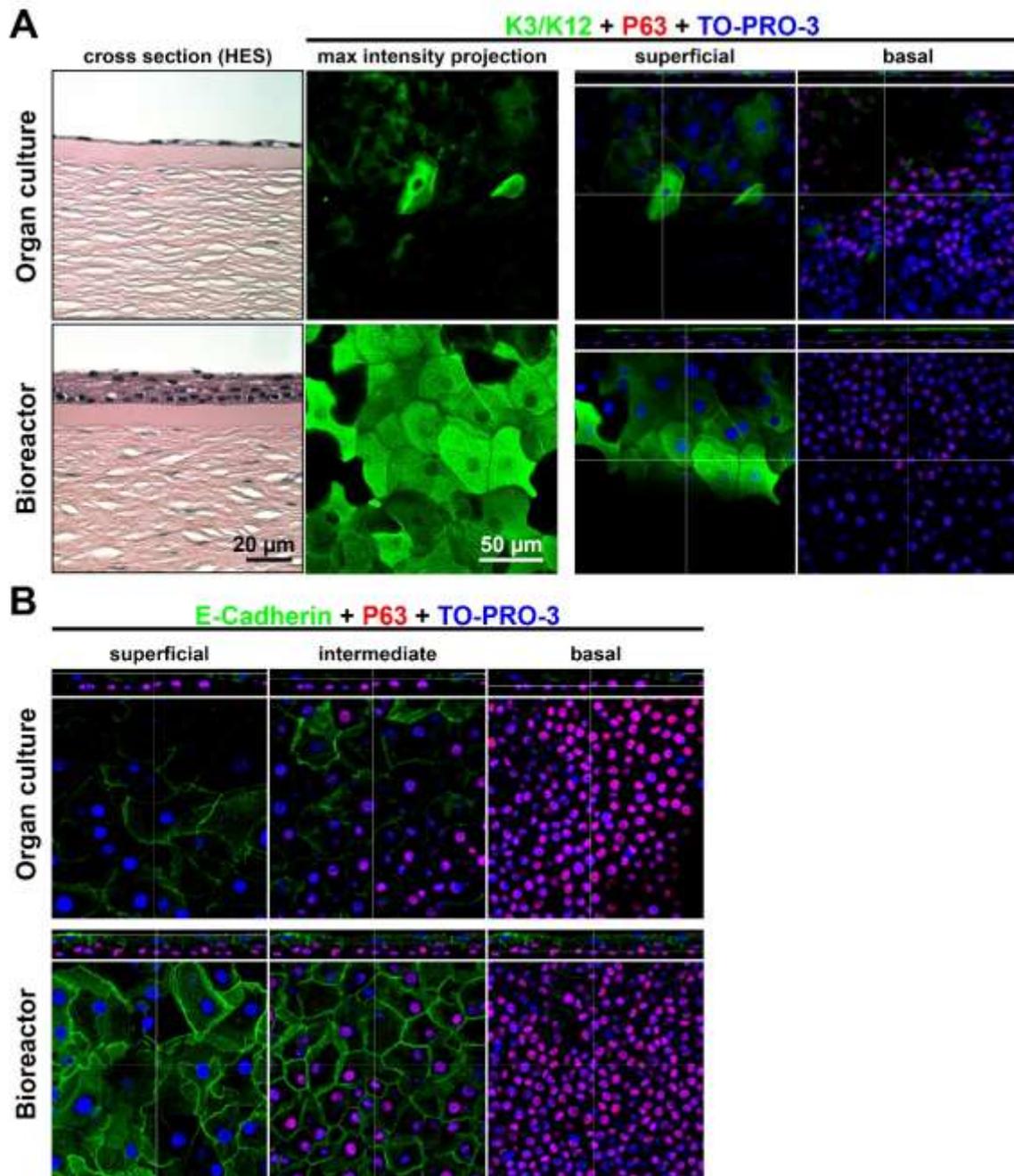


Figure 6. Central epithelium after 28 days in organ culture or in the bioreactor. (A) Histological cross sections stained by Hematein Eosin Saffron (HES) are put in perspective with immunostaining on flat mounted whole corneas. Differentiated epithelial cells was stained using anti-Cytokeratin K3/K12 and progenitors were stained using anti-P63; the first column showed expression of CK3+12 using maximum projection of whole epithelial thickness; The last two columns showed superficial and basal expression of CK3+12 and Δ Np63. **(B)** The superficial, intermediate and basal layers of the epithelium were stained using anti-E-cadherin and anti- Δ Np63 (n=5). Nuclei were counterstained in blue using To-Pro-3.

Discussion

We have developed a corneal bioreactor that restores a transcorneal pressure gradient that reproduce the physiologic IOP, and renewal of the culture medium that baths both sides of the cornea, thus defining an active corneal storage system. The present preclinical study of human paired corneas reveals that this new device dramatically improves corneal quality by increasing endothelial survival and allowing better control of thickness and transparency. To the best of our knowledges, for the first time, a machine perfusion improves a tissue (not a vascularized organ) destined to grafting. Interestingly, we also identified an increased expression of Na^+/K^+ -ATPase, the major function protein of ECs, demonstrating a better intrinsic cell quality and suggesting better function. Although there have been a number of previous studies describing perfusion chambers or anterior artificial chambers (*Brunette, Nelson, & Bourne, 1989; Dikstein & Maurice, 1972; Frenzt, Goss, Reim, & Schrage, 2008; Hull, Green, Boyd, & Wynn, 1977; Tanelian & Bisla, 1992; Thiel et al., 2001; Zhao et al., 2006*) our bioreactor is the only one designed to recreate a closed, sterile environment for long-term corneal storage. In addition, the two transparent windows on either side of the cornea allow permanent monitoring of tissue quality (cell counting, transparency and thickness measurement) without deconditioning.

The only 2 storage systems currently used in the world (cold storage and OC) ensure the minimum vital for the temporary survival of ECs but their mortality remains much higher than physiological mortality. They thus do not survive beyond 10-15 days at 4°C (unknown and probably non-linear daily mortality) and die at an average rate of 1% per day (600 times faster than in vivo (*Thuret et al., 2003*)) during OC which can be prolonged for 5 weeks. The exact mechanisms are not completely elucidated but the role of apoptosis has been demonstrated in both cases (*Albon et al., 2000; Gain et al., 2002; Komuro et al., 1999*). Moreover, at the end of OC, a final step of 24 to 72 hours of immersion in a hyperosmolar environment by adding Dextran macromolecules is essential to reduce the thickness. This step further increases endothelial mortality by 7% per day of deswelling (*Borderie, Baudrimont, Lopez, Carvajal, & Laroche, 1997; Knels, Goetze, Engelmann, & Valtink, 2014; Thuret, Manissolle, Campos-Guyotat, Guyotat, & Gain, 2005*).

In this preclinical study, we used a methodology close to that of a clinical trial by choosing the ECD as the main objective criterion allowing an a priori calculation of the number of corneas to be included to demonstrate an interest in BR.

The endothelial images used to measure ECD were different in nature in the 2 groups (transmitted light microscopy and specular microscopy) and therefore could not be analyzed blind to the storage method. Nevertheless, computerized counting (the same for both types of images) is an objective method, performed on calibrated images and we deliberately took into account a very large number of cells to minimize the usual counting biases of cornea banks (eye banks usually assess the ECD by counting in mean only 100 EC (*Thuret et al., 2004*)). In addition, the vDCE measurement determined on absolutely similar images for the 2 groups was carried out blind to the storage method and on a very large number of ECs corresponding to approximately one-tenth of the total number of graft cells. The other methods of analysis were all objective methods. Thickness measurements, immunolabeling, WB and histology were performed blind to the storage method.

We used the same storage medium for both groups to ensure comparability and to isolate the effect of the BR. It is a commercial DMEM-based medium supplemented with 2% FCS, derived from the media described in the 1980s, i.e. from the beginning of the OC. The same batches were used for both corneas from the same donor. Furthermore, we considered that the best control group was the reference method in Europe and followed a standard OC sequence. Nonetheless, it has recently been shown that, in vitro, several serum free media could preserve endothelial and epithelial cell viability better than the medium used in the present study (*Valtink, Donath, Engelmann, & Knels, 2016*). In addition, since OC media are not intended for renewal, they contain non-physiological doses of nutrients (glucose in particular). It is not excluded that these too high concentrations are harmful. The continuous renewal of the environment in the BR will allow the use of physiological concentrations. A more suitable environment is therefore likely to further improve the BR performance.

The main mechanism of improved endothelial survival appears to be a decrease in thickness and posterior folds formation due to the restoration of IOP that characterizes active storage. This recovery breaks the vicious cycle of "hypotonia-swelling-folds-endothelial mortality" that begins upon death and increases during passive storage. However, the significant increase in Na⁺/K⁺-ATPase expression in the bioreactor also suggests a more direct action of IOP on ECs through mechanotransduction. It is therefore likely that IOP is necessary for long-term endothelial survival via transduction of specific signals, but this remains to be demonstrated. Finally, compared to OC, the absence of direct manipulation and in particular the suppression of the final deswelling step, itself deleterious (*Borderie et al., 1997; Knels et al., 2014; Thuret, Manissolle, et al., 2005*), also contribute to the global improvement of endothelial survival.

Improving endothelial survival is a critical criterion for patients and eye banks. For patients, the number of donor ECs is one of the factors that influence postoperative graft survival. It has indeed been clearly demonstrated that donor ECs survive for many years in the recipient but with great variations between individuals (*N. S. Lagali et al., 2010; N. Lagali et al., 2009*). Indeed, when the transplant indication is an endothelial disease, the donor ECs are the only ones to ensure corneal transparency in the recipient. They migrate to the corneal periphery to re-form an intact endothelium. When the recipient still has his own functional ECs, his residual ECs on the periphery and the ECs of the graft in the centre share the work. Moreover, the higher the number of graft ECs, the better the graft's resistance to intercurrent events (mainly rejection episodes, hypertonia and cataract surgery), and the better its long-term survival. Nevertheless, overall, the life span of transplanted ECs remains much shorter than their extreme physiological longevity (annual adult mortality of only 0.3 (*Moller-Pedersen, 1997*) to 0.6% (*Bourne, Nelson, & Hodge, 1997*)). This premature cell death, poorly understood and generally attributed to an low-noise immune reaction, explains that even in the best of cases, a graft, preserved with current techniques, rarely lasts longer than 15 years because its endothelium is depleted. Re-grafting is now a frequent indication both in the USA and in Europe (*Bigan et al., 2018; EBAA, 2017*). The present work demonstrates that the BR reduces endothelial cell loss by half during storage. With, at the time of the transplant, 23% more viable cells than for OC, the cornea preserved in BR will bring to the recipient a cellular capital hitherto unequalled with preserved grafts. It thus approaches the fresh cornea whose endothelial mortality was practically nil at the time of surgery. Increasing the number of viable ECs at transplantation increases the probability of prolonged graft survival and decreases the number of re-grafts. For corneal banks, reducing cell loss during storage allows increasing the number of corneas that remained suitable for graft after a 4 week-storage and maintains the high quality of corneas with initially the highest ECD, called premium and super premium in this work. These corneas are usually chosen for endothelial grafting to compensate for the excess endothelial mortality caused by preparation and implantation. They are particularly sought after by banks that prepare these grafts. Finally, by preventing the formation of endothelial folds, the bioreactor makes endothelial counting more reliable than in OC where counting on folded surfaces exposes to the risk of overestimation of the ECD (*Jumelle et al., 2017*).

In addition to increasing EC survival, the bioreactor improves their morphology and their expression of Na⁺/K⁺ ATPase compared to OC. Endothelial cells might therefore be more functional and contribute to stromal deswelling during storage in BR. The absence of significant

change in the expression level of the mitochondrial protein CoxIV between BR and OC suggests that the changes observed for Na⁺/K⁺ ATPase are specific and not directly related to a metabolic state generally influenced by storage conditions. This result strongly suggests that the physical stimuli of the IOP is transduced inside ECs, resulting in the expression of specific transmembrane proteins involved in the ion pumps. The analysis of these regulatory pathways, hitherto unknown for ECs, could make it possible to identify molecules capable of stimulating the endothelial pump and thus open the way for new pharmacological treatments for endothelial insufficiencies. In addition, ECs of corneas stored in the BR had invariably a better morphology than after OC. With a better polygonal shape of their apical surface and increased length and complexity of their lateral membranes, they appear similar to the normal 3D organization of normal EC that we recently described (*He et al., 2016*). Preservation of a lateral membrane interdigitations correlates with the higher expression of Na⁺/K⁺ ATPase. The restoration of a normal IOP may be the sole stimulus explaining the maintenance of the cell polarity. On the contrary, absence of IOP during passive storage methods may contribute to a transient interruption of EC functions and could also be responsible for EC apoptosis (*Albon et al., 2000; Gain et al., 2002; Komuro et al., 1999*) by absence of transduction of cell survival signals. These results indicate that the BR, not only reduces EC loss but also better preserves morpho-functional characteristics of EC compared to OC. Whether this higher expression of enzymatic pumps could participate to a quicker postoperative deswelling and therefore a quicker visual recovery than with OC corneas remains to be investigated during a clinical trial.

We also demonstrated that the bioreactor significantly improved the corneal epithelium which remains pluristratified and presents a more physiological cellular differentiation than during passive immersion in OC. We recently reported the same result for pig corneas stored in an adapted bioreactor, operating on the same principle (*Guindolet et al., 2017*). The biological mechanisms linking IOP restoration to this improvement will need to be studied. The persistence of a good quality epithelium during storage is important for some corneal transplant recipients. It protects the graft pending regeneration by the recipient's epithelium from his/her limbal stem cells. Some recipients with partial limbal stem cell deficiency are at risk of delayed wound healing, exposing them to infection, aseptic necrosis or opacification. In these not exceptional situations, the graft stored in a bioreactor will improve post-operative safety.

There are some limitations to this work: 1/ The BR has to be incubated in a 5% CO₂ incubator because the storage medium's main buffer is a bicarbonate buffer that requires carbon dioxide-enriched atmosphere for its recycling. CO₂ diffuses easily through the different plastics of the

medium tank and tubings (in particular gaz permeable silicon). Consequently, outside the incubator in the ambient atmosphere with 0.3% CO₂, the pH rapidly increases with time (data not shown). The use of a CO₂-independent buffers in a future custom medium will allow using a simple incubator in a near future; 2/ During corneal assessments, the pressure and flow regulation is temporarily interrupted. Nevertheless, when the circuit is clamped, the pressure is maintained for a short but sufficient time for all the quality controls. A next version of the BR will allow an autonomous regulation without external pump; 3/ Corneas in the BR did not reach exactly the physiologic thickness (in mean 542 µm in adults (*Aghaian, Choe, Lin, & Stamper, 2004*)). Four mutually non-exclusive hypothesis can be proposed to explain the residual edema: i/ abnormal passage of water through residual endothelial damages (not reaching 100% of viability in this experimental setting, contrary to in vivo); ii/ hypofunctional endothelial pumps and/or increase intercellular permeability caused by an imperfect composition of the OC medium as discussed above; iii/ stromal imbibition by the epithelial side because of the permanent immersion in the OC medium; iv/ the 5% CO₂ atmosphere may favor anaerobic corneal metabolism directly involved in stromal edema (*Papas & Sweeney, 2016*). Improvements in the culture medium are therefore likely to further improve the quality of the grafts preserved in the bioreactor.

In other fields, preserving ex vivo the viability of vascularized organs until transplantation has always been a challenge. Beside the conventional passive cold storage (CS), that renders immense services, the first ex vivo machine perfusion has been used for patients for just 50 years (*Belzer, Ashby, Gulyassy, & Powell, 1968*). They restore perfusion (by controlling the flow and/or the pressure), thus allowing the opportunity to flush waste products, provide oxygen and nutrients, and reawaken metabolic function following warm ischemia and cold storage damage and could allow for measurement of graft viability prior to transplantation. They therefore aim at extending storage duration, improving overall quality of suboptimal organs in particular those of extended criteria donors, in order to expand the number of organs suitable for transplantation and to better meet the growing demands of patients on waiting lists (*Ali, Dua, & Cronin, 2015*). For kidney, the use of a machine perfusion is associated with a reduced incidence of delayed graft function, especially in case of prolonged cold ischemic time or marginal donors (*Lam, Laurence, Richardson, Pleass, & Allen, 2013*). Based on several controlled clinical trials, machine perfusion has now become a standard for kidney ex vivo preservation. Machine perfusion are also demonstrating promising results in preservation and improving liver (*Laing, Mergental, & Mirza, 2017*), pancreas (*Kuan et al., 2016*), lungs (*Reeb*

& Cypel, 2016), and heart (*Macdonald, Chew, Connellan, & Dhital, 2016*) transplantations, although there is as yet no consensus about the best storage parameters nor about quality parameters (*Ali et al., 2015*).

In summary, taken together, these results demonstrate that, by restoring 2 major ocular physiologic parameters to the ex vivo cornea (IOP and flow), the BR enables preserving human corneas during 4 weeks in conditions never reached up to now, with excellent endothelial cells survival, reduced thickness, shape maintenance, and integrity of the epithelium. Our next step will be to perform the first in man application of the BR. By profoundly modifying the face of eye banking, this new medical device could allow increasing both the quality but also the quantity of donor corneas made suitable for graft worldwide.

Materials and methods

Human Corneas and Ethics Statement

All procedures conformed to the tenets of the Declaration of Helsinki for biomedical research involving human subjects. The French Agence de la Biomédecine (ABM) specifically authorized the retrieval of corneas for this preclinical study, according to the French bioethical laws (ABM ref PFS15-008). We were authorized to select donors who presented contraindications for clinical use (for instance neurodegenerative diseases, hematologic malignancy or cancer of the central nervous system) in order not to decrease the number of donor corneas available for recipients during the study period. The protocol was also approved by our local Institutional Review Board (IORG0007394) approved also our protocol (project N°IRBN272016/CHUSTE). All corneas were retrieved by the same skilled operator (TG, more than 500 procurements). Corneas were procured by in situ excision according to the procedure recommended in France for corneas intended for transplantation, using a 17 mm diameter trephination. A regular and large diameter cutting was necessary to allow correct insertion into the BR. Both corneas were immediately immersed in glass vials, with water-and gas-tight lid, containing 100 mL of CorneaMax, a CE marked OC medium containing 2% foetal calf serum and having an osmolarity of 300-340 mOsm/L (Eurobio, les Ulis, France), and transferred to the laboratory within 20 minutes.

Study design

We designed a prospective controlled study with two parallel groups, BR versus OC, on paired corneas in order to increase comparability between groups. Randomization was centralized, unpredictable, and provided to coordinators just before procurement. The randomization program used a random code generator based on the rand function in the C++ library. The main objective was to compare the quality of human corneal grafts stored for 1 month in BR versus OC, using the same commercial storage medium. The primary endpoint was the daily EC loss between D2 and D26, expressed in percentage of the initial ECD. It was calculated using the ECD (expressed in cells/mm²) measured at the beginning and the end of storage like in most eye banks. ECD is indeed the usual quality criterion universally used in eye banks to qualify whether a cornea is suitable for graft or not. OC is a validated method for 5 weeks. We chose a 4 week-storage in order to assess a long-term storage without pushing OC to its limits (rarely achieved in practice). Corneas were assessed at D2, D26, D28. This timeline

is routinely used for long-term OC corneas in eye banks. Secondary endpoints were: the viable endothelial cell density (*Bernard et al., 2014; Pipparelli et al., 2011*); corneal thickness; corneal transparency (*Acquart et al., 2014*), expression of Na⁺/K⁺ ATPase in EC (by immunostaining and western blot); number of epithelial layers on histological cross section; the rate of microbiological contamination.

Corneal bioreactor

The cornea was tightly secured to the BR base using the scleral rim as a watertight seal to separate the epithelial chamber from the endothelial chamber. The geometry of the holding system was based on a series of measurements of scleral orientation obtained from 30 healthy emmetropic volunteers (data not shown). The mean value of the angle between the sclera and an horizontal plane parallel to the iris (33°) was used in order to minimize distortion of the cornea caused by its being held in the BR. A sterile disposable storage tank was filled with the storage medium. A peristaltic pump controlled by a pressure sensor and a microcontroller continuously renewed the storage medium at a predefined rate while creating an excess pressure in the endothelial chamber. After having circulated in the endothelial chamber, the medium circulated in the epithelial chamber and was finally directed into a waste tank. The epithelial chamber was at atmospheric pressure. Two transparent windows, on both sides of the cornea enable optical controls during experiments. The BR was designed to be compatible with slit lamps and optical coherence tomography (OCT) systems with a simple adaptation of the chin rest. For this series prototype BRs were machined in a biocompatible material (polyether ether ketone) and comprised optical quality windows. It was sterilized with ethylene oxide. The complete system, except its control panels, was placed in a 31°C dry 5% CO₂ incubator (**Figure 7**).

According to the randomization, one cornea of each pair was transferred inside the BR under a laminar flow hood and the storage medium was used to fill the BR's storage tank. We set a fixed limit of 1 hr between procurement and transfer into the BR in order to restore the IOP as soon as possible. Time was therefore recorder from retrieval to start of the BR. All the subsequent maintenance operations were carried out under a laminar flow hood. The medium flow rate was set at 2.6µl/min (normal aqueous humor flow rate (*Brubaker, 1991*)) and the transcorneal pressure gradient at 21.5 mmHg (upper limit of the normal IOP in humans) with atmospheric pressure as a reference. Temperature and pressure were automatically recorded

every minute by the control unit. The storage tank was refilled once with 100 mL of the same storage medium according to consumption by the active storage process, between D2 and D26. No deswelling step was necessary at D26. The waste tank was emptied as required, in particular for microbiological testing. For the different assessments (see below) the BR was disconnected from the peristaltic pump and removed from the CO₂ incubator. The cornea remained inside the BR from D0 to D28. The pressure inside the endothelial chamber was maintained by clamping of the tubes. Once replaced in the incubator, the fluid circuit was flushed with 15 mL of fresh storage medium (from the storage tank) and the active storage process restarted. Time outside the incubator was limited as much as possible (no more than 15 minutes). The same batch of CorneaMax was systematically used for the 2 corneas of a same donor. Eight batches were used during the present study in order to limit the effect of inter-batch variability.

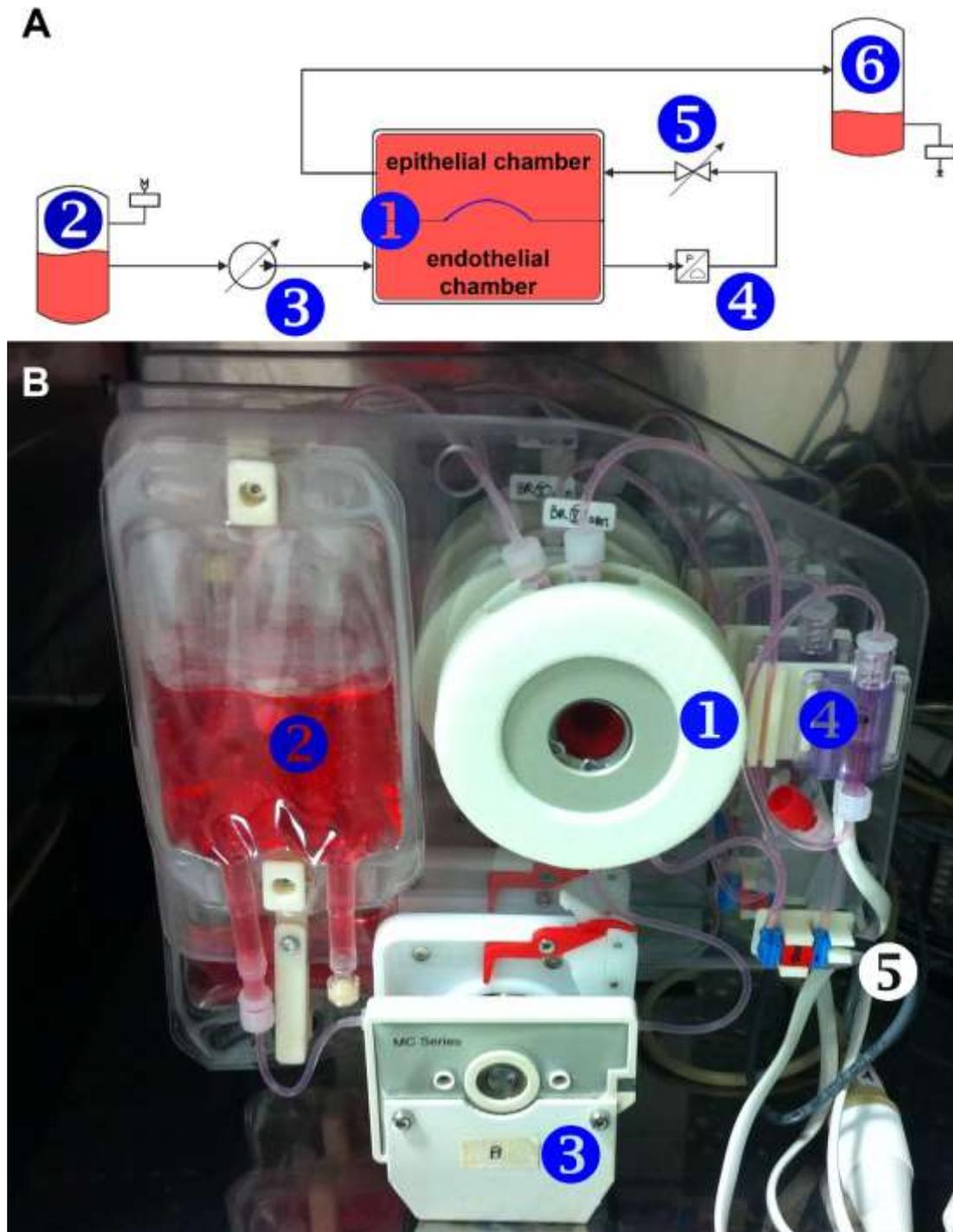


Figure 7. Corneal bioreactor developed for eye banking.

(A) Functional diagram of the bioreactor. The cornea (in blue) located in the heart of the bioreactor (1), separates the endothelial chamber from the epithelial chamber. The endothelial chamber of the bioreactor is filled with culture medium (containing red phenol as pH indicator) from a reservoir (2). Fluid is circulated by a peristaltic pump (3) driven by a pressure sensor (4), a solenoid valve (5), and a microcontroller (not shown). The pressure inside the endothelial chamber is kept at 21 mmHg. The culture medium then circulates in the epithelial chamber. The used medium is evacuated into a waste compartment (6). (B) Functioning bioreactor connected to the medium circuit.

Organ culture

After procurement, the cornea randomized in the OC group remained in its sealed bottle and was incubated at 31°C in a dry incubator. The OC group followed the same standard storage process as for corneas intended for graft and recommended by the European Eye Bank Association ([https://www.eeba.eu/article/Technical+Guidelines+\(Rev4\)/5](https://www.eeba.eu/article/Technical+Guidelines+(Rev4)/5)). At D2, after the first quality and safety assessments (see below), the OC medium was renewed (100mL) and the cornea suspended with a cornea claw (Eurobio). This sterile floating device avoided permanent contact between the cornea and the debris (especially from the desquamating epithelium). At D26, quality and safety assessments were repeated and the cornea was immersed in 60 mL of CorneaJet, a dextran-containing deswelling medium (Eurobio) and incubated for 48 hrs. In routine eye banking, this 2 day-deswelling time is used for graft shipping to the operating theater.

Methods of endothelial cell count

For both groups, ECD was determined two times (D2 and D26) using standard eye banking technics with some improvements. Nevertheless, each group required a specific method for EC visualization and could not been used interchangeably. For OC, a transmitted light microscope was necessary whereas for the BR a specular microscopy was used. We did not used a transmitted light microscope for the BR because this technique would have required turning the BR off, removing the cornea for a specific preparation and observation in a Petri dish. This supplementary handling would have been not representative of the real life functioning of the BR, conceived to be a closed system with quality assessment done without deconditioning the cornea. Conversely, specular microscopy was not possible for the OC cornea because storage-induced stromal swelling hindered from visualizing any ECs. The two methods of EC assessment were described below. At D2, in order to guarantee initial comparability of groups, only pairs of corneas with more than 2000 ECs/mm² and less than 10% difference between both corneas continued the experiment. All images were acquired and analyzed by a unique skilled observer (TG).

Transmitted light microscope

We followed the same protocol as routinely used in eye banks. The cornea was handled under a laminar flow hood in a clean room, rinsed with balanced salt solution (BSS, Alcon) and the endothelial side was exposed during 1 minute to 100 μl of 0.4% trypan blue (Eurobio). After gentle rinsing with 0.9% sodium chloride (Aguettant, Lyon, France), the endothelial side was incubated at room temperature with liquid renewal every minute, in order to trigger an optimal intercellular space dilation that make cells visible under the light microscope. Finally, the cornea was placed in a sterile hermetic Petri dish and observed under a direct transmitted light microscope motorized in Z (BX41, Olympus, Tokyo, Japan, equipped with a Märzhäuser Tango 1-Desktop1 motorized Z axis (Märzhäuser SensoTech GmbH Wetzlar, Germany)) equipped with a digital camera Color view I (Soft imaging system, Golden CO) and the software Cell D v3.1 (Olympus). The optical chain was calibrated using a certified micrometer (Thorlabs, Newton, NJ). Five non-overlapping microscopic fields (one in the centre and 1 per quadrant) of $722 \times 536 \mu\text{m}$ (1024×772 pixels) were acquired with a long working distance x10 objective (LM PlanFLN 10x/0.25 ∞ /-/FN26.5) in the 8 mm central area (corresponding to the area usually grafted). The observer chose areas where ECs were the most clearly visible and avoided marked folds. For each field, a Z-stack of 10 to 15 images (z spacing 10 μm from the lowest to the highest point focused on ECs) was acquired, as we recently described, in order to take account of the deep storage-induced endothelial folds (*Jumelle et al., 2017*). A 3D counting was performed on each field as described below and the mean of the 5 fields was calculated. ECs were counted using the freeware Image J (<https://fiji.sc>) with a customized plugin. The system was calibrated using ceramic gage blocks (Mitotoyo, Roissy, France) and we also took account of the indice of the liquid bathing the cells (1.330) to determine the pixel/ μm ratio. Firstly, a reconstruction algorithm with a model-based 2.5D method (Aguet et al. 2008) was performed to obtain a unique image compiling all focused endothelial areas of each image in the Z-stack, and the corresponding height-map. Secondly, the reconstructed fullfield image ECD was determined using a validated variable-frame center method (*Deb-Joardar et al., 2007; Takahashi, 1996*). The center of all ECs constituting a continuous group was pointed manually and the group's boundaries were selected manually. Cells contours were then automatically reconstructed using the Voronoi segmentation and carefully verified by the observer who performed all necessary corrections. Each individual cell area was then corrected according to the local slope of the height-map determined at the cell center. The process was similar to that used in our eye bank except for the number of ECs manually pointed. In this research work, it

was dramatically elevated (minimum 100 ECs per image, and the maximum possible) in order to increase cell count reliability.

Specular microscopy

Endothelial images were acquired through the endothelial windows without deconditioning the corneas. Both ends of the endothelial chamber tubes were temporarily clamped to maintain the pressure inside the endothelial chamber and allow removing the BR from the CO₂ incubator. A custom SM was built because commercial devices did not allow acquiring satisfying images and because we considered that their fields of view were too narrow. Our SM was composed of an optical bench, a CMOS camera (DCC3240M, Thorlabs) driven by the Scientific Imaging Thorcam v2.6.7064 software, a x10 plan objective (Leica, Wetzlar, Germany), an external led source (MCWHL5-C2, Thorlabs) mounted and collimated with a diaphragm (SM1D12, Thorlabs) and a plano-convex lens (f30mm, Thorlabs), a manual linear precision micrometer X Y Z stage (Newport, Irvine, CA) connected to a support intended to receive the BR. The LED light source was placed at $31 \pm 4^\circ$ of the optical axis of the camera. In order to modulate the contrasts and observe the endothelial cells (ECs), the LED source was also specifically inclined on the y axis. The device was calibrated using a certified micrometer (Thorlabs). Five non-overlapping microscopic fields (one in the centre and 1 per quadrant) of 935x748 μm (1280x1024 pixels) were acquired in the 8 mm central area. Image acquisition took less than 15 minutes. ECs were then counted using the same software as for OC, also taking into account the largest possible number of ECs.

Pan corneal endothelial viability

In addition to the routine endothelial assessments performed at D2 and D26, a third final measurement was done at the end of storage (D28) in both groups. The viable endothelial cell density (vECD) was determined using a triple Hoechst, Ethidium, Calcein-AM staining (HEC) as previously reported (*Bernard et al., 2014; Pipparelli et al., 2011*). Both paired corneas were analysed at the same time. Briefly, corneas were placed endothelial side up on a silicon concave support, then the concavity was filled with 250 μL of mixture containing 10 μM Hoechst 33342 (Sigma, St-Quentin Fallavier, France), 4 μM Ethidium homodimere, and 2 μM calcein-AM (Interchim, Montluçon, France) in balanced salt solution (BSS Alcon) and then incubated for 45 minutes at room temperature in the dark. Corneas were then gently rinsed with BSS for

1 minute. Tagged image format file (TIFF) images were acquired using a fluorescent macro zoom microscope (MVX-10; Olympus), run by imaging software (CellSens Dimension, Olympus). The camera settings were adjusted for each session of acquisition and were the same for both corneas of the same pair. A x0.8 objective allowed to observe the whole cornea in a unique field. Z-stacks of 10 to 12 images spaced 300µm apart (to obtain focused images from the periphery to the endothelium centre) were acquired with 3 consecutive filters: FITC (ex: 495/em: 520nm) for calcein, CY3 (ex: 528/em: 617nm) for Ethidium and DAPI (ex: 350/em: 461nm) for Hoechst. The in focus image of the whole endothelium stained with calcein-AM was reconstructed using the 3-D Extended Depth of Field of ImageJ. This image was used to calculate the area covered by viable, calcein positive cells. In addition, a x6.3 objective was used to acquire 5 images (center and 4 quadrants) using the DAPI and CY3 filters in order to obtain higher resolution for the counting of cell nuclei. These images were used to determine the number of EC per surface unit (mean of the 5 regions of interest). Image analysis was performed using the plugin Cornea J (*Bernard et al., 2014; Pipparelli et al., 2011*). The vECD was obtained by multiplying the average ECD calculated with Hoechst 33342-stained nuclei by the percentage of surface covered by viable ECs (Calcein +).

Transparency

For transparency, the organ-cultured cornea in its sterile Petri dish and the cornea inside the BR were directly placed horizontally between a backlit chart and a camera as previously described (*Acquart et al., 2014*). Computerized analysis of the overall transparency was performed. Results are expressed in percentage ranging from 0% to 100% corresponding respectively with complete opacity and perfect transparency. Measurements were repeated at D2, D26 and D28.

Thickness

Central corneal thickness (CCT) was assessed with an anterior segment Optical Coherence Tomography (OCT; CASIA SS-1000, Tomey, Nagoia Japan). Acquisition was performed in epithelial high definition mode (the most accurate of this OCT). The organ-cultured cornea in its sterile Petri dish and the cornea inside the BR were maintained in front of the OCT thanks to two different custom holders. The epithelial chamber of the BR was temporarily emptied

because OCT imaging required exposition of the ocular surface to air (to obtain a difference between refractive indexes), as it is the case in vivo.

Thickness was measured on the central cross section. Anterior and posterior limits of the cornea were automatically selected and manually corrected if necessary. A single central measurement was performed when thickness appeared homogeneous (in practice when corneas had no posterior folds). Otherwise, an average thickness was calculated within the 8 central millimeters (average of the 9 measurements spaced of 1mm from each other). Measurements were repeated at D2, D26 and D28 for OC to monitor the storage-induced swelling and deswelling in Dextran-containing medium. They were repeated only at D2 and D28 for the BR because no changes occurred at D26 in this group.

Histology, immunostaining and Western Blot

Immediately after the triple HEC staining, corneas were processed for histology, immunostaining and WB.

Whole cornea histology

One half was fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 24 hrs at RT, dehydrated through ascending concentrations of ethanol, and embedded in paraffin. Cross sections of 7µm thick were cut, rehydrated, and stained with hematoxylin, eosin, and saffron. Bright-field TIFF images of the cross sections were acquired using a microscope (IX81, Olympus). Histology was performed on 102 corneas (the whole series).

Immunostaining

Immunostaining protocols on flat-mounted whole cornea were optimized in our laboratory (*Forest et al., 2015; He et al., 2011*). One quarter of the cornea was fixed in pure methanol and the other in 0.5% paraformaldehyde (PFA) for 45 minutes. PFA-fixed corneas were permeabilized with 1% Triton 100-X for 5 minutes. Methanol-fixed corneas were rehydrated in PBS for 5 minutes. The non-specific binding sites were then blocked by incubation in phosphate buffered saline (PBS) containing 2% heat-inactivated goat serum and 2% bovine serum albumin (BSA) for 30 minutes at 37 °C. The primary antibodies (*Table*

I) were diluted at 1/200 in the blocking buffer and incubated with corneas (completely immersed) for 1 hr at 37 °C. The secondary antibodies were diluted at 1/500 in the blocking buffer and incubated with corneas for 45 minutes at 37 °C. These consisted of Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (A-11001, Invitrogen, Carlsbad, CA) and/or Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit (A-21429, Invitrogen). Nuclei were finally counterstained with 2 µM TOTO-3 Iodide (642/660) (T3605, Molecular Probes, Invitrogen) in PBS for 15 min. Three rinses in PBS were performed between all steps, except between saturation of non-specific protein binding sites and incubation with primary antibody. The corneal pieces were finally placed on glass slides, covered with Vectashield Mounting Medium (H-1000, Vector Laboratories) and gently flattened using a large glass coverslip retained immobilized by adhesive tape. Experiments were done at room temperature unless otherwise stated. The images were acquired using a FLUOVIEW FV1200 laser scanning confocal microscope (Olympus) equipped with the FV10-ASW4.1 imaging software.

Immunostaining was used to characterize the expression of key proteins in the epithelial and endothelial layers, liable to be altered during storage. For the endothelium, we investigated the expression of Na⁺/K⁺ATPase (n=17 pairs), N-CAM (n=16 pairs) and of ZO-1 (n=13 pairs). Na⁺/K⁺ATPase is the main membrane protein involved in the active ion pumping that controls corneal transparency. N-CAM has a specific expression pattern in EC underlining the characteristic complex lateral membrane expansions *in vivo*. ZO-1, as part of the apical tight-junctions underlines the hexagonal shape of the apical surface. In addition, its zig-zag pattern between adjacent ECs can be accentuated in stressed cells. For the epithelium we investigated the expression of the K3/K12 cytokeratin pair (on n=19 pairs), E-cadherin (n=5 pairs) and of ΔNp63 (n=21 pairs). K3/K12 is a differentiation marker expressed in the cytoplasm of the superficial epithelial cells. E-cadherin is a membrane protein expressed by the intermediate and superficial cells. ΔNp63 is a stem cell/progenitor marker expressed exclusively by the basal cell layer. We also used K3/K12 + ΔNp63 double staining to measure the central epithelial thickness and the number of cell layers in 19 pairs of corneas (one one picture selected at random in the central area of each cornea).

Table 1. Primary antibodies

Target protein	Source	Clonality	Laboratory	Reference	Applications
Actin	mouse	monoclonal	<i>BD Pharmingen</i> , San jose, CA	612656	WB
COX IV	rabbit	monoclonal	Cell signaling Technology, Danvers, MA	#4850	WB, IF/methanol
E-cadherin	mouse	monoclonal	Invitrogen, Carlsbad, CA	334000	IF/0.5% PFA
CK3+12	mouse	monoclonal	Abcam, Cambridge, UK	Ab68260	IF/0.5% PFA
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	mouse	monoclonal	Millipore, Billerica, MA	#05-369	WB, IF/methanol
NCAM	mouse	monoclonal	R&D systems, Mineapolis, MN	MAB24081	IF/methanol
ΔNp63	rabbit	polyclonal	CliniSciences, Nanterre, France	RP163-500	IF/0.5% PFA
ZO-1	rabbit	polyclonal	Zymed, Carlsbad, CA	40-2200	IF/methanol

CK 3+12: Cytokeratin 3+12, WB: Western Blot, IF: Immunofluorescence (Immunostaining on flat mounted whole cornea)

Western Blot for Na⁺/K⁺ATPase and Cox IV

The Descemet membrane (DM) with ECs of half of a cornea was carefully stripped under a surgical microscope and put into a tube containing 50µl of lysis buffer (2% Sodium Dodecyl Sulfate, 60 mM Tris, pH=7.5). After several pipetting, the DM was removed. The lysate was heated in boiling water for 10 minutes then stored at -80°C until use. Total protein concentration in cell lysates was measured using Pierce BCA protein assay kit (#23225, ThermoScientific, Rockfors, IL). Five µg of protein from whole-cell lysate were run on 4–15% polyacrylamide gel electrophoresis (Mini-PROTEAN TG Gels, #4561086, Bio-Rad, Hercules, CA) and then transferred onto Hybond ECL membrane (Amersham Hybond P Sandwich 0.45 PVDF, #10600110, GE Healthcare, Aurora, OH). Blots were blocked with 5% skim milk in TBS-T buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.1% Tween 20) for 1h then incubated 2h with 3 primary antibodies (Table 1) diluted (1/1000) in the blocking solution. After three washes with TBS-T buffer, HRP-conjugated anti-mouse (P0447, DAKO, Denmark) and anti-rabbit antibody (P0448, DAKO, Denmark) were diluted (1/1000) and added as secondary antibodies, followed by three washes with TBS-T buffer after 1h incubation with the antibodies. Finally, bands were visualized by using Clarity Western ECL Substrate (#1705060, Bio-Rad) in a western blot and chemiluminescence imaging system (Fusion solo S, Vilber Lourmat, France), their intensities were determined by using the software Fusion-Capt (Vilber Lourmat). Western blot was performed for 14 pairs of corneas for Na⁺/K⁺ ATPase and eleven for COX IV.

Microbiological testing

For both groups, media sterility was tested using inoculation into blood-culture bottle, which we pioneered and validated the use in eye banking (*Gain et al., 2001; Thuret et al., 2002; Thuret, Carricajo, et al., 2005*). Aerobic, anaerobic and fungal Bactec blood bottles (Becton Dickinson and Company, NJ) were inoculated each with 10 mL of medium and placed in an automat (Bactec FX, Becton Dickinson and Company) with continuous reading in real time during 14 days. Tests were repeated at D2 and D26. Contaminated corneas were discarded.

Statistics

We calculated the number of donors to include. We previously published the distribution of ECD for similar donor corneas stored in OC (same method as in the present work for the control group) (*Thuret et al., 2003*). The mean ECD of this distribution was 2716 cells/mm² at D2 and its standard deviation was 444 cells/mm². Considering that the cell loss during OC is of 0.88% per storage-day (*Thuret et al., 2003*), we estimated that the BR would present a real change if it reduces cell loss by 40% (in this hypothesis, the final ECD thus passing from 2198 to 2391 cells/mm²). Since both groups (BR or OC) are paired, the paired t-test will be used. With these hypothesis, a sample size of 49 donor corneas randomized to one of two groups provides adequate power (over 85%) to demonstrate a difference of 193 cells/mm² between these two groups using a two-tailed Type I error of 5% (*Gauderman & Barlow, 1992*). Considering that 7% of the corneas are usually found contaminated during microbiological testings in our eye bank (review of the last 3 years), a sample size of 52 donors was planned to achieve an evaluable sample size of 49 paired corneas.

The normality of the distribution of continuous data was analyzed with Shapiro-Wilk test with a non-normality threshold set at 5%. Normally distributed data were described by their mean and standard deviation. Continuous non-normally distributed variables were summarized as median (10 - 90 percentiles). The non-parametric Wilcoxon signed-rank test was used when the variable followed a non-normal distribution and a t-test when the variable followed a normal distribution. All tests were two-tailed. Results of OC and BR were compared using paired tests because both corneas of the same donor have a major biological link. The null hypothesis was rejected by a type I error <0.05 ($\alpha < 0.05$). Statistical analyses were performed using SPSS 23.0 (IBM Corp, Armonk, NY), and figure using Excel (Microsoft) and Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Inc).

Acknowledgements

We are grateful to the persons who donated their corneas to Science and to their family. We are thankful to the hospital coordination team for organs and tissues procurement (JL. Pugniet, T. Peyragrosse, and F. Rogues) for their invaluable expertise during family interview. We thank Ms. Yuenu WU for technical support during western blots. We also acknowledge the Agence de la Biomédecine for its institutional support and authorization.

Competing interests

PH, PG and GT have patented the bioreactor.

References

- Acquart, S., Campolmi, N., He, Z., Pataia, G., Jullienne, R., Garraud, O., Nguyen, F., Peoc'h, M., Lepine, T., Thuret, G., & Gain, P. (2014). Non-invasive measurement of transparency, arcus senilis, and scleral rim diameter of corneas during eye banking. *Cell Tissue Bank*, 15(3), 471-482.
- Aghaian, E., Choe, J. E., Lin, S., & Stamper, R. L. (2004). Central corneal thickness of Caucasians, Chinese, Hispanics, Filipinos, African Americans, and Japanese in a glaucoma clinic. *Ophthalmology*, 111(12), 2211-2219.
- Albon, J., Tullo, A. B., Aktar, S., & Boulton, M. E. (2000). Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(10), 2887-2893.
- Ali, F., Dua, A., & Cronin, D. C. (2015). Changing paradigms in organ preservation and resuscitation. *Curr Opin Organ Transplant*, 20(2), 152-158.
- Armitage, W.J., Dick, A.D., & Bourne, W.M. (2003). Predicting endothelial cell loss and long-term corneal graft survival. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(8), 3326-3331.
- Belzer, F. O., Ashby, B. S., Gulyassy, P. F., & Powell, M. (1968). Successful seventeen-hour preservation and transplantation of human-cadaver kidney. *N Engl J Med*, 278(11), 608-610.
- Bernard, A., Campolmi, N., Ha Thi, B. M., Piselli, S., Forest, F., Dumollard, J. M., Peoc'h, M., Acquart, S., Gain, P., & Thuret, G. (2014). CorneaJ: an imageJ plugin for semi-automated measurement of corneal endothelial cell viability. *Cornea*, 33(6), 604-609.
- Bigan, G., Puyraveau, M., Saleh, M., Gain, P., Martinache, I., Delbosc, B., & Gauthier, A. S. (2018). Corneal transplantation trends in France from 2004 to 2015: A 12-year review. *Eur J Ophthalmol*, 1120672118762224.
- Borderie, V. M., Baudrimont, M., Lopez, M., Carvajal, S., & Laroche, L. (1997). Evaluation of the deswelling period in dextran-containing medium after corneal organ culture. *Cornea*, 16(2), 215-223.
- Bourne, WM., Nelson, LR, & Hodge, DO. (1997). Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38(3), 779-782.
- Brubaker, R. F. (1991). Flow of aqueous humor in humans [The Friedenwald Lecture]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32(13), 3145-3166.
- Brunette, I., Nelson, L. R., & Bourne, W. M. (1989). A system for long-term corneal perfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 30(8), 1813-1822.
- Bryant, M. R., & McDonnell, P. J. (1998). A triphasic analysis of corneal swelling and hydration control. *J Biomech Eng*, 120(3), 370-381.
- Campolmi, N., He, Z., Acquart, S., Trone, M. C., Bernard, A., Gauthier, A. S., Garraud, O., Forest, F., Peoc'h, M., Gain, P., & Thuret, G. (2014). Comparison of endothelial cell density of organ cultured corneas with the cornea donor study. *Cornea*, 33(6), 597-603.
- Deb-Joardar, N., Thuret, G., Gavet, Y., Acquart, S., Garraud, O., Egelhoffer, H., & Gain, P. (2007). Reproducibility of endothelial assessment during corneal organ culture: comparison of a computer-assisted analyzer with manual methods. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(5), 2062-2067.

- Dikstein, S., & Maurice, D. M. (1972). The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. *J Physiol*, 221(1), 29-41.
- EBAA. (2017). *2016 Eye banking statistical report*. Retrieved from Washington, D.C., MA, USA:
- EEBA. (2018). *Directory. Twenty-six edition. January 2018*. Retrieved from Venice, Italy.: https://www.eeba.eu/files/00_98_2016Directory_26_Numbers2016_WJA_final.pdf
- Forest, F., Thuret, G., Gain, P., Dumollard, J. M., Peoc'h, M., Perrache, C., & He, Z. (2015). Optimization of immunostaining of flatmounted human corneas. *Mol Vis*, 21, 1345-1356.
- Frentz, M., Goss, M., Reim, M., & Schrage, N. F. (2008). Repeated exposure to benzalkonium chloride in the Ex Vivo Eye Irritation Test (EVEIT): observation of isolated corneal damage and healing. *Altern Lab Anim*, 36(1), 25-32.
- Gain, P., Jullienne, R., He, Z., Aldossary, M., Acquart, S., Cognasse, F., & Thuret, G. (2016). Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol*, 134(2), 167-173.
- Gain, P., Thuret, G., Chiquet, C., Dumollard, J. M., Mosnier, J. F., Burillon, C., Delbosc, B., Herve, P., & Campos, L. (2002). Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium: trypan blue versus TUNEL technique. *Br J Ophthalmol*, 86(3), 306-310.
- Gain, P., Thuret, G., Chiquet, C., Vautrin, A. C., Carricajo, A., Acquart, S., Maugery, J., & Aubert, G. (2001). Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media. *Br J Ophthalmol*, 85(10), 1158-1162.
- Gauderman, W. J., & Barlow, W. E. (1992). Sample size calculations for ophthalmologic studies. *Arch Ophthalmol*, 110(5), 690-692.
- Guindolet, D., Crouzet, E., He, Z., Herbepin, P., Jumelle, C., Perrache, C., Dumollard, J. M., Forest, F., Peoc'h, M., Gain, P., Gabison, E., & Thuret, G. (2017). Storage of Porcine Cornea in an Innovative Bioreactor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 58(13), 5907-5917.
- He, Z., Campolmi, N., Ha Thi, B. M., Dumollard, J. M., Peoc'h, M., Garraud, O., Piselli, S., Gain, P., & Thuret, G. (2011). Optimization of immunolocalization of cell cycle proteins in human corneal endothelial cells. *Mol Vis*, 17, 3494-3511.
- He, Z., Forest, F., Gain, P., Rageade, D., Bernard, A., Acquart, S., Peoc'h, M., Defoe, D. M., & Thuret, G. (2016). 3D map of the human corneal endothelial cell. *Sci Rep*, 6, 29047.
- Hull, DS, Green, K, Boyd, M, & Wynn, HR. (1977). Corneal endothelium bicarbonate transport and the effect of carbonic anhydrase inhibitors on endothelial permeability and fluxes and corneal thickness. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 16(10), 883-892.
- Jumelle, C., Garcin, T., Gauthier, A. S., Glasson, Y., Bernard, A., Gavet, Y., Klossa, J., He, Z., Acquart, S., Gain, P., & Thuret, G. (2017). Considering 3D topography of endothelial folds to improve cell count of organ cultured corneas. *Cell Tissue Bank*, 18(2), 185-191.
- Kitazawa, K., Inatomi, T., Tanioka, H., Kawasaki, S., Nakagawa, H., Hieda, O., Fukuoka, H., Okumura, N., Koizumi, N., Iliakis, B., Sotozono, C., & Kinoshita, S. (2017). The existence of dead cells in donor corneal endothelium preserved with storage media. *Br J Ophthalmol*. doi:10.1136/bjophthalmol-2017-310913

- Knels, L., Goetze, D., Engelmann, K., & Valtink, M. (2014). Serum-free medium and hydroxyethyl starch supports cell survival better than Minimal Essential Medium and dextran in organ-cultured mouse corneas. *Br J Ophthalmol*, 98(12), 1744-1750.
- Komuro, A., Hodge, D. O., Gores, G. J., & Bourne, W. M. (1999). Cell death during corneal storage at 4 degrees C. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(12), 2827-2832.
- Kuan, K. G., Wee, M. N., Chung, W. Y., Kumar, R., Mees, S. T., Dennison, A., Maddern, G., & Trochsler, M. (2016). Extracorporeal machine perfusion of the pancreas: technical aspects and its clinical implications--a systematic review of experimental models. *Transplant Rev (Orlando)*, 30(1), 31-47.
- Lagali, N. S., Stenevi, U., Claesson, M., Fagerholm, P., Hanson, C., Weijdegard, B., & Strombeck, A. S. (2010). Donor and recipient endothelial cell population of the transplanted human cornea: a two-dimensional imaging study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Lagali, N., Stenevi, U., Claesson, M., Fagerholm, P., Hanson, C., & Weijdegard, B. (2009). Survival of donor-derived cells in human corneal transplants. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(6), 2673-2678.
- Laing, R. W., Mergental, H., & Mirza, D. F. (2017). Normothermic ex-situ liver preservation: the new gold standard. *Curr Opin Organ Transplant*, 22(3), 274-280.
- Lam, V. W., Laurence, J. M., Richardson, A. J., Pleass, H. C., & Allen, R. D. (2013). Hypothermic machine perfusion in deceased donor kidney transplantation: a systematic review. *J Surg Res*, 180(1), 176-182.
- Macdonald, P. S., Chew, H. C., Connellan, M., & Dhital, K. (2016). Extracorporeal heart perfusion before heart transplantation: the heart in a box. *Curr Opin Organ Transplant*, 21(3), 336-342.
- Moller-Pedersen, T. (1997). A comparative study of human corneal keratocyte and endothelial cell density during aging. *Cornea*, 16(3), 333-338.
- Nishimura, J. K., Hodge, D. O., & Bourne, W. M. (1999). Initial endothelial cell density and chronic endothelial cell loss rate in corneal transplants with late endothelial failure. *Ophthalmology*, 106(10), 1962-1965.
- Papas, E. B., & Sweeney, D. F. (2016). Interpreting the corneal response to oxygen: Is there a basis for re-evaluating data from gas-goggle studies? *Exp Eye Res*, 151, 222-226.
- Pels, E., & Schuchard, Y. (1983). Organ-culture preservation of human corneas. *Doc Ophthalmol*, 56(1-2), 147-153.
- Pels, L. (1997). Organ culture: the method of choice for preservation of human donor corneas. *Br J Ophthalmol*, 81(7), 523-525.
- Pipparelli, A., Thuret, G., Toubreau, D., He, Z., Piselli, S., Lefevre, S., Gain, P., & Muraine, M. (2011). Pan-corneal endothelial viability assessment: application to endothelial grafts predissected by eye banks. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(8), 6018-6025.
- Reeb, J., & Cypel, M. (2016). Ex vivo lung perfusion. *Clin Transplant*, 30(3), 183-194.
- Takahashi, E. A. (1996). USA Patent No. 5,523,213. United States Patent.
- Tanelian, D. L., & Bisla, K. (1992). A new in vitro corneal preparation to study epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33(11), 3024-3028.

- Thiel, M. A., Morlet, N., Schulz, D., Edelhauser, H. F., Dart, J. K., Coster, D. J., & Williams, K. A. (2001). A simple corneal perfusion chamber for drug penetration and toxicity studies. *Br J Ophthalmol*, 85(4), 450-453.
- Thuret, G., Carricajo, A., Chiquet, C., Vautrin, A. C., Celle, N., Boureille, M., Acquart, S., Aubert, G., Maugery, J., & Gain, P. (2002). Sensitivity and rapidity of blood culture bottles in the detection of cornea organ culture media contamination by bacteria and fungi. *Br J Ophthalmol*, 86(12), 1422-1427.
- Thuret, G., Carricajo, A., Vautrin, A. C., Raberin, H., Acquart, S., Garraud, O., Gain, P., & Aubert, G. (2005). Efficiency of blood culture bottles for the fungal sterility testing of corneal organ culture media. *Br J Ophthalmol*, 89(5), 586-590. doi:89/5/586 [pii] 10.1136/bjo.2004.053439
- Thuret, G., Chiquet, C., Bernal, F., Acquart, S., Romanet, J. P., Mouillon, M., Hegelhoffer, H., Burillon, C., Damour, O., Maugery, J., Armitage, W. J., & Gain, P. (2003). Prospective, randomized clinical and endothelial evaluation of 2 storage times for cornea donor tissue in organ culture at 31 degrees C. *Arch Ophthalmol*, 121(4), 442-450.
- Thuret, G., Manissolle, C., Acquart, S., Garraud, O., Campos-Guyotat, L., Maugery, J., & Gain, P. (2004). Urgent need for normalization of corneal graft quality controls in French eye banks. *Transplantation*, 78(9), 1299-1302. doi:00007890-200411150-00009 [pii]
- Thuret, G., Manissolle, C., Campos-Guyotat, L., Guyotat, D., & Gain, P. (2005). Animal compound-free medium and poloxamer for human corneal organ culture and deswelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(3), 816-822.
- Valtink, M., Donath, P., Engelmann, K., & Knels, L. (2016). Effect of different culture media and deswelling agents on survival of human corneal endothelial and epithelial cells in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 254(2), 285-295.
- Zhao, B., Cooper, L. J., Brahma, A., MacNeil, S., Rimmer, S., & Fullwood, N. J. (2006). Development of a three-dimensional organ culture model for corneal wound healing and corneal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(7), 2840-2846.

CONCLUSION GENERALE

En une décennie, le contrôle qualité cellulaire et tissulaire s'est largement sophistiqué dans la plupart des banques de cornées afin de s'adapter aux raffinements des chirurgiens capables désormais de réaliser des greffes partielles de la de cornée. Malgré les avancées réalisées dans le domaine du contrôle qualité il restait à optimiser les systèmes de conservation des greffons cornéens, techniques datant des années 70-80. Le laboratoire « Biologie, imagerie et ingénierie de la Greffe de Cornée (BiiGC, EA 2521, Université Jean Monnet de St- Etienne) a donc développé une technologie de conservation active en bioréacteur limitant l'œdème cornéen en restituant le gradient de pression de part et d'autre de la cornée et la circulation de milieu nutritif. Il permet ainsi de pallier aux deux inconvénients majeurs de la conservation cornéenne standard (œdème et mortalité cellulaire endothéliale induite) et de mettre en œuvre les développements du futur.

Ce travail de thèse a pu mettre en évidence l'efficacité de ce nouveau système de conservation. Il permet, en comparaison avec l'organoculture, de délivrer à long terme (28 jours) 3,75 fois plus de greffons et de meilleure qualité cellulaire (+25 % de cellules endothéliales viables), une meilleure structure et fonctionnalité cellulaire (meilleure activité des pompes endothéliales notamment) tout en assurant une excellente sécurité microbiologique.

Une toute récente étude comparant la mortalité cellulaire en BR versus en organoculture vient confirmer ces résultats sur une période très longue de 3 mois. Par ailleurs d'autres optimisations du modèle cornéen dans le cadre du développement du modèle laboratoire du BR sont en cours d'optimisation.

Le BR, désormais en phase d'industrialisation, pourrait être la solution réaliste d'eye banking des prochaines années.

Publications et communications scientifiques

EVER (European association for Vision and Eye Research), Nice octobre 2012

CHU
SAINT-ETIENNE

Revisiting corneal storage using a bioreactor: proof of concept

GALIN P., BERNARD A., NEFFAQUI C., CAMPOLINI N., GRIOT O., ACQUART S., PISELLI S., THURET G.
1. Corneal Graft, Biology, Engineering and Imaging Laboratory, EA5321, Federative Institute of Research in Sciences and Health Engineering, Faculty of Medicine, Jean Monnet University,
2. Eye Bank, French Blood Centre
Saint-Etienne, France

biigc
Biologie Industrielle et Intégrative
de la santé de Corneal

BACKGROUND

Cold storage (CS) or organ culture (OC) for corneal storage, have not been dramatically improved since the 70'. Basically, they consist of immersion of the cornea in a sealed vial or viewing chamber filled with storage medium containing macromolecules for permanent (CS) or sequential (OC) deswelling. None respects the corneal physiology (higher pressure to the endothelial side associated with a retrocorneal fluid circulation), resulting more or less rapidly in endothelial cell (EC) death, stromal swelling and Descemet folding (for OC) that accentuate EC death. In the past, several artificial chambers were built or patented¹⁻⁴, mainly for toxicology experiments and never with a view to improve graft storage. We developed a corneal bioreactor (BR) that reconstitutes both pressure and continuous slow medium renewal in order to improve corneal storage (Fig. 1).

Results. The BR maintained a stable gradient of pressure during at least 5 weeks with a controlled flow (Fig. 2). A few hours after insertion of the cornea in the BR, transparency improved and thickness and folding decreased and were maintained without deswelling molecules (Fig. 3).

Conclusions

By re-creating transcorneal pressure gradient and flow circulation of nutritive medium, the BR could improve corneal storage in eye banks.

METHODS

The BR (patent N°1250832 January 2012) comprised sterile endothelial and epithelial chambers closed with transparent windows to allow easy controls (transparency, thickness, detection of interfaces, and EC count) from both sides. Adjustable fluid flow and pressure (15-30 mmHg) in the endothelial side were maintained by a disposable infusion system connected to a microsolenoid valve controlled by a pressure sensor and a microcontroller (Fig. 2). Furthermore, the height of the epithelial window could be adjusted to applanate the cornea for femtosecond laser cut.

References

1. Sponer L, Sponer A, Sponer J. *Cornea*. 2004;21(12):1485-1493.
 2. Pflug W, Wollensack G, Sponer L, Sponer A, Sponer J. *Cornea*. 2004;21(12):1485-1493.
 3. Sponer L, Sponer A, Sponer J. *Cornea*. 2004;21(12):1485-1493.
 4. Sponer L, Sponer A, Sponer J. *Cornea*. 2004;21(12):1485-1493.

EEBA (European eye bank association) Lausanne 2014: Communication affichée: Optical measurement of dioptric power and transparency of cornea stored in an innovative bioreactor

GAUTHIER AS, PATAIA G, NAIGEON N, BERNARD A, NANGOUM-FOSSO T, CAMPOLMI N, TRONE MC, ACQUART S, DELBOSC B, THURET G, GAIN P

Purposes: quantification of dioptric power (DP) and transparency (T) of store corneas remain almost unmet in daily eye bank practice. Complementary to T, DP could help screening donors having had refractive surgery and selecting the best donor/recipient refractive matching. During the development of an innovative corneal bioreactor (patented) for preclinical research and long-term storage, we took into account the possibility to integrate devices to perform these new quality controls. Aim: to present an original device, named “frontofoco-graft-meter” (FGM) able to quantify DP and T of corneas in the bioreactor.

Methods: measurement of DP was based on the principle of magnification measurement and for T on the transmitted light over incoming light ratio. The FGM comprised a light source + specific chart made of parallel black lines + digital camera. Human corneas in the bioreactor were pressurised at 15 mmHg, with medium circulation in endothelial chamber, whereas epithelial chamber was filled with air during measurements. DP was compared to the power map provided by OCT (Tomey, Casia SS-1000, Japan), and T measures to results provided by our previous device called ‘transparometer’ (based on the analysis of modulation transfer function). Measurements were done by 3 operators in a masked fashion.

Results: for DP, agreement with OCT was good (within ± 1 Dioptre). For T, measurements were comparable with both devices. Inter-rater agreement was good for DP and T. FGM took a limited place and could easily be integrate in eye banks.

Conclusions: the new FGM provides objective and reproducible quality controls of DP and T of corneas placed in the corneal bioreactor.

Grants: Agence de la BioMédecine 2012, Agence Nationale pour la Sécurité du Médicament 2012, Etablissement Français du Sang 2012

**ARVO (American association for research in vision and ophthalmology) Orlando 2014:
Communication affichée: Optical measurement of dioptric power and transparency of
cornea stored in an innovative bioreactor**

**GAUTHIER AS, PATAIA G, NAIGEON N, BERNARD A, NANGOUM-FOSSO T, CAMPOLMI N,
TRONE MC, ACQUART S, DELBOSC B, THURET G, GAIN P**

Purposes: quantification of dioptric power (DP) and transparency (T) of stored corneas remain almost unmet in daily eye bank practice. Complementary to T, DP could help screening donors having had refractive surgery and selecting the best donor/recipient refractive matching. During the development of an innovative corneal bioreactor (patented) for preclinical research and long-term storage, we took into account the possibility to integrate devices to perform these new quality controls. Aim: to present an original device, named “frontofoco-graft-meter” (FGM) able to quantify DP and T of corneas in the bioreactor.

Methods: measurement of DP was based on the principle of magnification measurement and for T on the transmitted light over incoming light ratio. The FGM comprised a light source + specific chart made of parallel black lines + digital camera. Human corneas in the bioreactor were pressurised at 15 mmHg, with medium circulation in endothelial chamber, whereas epithelial chamber was filled with air during measurements. DP was compared to the power map provided by OCT (Tomey, Casia SS-1000, Japan), and T measures to results provided by our previous device called ‘transparometer’ (based on the analysis of modulation transfer function). Measurements were done by 3 operators in a masked fashion.

Results: for DP, agreement with OCT was good (within ± 1 Dioptre). For T, measurements were comparable with both devices. Inter-rater agreement was good for DP and T. FGM took a limited place and could easily be integrate in eye banks.

Conclusions: the new FGM provides objective and reproducible quality controls of DP and T of corneas placed in the corneal bioreactor.

Grants: *Agence de la BioMédecine 2012, Agence Nationale pour la Sécurité du Médicament 2012, Etablissement Français du Sang 2012*

EVER (European association for Vision and Eye Research), Nice 2013: Communication orale: Endothelial and stromal quality control of corneas stored in an innovative bioreactor

GAUTHIER A, TRONE MC, CAMPOLMI N, NEFZAOUI C, BERNARD A, NAIGEON N, NANGOUM-FOSSO T, PISELLI S, DELBOSC B, ACQUART S, THURET G, GAIN P

Purpose We recently patented a bioreactor (BR) for corneal storage, based on the restoration of a transcorneal pressure gradient and a continuous fluid circulation. Being designed for experimental works and eye banking it comprises 2 windows enabling a right through observation of the cornea. Aim: to assess on human corneas placed in the BR, the possibilities of non-invasive quality controls (QC) of endothelial cells (EC) and of the stroma (thickness, dioptric power, transparency, detection of scars)

Methods EC QC were: 1/transmitted light microscopy (TLM) with a x10 very LWD objective after trypan blue + osmotic preparation directly performed in the BR; 2/ observation with a microscope (same preparation); 3/specular microscopy (SM, Konan and Hai) without preparation. Stromal QC were: 1/slit lamp; 2/OCT (Heidelberg and Tomey Casia); 3/customized transparometer (analysis of modulation transfer function), and 4/microscope. Both quality of results and ergonomic aspects were considered

Results EC were visible with TLM and microscope at highest magnification but not with SM. Casia OCT allowed easy thickness mapping with a good agreement with US pachymetry performed as a control, and dioptric power measurements. Transparency could be controlled with the slit lamp and with our transparometer. _e microscope visualized stromal scars

Conclusion EC and new stromal QC are now possible for corneas stored in the innovative BR. Other new complementary technologies of optical control are currently in development in our lab. Acknowledgments: EFS of Besançon Grant: ABM 2012, EFS 2012, ANSM 2012. PG, GT and SA patented the BR

EVER (European association for Vision and Eye Research), Nice 2013: Communication affichée: Conception and optimization of a corneal bioreactor

TRONE MC, CAMPOLMI N, GAUTHIER AS, NEFZAOUI C, BERNARD A, NAIGEON N, NANGOUM-FOSSO T, PISELLI S, GARRAUD O, ACQUART S, THURET G, GAIN P

Purpose Restoration of a trans-corneal pressure (P) gradient and continuous circulation of fluids on both sides of the cornea could improve endothelial cell survival and reduce stromal swelling and Descemet folding during long-term corneal storage. Aim: to present the technical requirements and the technical choices we made during the development of an innovative corneal bioreactor (BR)

Methods Main functions were defined with a process of functional analysis of needs in collaboration with eye bankers. Successive prototypes were built using 3D printing with biocompatible resins, and machining of PMMA blocks, and windows made out of optical grade glass were glued. Different types of connecting tubes were assessed. Efficiency was analysed in term of capacity of maintaining the cornea perfectly tighten in order to create 2 hermetic endo and epi compartments. P (adjustable from 0 to 50 mmHg with a mini-LCD screen for live display) was regulated by a continuous irrigation from a disposable infusion system associated with a P sensor and a micro-solenoid valve driven by a customized microcontroller

Results The 3 most challenging points were: 1/waterproofness between epi and endo chambers that require to use corneas with at least a 16 mm diameter regular scleral rim 2/ biocompatibility of glues 3/ oxidation and alcalinization of storage medium caused by materials permeable to atmospheric gases. Since 2 years, 9 successive prototypes allowed selection of efficient solutions

Conclusion Our innovative BR will be useful for both laboratory research and corneal storage by eye banks in a next future. Grant: ABM 2012, EFS 2012, ANSM 2012. PG, GT and SA patented the BR

EVER (European association for Vision and Eye Research), Nice 2013 : Communication affichée: Optical measurement of dioptric power and transparency of cornea stored in bioreactor

PATAIA G, GAUTHIER AS, TRONE MC, CAMPOLMI N, BERNARD A, NAIGEON N, NANGOUM FOSSO T, PISELLI S, ACQUART S, LEPINE T, DELBOSC B, THURET G, GAIN P

Purpose Quantification of dioptric power (DP) and transparency (T) of stored corneas remain almost unmet in daily eye bank practice. Complementary to T, DP could help screening donors having had refractive surgery and selecting the best donor/recipient refractive matching. During the development of an innovative corneal bioreactor (BR) (patented) for preclinical research and long-term storage, we took into account the possibility to integrate devices to perform these new quality controls. Aim: to present a device, named “frontofoco-graft-meter” (FGM) able to quantify DP and T of corneas in BR

Methods measure of DP was based on the principle of magnification measurement and for T on the transmitted light over incoming light ratio. The FGM comprised a light source + specific chart made of parallel black lines + digital camera. Human corneas in the BR were pressurised at 15mmHg, with medium circulation in endothelial chamber, whereas epithelial chamber was filled with air during measurements. DP was compared to the power map provided by OCT (Tomey, Casia), and T measures to results provided by our previous device called ‘transparometer’ (based on the analysis of modulation transfer function). Measurements were done by 3 operators in a masked fashion

Results For DP, agreement with OCT was good (within ± 1 Dioptre). For T, measures were comparable with both devices. Inter-rater agreement was good for DP and T. FGM took a limited place and could easily be integrate in eye banks

Conclusion the new FGM provides objective and reproducible QC of DP and T of corneas placed in the BR. Grants: ABM 2012, ANSM 2012, EFS 2012

Curriculum vitae

Curriculum Vitæ

Anne Sophie GAUTHIER

Nationalité: Française

Date et lieu de naissance: 12 avril 1984, Annecy (Haute-Savoie), France

Adresse professionnelle: Service d'ophtalmologie
CHU Jean Minjoz
25030 Besançon, cedex, FRANCE

Adresse personnelle: 4F rue Louis Pergaud, 25000 Besançon

E-Mail: asgauthier@chu-besancon.fr

Tel professionnel: +33 (0)3.81.66.81.66 (poste 67385)

Tel mobile: +33. (0)6.12.42.75.66

Fax: +33 (0) 3 81 66 84 75

Université ou établissement d'appartenance : UFR-SMP Besançon, Université de Franche Comté

Unité de recherche d'appartenance : Laboratoire « Biologie, ingénierie et imagerie de la Greffe de Cornée » BiiGC, Equipe d'Accueil EA 2521, Faculté de Médecine de St-Etienne, Université Jean Monnet

Numéro RPPS : 10100679876

Langues : anglais

CURSUS UNIVERSITAIRE

❖ Médecine

2002-2008 : Université de Franche-Comté : externat

- Reçue primante en PCEM1, classée 63^{ème}
- DCEM effectué en 4 ans.
- Examen national classant 2008 : rang 85 national, choix : Besançon (Major) en spécialités chirurgicales

2008-2014: UFR-SMP Besançon, Université de Franche Comté : DES d'ophtalmologie

❖ Biologie humaine: Université Jean Monnet Saint-Etienne

2004-2006: Maîtrise de sciences biologiques et médicales : master 1

2012-2013: Master 2 Recherche : Relation hôte-greffon-Année recherche

2015-2017 : école doctorale de Bourgogne-Franche-Comté environnement et santé

- thèse de science : Contribution à l'amélioration de la conservation cornéenne en bioréacteur

DIPLOMES UNIVERSITAIRES

2002 : Baccalauréat série S-SVT, spécialité physique-chimie, mention : bien (Lycée Charles Nodier, Dole)

2004 : **Maîtrise d'anatomie : UFR-SMP Besançon,** Université de Franche Comté

2005 : **Certificat de maîtrise de sciences biologiques et médicales d'anatomie descriptive et topographique UFR-SMP Besançon,** Université de Franche Comté

2006 : UE : Psychologie Neurobiologie

2011 : **Diplôme d'université Neuro-ophtalmologie.** Université de Paris, faculté de médecine Pierre et Marie Curie (Pr Le Hoang)

2013 : **Master 2 Recherche « Relation hôte-greffon» UFR-SMP Besançon,** Université de Franche Comté **(année recherche du ministère).** Stage d'un an au laboratoire « Biologie, ingénierie et imagerie de greffe de Cornée » EA2521, BiiGC, Pr. Gain, Faculté de Médecine de Saint-Etienne, Mémoire de recherche: «Intégration d'instruments de contrôle qualité cellulaire et tissulaire sur bioréacteur cornéen original».

2013 : **Diplôme d'université Interprétation et lecture critique des essais thérapeutiques.** Université Lyon 1 Faculté de médecine RTH Laennec, (Pr Gueyffier)

2013 : **Thèse d'exercice de la médecine. UFR-SMP Besançon,** Université de Franche Comté intitulée : «Intégration d'instruments de contrôle qualité cellulaire et tissulaire sur bioréacteur cornéen original». Obtenue avec mention honorable

2014 : **European Board of Ophthalmology**

2014 : Diplôme d'étude spécialisé en Ophtalmologie, mémoire intitulé : « Découpe au laser femtoseconde de greffons endothéliaux : comparaison entre aplanation endothéliale et épithéliale »

2014 : Diplôme d'université Imagerie et Pathologie Rétinienne, faculté de médecine Paris – Diderot (Pr Massin)

TITRES HOSPITALIERS

2006 : Examen national classant 85^{ème}, choix de Besançon (Major) en spécialités chirurgicales

2006-2014 : Cursus DES en Ophtalmologie CHU Besançon entrecoupé d'une année recherche à Saint-Etienne

- ❖ **Novembre 2008-Mai 2009** : 1er semestre en chirurgie viscérale vasculaire (service du Docteur Leguillouzic, CHR Louis Pasteur de Dole)
- ❖ **Mai 2009-Novembre 2009** : 2ème semestre en ophtalmologie (service du Docteur Patillon, CHR Louis Pasteur de Dole)
- ❖ **Novembre 2010-Mai 2010** : 3ème semestre en neurochirurgie (service du Professeur Czorny, CHU Jean Minjot de Besançon)
- ❖ **Mai 2010-Novembre 2010** : 4ème semestre en ophtalmologie (service du Docteur Patillon, CHR Louis Pasteur de Dole)
- ❖ **Novembre 2010-Novembre 2011** : 5ème et 6ème semestre en ophtalmologie (service du Professeur Montard, CHU Jean Minjot de Besançon)
- ❖ **Novembre 2011-Mai 2012** : 7ème semestre en radiologie (service du docteur Yacoubi, CHR Dole)
- ❖ **Mai 2012-Novembre 2012** : 8ème semestre en ophtalmologie (service du Pr Delbosc, CHU Jean Minjot de Besançon)
- ❖ **Novembre 2012 à Novembre 2013 : Année recherche ministérielle – Master 2R – laboratoire « Biologie, ingénierie et imagerie de greffe de Cornée » BiiGC, EA2521, Pr. Gain, Dr Thuret – Faculté de ST-ETIENNE**
- ❖ **Novembre 2013-Mai 2013** : 9^{ème} semestre en ophtalmologie (service du Pr Delbosc, CHU Jean Minjot de Besançon)
- ❖ **Mai 2013-Novembre 2014** : 10^{ème} semestre en ophtalmologie (service du Pr Delbosc, CHU Jean Minjot de Besançon)

2014-2016 : Chef de clinique assistante des hôpitaux (service du Pr Delbosc, CHU Jean Minjot de Besançon)

2016-2017 : Praticien hospitalier contractuelle (service du Pr Delbosc, CHU Jean Minjot de Besançon)

2017 à ce jour : Praticien hospitalier (service du Pr Delbosc, CHU Jean Minjot de Besançon)

APPARTENANCE A DES SOCIETES SAVANTES

2010 à ce jour : Membre de la Société Française d'Ophtalmologie (**SFO**)

2012 à ce jour : Membre de European Association for Vision and Eye Research (**EVER**)

2013 à ce jour : Membre de European Eye Bank Association (**EEBA**)

PARTICIPATION A DES CONGRES NATIONAUX ET INTERNATIONAUX

- 2010 à ce jour:** Réunion de la Société Française d’Ophtalmologie (**SFO**), Paris
- 2010, 2011, 2012 :** Journées de Réflexions Ophtalmologiques (JRO), Paris
- 2013 à 2016:** European Association for Vision and Eye Research (**EVER**)
- 2013 à ce jour:** European Eye Bank Association (**EEBA**)
- 2014 :** Association of Research in Vision and Ophthalmology (**ARVO**), Orlando, USA

Activité de recherche

Score SIGAPS personnel 2012-2018

n=238 (Aout 2018)

Nombre de publications par catégorie et par position

Période : 2012 - 2018							
Position	Total	A	B	C	D	E	NC
1	10	1	1	0	1	7	0
2	3	0	0	0	2	1	0
3	4	1	0	2	0	1	0
k	7	1	2	4	0	0	0
ADA	1	0	0	0	0	1	0
DA	1	0	0	0	1	0	0
Total	26	3	3	6	4	10	0

k = Toute position intermédiaire entre 3 et ADA
ADA = Avant Dernier Auteur
DA = Dernier Auteur
Inv = Investigateur

Répartition par catégorie et par année

Période : 2012 - 2018								
Année	Total	A	B	C	D	E	NC	Score
2012	1	0	0	0	0	1	0	8
2013	1	0	0	0	0	1	0	8
2014	4	0	1	2	0	1	0	38
2015	3	0	0	2	0	1	0	18
2016	4	1	1	0	0	2	0	30
2017	8	1	1	1	1	4	0	83
2018	5	1	0	1	3	0	0	53
Total	26	3	3	6	4	10	0	238

Nombre de publications par revue

Nombre de publications par revue			
Titre	Total 	Cat.	IF
<input type="text"/> x	<input type="text"/> x	<input type="text"/> x	<input type="text"/> x
J Fr Ophthalmol	9	E	0.567
Cornea	4	C	2.01
Br J Ophthalmol	2	A	3.806
Cell Tissue Bank	2	E	1.331
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.	2	B	3.303
Am J Ophthalmol	1	A	5.052
Cutan Ocul Toxicol	1	E	1.213
Eur J Ophthalmol	1	D	1.381
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	1	C	2.349
JAMA Ophthalmol	1	A	5.625
J Neuroophthalmol	1	D	2

PUBLICATIONS

❖ Publications dans des revues internationales à comité de lecture ACLI

- 1 SALEH M, **GAUTHIER AS**, DELBOSC B, CASTELBOU M. Impact of Metamorphopsia on Quality of Life after Successful Retinal Detachment Surgery, *Ophthalmologica*. 2018 May 29:1-8.
- 2 BIGAN G, PUYRAVEAU M, SALEH M, GAIN P, MARTINACHE I, DELBOSC B, **GAUTHIER AS**: Corneal transplantation trends in France from 2004 to 2015: A 12-year review, *Eur J Ophthalmol*. 2018 Apr 1:1120672118762224.
- 3 MARCON A, PÉRILLAT N, GARCIN T, JULLIENNE R, HE Z, FOREST F, **GAUTHIER AS**, GAIN P, THURET G : Transplantation Blues: Inadvertent Staining of Amyloid Deposits With Trypan Blue, *Cornea*. 2018 Jul;37(7):824-828
- 4 CROUZET E, GARCIN T, **GAUTHIER AS**, HE Z, PERRACHE C, DELAVENNE X, BASSET T, PEOC'H M, GAIN P, THURET G. Immunosuppression by a subconjunctival implant releasing dexamethasone in a rabbit model of penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol*. 2018 May;102(5):692-699.
- 5 GUYON B, ELPHEGE E, FLORES M, **GAUTHIER AS**, DELBOSC B, SALEH. M. Retinal Reflectivity Measurement for Cone Impairment Estimation and Visual Assessment After Diabetic Macular Edema Resolution (RECOVER-DME), *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Dec 1;58(14):6241-6247.
- 6 SALEH M, FLORES M, **GAUTHIER AS**, ELPHEGE E, DELBOSC B. Quantitative analysis of photoreceptor layer reflectivity on en-face optical coherence tomography as an estimator of cone density. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2017 Nov;255(11):2119-2126.
- 7 JUMELLE C, GARCIN T, **GAUTHIER AS**, GLASSON Y, BERNARD A, GAVET Y, KLOSSA J, HE Z, ACQUART S, GAIN P, THURET G. Considering 3D topography of endothelial folds to improve cell count of organ cultured corneas. *Cell Tissue Bank*. 2017 Jun;18(2):185-191.
- 8 **GAUTHIER AS**, CASTELBOU M, GARNIER MB, PIZZUTO J, ROUX S, GAIN P, POUTHIER F, DELBOSC B. Corneal transplantation: study of the data of a regional eye bank for the year 2013 and analysis of the evolution of the adverse events reported in France since 2010. *Cell Tissue Bank*. 2017 Mar;18(1):83-89.
- 9 RIVET A, **GAUTHIER AS**, CHATAIN M, BILLON-GRAND R, THINES L, DELBOSC B, A Giant Tumefactive Virchow-Robin Space: A Rare Cause of a Homonymous Quadrantanopia, *J Neuroophthalmol*. Mar;37(1):75-76.
- 10 **GAUTHIER AS**, GARCIN T, THURET G, HE Z, JULLIENNE R, TRONE MC, NEFZAOUI C, ACQUART S, FOREST F, PEOC'H M, DELBOSC B, GAIN P, Very early endothelial cell loss after penetrating keratoplasty with organ-cultured corneas, *Br J Ophthalmol*. 2017 Aug;101(8):1113-1118.
- 11 **GAUTHIER AS**, FRIOT M, PUYRAVEAU M, GARCIN T, SALEH M, GAIN P, DELBOSC B. Visual outcomes of the second eye in keratoconic patients who have a corneal graft in the first eye: analysis at 12 years. *Eur J Ophthalmol*. 2018 Jan;28(1):19-24.

- 12 HE Z, FOREST F, BERNARD A, **GAUTHIER AS**, MONTARD R, PEOC'H M, JUMELLE C, COURRIER E, PERRACHE C, GAIN P, THURET G : Cutting and Decellularization of Multiple Corneal Stromal Lamellae for the Bioengineering of Endothelial Grafts, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Dec 1;57(15):6639-6651.
- 13 BIDAUT-GARNIER M, MONNET E, PRONGUÉ A, MONTARD R, **GAUTHIER AS**, DESMARETS M, MARIET AS, RATAJCZAK C, BINDA D, SALEH M, DELBOSC B Evolution of Corneal Graft Survival Over a 30-Year Period and Comparison of Surgical Techniques: A Cohort Study, Am J Ophthalmol. 2016 Mar;163:59-69.
- 14 BERNARD A, HE Z, **GAUTHIER AS**, TRONE MC, BAUBEAU E, FOREST F, DUMOLLARD JM, PEOC M, THURET G, GAIN P : Femtosecond laser cutting of endothelial grafts: comparison of endothelial and epithelial applanation, Cornea. 2015 Feb;34(2):209-17.
- 15 BERNARD A, HE Z, FOREST F, **GAUTHIER AS**, PEOC M, DUMOLLARD JM, ACQUART S, MONTARD R, DELBOSC B, MD, GAIN P, THURET G :Femtosecond laser cutting of multiple thin corneal stromal lamellae for endothelial bioengineering, Cornea 2015 Feb;34(2):218-24.
- 16 KHOUANI M, DEBELLEMANIERE G, MALUGANI C, **GAUTHIER AS**, POUTHIER F, DELBOSC B, SALEH M. : Evaluation of Microbial Contamination of Corneal Transplants: One-Year Report From a French Regional Eye Bank. Cornea. 2014 Sep;33(9):899-904.
- 17 **GAUTHIER AS**, CAMPOLMI N, TUMAHAI P, KANTELIP B, DELBOSC B. Sebaceous Carcinoma of the Eyelid and Muir-Torre Syndrome, JAMA Ophthalmol 2014;132:1025-8.
- 18 CAMPOLMI N, HE Z, ACQUART S, TRONE MC, BERNARD A, **GAUTHIER AS**, GARRAUD O, FOREST F, PÉOC'H M, GAIN P, THURET G. Comparison of endothelial cell density of organ cultured corneas with cornea donor study. Cornea. 2014 Jun;33(6):597-603.

❖ Publications dans des revues internationales à comité de lecture en français

- 1 **GAUTHIER AS**, LOGANADANE P, TUMAHAI P, FLORES M, SALEH M, DELBOSC B. Spontaneous hyphema as presenting sign of iris metastasis: Case report. J Fr Ophtalmol. 2018 Jun;41(6):e275-e276.
- 2 **GAUTHIER AS**, CASTELBOU M, SALEH M, DELBOSC B. Visual outcomes after Descemet's membrane endothelial keratoplasty, J Fr Ophtalmol. 2017 Jun;40(6):467-476.
- 3 **GAUTHIER AS**, BILLON-GRAND R, RIVET A, CHATAIN M, SALEH M, DELBOSC B.: Left inferior homonymous quadrantanopia secondary to dilation of the Virchow-Robin spaces: Case report, J Fr Ophtalmol. Jan;40(1):82-83.
- 4 **GAUTHIER AS**, TEA S, HUSTACHE MATHIEU L, SCHWARTZ C, SALEH M, DELBOSC B. Ocular syphilis: 9 cases, J Fr Ophtalmol. 2016 Nov;39(9):750-755.
- 5 **GAUTHIER AS**, FRIOT M, MONTARD R, SALEH M, DELBOSC B : Femtosecond-assisted Ferrara intrastromal corneal ring implantation for treatment of keratoconus: Functional outcomes at one year, J Fr Ophtalmol. 2016 May;39(5):428-36.
- 6 PICOT C, **GAUTHIER AS**, CAMPOLMI N, DELBOSC B : Quality of life of patients wearing scleral lens, J Fr Ophtalmol. 2015 Sep;38(7):615-9.
- 7 CAMPOLMI N, **GAUTHIER AS**, CINOTTI E, FOREST F, THURET G, GAIN P. Specular microscopic analysis of endothelial wound healing after trauma from pine processionary caterpillar hairs: pediatric case report. J Fr Ophtalmol. 2014 Jun;37(6):83-5.
- 8 CAMPOLMI N, **GAUTHIER AS**, GRIOT A, CINOTTI E, FOREST F, THURET G, GAIN P. Retrobulbar optic neuropathy as presenting sign of a rare form of CD4/CD56-positive acute myeloid leukemia. J Fr Ophtalmol. 2014 Apr;37(4):57-9.
- 9 **GAUTHIER AS**, RIVAL B, SAHLER J, FAGNONI-LEGAT C, LIMAT S, GUILLAUME Y, DELBOSC B. Galenic and analytic development of tacrolimus 0.06% eye drops. J Fr Ophtalmol. 2013 May;36(5):408-13.
- 10 **GAUTHIER AS**, DELBOSC B. Focus on interstitial keratitis. J Fr Ophtalmol. 2012 Nov;35(9):726-34.
- 11 CAMPOLMI N, GUY C, CINOTTI E, FOREST F, GAIN P, PHILIPPE-ZECH C, **GAUTHIER AS**, THURET G. Corneal perforation: another side effect of nicorandil. Cutan Ocul Toxicol. 2014 Jun;33(2):96-8.

❖ Publications en cours (revues ACLI ou ACL)

- 1 FANNY RICOUARD, MARC PUYRAVEAU, MAHER SALEH, GAIN PHILIPPE, ISABELLE MARTINACHE, BERNARD DELBOSC, **ANNE SOPHIE GAUTHIER**. Regional trends in corneal transplantation from 2004 to 2015 in France: a 12-year review on indications, technique and waiting period. Cell Tissue Bank (under review)

❖ Chapitre d'ouvrage

- a. **GAUTHIER AS**, DELBOSC B. Kératites interstitielles. EMC-Ophtalmologie 2012 ; 9(4) :1-9
- b. **GAUTHIER AS**, DELBOSC B. Kératites interstitielles. EMC-Ophtalmologie 2017 ; 9(4) :1-9
- c. THURET G, GARCIN A, **GAUTHIER AS**, ACQUART S, GAIN P, DELBOSC B: Evolution des techniques d'Eye Banking « Chirurgies cornéennes innovantes et réparatrices » Rapport Annuel des Sociétés d'Ophtalmologie de France 2017
- d. **GAUTHIER AS**, GARCIN A, ACQUART S, THURET G, DELBOSC B, GAIN P Greffons lamellaires et banques de tissus « Chirurgies cornéennes innovantes et réparatrices » Rapport Annuel des Sociétés d'Ophtalmologie de France 2017
- e. GARCIN T, **GAUTHIER AS**, TRONE MC, ACQUART S, PUGNET JL, PEYRAGROSSE T, ROGUES F, DELBOSC B, THURET G, GAIN P : Prélèvement et conservation des greffons cornéens, EMC Ophtalmologie 2017

COMMUNICATIONS

❖ Communications en congrès internationaux

1. GARCIN T, **GAUTHIER A S**, CROUZET E, HERBEPIN P, PERRACHE C, HE Z, THURET G, GAIN P : An innovative bioreactor allows corneal storage for up to 3 months, EVER, Nice 2018 (communication affichée)
2. THURET G, CROUZET E, GARCIN T, HERBEPIN P, HE Z, COURRIER E, PERRACHE C, AL BOURGOL S, LAMBERT V, MAURIN C, SAUNIER V, **GAUTHIER A S**, GAIN P : The OBserV platform (Ophthalmic Bioreactor specialized in experimental research & Valorisation): overview of possible applications
3. **GAUTHIER AS**, GARCIN T, THURET G, BERNARD A, CALYAKA E , HOR G, HERBEPIN P, PUGNIET JL, PEYRAGROSSE T, ROGUES F, LEPINE T, GAIN P : specular microscopy of long-term stored corneas in an innovative bioreactor, EEBA, Prague 2017 (Communication affichée)
4. **GAUTHIER AS**, KHOUANI M, MALUGANI C, POUTHIER F, SALEH M, DELBOSC B: Evaluation of Microbial Contamination of Corneal Transplants : One-Year Report From a French Regional Eye Bank, EEBA Venice 2015 (communication affichée)
5. BERNARD A., MAUCLAIR C., BAUBEAU E., NANGOUM-FOSSO T., NAIGEON N. CAMPOLMI N., **GAUTHIER AS.**, TRONE MC., HE Z., PISELLI S., PERRACHE C, PEOC'H M., FOREST F., DUMOLLARD JM., THURET G., GAIN P : Femtosecond laser endothelial graft cutting from endothelial side in a new corneal bioreactor with epithelial appplanation, EEBA, Lausanne 2014 (communication orale)
6. NAIGEON N, BERNARD A, NANGOUM-FOSSO T, CAMPOLMI N, **GAUTHIER AS**, TRONE MC, PATAIA G, HE Z., ACQUART S., PISELLI S., PERRACHE C., GARRAUD O., FOREST F., DUMOLLARD JM., PEOC'H M., THURET G., GAIN P : Integration of current and future quality controls for corneas stored in an innovative bioreactor, EEBA, Lausanne, 2014 (communication orale)
7. THURET G., BERNARD A., NAIGEON N., NANGOUM-FOSSO T., HE Z., TRONE MC., NEFZAOUI C., CAMPOLMI N., **GAUTHIER AS.**, PISELLI S., PERRACHE C., ACQUART S., GARRAUD O., FOREST F., DUMOLLARD JM., PEOC'H M., GAIN P : Revisiting corneal storage using an innovative bioreactor, EEBA, Lausanne, 2014 (communication orale)
8. **GAUTHIER AS**, PATAIA G, NAIGEON N, BERNARD A, NANGOUM-FOSSO T, CAMPOLMI N, ACQUART S, LEPINE T, THURET G, GAIN P : Optical measurement of dioptric power and transparency of cornea stored in an innovative bioreactor, EEBA, Lausanne, 2014 (communication affichée)
9. BERNARD A, MACULAIR C, BAUBEAU E, CAMPOLMI N, **GAUTHIER AS**, THURET G, GAIN P : Femtosecond laser endothelial graft cutting from endothelial side in a new corneal bioreactor with epithelial appplanation, EuCornea Congress, London 2014 (communication affichée)
10. BERNARD A, MACULAIR C, BAUBEAU E, CAMPOLMI N, **GAUTHIER AS**, THURET G, GAIN P : Comparaison of femtosecond laser cut of endothelial grafts with endothelial and epithelial appplanation, EuCornea Congress, London 2014 (communication affichée)
11. THURET G, PATAIA G, **GAUTHIER AS**, TRONE MC , BERNARD A, LEPINE T, GAIN P : Integration of current and development of future quality controls for corneas stored in an innovative bioreactor, EuCornea Congress, London 2014 (communication affichée)

12. **GAUTHIER AS**, FRIOT M, ROYER B, DELBOSC B : New non-invasive technique for dosing eye drops concentration of drugs in tears, EVER Nice 2014 (communication affichée)
13. **GAUTHIER A**, TRONE MC, CAMPOLMI N, NEFZAQUI C, BERNARD A, NAIGEON N, NANGOUM-FOSSO T, PISELLI S, DELBOSC B, ACQUART S, THURET G, GAIN P. Endothelial and stromal quality control of corneas stored in an innovative bioreactor, European Association for Vision and Eye Research Nice, 2013 (communication orale)
14. TRONE MC, CAMPOLMI N, **GAUTHIER AS**, NEFZAQUI C, BERNARD A, NAIGEON N, NANGOUM-FOSSO T, PISELLI S, GARRAUD O, ACQUART S, THURET G, GAIN P. Conception and optimization of a corneal bioreactor, European Association for Vision and Eye Research, Nice, 2013, (communication orale)
15. CAMPOLMI N, **GAUTHIER AS**, MONTARD R, ACQUART S, THEILLIERE C, PEIRERA S, GARRAUD O, HE Z, PISELLI S, THURET G, DELBOSC B, GAIN P. Setting up organ-cultured corneas pre-cutting by a French blood center-eye bank, European Association for Vision and Eye Research, Nice, 2013, (communication orale)
16. PATAIA G, **GAUTHIER AS**, TRONE MC, CAMPOLMI N, BERNARD A, NAIGEON N, NANGOUM-FOSSO T, PISELLI S, ACQUART S, LEPINE T, DELBOSC B, THURET G, GAIN P. Optical measurement of dioptric power and transparency of cornea stored in bioreactor, European Association for Vision and Eye Research, Nice, 2013, (communication orale)
17. TRONE MC, **GAUTHIER AS**, CAMPOLMI N, NAIGEON N, NANGOUM-FOSSO T, PATAIA G, FOREST F, PEOC'H M, DUMOLLARD JM, ACQUART S, THURET G, GAIN P. Simulation of DSAEK in a new corneal bioreactor, European Association for Vision and Eye Research, Nice, 2013, (communication affichée)
18. PATAIA G, **GAUTHIER AS**, CAMPOLMI N, TRONE MC, HE Z, PISELLI S, FOREST F, ACQUART S, LEPINE T, GAIN P, THURET G. Corneal graft imaging by anterior segment OCT during storage in eye banks, European Association for Vision and Eye Research, Nice, 2013 (communication affichée)
19. BERNARD A, CAMPOLMI N, HE Z, PATAIA G, **GAUTHIER AS**, TRONE MC, NANGOUM-FOSSO T, PISELLI S, ACQUART S, GAIN P, THURET G. New Image Plugin for rapid and reproducible measurement of viable corneal endothelial cell density, European Association for Vision and Eye Research, Nice, 2013, (communication affichée)
20. CAMPOLMI N, **GAUTHIER AS**, ACQUART S, THEILLIERE C, PEIRERA S, GARRAUD O, HE Z, PISELLI S, THURET G, DELBOSC B, GAIN P. Viable endothelial cell density by triple HEC staining of a failed Descemet stripping automated endothelial keratoplasty, European Association for Vision and Eye Research, Nice, 2013 (communication affichée)
21. **GAUTHIER AS**, RIVAL B, SAHLER J, FAGNONI-LEGAT C, LIMA S, GUILLAUME Y, DELBOSC B. Galenic and analytical development of Tacrolimus 0.06% eye drops. European Association for Vision and Eye Research, nice, 2012 (communication affichée)

❖ Communications en congrès national et/ou régional

1. **GAUTHIER AS**, GARCIN T, ACQUART S, PEREIRA S, PIZZUTTO J, DELBOSC B, GAIN P, THURET G, Greffons lamellaires et banque de tissus, réunion plénière des Sociétés d'Ophtalmologie de France, Paris 2017 (communication orale)
2. THURET G, GARCIN T, **GAUTHIER AS**, GAIN P : La thérapie cellulaire endothéliale : pour qui ? pour quand ?, Rock Lyon 2017 (communication orale)
3. VIOTTE A, **GAUTHIER AS**, MONTARD R, DELBOSC B : Résultat fonctionnel et données abérrométriques après DMEK. Société Français d'Ophtalmologie, Paris, 2017 (communication orale)
4. **GAUTHIER AS**, FRIOT M, MONTARD R, DELBOSC B : Devenir du deuxième œil des patients porteurs d'un kératocône dont le premier œil a bénéficié d'une greffe de cornée ; facteurs de risque d'évolution vers une kératoplastie du deuxième œil et étude longitudinale de 10 ans. Société Français d'Ophtalmologie, Paris, 2016 (communication orale)
5. **GAUTHIER AS** : Kératites inflammatoires, entretiens annuels d'ophtalmologie, Société Français d'Ophtalmologie, Paris, 2016 (communication orale)
6. NAIGEON N, BERNARD A, NANGOUM FOSSO T, HE Z, TRONE MC, CAMPOLMI N, **GAUTHIER AS**, PISELLI S, ACQUART S, FOREST F, GAIN P, THURET G (Saint-Étienne) : Conservation des greffons cornéens revisitée grâce à un bioréacteur innovant. Revisiting corneal storage using an innovative bioreactor. Société Français d'Ophtalmologie, Paris, 2014 (communication affichée)
7. NAIGEON N, BERNARD A, NANGOUM FOSSO T, HE Z, TRONE MC, CAMPOLMI N, **GAUTHIER AS**, PISELLI S, ACQUART S, FOREST F, GAIN P, THURET G (Saint-Étienne) : Conservation des greffons cornéens revisitée grâce à un bioréacteur innovant. Revisiting corneal storage using an innovative bioreactor. Société Français d'Ophtalmologie, Paris, 2014 (communication affichée)
8. PATAIA G, **GAUTHIER AS**, NAIGEON N, BERNARD AS, NANGOUM FOSSO T, CAMPOLMI N, TRONE MC, ACQUART S, LEPINE T (Saint-Étienne), DELBOSC B (Besançon), THURET G, GAIN P (Saint-Étienne) : Caractérisation optique de greffons de cornée conservés en bioréacteur innovant : mesure de la puissance et de la transparence. Optical measurement of graft properties during storage in an innovative corneal bioreactor:measuring optical power and transparency. Société Français d'Ophtalmologie, Paris, 2014 (communication affichée)
9. BERNARD A, MAUCLAIR C, BAUBEAU E, NANGOUM FOSSO T, NAIGEON N, CAMPOLMI N, **GAUTHIER AS**, TRONE MC, HE Z, FOREST F, THURET G, GAIN P (Saint-Étienne) : Découpe de greffons lamellaires endothéliaux au laser femtoseconde par voie endothéliale dans un bioréacteur cornéen innovant avec aplanation épithéliale. Femtosecond laser endothelial graft cutting from endothelial side in a new corneal bioreactor with epithelial applanation. Société Français d'Ophtalmologie, Paris, 2014 (communication affichée)
10. FOSSO T, NAIGEON N, BERNARD A, CAMPOLMI N, **GAUTHIER AS**, TRONE MC, PATAIA G, HE Z, ACQUART S (Saint-Étienne), DELBOSC B (Besançon), THURET G, GAIN P (Saint-Étienne) : Intégration de contrôles de qualité actuels et futurs sur des cornées conservées dans un bioréacteur innovant. Integration of current and future quality controls for corneas stored in an innovative bioreactor. Société Français d'Ophtalmologie, Paris, 2014 (communication orale)
11. HE Z, BERNARD A, CAMPOLMI N, PATAIA G, **GAUTHIER AS**, TRONE MC, NAIGEON N, PISELLI S, ACQUART S, FOREST F, GAIN P, THURET G (Saint-Étienne) : Nouveau plugin Image J pour la mesure rapide et reproductible de la densité cellulaire endothéliale viable des greffons cornéens

- après triple coloration Hoechst/Ethidium/Calcéine. New ImageJ Plugin for rapid and reproducible measurement of viable corneal endothelial cell density after triple labelling with Hoechst/Ethidium/Calcein. Société Française d'Ophtalmologie, Paris, 2014 (communication orale)
12. MONTARD R, **GAUTHIER AS**, HENRIOT C, DELBOSC B, MONTARD M: Greffes endothéliales : évolution des techniques chirurgicales. (Besançon) Société Française d'Ophtalmologie, Paris, 2014 (communication orale)
 13. **GAUTHIER AS**, MONTARD R, PRONGUE A, SIMONIS JS, MONTARD M, DELBOSC B: À propos de nos 10 premières DMEK : résultats fonctionnels à 3 mois (Besançon) Société Française d'Ophtalmologie, Paris, 2014 (communication orale)
 14. NEFZAOUI C, HE Z, BERNARD A, CAMPOLMI N, **GAUTHIER AS**, PISELLI S, PERRACHE C, FOREST F, PEOC'H M (SAINT-ÉTIENNE), DELBOSC B (BESANÇON), THURET G, GAIN P (Saint-Étienne) : Multi-découpe de lamelles stromales ultrafines au laser femtoseconde pour le bioengineering de greffons cornéens endothéliaux. Société Française d'Ophtalmologie, Paris, 2014 (communication orale)
 15. PRONGUE A, MONTARD R, **GAUTHIER AS**, HENRIOT C, DELBOSC B, MONTARD M (Besançon) DSAEK : résultats fonctionnels et gestion des complications post-opératoires. Société Française d'Ophtalmologie, Paris, 2014 (communication affichée)
 16. FRIOT M, MONTARD R, **GAUTHIER AS**, CLÉMENT B, PRONGUE A, DELBOSC B, MONTARD M, MONTARD M (Besançon) Anneaux Intra-cornéens (AIC). Société Française d'Ophtalmologie, Paris, 2014 (communication affichée)
 17. **GAUTHIER AS**, KANTELIP B, DELBOSC B. Carcinome sébacé de la paupière supérieure et syndrome de Muir-Torre : à propos d'un cas. Société Française d'Ophtalmologie, Paris, 2012 (communication affichée)
 18. **GAUTHIER AS**, RIZATTO A, PATILLON JC. Ptôsis isolé révélant un lymphome B diffus à grandes cellules, à propos d'un cas. Société Française d'Ophtalmologie, Paris, 2011 (communication affichée)

❖ Communication en EPU grand public

1. EPU de Besançon : Présentation de cas annuellement
2. EPU DE CORNÉE Hôtel-Dieu *Samedi 24 janvier 2015 : Kératites interstitielles*

DIVERS : REVIEWING ET ENCADREMENT

❖ Reviewing

pour " International Journal of Ophthalmic Pathology, 2013

ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

ENSEIGNEMENT

1. Enseignement théorique local : UFR-SMP Besançon

- a.* Conférence ENC pour les étudiants en médecine de P3 à M3
- b.* Enseignement pour le DES d'urgence, DESC de chirurgie orales
- c.* Enseignement aux écoles d'infirmières et d'IBODE
- d.* Enseignement aux prélèvements de cornées pour les coordinations locales de prélèvements

	n-5	n-4	n-3	n-2	n-1
Nombres d'enseignants de la discipline	4	4	4	4	4
Nombre d'heures effectuées	0	15	15	15	15
PACES	0	0	0	0	0

2. Enseignement pratique

- a. certification des compétences des étudiants en médecine de l'UFR-SMP Besançon
 - Stages cliniques hospitaliers: référent de stage étudiants en P2-P3
 - Evaluation toutes les 8 semaines des étudiants en M1, M2, M3
- b. Encadrement des internes dans le service d'ophtalmologie

Encadrement des travaux de thèse d'exercice et mémoire de DES d'ophtalmologie

- **GAUTHIER AS**, FRIOT M, PUYRAVEAU M, GARCIN T, SALEH M, GAIN P, DELBOSC B. Visual outcomes of the second eye in keratoconic patients who have a corneal graft in the first eye: analysis at 12 years. Eur J Ophthalmol. 2017 Jun 10:0.
- **GAUTHIER AS**, CASTELBOU M, SALEH M, DELBOSC B. Visual outcomes after Descemet's membrane endothelial keratoplasty, J Fr Ophtalmol. 2017 Jun;40(6):467-476.
- **GAUTHIER AS**, FRIOT M, MONTARD R, SALEH M, DELBOSC B : Femtosecond-assisted Ferrara intrastromal corneal ring implantation for treatment of keratoconus: Functional outcomes at one year, J Fr Ophtalmol. 2016 May;39(5):428-36.

Enseignement pratique médico-chirurgical**Présentation de cas cliniques lors des stafs hebdomadaires du service d'ophtalmologie**

- c. Participations aux jurys de thèse

- Marie Friot : Devenir du deuxième œil des patients porteurs d'un kératocône dont le premier œil a bénéficié d'une greffe de cornée ; facteurs de risque d'évolution vers une kératoplastie du deuxième œil et étude longitudinale de 10 ans. Thèse soutenue en octobre 2015, UFR SMP médecine pharmacie Besançon.
- Chaker Nefzaoui : Le chirurgien ne greffe pas autant de cellules endothéliales que le comptage en banque ne le laisse présager. Thèse soutenue en décembre 2015, UFR SMP médecine pharmacie Saint-Etienne.
- Rémy Julienne: Worldwide Eye Banking project. Thèse soutenue en décembre 2015, UFR SMP médecine pharmacie Saint-Etienne.
- Adeline Koehl : Evolution de la qualité de vie des patients strabiques opérés. Thèse soutenue en octobre 2016, UFR SMP médecine pharmacie Besançon.
- Marie Castelbou : Etude de la réhabilitation visuelle après kératoplastie endothéliale manuelle. Thèse soutenue en octobre 2016, UFR SMP médecine pharmacie Besançon.
- Benjamin Guyon : Evaluation de la perte de photorécepteurs après résolution d'un œdème maculaire diabétique. Thèse soutenue en mai 2017, UFR SMP médecine pharmacie Besançon

Titre : Contribution à l'amélioration de la conservation cornéenne en bioréacteur

Mots clés : conservation cornéenne, banque de cornée, viabilité endothéliale, organoculture, bioréacteur, survie des greffons

Depuis l'abandon depuis les années 70-80, pour des raisons logistiques et de sécurité sanitaire, des greffes fraîches dont la longévité dépassait deux décennies, la greffe s'est organisée autour de deux techniques d'eye banking: hypothermie aux USA et organoculture en Europe (dont Besançon fut pionnière pour la France) permettant une conservation respectivement à court et moyen terme. L'œdème stromal inéluctable lié à ces techniques passives engendre une perte endothéliale importante qui réduit la longévité des greffons, limite les contrôles qualités de plus en plus exigeants et obère les développements futurs tels les prédécoupes des greffons ou le bioingéniering endothélial. Le laboratoire « Biologie, imagerie et ingénierie de la Greffe de Cornée (BiiGC, EA 2521,

Université Jean Monnet de St-Etienne) a développé une technologie de conservation active en bioréacteur qui limite l'œdème cornéen en restituant le gradient de pression de part et d'autre de la cornée et la circulation de milieu nutritif. Il permet ainsi de pallier à ces deux inconvénients majeurs et de mettre en œuvre les développements du futur.

Notre travail de thèse 1/ retrace les évolutions des techniques de conservation et de contrôle des greffons ; 2/ dresse le bilan de l'évolution des techniques/indications de greffes en France; 3/ documente la perte cellulaire endothéliale précoce liée à la conservation passive en organoculture ; 4/ la compare avec la technologie active de conservation en bioréacteur.

Title : Improvement of corneal storage in bioreactor

Keywords : corneal storage, eye bank, endothelial viability, organ culture, bioreactor, graft survival

Since the abandonment for logistical and health security reasons in the 70s-80 of fresh grafts whose longevity exceeded two decades, the technical storage was organized around two techniques of eye banking: hypothermia (short term storage) in the USA and organ culture (long term storage) in Europe. Besançon was a pioneer in France for this technique. Induced stromal edema associated with these passive techniques leads to a significant endothelial cell loss and reduces grafts survival, limits quality control and obstructs further developments such as pre-cut endothelial graft or endothelial bioengineering. The laboratory "Biology, Imaging and Engineering of the Corneal Graft (BiiGC, EA 2521, Jean

Monnet University of St-Etienne) has developed an active storage system, the bioreactor, that limits corneal

edema by restoring a pressure corneal gradient and circulation of the storage medium. Bioreactor make s possible to overcome these two major disadvantages and to implement the developments of the future.

The aim of this thesis is to 1 / trace the evolution of storage and control techniques of corneal graft; 2 / review

the evolution of corneal graft techniques / indications in France; 3 / document early endothelial cell loss

related to passive conservation in organ culture; 4 / Compare organ culture versus bioreactor storage.