

CONTEXTE MÉDICAL de L'œil humain

Le chapitre 1 contient une description de l'anatomie de l'œil humain. Une revue des différentes pathologies oculaires qui sont d'ores et déjà ou seront potentiellement traitées grâce à la technologie laser est également présentée avec plus particulièrement celles nécessitant un laser femtoseconde.

L'œil, ou globe oculaire, est un organe dont la fonction est de détecter la lumière et de procurer le sens de la vue. De structure creuse et de forme globalement sphérique, il fait en moyenne 2,5 cm de long et 2,3 cm de haut. Les figures 1 et 2 sont des représentations schématiques des principaux composants de l'anatomie de l'œil.

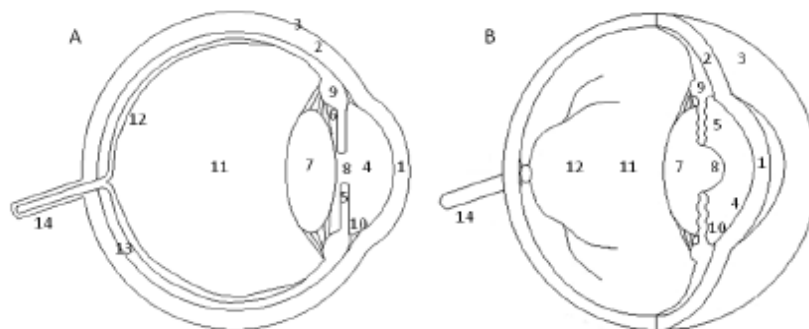


Figure 1 : perspective d'une coupe transversale (A) et deux-points (B) de l'œil humain : cornée (1), sclérotique (2), conjonctive (3), chambre antérieure (4), iris (5), chambre postérieure (6), cristallin (7), pupille (8), corps ciliaire (9), trabeculum et canal de Schlemm (10), humeur vitreuse (11), rétine (12), choroïde (13) et nerf optique (14) [5].

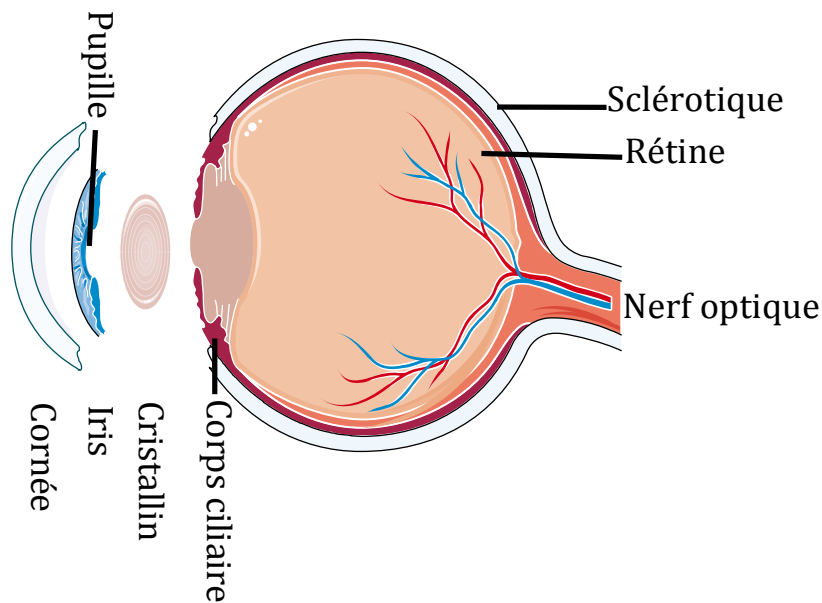


Figure 2 : Description schématique de l'anatomie de l'œil [6]

La lumière entre par la cornée puis traverse l'humeur aqueuse et la pupille qui joue le rôle d'un diaphragme. Elle est ensuite transmise par le cristallin et atteint enfin la rétine en passant par l'humeur vitrée. Les principales caractéristiques optiques de ces milieux sont décrites dans le tableau 1.

Structure	Rayon de courbure antérieur	Rayon de courbure postérieur	Pouvoir de focalisation	Indice de réfraction
Cornée	7,8 mm	6,8 mm	2/3	1,377
Humeur aqueuse	----	----	----	1,337
Cristallin	10 mm	6 mm	1/3	1,413
Humeur vitrée	----	----	----	1,336

Tableau 1 : Caractéristiques optiques principales des éléments de l'œil traversés par la lumière lors de la formation d'une image [7].

Le globe oculaire se compose de trois tuniques, du cristallin et de deux milieux liquides transparents : l'humeur aqueuse dans le segment antérieur et le vitré dans le segment postérieur.

La tunique interne est la partie sensorielle de l'œil : elle comprend la rétine qui est constituée de l'épithélium pigmentaire rétinien et de la rétine neurosensorielle. Cette dernière est constituée de six types de cellules neuronales parmi lesquelles les cellules assurant le traitement de l'information lumineuse ou la photo-transduction sont les photorécepteurs : les bâtonnets sont responsables de la vision nocturne (scotopique) et

les cônes sont responsables de la vision diurne (photopique). La papille optique est la région où près d'un million de fibres nerveuses se réunissent pour former le nerf optique avec qui cheminent les vaisseaux centraux de la rétine. Au centre de l'axe optique se trouve la *macula lutea*, « la tâche jaune », au cœur de laquelle est située la fovéa, zone rétinienne composée uniquement de cônes et où l'acuité visuelle est la plus sensible.

La tunique intermédiaire vascularisée, l'uvée, est composée de la choroïde, puis s'épaissit sur l'avant pour former le corps ciliaire et l'iris. La choroïde a un rôle essentiel dans la nutrition de la rétine. Par sa pigmentation, l'iris donne la couleur de l'œil et est innervé par des fibres nerveuses stimulant la dilatation et la constriction de la pupille, en fonction de la luminosité environnante. Situé en couronne derrière l'iris, le corps ciliaire est constitué par des procès ciliaires, responsables de la sécrétion de l'humeur aqueuse et par le muscle ciliaire dont la contraction contrôle la forme du cristallin.

Enfin, la tunique fibreuse externe est celle qui nous intéresse particulièrement puisqu'elle se compose de la sclère en périphérie et se prolonge dans le segment antérieur par la cornée. La sclère (ou sclérotique) est la partie blanche de l'œil qui le protège des agressions extérieures. Transparente et non vascularisée la cornée joue le rôle de première lentille optique de l'œil puisqu'elle est responsable aux 2/3 du pouvoir de focalisation de l'œil.

1.2. Anatomie de la cornée

Formant la première « fenêtre » de l'œil devant l'iris et la chambre antérieure, la cornée est exposée à l'environnement externe. Ses fonctions principales sont de focaliser et de transmettre la lumière vers la rétine et de protéger les composants internes de l'œil contre les agressions physiques. Elle est de forme convexe et asphérique, et présente un rayon de courbure plus important au centre qu'à sa périphérie. Elle mesure horizontalement de 11 à 12 mm contre 9 à 10 mm verticalement. Son épaisseur physiologique varie de 0,5 à 0,7 mm et peut atteindre plus d'1 mm lorsqu'elle est pathologique. Son pouvoir de réfraction étant de 40 à 44 dioptries, une faible variation de sa forme ou de son épaisseur peut entraîner d'importantes modifications dans la vision.

Sa transparence est également une des caractéristiques importantes de ce tissu. Bien que la sclère et la cornée aient une constitution très proche, la première est opaque alors que la seconde est transparente. La différence vient de la forte organisation du tissu et aux faibles variations d'indices de réfraction (*cf* section 2.2.2). Cette structure a été étudiée par microscopie électronique en transmission et par diffraction de rayons X.

La cornée est formée de trois tissus superposés : l'épithélium, le stroma et l'endothélium. Ils sont séparés par deux couches membranaires : la couche de Bowman et la membrane de Descemet (figure 3). Normalement avasculaire, la cornée tire son énergie métabolique du film lacrymal très mince (environ 7 μm) qui la recouvre, de la conjonctive et de l'humeur aqueuse [8].

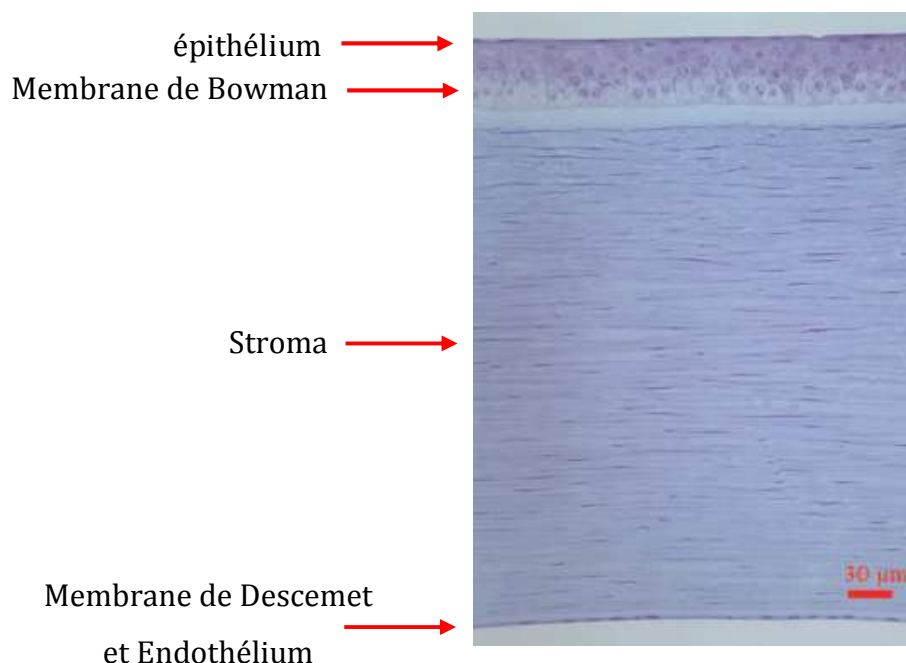


Figure 3: Coupe histologique de la cornée²

L'épithélium, de 50 à 52 μm d'épaisseur, est constitué de cellules présentant trois stades de différenciation. Les cellules superficielles sont les plus distinctes : elles sont sans noyau et organisées en 2 à 3 couches de cellules plates et desquamantes³. Les cellules intermédiaires forment deux à trois assises de cellules en voie d'apoptose (mort cellulaire). Les cellules basales forment une couche monostratifiée. Très hautes et en contact avec la lame basale, elles sont douées d'un métabolisme particulier leur

² de Michèle Savoldelli Hôtel Dieu Paris

³ Mort progressive des couches superficielles de l'épiderme

permettant de vivre dans un environnement non vascularisé. Comme celles de l'épithélium cutané, ces cellules sont capables de proliférer. Elles s'auto-renouvellent rapidement à partir des cellules souches situées dans la zone séparant la cornée de la sclère : le limbe. Il suffit de 7 jours pour que cette couche épithéliale se renouvelle complètement.

La couche de Bowman mesure entre 8 et 12 μm . Cette structure acellulaire correspond à une condensation du stroma antérieur composé essentiellement de protéoglycanes et de collagènes de type I et III. Ces fibrilles de collagène sont entremêlées, contrairement à l'organisation bien ordonnée des fibrilles stromales.

Le stroma constitue 90 % de l'épaisseur totale de la cornée (500 μm). Ce sont sa structure et ses caractéristiques qui confèrent à la cornée ses propriétés particulières de transparence et de résistance mécanique. Composé à 80% d'eau, il contient quelques cellules : les kératocytes, des fibres nerveuses et une matrice extracellulaire composée principalement de collagène, de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes et d'autres protéines qui peuvent absorber jusqu'à 1000 fois leur volume en eau.

Les fibrilles de collagène forment des lamelles empilées les unes sur les autres, orientées parallèlement à la surface de la cornée. Elles sont principalement composées de collagène de type V qui limite le diamètre maximum des fibrilles, et contiennent également une proportion non négligeable de collagène de type V. La régularité de la structure stromale est assurée par le collagène de type VI et XII. Ces fibrilles sont formées à partir du tropocollagène, une molécule de 1,5 nm de diamètre et de 300 nm de long, constituée de trois chaînes polypeptidiques, associées entre elles hélicoïdalement avec une période de 8,6 nm (figure 4).

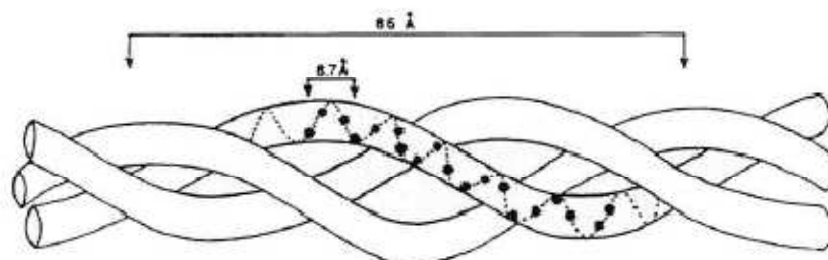


Figure 4 Représentation schématique de la molécule de tropocollagène (modifié à partir de [9])

Une fibrille est formée de cinq molécules de procollagène qui se rassemblent de façon quasi hexagonale. Un ensemble régulièrement espacé de fibrilles compose les lamelles de collagènes. Les mesures par diffraction de rayons X ont permis de déterminer le

diamètre de fibrilles et leur distance centre à centre qui valent respectivement 31 nm et 62 nm en moyenne [10,11,12]. Au centre de la cornée, le stroma cornéen contient plus de 300 lamelles, chacune mesurant 1 à 2 μm , parallèles à la surface et se différenciant l'une par rapport à l'autre par une rotation entre 0° et $\pm 90^\circ$ de leur orientation par rapport à la surface (figure 5) [9]. La régularité de cet arrangement est indispensable à la transparence de la cornée.

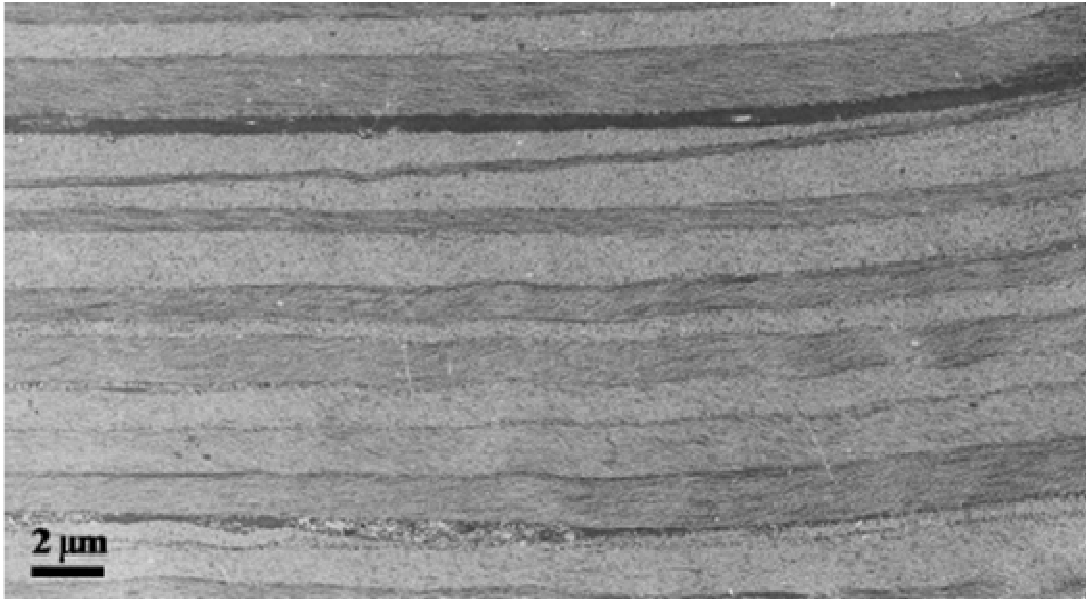


Figure 5 Micrographie du stroma cornéen montrant l'organisation des lamelles du stroma⁴

Les kératocytes qui ne constituent que 2 à 3% du volume stromal apparaissent comme de longues cellules aplaties et parallèles aux lamelles de collagène. Ils forment un réseau tridimensionnel dans lequel les cellules sont liées les unes aux autres, contribuant ainsi à la stabilité, la forme et la régularité de la structure cornéenne.

La membrane de Descemet, légèrement plus mince que la couche de Bowman (8 à 10 μm), forme une barrière protectrice entre le stroma et l'endothélium. Elle est riche en différentes molécules dont la fibronectine, la laminine, des collagènes de types IV et VIII ainsi que des protéoglycanes.

L'endothélium a un rôle fondamental dans l'entretien de la transparence de la cornée. Pour contrôler son état d'hydratation, il agit comme une pompe à eau en assurant en permanence des mouvements ioniques entre le stroma et l'humeur aqueuse. Mesurant entre 4 et 6 μm , cette monocouche cellulaire a un aspect très uniforme, avec

⁴ De Michèle Savoldelli, Hôpital Hôtel Dieu Paris

une densité cellulaire d'environ 3500 cellules/mm². Ses cellules ont une morphologie régulière hexagonale en partie due à la présence de filaments d'actine reliant les cellules les unes aux autres au niveau apical (côté humeur aqueuse).

L'endothélium cornéen mature ne prolifère pas. Ainsi, une fois cette couche monocellulaire formée et bien différenciée, les cellules endothéliales restent quiescentes⁵. En cas de traumatisme localisé, les cellules endothéliales voisines s'étalent, augmentent de taille et combent l'espace, ce qui fait de l'endothélium une zone extrêmement fragile qu'il est important de préserver, notamment lors d'interventions chirurgicales. Le stress, le vieillissement, des conditions pathologiques diverses sont des facteurs qui entraînent une diminution de la densité cellulaire avec une augmentation de la taille des cellules (polymégatisme) et une perte de leur morphologie hexagonale (pléomorphisme). Lorsque la densité cellulaire descend en dessous d'un certain seuil (500 – 1.000 cellules/mm²), la fonction de pompe de l'endothélium est altérée, ce qui entraîne une surhydratation de la cornée, conduisant à la formation d'un œdème. Ce dysfonctionnement des cellules endothéliales compromet la transparence cornéenne et conduit inévitablement à une greffe.

1.3. Les pathologies oculaires traitées au laser

De nombreuses pathologies oculaires peuvent être traitées par une grande variété de lasers. Cette section donne une vue d'ensemble des différents effets physiques exploités et des pathologies concernées. Les principaux paramètres étant la longueur d'onde, la durée de l'interaction laser-tissu et le taux de répétition. Nous verrons ensuite comment ces paramètres peuvent être exploités pour optimiser la chirurgie du segment antérieur de l'œil. Un résumé des applications est présenté dans le tableau 2 [13].

⁵ Cellules ne se divisant pas

Lasers	Longueur d'onde	Effet sur le tissu	Application ophtalmologique
Excimère	193 nm	Photo-ablation	<ul style="list-style-type: none"> • Kératoplastie du stroma antérieur et épithélial • Photokératectomie réfractive • LASIK
Argon	488-514 nm	Photocoagulation	<ul style="list-style-type: none"> • Photocoagulation rétinienne • Iridiotomie • Trabéculotomie • Iridioplastie • Sclérostomie
Krypton	647 nm	Photocoagulation	<ul style="list-style-type: none"> • Photocoagulation rétinienne
Diode	810 nm	Photocoagulation	<ul style="list-style-type: none"> • Cyclophotocoagulation • Photocoagulation rétinienne • Iridiotomie • Trabéculoplastie • Sclérostomie
Ytterbium	1030-1050 nm	Photo-disruption	<ul style="list-style-type: none"> • Femto-LASIK • Greffe de cornée • Presbytie • Intracore • Chirurgie de la cataracte
Néodyme :YAG		Photocoagulation	<ul style="list-style-type: none"> • Capsulotomie • Cyclophotocoagulation • Chirurgie de la cataracte
Continue	1064 nm		
pulsé		Photodisruption	<ul style="list-style-type: none"> • Photocoagulation rétinienne • Iridiotomie • Trabéculoplastie • Sclérostomie
CO2	10 600 nm	Photoablation	<ul style="list-style-type: none"> • Blépharoplastie • Carcinome conjonctival

Tableau 2 : État de l'art des interventions laser dans le traitement des pathologies oculaires

- Le premier laser ayant servi cliniquement est le laser rubis dès 1961 pour ses propriétés de photo-ablation. Il n'est cependant plus utilisé aujourd'hui.
- Le laser argon entraîne une dénaturation des protéines par effet thermique à l'origine d'une nécrose de coagulation.
- Le laser krypton est également utilisé pour son effet coagulant induit par la chaleur.
- Émettant dans l'UV, le laser excimer offre la possibilité de rompre les jonctions intermoléculaires. Il est exclusivement utilisé pour la chirurgie réfractive, opération au cours de laquelle le rayon de courbure de la cornée est corrigé par ablation du tissu
- Le laser à CO₂ a pour effet de carboniser ou vaporiser les tissus.
- Les lasers à néodyme:YAG (*Yttrium Aluminium Garnet*) permettent de générer, en mode continu, une photo-coagulation thermique et en mode pulsé, des effets photo-mécaniques.

Aujourd'hui, ce dernier type de laser est remplacé par les lasers à diode, plus compacts et économiques, et permettant d'obtenir les mêmes effets thermiques. Pour la chirurgie de la cornée, les effets mécaniques sont obtenus grâce aux lasers femtosecondes à ytterbium ou à néodyme: verre.

1.3.1. Les pathologies de la tunique externe pouvant être traitées au laser

1.3.1.1. La greffe de cornée

La kératoplastie, ou greffe de cornée, est une procédure chirurgicale impliquant le remplacement d'une partie ou de la totalité d'une cornée pathologique par la cornée saine d'un donneur récemment décédé [14,15] (figure 6). Il s'agit de la plus ancienne, de la plus fréquente et d'une des plus efficaces greffe de tissu. Environ 100.000 procédures sont effectuées chaque année dans le monde [16,17,18].

En plus du fait que la cornée ne soit pas vascularisée, l'œil est pourvu d'un privilège immunologique. Cette propriété a été rapportée en 1948 par Medawar qui a observé la tolérance de tissus greffés dans différents sites anatomiques privilégiés : le cerveau, les organes sexuels et la chambre antérieure de l'œil. De ce fait, lors des greffes

de cornée, peu de complications sont liées à une incompatibilité immunologique, et le taux de rejet est très faible [19,20].

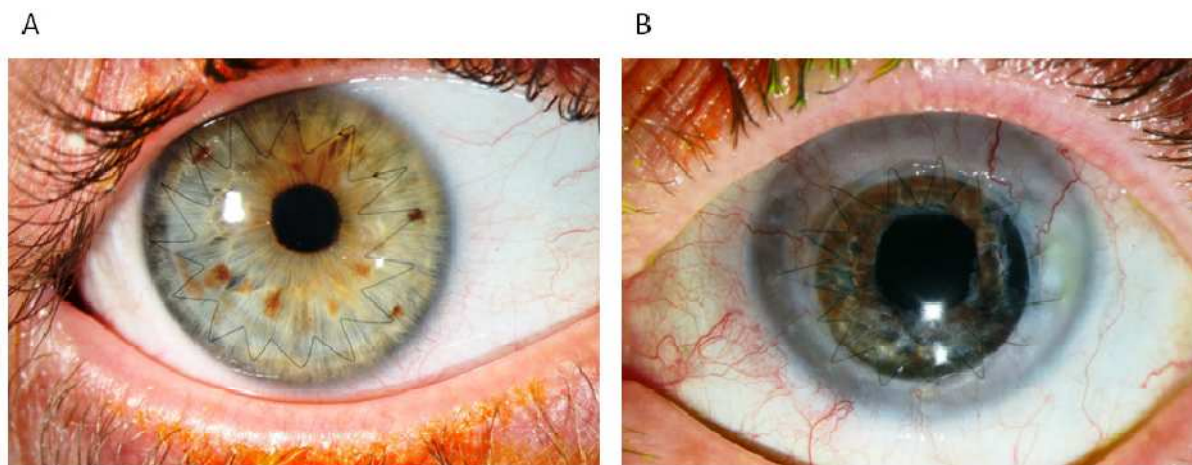


Figure 6 : Kératoplastie pour des opacités kératoconiques localisées (A) et des opacités œdémateuses diffuses(B)⁶. Le kératocône est une pathologie cornéenne évoluant progressivement. Elle se caractérise par un amincissement du stroma qui conduit la cornée à prendre une forme conique, entraînant une perte de la fonction visuelle sous forme de myopie ou d'astigmatisme.

Les troubles optiques induits par une opacification de la cornée constituent la principale raison pour préconiser une greffe. Ce type d'opération est également indiqué pour des raisons mécaniques, par exemple, afin de préserver l'intégrité de l'œil lorsque la cornée est trop fine voire perforée ou pour le traitement de certaines pathologies oculaires telles que les inflammations (uvéites), infectieuses ou non infectieuses. Les études antérieures et les registres locaux et nationaux donnent pour ces principales indications les chiffres répertoriés dans le tableau 3 [21,22,23,24,25].

Indication :	Disfonctionnement des cellules endothéliales	Infection	Dystrophies	Échec de greffes
Proportion des patients :	30 à 50 %	10 à 20 %	10 à 20 %	5 à 10 %

Tableau 3 : Principales indications de greffes de cornées [5].

Les échecs de greffes sont fréquemment dus à la perte de cellules endothéliales induite par l'intervention chirurgicale intraoculaire.

⁶ Florent Aptel, hôpital Édouard Herriot, Lyon, [5]

1.3.1.2. Le glaucome (intervention dans la sclérotique)

Le glaucome est une maladie multifactorielle qui se caractérise par la dégénérescence progressive des cellules ganglionnaires de la rétine, ce qui entraîne une forte atrophie du nerf optique et engendre une baisse progressive de la vision pouvant aller jusqu'à la cécité [26,27]. Le glaucome étant la seconde cause de cécité dans le monde après la cataracte, le nombre de personnes atteintes de cette pathologie est estimé entre 80 et 105 millions, dont environ 5 millions avec une perte totale de la vue [30,31]. Différents facteurs de risques ont été identifiés : une pression intraoculaire élevée, les antécédents familiaux, l'origine africaine, l'âge (à partir de 50 ans) et la myopie [28]. A ce jour, la pression intraoculaire élevée est le facteur le plus étudié car c'est le seul qui puisse être traité cliniquement.

La pression intraoculaire peut être régulée par un équilibre entre la production d'humeur aqueuse par le corps ciliaire et son drainage par le trabéculum. L'humeur aqueuse est évacuée de la chambre postérieure vers la chambre antérieure par l'angle irido-cornéen qui correspond à la zone de transition entre la cornée, la sclère, l'iris et le corps ciliaire. Elle est alors absorbée par le trabéculum, une bande prismatique triangulaire, disposée en anneaux parallèles et située au niveau du limbe (zone de jonction entre la cornée et la sclère) pour finalement rejoindre la circulation générale des veines.

La majorité des glaucomes est due à une résistance accrue du drainage de l'humeur aqueuse par le trabéculum du fait d'un rétrécissement de l'espacement intercellulaire. Les études cliniques antérieures ont démontré que le pourcentage de patients développant un glaucome augmente rapidement dès que la pression intraoculaire dépasse 21 mm de mercure (3.10^3 Pa), ce qui est encore plus flagrant pour des pressions entre 26 et 30 mm de mercure [28,29]. L'un des buts du traitement est donc de réduire la pression intraoculaire avant la perte de vision. Le traitement recommandé est progressif et commence par l'administration de médicaments. Puis lorsque le seuil d'indication thérapeutique est atteint, une intervention chirurgicale aujourd'hui majoritairement manuelle est préconisée [32,33]. L'échec des traitements médicamenteux est fréquent, par conséquent la chirurgie est souvent nécessaire. Ainsi, en France, 25% des patients sont opérés deux ans après leur première apparition d'un

glaucome [34] et en 2005 plus de 1600 interventions ont été effectuées [35] pour presque 400 000 aux USA chaque année [36,37].

1.4. État de l'art de la greffe de cornée

1.4.1. Protocoles chirurgicaux

La greffe de pleine épaisseur (kératoplastie transfixiante) est la plus commune des interventions de greffe. Le remplacement de la totalité de la cornée donne d'excellents résultats visuels pour le patient souffrant de différents degrés d'œdèmes [38,39]. Cependant, la kératoplastie transfixiante peut engendrer de nombreuses complications. L'exposition complète du globe oculaire peut provoquer des hémorragies intraoculaires et augmenter les risques d'infections postopératoires [40,41,42]. L'ouverture large peut causer de l'astigmatisme retardant la récupération visuelle et affaiblir le globe oculaire [42,43,45]. De plus, le remplacement de l'endothélium, parfois inutile, augmente les risques immunologiques de rejet et diminue la survie à long-terme du greffon du fait de la perte continue des cellules endothéliales.

La greffe lamellaire est devenue de plus en plus répandue ces 10 dernières années [46,47,48,49]. Seule la partie pathologique de la cornée est alors remplacée par du tissu cornéen sain d'un donneur. Plusieurs formes de kératoplasties lamellaires ont été développées car ce type de chirurgie présente plusieurs avantages (figure 7). Il s'agit d'une opération moins invasive qui diminue les risques d'infections. L'intégrité, la robustesse et la qualité de l'œil sont préservées. Dans le cas des greffes lamellaires antérieures, c'est-à-dire sans remplacement de l'endothélium, les risques de rejets immunologiques sont fortement atténués et l'efficacité à long-terme est grandement améliorée.

La plupart des greffes transfixiantes ou lamellaires sont aujourd'hui effectuées manuellement ou à l'aide d'un microkératome⁷. En kératoplastie transfixiante, un trépan est généralement utilisé pour couper la cornée du patient et celle du donneur. Le greffon est ensuite positionné sur l'œil receveur et suturé avec un fil très fin en nylon. Le principal facteur de recouvrement visuel après une greffe transfixiante est le niveau

⁷ Rabot à lame de diamant permettant la découpe d'un capot cornéen

d'astigmatisme induit par la découpe ou la suture. Pour la greffe lamellaire manuelle, un scalpel « lamellaire » est le plus souvent utilisé. Dans le cas des greffes lamellaires antérieures, l'usage d'un microkératome chirurgical semi-automatique est également possible. Le pronostic de succès est alors lié à la qualité et à la régularité des surfaces des lamelles. Cependant, cette procédure demeure encore limitée du fait des difficultés à obtenir des surfaces très régulières – ce qui limite la récupération visuelle et à cause des risques de perforation de la membrane de Descemet pour les greffes lamellaires profondes. Dans ce dernier cas, le chirurgien est contraint de réaliser une greffe de pleine épaisseur [50].

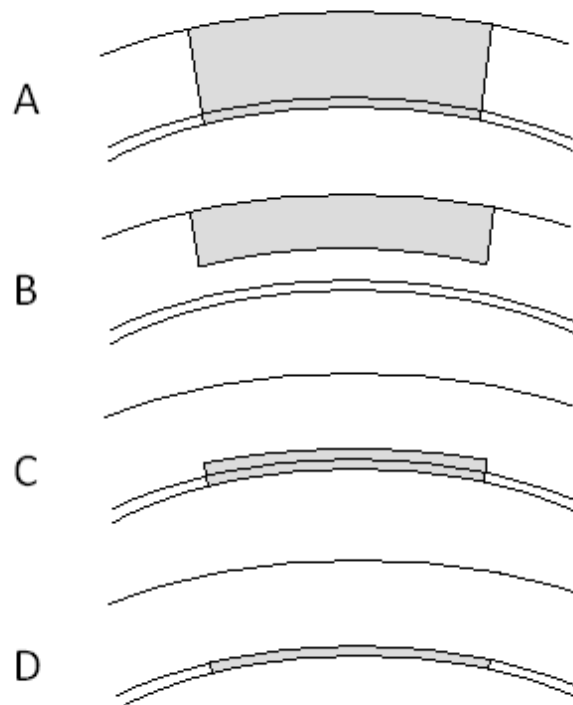


Figure 7 : Schéma des différentes pratiques de greffe, (A) kératoplastie transfixiante, (B) kératoplastie lamellaire antérieure, (C) kératoplastie lamellaire postérieure profonde, (D) kératoplastie endothéliale.

Au cours de cette dernière décennie, les lasers femtosecondes sont apparus comme des outils très performants pour la réalisation de greffes lamellaires ou transfixiantes. Leur première application clinique en ophtalmologie a concerné la préparation du capot lors des interventions *Laser In Situ Keratomileusis* (LASIK), dans le cadre de la chirurgie réfractive. Ils peuvent ainsi remplacer le microkératome [50,51,52].

Leur application s'est plus récemment étendue à la greffe de cornée [53,54,55,56]. Il a pour avantage d'améliorer la cohésion entre la découpe de la cornée du patient et celle du greffon grâce à de meilleures flexibilité, précision et reproductibilité [57,58,59,60]. Ce type de laser donne accès à une grande diversité de géométries des greffons. Ainsi, la surface de contact peut être étendue et l'intrication peut être optimisée : la tenue du greffon et son adéquation avec le lit receveur sont améliorées, diminuant du même fait la durée de récupération et les risques d'astigmatisme. Les avantages sont similaires pour les greffes lamellaires puisque la profondeur, l'épaisseur et les surfaces de coupes sont mieux contrôlées.

1.4.2. Les systèmes cliniques

Cinq systèmes laser femtosecondes sont actuellement commercialisés en chirurgie ophtalmologique dont le dernier très récemment.

- Intralase FS (Abott Medical Optics, Santa Ana, Californie, États-Unis).
- Femtec (PerfectVision, Heidelberg, Allemagne).
- Visumax (Carl Zeiss Meditec, Jena, Allemagne).
- Femto LDV (anciennement Da Vinci, Ziemer Ophthalmic Systems AG, Port, Suisse).
- Ultraflap (Alcon-Wavelight AG, Erlangen, Allemagne).

Les caractéristiques principales de ces systèmes sont résumées dans le tableau 4 excepté pour l'Ultraflap, pour lequel aucun communiqué détaillé n'est disponible, excepté une étude chirurgicale [61]. Les quatre premiers systèmes émettent dans l'infrarouge proche, juste au dessus de $1 \mu\text{m}$. Les trois premiers utilisent un oscillateur, suivi d'un amplificateur régénératif et délivrent donc des impulsions femtosecondes de quelques μJ à des taux de répétition entre 30 et 500 kHz. Par contre, le femto LDV n'est composé que d'un oscillateur, délivrant quelques dizaines de nJ à une cadence de l'ordre du MHz. Ce système permet une succession de plus petites bulles de cavitation améliorant la qualité de surface des coupes mais il complexifie nettement les contraintes sur le système optique de délivrance du faisceau. La nécessité d'une forte ouverture numérique rend délicate la propagation en profondeur d'un tel faisceau et donc une éventuelle application à la greffe de cornée.

	Intralase FS	Femtec	Visumax	Femto LDV
Système laser	Oscillateur amplifié	Oscillateur amplifié	Oscillateur fibré amplifié	Oscillateur non amplifié
Longueur d'onde	1 μm	1 μm	1 μm	1 μm
Taux de répétition	30, puis 60 puis 150 kHz	40 puis 80 kHz	500 kHz	>MHz
Durée des impulsions	400 à 800 fs	500 à 800 fs	200 à 600 fs	200 à 300 fs
Énergie	$\sim 1\mu\text{J}$	$\sim 1\mu\text{J}$	$< 1\mu\text{J}$	$\ll 1\mu\text{J}$
Taille focale	Qq μm	Qq μm	$\sim \mu\text{m}$	$< \mu\text{m}$
Lentille d'aplanation	Plane (bientôt disponible incurvé)	Incurvé	Incurvé	Plane
Option kératoplastie	Oui	Oui	Oui	Non
Dimension	Assez volumineux	Assez volumineux	Assez volumineux	Plutôt compacte et amovible

Tableau 4 : Caractéristiques des lasers cliniques [62,63,64,65]

Les systèmes Intralase FS et Femto LDV utilisent un *cône d'aplanation* permettant d'obtenir une surface de cornée plane, tandis que le Femtec et le Visumax utilisent une fenêtre incurvée respectant mieux les contraintes physiologiques de la géométrie cornéenne. La durée totale de la procédure varie entre 10 s et 1 mn, suivant les systèmes et la géométrie de découpe. Au moins les trois premiers proposent actuellement une option greffe de cornée.

Les lasers actuellement commercialisés ont tous été initialement développés pour la chirurgie réfractive, donc pour la découpe peu profonde de tissus transparents. Leurs caractéristiques de focalisation, d'énergie et de profondeur de pénétration n'ont donc pas optimisées pour la greffe de cornée. En effet, selon l'expérience de nos partenaires cliniques, la dissection est souvent incomplète et irrégulière (présence de ponts tissulaires) [66,67]. Par conséquent, les greffes réalisées avec ces systèmes concernent essentiellement des pathologies localisées, tels que les kératocônes ou certaines infections [68,69].

Chapitre 2 PROPRIÉTÉS OPTIQUES DE LA CORNÉE

Le chapitre 2 décrit les propriétés optiques de la cornée et leur lien avec la présence de pathologies et en particulier d'œdèmes. Cela a pour effet d'augmenter l'épaisseur de la cornée et de modifier sa microstructure. Ces variations désordonnent le tissu, ce qui a une incidence directe sur les propriétés de diffusion de la lumière et donc sur la transparence de la cornée. Ce phénomène est fortement dépendant de la longueur d'onde de la lumière. Les profondeurs de pénétration des lasers peuvent donc être optimisées en décalant leur spectre d'émission vers l'infrarouge. Les cornées humaines dont nous disposons pour nos expériences souffrent systématiquement de la présence d'œdèmes. Un traitement physico-chimique de déturgescence permet de contrôler leur degré d'œdèmes jusqu'à leur redonner leur épaisseur et leur transparence physiologique. Cette méthode est utilisée notamment pour redonner sa transparence à la cornée du donneur au préalable d'une intervention de greffe de cornée. Elle nous permet d'étudier en détail les liens entre les propriétés de transparence du tissu et la perturbation de leur structure⁸.

2.1. Indice de réfraction et biréfringence

2.1.1. Indice de réfraction

Les expériences par diffraction de rayons X menées par Leonard *et al.* [70] ont permis de déterminer la fraction volumique des fibrilles de collagène dans le tissu sain et d'en déduire indirectement qu'il existe une différence d'indice de réfraction entre les fibrilles de collagène et la matrice extra-fibrillaire. Ces fibrilles ne pouvant être considérées comme isolées, il est difficile de mesurer les indices respectifs de ces éléments. Cependant, la technique utilisée donne une information sur le volume et permet d'évaluer l'indice de réfraction total par la relation de Gladstone-Dale.

⁸ Une grande partie du travail expérimental présenté dans ce chapitre a été effectué dans le cadre du projet post-doctoral de Donald Peyrot qui a été mené en parallèle de cette thèse.

L'indice réfractif total n_{tot} d'un milieu complexe peut être exprimé comme la somme partielle des indices réfractifs des éléments qui le composent, n_1, n_2, \dots, n_N , pondérés par la fraction volumique de chaque composant, f_1, f_2, \dots, f_N ,

$$n_{tot} = n_1 f_1 + n_2 f_2 + \dots + n_N f_N; \quad (2-1)$$

Dans une cornée humaine, Leonard *et al.* [70] ont établi que l'indice des fibrilles est de 1,41, contre 1,36 pour la matrice extra-fibrillaire, avec une fraction volumique des fibrilles de 0,22. En appliquant la loi de Gladstone-Dale, l'indice moyen pour le stroma calculé est de 1,37, ce qui est en accord avec le résultat obtenu par Maurice dans une étude antérieure [71].

2.1.2. Biréfringence

Le tissu cornéen présente deux propriétés de biréfringence : l'une est intrinsèque et l'autre est une biréfringence de forme [71,72]. La première est issue de la structure longitudinale des molécules qui composent les fibrilles de collagène. La lumière polarisée linéairement suivant l'axe des fibrilles se propage plus lentement que celle polarisée perpendiculairement à ces mêmes fibrilles. La biréfringence de forme est attribuée aux anisotropies du stroma organisé en lamelles de collagène. Chaque lamelle contribue indépendamment à un retard dont l'axe lent est orienté le long de l'axe des fibrilles qui la composent. La biréfringence globale de la cornée correspond à la contribution cumulée des lamelles sur l'intégralité du stroma. Une autre approche consiste à assimiler la cornée à un cristal biaxe incurvé dont l'axe rapide principal est perpendiculaire à la surface.

Un grand nombre de situations cliniques en ophtalmologie (chirurgie ou diagnostic) impliquent une lumière incidente polarisée perpendiculairement à la surface. Cependant, cet axe entraîne peu de modifications de la polarisation car la biréfringence cornéenne est essentiellement influente selon les axes tangentiels à la surface.

Ces propriétés de biréfringence ont été étudiées par des mesures de transmission de la polarisation croisée au travers d'une cornée de lapin, en faisant tourner la polarisation du faisceau incident sur 360° [12]. Les résultats sont présentés en figure 8 et

montrent l'influence de cette biréfringence bien que le minimum de transmission soit strictement positif lorsque polariseur et analyseur sont perpendiculaires.

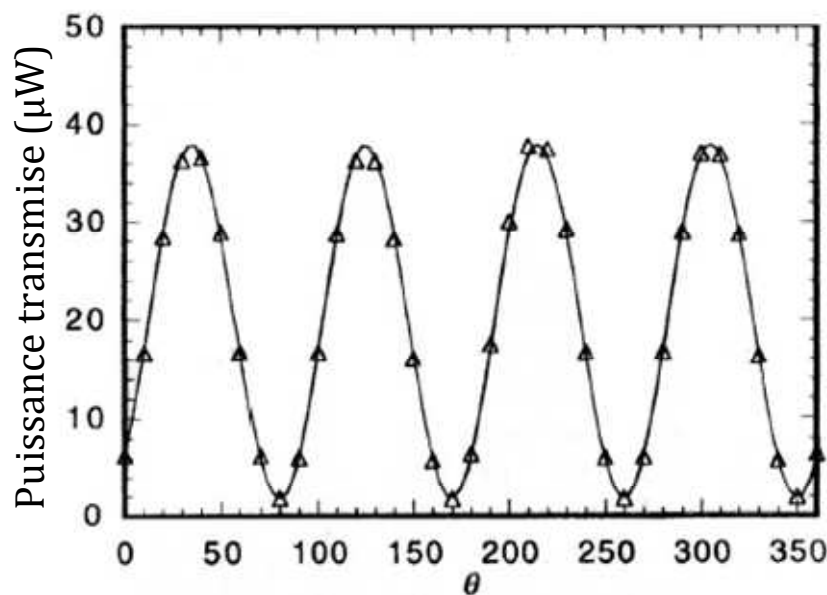


Figure 8 : Puissance transmise en configuration polariseur/analyseur au travers d'une cornée de lapin enregistrée en tournant la polarisation incidente sur 360°. La ligne solide est une interpolation de l'évolution des données [12].

2.2. Caractérisation des propriétés de transmission de la cornée

2.2.1. Protocole de déturgescence

Afin de caractériser les propriétés optiques de transmission des cornées, nous avons mené une série d'expériences sur des cornées humaines fournies par la Banque française des yeux. Ces échantillons sont exclusivement réservés à un usage scientifique lorsque leur qualité les rend impropres à la greffe (mauvaise qualité endothéliale, défauts épithéliaux, aire transparente insuffisante), conformément aux directives de la déclaration d'Helsinki et à la législation française.

Les cornées sont prélevées sur des personnes récemment décédées et conservées dans un milieu de conservation pour organo-culture, entre 31°C et 35°C [74,75]. Au cours des dix jours qui suivent leur prélèvement, la qualité des cornées est évaluée grâce à des

tests microbiologiques, à l'observation de leur aspect général (anomalies du globe extérieur et signes d'opération antérieure, abrasions et défauts épithéliaux, opacités stromales et formes cornéennes anormales : kératocônes et micro- ou mégalo-cornée notamment, état de la chambre antérieure : forme, présence de sang) et à l'évaluation de leur qualité endothéliale. Généralement réalisée par microscopie en lumière transmise (contraste de phase), cette analyse nécessite de mettre en évidence les cellules endothéliales par induction du gonflement de l'espace intercellulaire à l'aide d'une solution hypotonique (NaCl 0,9%). L'utilisation d'un colorant vital (*i.e.* le bleu trypan) permet de mettre en évidence les cellules mortes ou nécrotiques et les parties dénudées de la membrane de Descemet. Après l'évaluation de la densité de cellules endothéliales, les cornées propres à la greffe, *i.e.* présentant une densité cellulaire supérieure à 2.000 cellules/mm², sont séparées des autres [76,77].

Les cornées rejetées pour la greffe et destinées à un usage scientifique peuvent être conservées dans un milieu de culture 4 à 5 semaines après leur prélèvement avant d'être utilisées au laboratoire. Compte tenu de leur mauvaise qualité endothéliale, elles sont généralement fortement œdémateuses au moment des expérimentations (leur épaisseur pouvant atteindre le double de l'épaisseur physiologique). Elles représentent donc un bon modèle pour nos études de greffes de cornées pathologiques par laser.

Afin de comparer le comportement en transmission d'une cornée œdémateuse avec celui d'une cornée saine en fonction de la longueur d'onde, certains échantillons sont placés dans un milieu leur permettant de retrouver une épaisseur physiologique normale et leur transparence. Ce processus est appelé *déturgescence*. Il est également utilisé pour les cornées destinées à la greffe, dans ce cas les greffons sont incubés dans le milieu de déturgescence 2 à 3 jours avant l'opération. Ce milieu contient des macromolécules qui augmentent la pression osmotique du milieu de base, ce qui permet d'entraîner une déshydratation du stroma [78]. Dans le cadre de nos expérimentations, les cornées sont mises en déturgescence 48 à 72 h dans une solution de Hanks, supplémentée avec un polymère glucidique de 500 kDa⁹, le Dextran 500¹⁰, typiquement utilisé à une concentration de 5%.

Au cours du projet postdoctoral de Donald Peyrot effectué au sein du groupe et en parallèle de cette thèse, nous avons étudié les influences du temps d'incubation et de

⁹ Da=Dalton=atomic mass unit

¹⁰ Sigma-Aldrich, Spruce st, St Louis, États-Unis