

Université de Montréal

**La fonte cornéenne post-kératoprothèse de Boston type I:  
Épidémiologie, pathophysiologie et approche novatrice  
pour sa prévention.**

par Marie-Claude Robert

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présentée à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences (M. Sc.)

En Sciences biomédicales

Option recherche clinique

17 août 2016

© Marie-Claude Robert, 2016

## Résumé

La fonte cornéenne post-kératoprothèse de Boston (B-KPro) est une complication sévère pouvant nuire à la rétention de la prothèse et pouvant mener à la perte du globe oculaire. Quoique multifactoriel, le mécanisme final menant à une fonte cornéenne est médiée par des métalloprotéinases matricielles (MMP). L'activité de ces enzymes peut être induite par des cytokines inflammatoires dont le facteur de nécrose tumorale alpha. Les objectifs de cette thèse sont de 1) relever les données épidémiologiques de la fonte cornéenne post-B-KPro, 2) de caractériser la teneur et l'activité des MMP, de la myeloperoxydase (MPO) et de l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase 1 (TIMP-1) des larmes de patients ayant une B-KPro et de différencier ces profils selon le diagnostic sous-jacent et 3) de développer une goutte oculaire d'infliximab et d'évaluer ses caractéristiques *in vitro*. Une revue de la littérature et des cas de B-KPro implantés au CHUM a permis de déterminer les facteurs de risque de la fonte cornéenne, les plus importants étant l'apport nutritif au stroma cornéen et la présence d'inflammation. Le profil enzymatique a été déterminé à l'aide d'ELISA multiplex. L'élévation des MMP-8, MMP-9 et MPO des larmes est corrélée avec le type de pathologie cornéenne mais non pas avec la présence de fonte cliniquement significative. L'infliximab topique 10 mg/mL reste stérile, stable et non toxique pour l'épithélium de la surface oculaire. En conclusion, l'inflammation de la surface oculaire est un facteur de risque important de la fonte cornéenne et diverses stratégies thérapeutiques menant à l'inhibition des MMP devront être explorées dans le cadre d'études cliniques futures.

**Mots-clés** : Fonte cornéenne, kératolyse, facteur de nécrose tumorale alpha, métalloprotéinase matricielle, infliximab, kératoprothèse de Boston

## **Abstract**

Corneal melting after implantation of a Boston keratoprosthesis (B-KPro) is a severe sight- and globe-threatening complication. While multifactorial, the final mechanism leading to corneal melting is mediated by matrix metalloproteinases (MMP). The activity of these enzymes is induced by inflammatory cytokines, mostly tumor necrosis factor alpha. The objectives of this thesis is to 1) report the epidemiologic data surrounding post-B-KPro corneal melting, 2) characterize the content and activity of MMP, myeloperoxidase (MPO) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in the tears of patients with a B-KPro and to distinguish these enzymatic profiles in accordance to the underlying ocular diagnosis and 3) to develop an ophthalmic drop of infliximab and to evaluate its *in vitro* characteristics. A literature review and a review of all B-KPros implanted at the CHUM allowed identification of the risk factors of corneal melting, the most important being corneal stromal nutrition and the presence of inflammation. The enzymatic profile at the ocular surface was determined through bead-based multiplex ELISA. Significant elevations of MMP-8, MMP-9 and MPO in the tears of B-KPro eyes were correlated with the type of underlying corneal pathology but not with the presence of clinically significant corneal melting. Topical infliximab 10 mg/mL remained sterile, stable and non toxic to ocular surface epithelium when prepared and used in accordance with United States Pharmacopeia recommendations. In conclusion, ocular surface inflammation is an important risk factor for corneal melting with B-KPro and therapeutic strategies to inhibit MMP should be explored in future clinical studies.

**Keywords** : corneal melt, keratolysis, tumor necrosis factor alpha, matrix metalloproteinase, infliximab, Boston keratoprosthesis

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures .....	vi
Liste des sigles .....	vii
Remerciements.....	x
Introduction.....	12
Chapitre 1 : Aspects cliniques de la fonte cornéenne post-kératoprothèse de Boston.....	13
Chapitre 1.1 : Considérations anatomiques .....	13
Chapitre 1.2 : La kératoprothèse de Boston.....	16
Chapitre 1.3 : Présentation clinique de la fonte cornéenne.....	19
Chapitre 2 : Épidémiologie de la fonte cornéenne post-kératoprothèse de Boston .....	23
Chapitre 2.1 : Revue de la littérature - Mesures de fréquence.....	23
Chapitre 2.2 : Revue de la littérature - Facteurs de risque.....	29
Chapitre 2.2.1 : Inflammation de la surface oculaire .....	29
Chapitre 2.2.2 : Barrière à l'apport nutritionnel aux kératocytes.....	32
Chapitre 2.2.3 : Stress dessicatif de la surface oculaire .....	34
Chapitre 2.3 : Épidémiologie locale de la fonte cornéenne post-kératoprothèse de Boston .....	35
Chapitre 2.3.1 : Objectifs de l'étude .....	35
Chapitre 2.3.2 : Méthodes .....	36
Chapitre 2.3.3 : Résultats .....	36
Chapitre 2.3.4 : Conclusion.....	42
Chapitre 3 : Pathophysiologie et traitement de la fonte cornéenne post-kératoprothèse de Boston type I. ....	43

Chapitre 3.1 : Le rôle des métalloprotéinases matricielles .....	43
Chapitre 3.2 : Implications cellulaires .....	45
Chapitre 3.3 : Stresseurs associés à la kératoprothèse de Boston pouvant déréguler les métalloprotéinases matricielles .....	46
Chapitre 3.4 : Traitement de la fonte cornéenne .....	49
Chapitre 3.4.1 : Traitement médical .....	49
Chapitre 3.4.2 : Traitement chirurgical .....	51
Chapitre 4 : Présentation du premier article .....	52
Chapitre 4.1: Problématique .....	52
Chapitre 4.2: Objectifs et hypothèses .....	52
Chapitre 4.3: Devis et population à l'étude .....	53
Chapitre 4.4: Collecte des données .....	54
Chapitre 4.5: Analyses de laboratoire .....	55
Chapitre 4.6 : Description de la contribution de chacun des auteurs .....	57
Chapitre 4.7 : Tear Matrix Metalloproteinases and Myeloperoxidase Levels in Patients with Boston Keratoprosthesis Type I .....	59
Chapitre 5 : Présentation du deuxième article .....	91
Chapitre 5.1: Problématique .....	91
Chapitre 5.2: Objectifs et hypothèses .....	92
Chapitre 5.3: Analyses de laboratoire .....	93
Chapitre 5.4 : Description de la contribution de chacun des auteurs .....	96
Chapitre 5.5 : Stability and <i>in vitro</i> Toxicity of an Infliximab Eye Drop Formulation .....	98
Chapitre 6 : Discussion .....	127
Conclusion .....	130
Bibliographie .....	i

## Liste des tableaux

Tableau 1 :	Proportion des yeux ayant développés une fonte cornéenne stérile dans les différentes séries de cas de kératoprothèse de Boston type 1 publiés depuis les derniers 10 ans.....	25
Tableau 2 :	Caractéristiques de base des yeux implantés avec une kératoprothèse de Boston type I, comparant les yeux avec et sans fonte cornéenne postopératoire.....	38
Tableau 3 :	Complications suite à l'implantation de la kératoprothèse de Boston type I, comparant les yeux avec et sans fonte cornéenne.....	41

## Liste des figures

Figure 1 :	Coupe histologique de la cornée démontrant les diverses couches et l'organisation lamellaire du stroma.....	15
Figure 2 :	Kératoprothèse de Boston type I.....	18
Figure 3 :	Images à la lampe à fente de fonte cornéenne post-kératoprothèse de Boston type I.....	20
Figure 4 :	Images de tomographie par cohérence optique du segment antérieur (AS-OCT) démontrant l'étendu de la fonte cornéenne.....	22
Figure 5 :	Courbe de survie Kaplan-Meier représentant le temps entre l'implantation d'une kératoprothèse de Boston type I au développement d'une complication associée à la fonte cornéenne.....	28
Figure 6 :	Analyse Kaplan-Meier de 53 yeux ayant atteints une acuité visuelle d'au moins 20/200 suite à l'implantation d'une kératoprothèse de Boston type I ou type II.....	30
Figure 7 :	Analyse Kaplan-Meier démontrant la survie sans fonte cornéenne chez 110 yeux ayant reçu une kératoprothèse de Boston type I au Centre Hospitalier de l'Université de Montréal entre 2008 et 2012.....	39

## Liste des sigles

ACE – œdème cornéen aphaque

AS-OCT – tomographie par cohérence optique du segment antérieur

B-KPro – kératoprothèse de Boston

CHED – dystrophie endothéliale congénitale héréditaire

CHUM – Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

EMMPRIN – inducteur des métalloprotéinases matricielles

FDA – Food and Drug Administration

FECD – dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs

HCLE – cellules épithéliales cornéolimbiques humaines

IL – interleukine

IND – investigational new drug

LSCD – déficience en cellules souches limbiques

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

MEEI – Massachusetts Eye and Ear Infirmary

MMP – métalloprotéinases matricielles

MPO – myéloperoxidase

OD – optical density

PCE – œdème cornéen pseudophaque

PMMA – polyméthylméthacrylate

PUK – kératite périphérique ulcéral

RC – rapport de cotes

SDS – sodium dodecyl sulfate



SJS – Syndrome de Stevens Johnson

TEN – Épidermolyse toxique (syndrome de Lyell)

TIMP – Inhibiteur tissulaire de la metalloproteinase

TNF- $\alpha$  – facteur de nécrose tumorale alpha

TGF- $\beta$ 1 – transforming growth factor- $\beta$ 1

USP – United States Pharmacopeia

VC – verre de contact

*À mes hommes : Mathieu, Xavier, David et Jambo!*

## Remerciements

Après de nombreuses années de formation, de nombreux remerciements s'imposent. J'aimerais d'abord remercier mes parents. Ma mère, Dominique Robert, ayant effectué ses études universitaires pendant mon enfance, m'a instillé ma soif de savoir et ce besoin intrinsèque de toujours vouloir se dépasser. Mon père, Émile Robert, via ses activités bénévoles et sa joie de vivre, m'a montré les bénéfices du don de soi et du travail d'équipe. Je leur suis infiniment reconnaissante de m'avoir guidée et supportée dans tous mes projets et plus récemment, de m'avoir libérée des soins de Xavier pour plusieurs heures, me permettant de rédiger cette thèse.

Pour m'avoir fait rêver d'une carrière en sciences dès mon jeune âge, je souhaite remercier Marie Sklodowska Curie, un exemple féminin de persévérance et de quête du savoir. Son histoire m'a encouragé lors de moments de solitude.

Merci à Mathieu Frenette, mon mari et partenaire depuis maintenant plus de 15 ans. Merci d'avoir été complice et « cheer-leader » pendant mes années d'études, mais surtout d'avoir partagé nos objectifs de vie, nos carrières, nos loisirs et d'être un père exemplaire pour nos enfants. J'espère que nous continuerons à nous lancer dans de belles aventures ensemble.

Merci au Dr Suzanne Véronneau-Troutman pour son philanthropisme envers notre département d'ophtalmologie et pour son support financier pendant ma première année du programme de maîtrise. Merci au Fonds de Recherche du Québec – Santé pour leur support financier pendant ma deuxième année de maîtrise.

Enfin, merci à mes mentors en ophtalmologie, les Dr Harissi-Dagher et Dr Dohlman, pour avoir partagé avec moi leur passion pour la recherche et pour l'amélioration des soins de leurs patients. Onwards and forwards!

## **Introduction**

La kératoprothèse de Boston (B-KPro) est la kératoprothèse la plus fréquemment utilisée dans la prise en charge de la cécité cornéenne complexe, soit chez des patients où la greffe de cornée standard ne serait pas adéquate. Suite à de nombreuses améliorations au niveau de la conception de la prothèse ainsi que de la sélection et de la prise en charge postopératoire des patients, le taux de complications sévères a été nettement réduit. Ainsi, l'utilisation mondiale de la B-KPro a augmenté tout au long de la dernière décennie. Par contre, la fonte du greffon support de la B-KPro demeure une complication relativement commune dans les études ayant un suivi prolongé, en particulier chez les patients ayant une inflammation chronique de la surface oculaire. Cette thèse révisite l'épidémiologie et la pathophysiologie de la fonte cornéenne post-B-KPro ainsi que les innovations ayant préalablement mené à une réduction du taux de cette complication. Par ailleurs, deux articles scientifiques sont présentés. Le premier article rapporte les résultats d'une étude transversale évaluant la teneur en métalloprotéinases matricielles (MMP), myeloperoxydase (MPO) et inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase 1 (TIMP-1) dans les larmes de 40 patients avec B-KPro. Ces profils enzymatiques ont été analysés par sous-groupes pronostiques et corrélés avec la présence de fonte cornéenne clinique. Le deuxième article décrit le développement d'une goutte ophtalmique d'infliximab, destinée à de futurs essais cliniques sur la prophylaxie et le traitement de la fonte cornéenne en présence ou en absence de la B-KPro. Enfin, des stratégies additionnelles cherchant à adresser la problématique de la fonte cornéenne post-KPro sont abordées.

# **Chapitre 1 : Aspects cliniques de la fonte cornéenne post-kératoprothèse de Boston.**

## **Chapitre 1.1 : Considérations anatomiques**

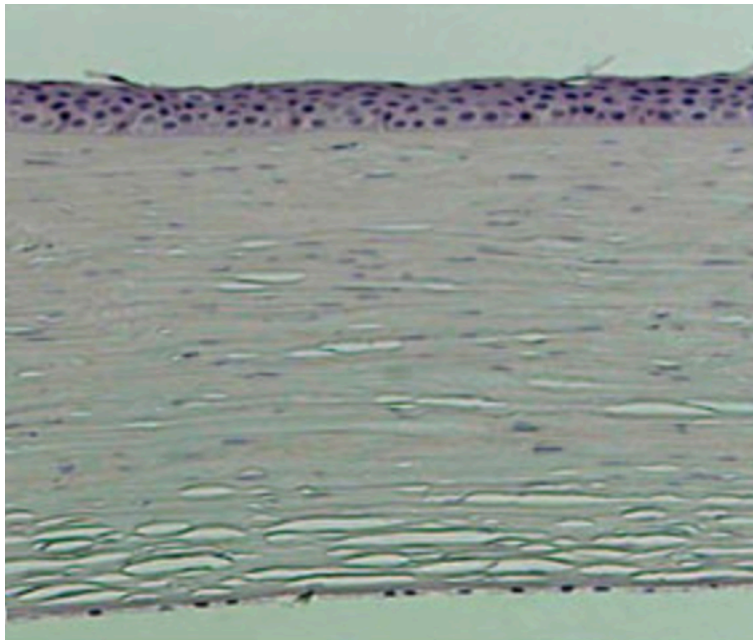
La cornée est un tissu spécialisé du segment antérieur de l'œil. Afin de permettre la transmission de la lumière vers la rétine, la cornée est transparente et avasculaire. Selon sa conceptualisation traditionnelle, la cornée est constituée de cinq couches distinctes. D'abord, un épithélium malpighien stratifié d'environ 50  $\mu\text{m}$  d'épaisseur recouvre la surface de la cornée. Grâce à l'expression de mucines, l'épithélium permet une distribution régulière du film lacrymal et une surface lisse contribuant ainsi à 74% du pouvoir réfractif de l'œil.<sup>1</sup> L'épithélium se régénère continuellement grâce aux cellules souches retrouvées dans les palissades de Vogt au niveau du limbe.

La couche de Bowman et le stroma cornéen se retrouvent sous l'épithélium. Ces deux structures sont composées d'une matrice extracellulaire de collagène et de protéoglycans organisés en lamelles. Le collagène de type I prédomine alors que les collagènes de type III, V et VI y sont également retrouvés. Les protéoglycans prédominants du stroma adulte sont le lumican, le keratocan, le mimecan et la décorine.<sup>2</sup> Alors que la couche de Bowman est acellulaire et d'environ 12  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, le stroma contient des kératocytes et représente plus de 90% de l'épaisseur cornéenne. Les kératocytes sont des fibroblastes cornéens. Quoiqu'ils occupent seulement 2 à 3 % du volume stromal, ils sont responsables de maintenir l'intégrité structurale

et optique de la cornée en orchestrant la dégradation et la production progressive de sa matrice extracellulaire.<sup>2</sup> En effet, cette distribution uniforme et organisée des fibres de collagène stromal est un déterminant majeur de la transparence cornéenne. Une couche rigide et acellulaire de stroma pré-Descemetique (couche de Dua) a récemment été identifiée.<sup>3</sup>

Enfin, les couches profondes de la cornée comprennent la membrane de Descemet et l'endothélium cornéen. La membrane de Descemet est la membrane basale des cellules endothéliales et est constituée de collagène de type IV et de laminine.<sup>2</sup> Elle s'épaissit progressivement au cours de la vie et dans certaines pathologies, dont la dystrophie endothéliale de Fuchs. L'endothélium recouvre la surface postérieure de la cornée, ne formant qu'une seule couche. Ce sont des cellules hexagonales d'environ 5  $\mu\text{m}$  qui régulent le degré d'hydratation optimal (78%) du stroma cornéen.<sup>1,2</sup>

**Figure 1** – Coupe histologique de la cornée démontrant les diverses couches et l'organisation lamellaire du stroma. Tiré de Knappe S, Stachs O, Zhivov A, Hovakimyan M, Guthoff R. Results of confocal microscopy examinations after collagen cross-linking with riboflavin and UVA light in patients with progressive keratoconus. *Ophthalmologica*. 2011; 225(2):95-104 avec permission.



Épithélium

Stroma

Descemet/Endothélium



## **Chapitre 1.2 : La kératoprothèse de Boston**

Les maladies de la cornée occupent une place considérable en ophtalmologie moderne et représentent la 4<sup>e</sup> cause de cécité mondiale.<sup>4</sup> Plusieurs alternatives chirurgicales existent afin de procurer une réhabilitation visuelle aux patients atteints de pathologies cornéennes, dont la greffe de cornée (kératoplastie). Parmi les différents types de greffons cornéens (greffes lamellaires antérieures ou pénétrantes), la kératoprothèse de Boston type I (B-KPro) représente une alternative efficace et viable suite à l'échec à la kératoplastie traditionnelle. Dans des cas particuliers, soit en présence de déficience en cellules souches limbiques, de néovascularisation cornéenne extensive ou de rejets répétés de greffes cornéennes, la B-KPro est un choix de première ligne afin de rétablir la clarté de l'axe visuel.<sup>5</sup> Elle représente aujourd'hui la forme de kératoprothèse la plus utilisée au monde.<sup>6</sup>

La B-KPro a été conçue par Dr Claes H Dohlman au Massachusetts Eye and Ear Infirmary dans les années 1960s. Le concept de base de la B-KPro est celui d'un bouton de manchette dans lequel un cylindre optique et une plaque postérieure sont fixés de part et d'autre d'un greffon cornéen, ce dernier agissant comme support à la prothèse et permettant sa fixation à la cornée hôte par l'entremise de points de suture (Figure 2). Le cylindre optique est fait de polyméthylméthacrylate (PMMA) et peut être commandé en une variété de puissance dioptrique selon que l'œil opéré soit aphaque ou pseudophaque. La plaque postérieure est disponible en deux types de matériel, soit du PMMA ou du titane, et présente des fenestrations permettant un flux d'humeur aqueuse et un apport nutritionnel vers le stroma cornéen du greffon support. Un

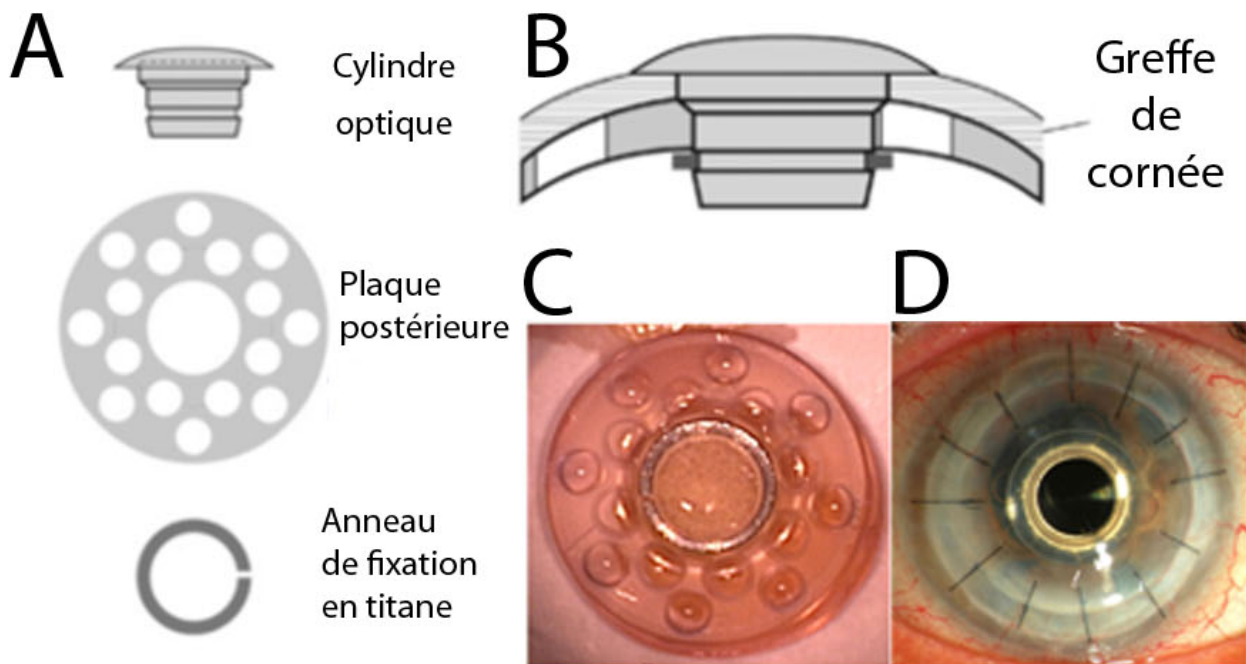
anneau de titane, maintenant incorporé à la plaque postérieure dans le modèle de B-KPro le plus récent permet de solidifier l'unité B-KPro-greffon.<sup>7</sup>

Par ailleurs, la B-KPro est disponible en deux modèles : la B-KPro de type I et la B-KPro de type II. La B-KPro de type I est le modèle le plus couramment utilisé ayant été décrit ci-haut. Il est indiqué chez les yeux relativement humides et ayant un mécanisme de clignement adéquat. La B-KPro de type II possède une tige additionnelle faisant protrusion au travers d'une tarsoraphie permanente. La B-KPro de type II offre une protection additionnelle de la surface oculaire. Ce modèle est donc réservé aux yeux ayant une surface oculaire kératinisée ou des anomalies palpébrales sévères lesquelles résultent le plus souvent de pathologies auto-immunes à des stades terminaux.<sup>8</sup>

Grâce à des efforts continus en recherche et à des innovations au niveau de la fabrication de la prothèse et de la prise en charge postopératoire, les résultats cliniques de la B-KPro se sont progressivement améliorés depuis son approbation par la Food and Drug Administration (FDA) des Etats-Unis en 1992. Suite à ces améliorations, l'utilisation mondiale de la B-KPro a également augmenté tout au long de ces années. Par exemple, alors que seulement 30 B-KPros ont été implantées en l'année 2000, près de 1200 B-KPro ont été implantées en 2013.<sup>6</sup>

Avec plus de 10 000 B-KPros implantées depuis 1992, il s'agit de la kératoprothèse la plus utilisée et la plus répandue.

**Figure 2 :** Kératoprothèse de Boston type I – A) Schéma démontrant les composantes de la kératoprothèse de Boston type I : le cylindre optique de polyméthylméthacrylate, la plaque postérieure de polyméthylméthacrylate ou de titane et l’anneau de titane; B) Schéma démontrant la kératoprothèse de Boston type montées de part et d’autre d’un greffon cornéen; C) Image clinique démontrant l’unité kératoprothèse-greffon après l’assemblage; D) Image clinique démontrant une kératoprothèse de Boston type I après fixation dans l’œil d’un patient. Figure adaptée de Dohlman CH, Harissi-Dagher, M, Graney JM. The Boston Keratoprosthesis: a new threadless design. Digital Journal of Ophthalmology. 13(3) avec permission.



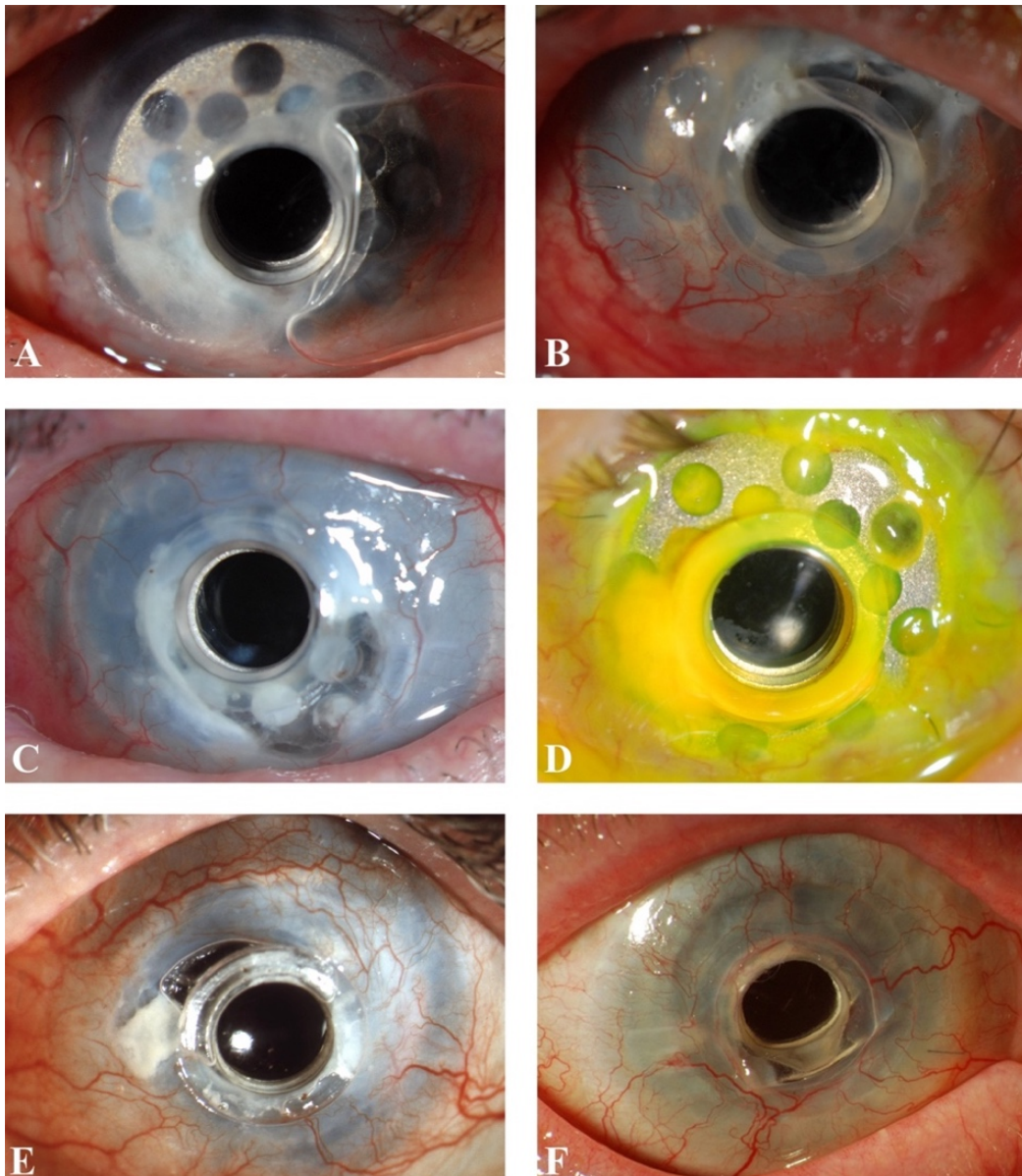
## **Chapitre 1.3 : Présentation clinique de la fonte cornéenne**

En dépit des nombreuses innovations et de l'amélioration du pronostic des patients suite à l'implantation de la B-KPro, de nombreux défis persistent. La fonte cornéenne ou kératolyse stérile demeure une complication sévère et souvent sous-estimée par les chirurgiens de kératoprothèse. En effet, la fonte cornéenne peut mener à de nombreuses conséquences désastreuses au niveau du pronostic visuel et anatomique de l'œil. Ces complications comprennent l'endophtalmie, la fuite d'humeur aqueuse, l'hypotonie, le décollement rétinien ou choroidien, l'hémorragie choroidienne et l'extrusion de la prothèse.

La fonte cornéenne s'observe facilement lors de l'examen à la lampe à fente (Figure 3). Dans la majorité des cas, un amincissement stromal sera noté autour du cylindre optique ou le long du rebord de la plaque antérieure de la B-KPro. Cet amincissement peut être accompagné ou non d'un déficit épithélial surjacent.<sup>9</sup> Plus rarement, une fonte peut se développer au niveau de la jonction greffon-hôte de la cornée. La présence d'une bulle d'air sous un verre de contact thérapeutique préalablement bien ajusté est un indice clinique pouvant présager la présence d'un amincissement stromal. La fonte cornéenne peut progresser circonférentiellement ou en profondeur, menant à l'exposition de la plaque postérieure ou à l'extrusion de la B-KPro. En effet, la fonte cornéenne est la cause primaire d'échec de ce type de prothèse.<sup>10</sup>

**Figure 3 :** Images à la lampe à fente de fonte cornéenne post-kératoprothèse de Boston type I.

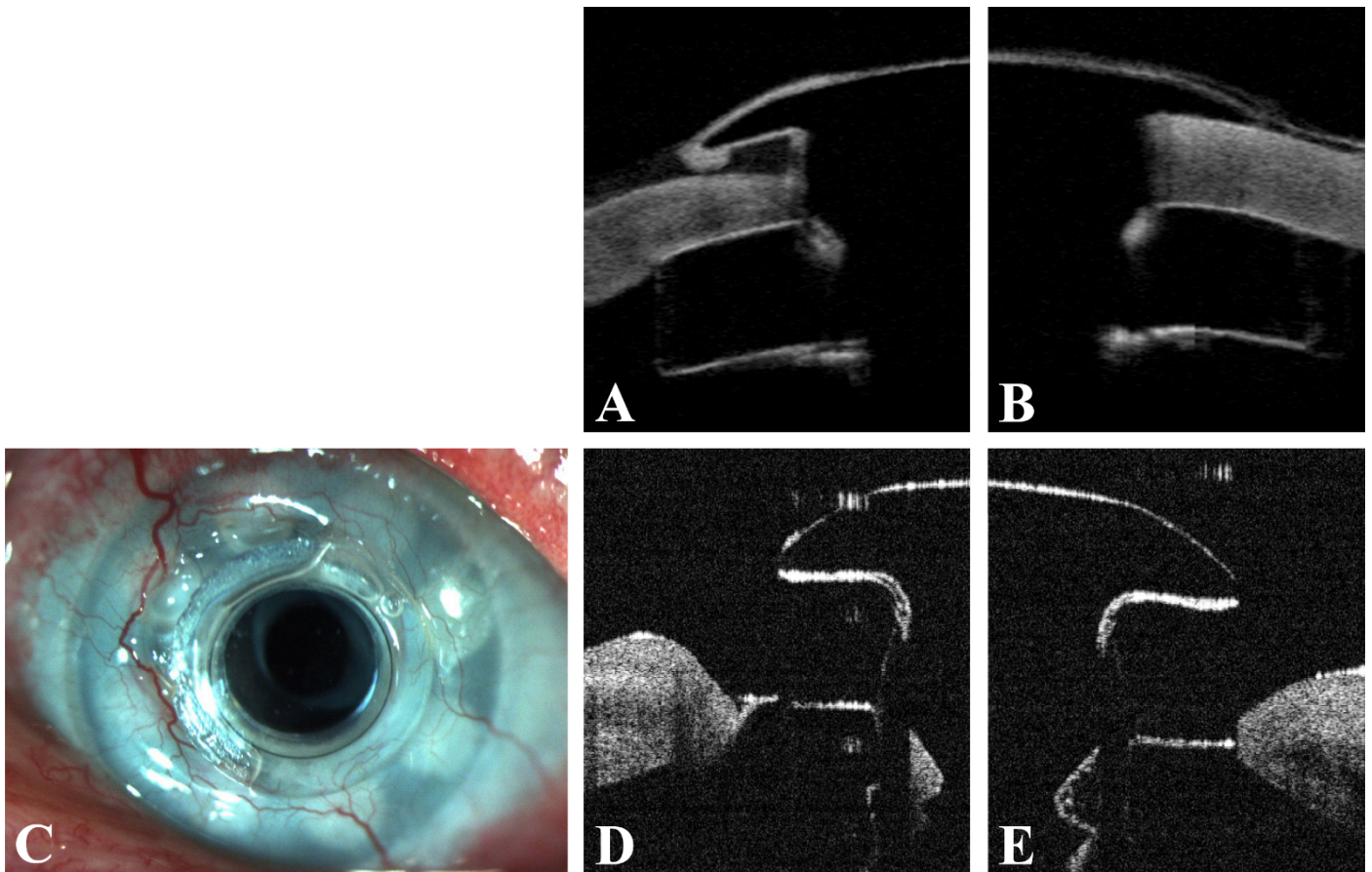
A) La présence d'une large bulle sous le verre de contact thérapeutique signale la présence d'un amincissement stromal. B) Fonte de pleine épaisseur. C) Importante membrane rétroprosthétique adjacent à la région de fonte. D) Exposition extensive de la plaque postérieure. E) Voilet de stroma nécrotique. F) Affaissement de la chambre antérieure. Tiré de Robert M, Dohlman C. A review of corneal melting after Boston Keratoprosthesis. *Semin Ophthalmol.* 2014;29(5-6):349-357 avec permission.



L'examen clinique doit par ailleurs porter une attention particulière à la présence d'infiltrat. Un infiltrat blanchâtre suggérerait qu'une étiologie infectieuse plutôt que stérile est responsable de la fonte. En effet, les kératites infectieuses tout comme les fontes stériles ont tendance à se développer le long du cylindre optique de la B-KPro. En présence de doute, des cultures de la cornée devraient ainsi être effectuées. Cependant, la région d'infiltrat n'est pas toujours facilement accessible pour les cultures, étant recouverte par la face antérieure de la B-KPro.

Lorsque la fonte cornéenne s'étend sur toute l'épaisseur cornéenne, elle mène à une communication entre la chambre antérieure et la surface oculaire, permettant ainsi la fuite d'humeur aqueuse. Une telle fuite ne s'avère pas toujours évidente au test de Seidel et à l'examen à la lampe à fente en raison de l'hypotonie associée. La fuite peut toutefois devenir apparente lors de chirurgies réparatrices nécessitant le placement de cannules d'infusion intraoculaire.<sup>11</sup> Il est ainsi important de considérer la fonte périprosthétique comme étiologie de l'hypotonie ou de toute complication associée à l'hypotonie. Dans de tels cas, l'obtention d'une tomographie par cohérence optique du segment antérieur pourrait révéler des zones d'amincissement, de rétraction ou de dégénérescence kystoïde du stroma périprosthétique ayant permis la fuite d'humeur aqueuse (Figure 4).<sup>12,13</sup> Il est à noter que de telles anomalies du tissu périprosthétique ont aussi été associées à la physiopathologie de la vitréite stérile post-B-KPro.<sup>14</sup> L'hypothèse actuelle est que ces anomalies du tissu périprosthétique permettraient un influx de matériel pro-inflammatoire de la surface oculaire vers le milieu intraoculaire et que ce matériel serait responsable de la vitréite stérile.

**Figure 4 :** Images de tomographie par cohérence optique du segment antérieur (AS-OCT) démontrant l'étendu de la fonte cornéenne. A) Amincissement d'épaisseur partiel du greffon support B) Bonne apposition entre le greffon et la kératoprotèse dans une coupe faite à 180 degrés de la région de fonte. C) Photographie à la lampe à fente d'une fonte périprosthétique de pleine épaisseur. D et E) Images correspondantes à l'AS-OCT démontrant la perte totale de tissu autour du cylindre optique et l'exposition de la plaque postérieure de la kératoprotèse. Tiré de Robert MC, Dohlman CH. A review of corneal melting after Boston Keratoprosthesis. *Semin Ophthalmol.* 2014;29(5-6):349-357 avec permission.



## **Chapitre 2 : Épidémiologie de la fonte cornéenne post-kératoprothèse de Boston**

### **Chapitre 2.1 : Revue de la littérature - Mesures de fréquence**

Les diverses séries de cas de B-KPro dans la littérature rapportent des taux très variables de fonte cornéenne. Cette variabilité s'explique surtout par la durée de suivi non homogène parmi ces publications ainsi que par la composition variée des différents groupes de patients. Tel qu'expliqué plus tôt, le pronostic de la B-KPro dépend fortement sur le diagnostic sous-jacent ayant mené à la cécité cornéenne. Le tableau 1 identifie les séries de cas d'implantation d B-KPro type I comprenant plus de 20 yeux et ayant été publiés dans la littérature anglophone depuis la dernière décennie. Ces dernières sont classifiées selon la durée moyenne de suivi des patients. Puisque la majorité des séries de cas existantes ne rapportent ni les résultats cliniques sur une période définie de suivi, ni le nombre total de patient-années de suivi, il est impossible de calculer un taux d'incidence précis. Le tableau 1 rapporte donc la proportion des yeux ayant développés une fonte cornéenne ainsi que la durée moyenne de suivi de chacune des études.

En utilisant les lignes directrices pour la publication des résultats de l'implantation de kératoprothèses, il est possible de regrouper ces études selon leurs durées de suivi. On classifie ainsi le suivi comme étant soit à court terme (6 à 23 mois de suivi postopératoire), à terme intermédiaire (24 à 59 mois de suivi postopératoire) ou à long terme (60 mois et plus de suivi postopératoire).<sup>15</sup> En pondérant chaque étude selon sa taille d'échantillon (nombre de yeux), on calcule qu'une proportion de 9% des yeux développent une fonte cornéenne lors d'un suivi à



court terme alors que cette figure s'élève à 17% lors d'un suivi à terme intermédiaire. Une seule étude rapporte un suivi postopératoire de plus de 5 ans, démontrant le développement d'une fonte cornéenne chez 24% des yeux.<sup>16</sup> Quoique cette analyse soit imparfaite en raison du risque de chevauchement des cas entre les différentes études, ces résultats suggèrent que le risque de fonte cornéenne s'accroît progressivement avec la durée du suivi postopératoire.

Il existe peu de données sur le délai entre l'implantation de la B-KPro et le début de la fonte cornéenne. Seulement deux études rapportent le moment où la fonte cornéenne a d'abord été notée. Patel *et al* ont rapporté deux cas de fonte cornéenne post-infectieuse à 2 et 4 mois et deux cas d'extrusion de la B-KPro à 6 et 9 mois après l'implantation de la prothèse.<sup>17</sup> Aucun des yeux impliqués n'avait un diagnostic auto-immun sous-jacent. Au contraire, Utine *et al* ont rapporté quatre cas de fonte cornéenne stérile à 5, 15, 30 et 42 mois après l'implantation de la B-KPro, mais cette fois uniquement chez des patients avec diagnostics auto-immuns tels le syndrome de Sjögren ou le syndrome de Stevens Johnson / Lyell (nécrolyse épidermique toxique).<sup>9</sup> Ces quelques données suggèrent que la fonte cornéenne peut se développer à la fois tôt après la chirurgie ou encore de façon tardive, plusieurs années après l'implantation de la B-KPro. Dans une publication récente, Chan *et al* présente une courbe de survie Kaplan-Meier du temps au développement de complications associées à la fonte cornéenne (Figure 5).<sup>18</sup> Quoique cette analyse ne comprenne pas les cas de fonte n'ayant pas mené à une complication ou à une chirurgie réparatrice, on note justement que la courbe a une pente plus rapide dans les premiers 12 mois de suivi et que celle-ci s'amenuise par la suite.

**Tableau 1:** Proportion des yeux ayant développé une fonte cornéenne stérile dans les différentes séries de cas de kératoprothèse de Boston type I publiés depuis les derniers 10 ans.

Auteur, année de publication	Nombre de yeux	Catégories pronostiques (%)			Durée de suivi (mois, moyenne $\pm$ écart-type)	Proportion des yeux ayant développé une fonte cornéenne (%)
		Maladies autoimmunes	Brûlure chimique	Maladies non cicatricielles		
Dunlap, 2010 <sup>19</sup>	126	8	4	88	6	2
Robert, 2011 <sup>20</sup>	47	2	9	89	10 $\pm$ 5	0
Chew, 2009 <sup>21 a</sup>	36	8	5	87	16 $\pm$ 6	14
Shihadeh, 2012 <sup>22</sup>	20	5	15	80	18 $\pm$ 10	10
Aldave, 2012 <sup>23 b, c</sup>	117 (bras international)	13	27	60	14 $\pm$ 12	18
	98 (bras UCLA)	5	7	88	24 $\pm$ 20	16
Noel, 2016 <sup>24</sup>	44	2	16	82	21 $\pm$ 12	11
Patel, 2012 <sup>17</sup>	58	5	5	90	22 $\pm$ 11	7

de la Paz, 2014 <sup>25 b</sup>	67	24	18	58	26	6
De Rezende, 2014 <sup>26</sup>	59	17	20	63	27 (4-54) <sup>d</sup>	7
Alexander, 2015 <sup>27 c</sup>	209	15	9	76	28	20
Chan, 2016 <sup>18</sup>	128	14	20	66	29	16 <sup>e</sup>
De Oliveira, 2014 <sup>28</sup>	30	13	33	53	32 ± 16	20
Kosker, 2015 <sup>29 a</sup>	37	0	11	89	32 ± 21	11
Greiner, 2011 <sup>30 b</sup>	40	7.5	25	67.5	34 ± 17	15
Aravena, 2016 <sup>31 c</sup>	149	9	7	84	37	15
Chang, 2015 <sup>32</sup>	43	0	0	100	39	19
Salvador- Culla, 2016 <sup>33</sup>	42	0	100	0	40 ± 24	31
Goins, 2016 <sup>34 b</sup>	75	5	12	83	41	16

Duignan, 2015 <sup>35</sup>	34 <sup>f</sup>	18	9	73	42 ± 31	15
Srikumaran, 2014 <sup>36 c</sup>	158	23		77	47 ± 26	20
Lekhanont, 2014 <sup>16</sup>	42	19	19	62	65 ± 15	24

<sup>a</sup> Selon les méthodes, la série de Kosker inclurait des yeux inclus dans la série de Chew. Or, les deux articles sont inclus car il est impossible d'identifier les cas dupliqués (Kosker : maladies cornéennes unilatérales opérées entre 2005 et 2013 versus Chew : maladies cornéennes unilatérales ou bilatérales opérées entre 2005 et 2007 au même centre). La série de cas de Chew comprend un œil ayant reçu une B-KPro type II

<sup>b</sup> Les séries de cas par Aldave *et al*<sup>5</sup>, Bradley *et al*<sup>37</sup>, Muñoz-Gutierrez *et al*<sup>38</sup> ainsi que Hager *et al*<sup>39</sup> ne sont pas incluses car des séries avec suivi plus prolongé ont été publiées par les mêmes groupes de recherche.

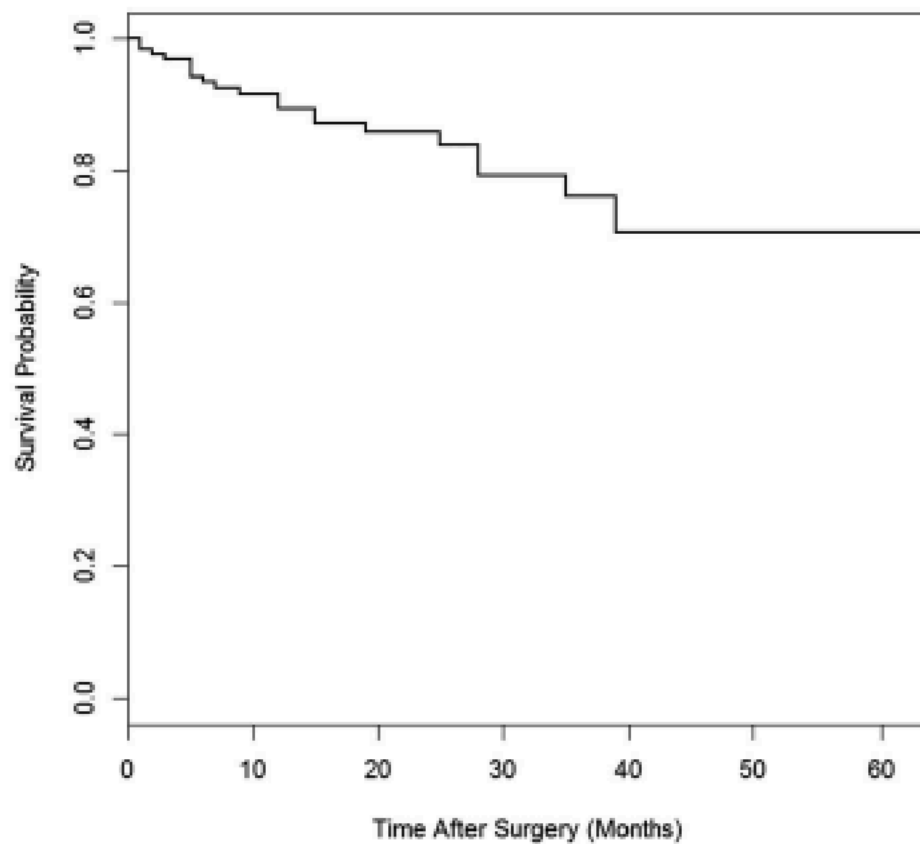
<sup>c</sup> Ces études pourraient inclure des cas dupliqués parmi les autres études mono ou multicentriques.

<sup>d</sup> La durée de suivi a été rapportée en tant que médiane et étendu par les auteurs.

<sup>e</sup> Seulement les cas de fonte cornéenne nécessitant une intervention chirurgicale ont été rapportés dans cette étude.

<sup>f</sup> Cette étude inclut 3 cas de B-KPro type II.

**Figure 5** – Courbe de survie Kaplan-Meier représentant le temps entre l’implantation d’une kératoprothèse de Boston type I au développement d’une complication associée à la fonte cornéenne. Tiré de Chan CC, LoVerde L, Qiang J, Nordlund ML, Holland EJ. Incidence, risk factors and surgical management of Boston type 1 keratoprosthesis corneal melts, leaks and extrusions. *Cornea*. 2016;35(8):1049-1056.avec permission.



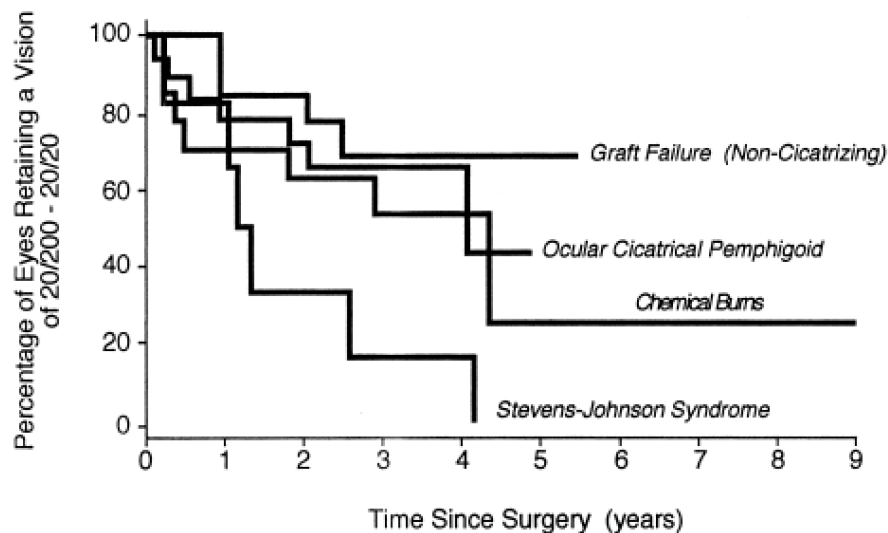
## **Chapitre 2.2 : Revue de la littérature - Facteurs de risque**

L'expérience clinique a révélé plusieurs facteurs pouvant promouvoir la fonte cornéenne et a mené à de nombreuses modifications au niveau de la conception de la prothèse et du suivi postopératoire. En particulier, trois facteurs de risque ont été identifiés de façon empirique au cours des années de développement de la B-KPro : 1) l'inflammation de la surface oculaire, 2) les barrières à l'apport nutritionnel aux kératocytes et 3) le stress dessicatif.

### **Chapitre 2.2.1 : Inflammation de la surface oculaire**

L'une des premières séries de cas émanant du Massachusetts Eye and Ear Infirmary de Boston a établi la présence de catégories pronostiques pour l'implantation de la B-KPro.<sup>40</sup> Dans cette étude, 63 patients ont été suivis rétrospectivement pour un minimum de 21 mois après implantation de la B-KPro. La rétention anatomique de la B-KPro ainsi que la perte de vision postopératoire étaient les critères de résultats principaux. L'analyse a été effectuée en distinguant les patients en quatre catégories diagnostiques : syndrome de Stevens Johnson (SJS) (N = 7), brûlure chimique (N = 20), pemphigoïde des membranes muqueuses (N = 20, autrefois connu sous le terme pemphigoïde oculaire cicatriciel) et maladies non cicatricielles (N = 19, incluant de multiples étiologies – dystrophies, dégénérescences et infections - ayant mené à un échec de greffe cornéenne pénétrante). Cependant, les B-KPro de type I (42 yeux) et de type II (21 yeux) étaient agglomérées dans l'analyse. Yaghouti *et al* démontraient ainsi une hiérarchie claire des résultats visuels et anatomiques de la B-KPro selon le diagnostic préopératoire (Figure 6).<sup>40</sup>

**Figure 6** – Analyse Kaplan-Meier de 53 yeux ayant atteint une acuité visuelle d’au moins 20/200 suite à l’implantation d’une kératoprothèse de Boston type I ou type II. La survie était définie par une conservation d’une acuité visuelle supérieure à 20/200 pour la durée du suivi. Quatre catégories de patients (de haut en bas : Échec de greffe (maladie non-cicatricielle); pemphigoïde de membranes muqueuses; brûlure chimique et syndrome de Stevens Johnson) sont identifiées. Des différences statistiquement significatives ont été démontrées pour le syndrome de Stevens Johnson et pemphigoïde des membranes muqueuses ( $p = 0.01$ ) ainsi que pour le syndrome de Stevens Johnson et l’échec de greffe ( $p = 0.03$ ). Tiré de Yaghouti F, Nouri M, Abad JC, Power WJ, Doane MG, Dohlman CH. Keratoprosthesis : Preoperative prognostic categories. *Cornea*. 2001; 20(1) : 19-23 avec permission



En effet, le syndrome de Stevens Johnson, le pemphigoïde des membranes muqueuses et les brûlures chimiques sont reconnues pour l'inflammation chronique de la surface oculaire persistante et ce, en dépit de la résolution de l'insulte initiale. Par exemple, on retrouve des élévations significatives de divers marqueurs inflammatoires dans les larmes des yeux avec SJS ou pemphigoïde des membranes muqueuses même si ceux-ci sont traités et d'allure quiescente.<sup>41</sup>

D'autres séries de cas supportent le pronostic plus limité de la B-KPro chez les yeux avec maladies inflammatoires chroniques et l'associent à un risque augmenté de fonte cornéenne et d'extrusion de la prothèse. Selon Palioura *et al*, 5 des 8 yeux (62.5%) avec pemphigoïde des membranes muqueuses et B-KPro de type I ont développé une extrusion de la prothèse (N = 2) ou ont nécessité un échange de KPro pour cause de fuite d'humeur aqueuse (N = 3) sur un suivi moyen de 1.7 ans.<sup>42</sup> Encore, Sayegh *et al* ont rapporté le développement d'une fuite aqueuse chez 4 de 16 yeux (25%) avec syndrome de Stevens Johnson ayant reçu une B-KPro de type I ou de type II.<sup>43</sup>

Plus récemment, l'augmentation du risque de fonte cornéenne chez les maladies inflammatoires chroniques a été quantifiée par Chan *et al*. Dans une série de cas rétrospective analysée en tant qu'étude cas-témoin, le rapport de cotes pour le développement d'une complication associée à la fonte cornéenne était de 2.66 (intervalles de confiance à 95% de 1.01 à 7.02, p = 0.043) chez les yeux avec déficience conjonctivale (une terminologie alternative définissant également les yeux avec un diagnostic de SJS, de syndrome de Lyell (TEN), de pemphigoïde des membranes muqueuses ou de brûlures chimiques) par rapport aux yeux sans déficience conjonctivale.<sup>18</sup>



Les infections de la cornée sont également une source d'inflammation soutenue au niveau de la surface oculaire. Les cellules inflammatoires responsables du contrôle de l'infection persistent dans le stroma cornéen lors des phases de remodelage et de guérison de l'ulcère et peuvent occasionner une fonte localisée ou plus étendue du stroma. La kératite infectieuse post-B-KPro a ainsi été identifiée en tant que facteur de risque pour la fonte cornéenne. La fonte cornéenne associée aux infections peut être de nature infectieuse (via des collagénases microbiennes ou produites par l'hôte pendant la phase d'infection active) ou de nature stérile, progressant même plusieurs semaines après la résolution de l'infection. Chan et Hollande ainsi que Kim *et al* ont rapporté un risque de 50% de fonte cornéenne dans un contexte de kératite infectieuse post-B-KPro.<sup>44,45</sup> Dans l'étude de Chan *et al* cité plus haut, le rapport de cotes pour le développement d'une complication associée à la fonte cornéenne était de 12.50 (intervalles de confiance à 95% de 4.02 à 38.9,  $p < 0.0001$ ) chez les yeux avec une kératite infectieuse préalable et donc, inactive au moment de la fonte.<sup>18</sup>

### **Chapitre 2.2.2 : Barrières à l'apport nutritionnel aux kératocytes**

Les kératocytes sont les fibroblastes résidents du stroma cornéen. Ils sont responsables de maintenir l'intégrité métabolique et structurale de la cornée. Ces cellules obtiennent leurs nutriments via la diffusion de glucose, d'acides aminées et de vitamines de l'humeur aqueuse. Les larmes et les vaisseaux périlimbiques n'offrent qu'une contribution minimale aux besoins nutritifs des kératocytes.<sup>46-48</sup> Un apport nutritif inadéquat mène à une perte des kératocytes et se manifeste cliniquement en tant que fonte cornéenne. Ce phénomène a été observé suite à

l'implantation de différents types de prothèses cornéennes qui agissent en tant que barrière de diffusion entre l'humeur aqueuse et le stroma cornéen.<sup>49</sup>

Dans le cas de la B-KPro, il existe deux barrières potentielles à la diffusion des nutriments : le matériel propre à la plaque postérieure (PMMA ou titane) et la présence d'une membrane rétroprothétique (RPM). Les modèles initiaux de la B-KPro avaient une plaque postérieure solide faite en PMMA. En étant complètement imperméable à l'humeur aqueuse, ces B-KPro étaient associées à un risque significatif de fonte cornéenne, soit de 51%.<sup>50</sup> Des révisions au design de la plaque postérieure, y ajoutant 8 fenestrations de 1.3 mm de diamètre, ont permis de réduire le taux de fonte cornéenne postopératoire par un facteur de 5, soit à 10%.<sup>50</sup> Les modèles les plus récents de la B-KPro incorporent 16 fenestrations de 1.18 mm dans la plaque postérieure de 8.5 mm.

Le développement d'une RPM est l'une des complications les plus fréquentes de la B-KPro, notée chez 30% des yeux en moyenne.<sup>51</sup> La RPM provient d'un mélange hétérogène de cellules de l'hôte, incorporant parfois aussi des cellules du greffon donneur, qui migrent de la plaie cornéenne jusque dans la chambre antérieure.<sup>52,53</sup> Des fibroblastes, lymphocytes ainsi que des cellules épithéliales ont été identifiés lors d'analyse histologique de RPM chez des B-KPro explantées. La RPM prolifère le long de la plaque postérieure, bouchant ainsi les fenestrations, pour ensuite recouvrir l'axe visuel et mener à une perte de vision. Une capsulotomie laser ou chirurgicale peut être effectuée afin de retrouver la vision. De plus, la RPM bloquant les fenestrations peut agir en tant que barrière de diffusion. Sivaraman *et al* ont démontré qu'une RPM était présente au niveau des fenestrations chez 100% des yeux avec fonte cornéenne post-

B-KPro alors que seulement 34% des yeux sans fonte avaient une telle RPM. De même, l'épaisseur des RPM était corrélée avec la présence de fonte cornéenne.<sup>54</sup>

### **Chapitre 2.2.3 : Stress dessicatif de la surface oculaire**

L'utilisation d'un verre de contact (VC) thérapeutique afin de protéger la surface oculaire s'est incorporée à la prise en charge postopératoire standard de la B-KPro à partir de l'année 2000.<sup>55</sup> Ainsi, l'application d'un VC souple de large diamètre de type Kontur (diamètre 16.0 mm, rayon de courbure 9.8 mm, Dk 18.8, Kontur Contact Lens, Richmond, CA) s'effectue à la fin de la chirurgie d'implantation de la B-KPro. Le VC est porté de façon continue. Il peut être nettoyé ou échangé lors des rendez-vous de suivi s'il développe des signes d'usure ou des dépôts visuellement significatifs. Cette utilisation d'un VC s'est avérée très importante afin de prévenir les dommages évaporatifs de la surface oculaire.<sup>56</sup> L'incapacité de maintenir un VC suite à l'implantation d'un B-KPro s'est d'ailleurs avérée un facteur de risque indépendant pour le développement de fonte cornéenne ou d'infection postopératoire.<sup>57</sup> En prenant compte également de l'âge et du diagnostic préopératoire, l'absence d'un VC augmente le risque de ces complications avec un ratio de cotes de 5.76 [intervalles de confiance à 95% (IC95%) : 1.53-21.72] à 12 mois, 12.42 [IC95% : 2.32-66.61] à 24 mois et 11.37 [IC95% : 1.83-23.90] à 36 mois. En incluant tous les temps de suivi postopératoire, Kammerdiener *et al* ont calculé un ratio de cotes de 6.60 [IC95% : 1.83-23.90].<sup>58</sup>

## **Chapitre 2.3 : Épidémiologie locale de la fonte cornéenne post-kératoprothèse de Boston**

Depuis 2008, le Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) est devenu l'un des centres d'excellence en matière de la B-KPro, ayant l'une des plus grandes séries de patients implantés avec cette prothèse. Par ailleurs, de nombreux efforts par l'équipe de recherche clinique dirigée par Dr Mona Harissi-Dagher ont permis de faire d'importantes contributions au domaine des kératoprothèses. De sorte à élucider l'épidémiologie locale de la fonte cornéenne post-B-KPro, une étude clinique par révision de dossiers a été effectuée dans le cadre de ce mémoire.

### **Chapitre 2.3.1 : Objectifs de l'étude**

En raison de l'absence de données épidémiologiques de qualité concernant le développement de fonte cornéenne post-B-KPro, nous avons entrepris une révision des dossiers des patients opérés au CHUM entre 2008 et 2012. L'objectif de cette étude était de mettre en évidence l'expérience clinique du CHUM en ce qui a trait à la fonte cornéenne associée à la B-KPro, de calculer l'incidence de cette complication et d'investiguer les divers mécanismes pouvant mener à la fonte cornéenne.

### **Chapitre 2.3.2 : Méthodes**

Le protocole de cette étude a été approuvé par le comité d'éthique de la recherche et a été mené en adhérence à la Déclaration de Helsinki. Tous les patients adultes (> 18 ans) ayant reçu une B-KPro de type I au CHUM entre 2008 et 2012 ont été identifiés. Une revue systématique des dossiers a été effectuée. Dans le cas de chirurgie de B-KPro bilatérale, les deux yeux ont été inclus dans l'analyse. Les yeux ayant développé une fonte cornéenne ont été comparés aux yeux n'ayant pas développé cette complication. Le test de chi-carrée ou le test exact de Fisher a été utilisé pour les variables catégorielles alors que le test T de Student a été utilisé pour les variables continues. Les rapports de cotes ainsi que leurs intervalles de confiance à 95% ont été calculés à l'aide des données de patients ayant au moins 2 ans de suivi postopératoire. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de SPSS (v21, Armonk NY) en utilisant un seuil de signification statistique fixé à  $p < 0.05$ .

### **Chapitre 2.3.3 : Résultats**

La B-KPro a été implantée chez 110 yeux de 96 patients entre octobre 2008 et octobre 2012. L'âge moyen des patients était de  $61 \pm 16$  ans (étendu : 19 à 96 ans). Les diagnostics préopératoires les plus communs étaient la déficience en cellules souches limbiques (LSCD; 32%, N = 35), l'oedème cornéen pseudophaque (PCE; 26%, N = 29) et les dystrophies cornéennes (15%, N = 17). Les autres indications pour la B-KPro sont identifiées au Tableau 3 ci-dessous. Cinquante-quatre yeux (49%) ont reçu la B-KPro en tant que chirurgie pénétrante de la cornée primaire (sans kératoplastie antérieure). Neuf yeux (8%) avaient un antécédant de

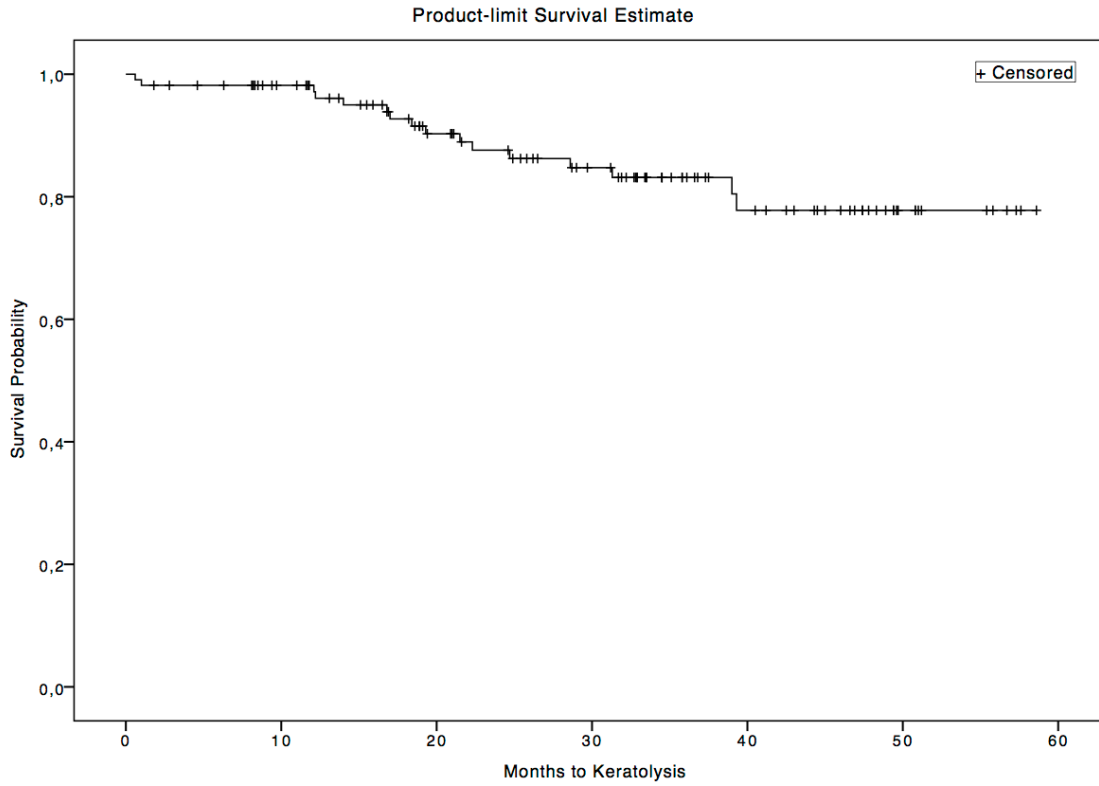
fonte cornéenne avant l'implantation de la B-KPro. Le suivi postopératoire moyen était de  $31 \pm 15$  mois (étendu: 2 à 59 mois). Les complications postopératoires les plus communes étaient le glaucome (N = 51, 55%) et la RPM (N = 46, 42%).

Seize cas de fonte cornéenne post-B-KPro ont été identifiés, représentant 14% des yeux et un taux d'incidence de 0.06 cas / patient-années. En moyenne, la fonte cornéenne a d'abord été notée à 20 mois de suivi postopératoire (étendu : 2 semaines à 40 mois). La durée de suivi moyenne des yeux avec fonte cornéenne ( $34 \pm 11$  mois) était comparable à celle des yeux n'ayant pas développé cette complication ( $p = 0.24$ ). La durée de survie sans fonte cornéenne est représentée sous forme d'analyse Kaplan-Meier (Figure 7). Contrairement à l'analyse faite par Chan *et al*, on note un déclin plus prononcé après la première année de suivi postopératoire.<sup>18</sup>

**Tableau 2 :** Caractéristiques de base des yeux implantés avec une kératoprothèse de Boston type I, comparant les yeux avec et sans fonte cornéenne postopératoire. Les variables continues sont présentées en tant que moyennes  $\pm$  écart-types alors que les variables catégorielles sont présentées en tant que nombre (proportion %)

<b>Variabiles</b>	<b>Yeux avec fonte (N = 16)</b>	<b>Yeux sans fonte (N = 94)</b>	<b>Rapport de cotes (Intervalles de confiance à 95%)</b>	<b>Valeur p</b>
Age	55 $\pm$ 18	62 $\pm$ 16	NA	0.11
Sexe [femmes]	8 (50)	39 (41)	1.4 (0.5 – 4.1)	0.53
Latéralité [oeil gauche]	8 (50)	45 (48)	NA	0.70
Diagnostic préopératoire				
Auto-immun	1 (6)	4(4)	1.5 (0.2 – 14.4)	0.47
Brûlure chimique	1 (6)	7(7)	0.8 (0.1 – 7.2)	1.0
Déficiency en cellules souches	8 (50)	27 (29)	3.3 (1.1 – 9.7)	0.09
Œdème cornéen pseudophaque	1 (6)	28 (30)	0.9 (0.2 – 4.4)	0.06
Dystrophie cornéenne	1(6)	16 (17)	0.5 (0.1 – 3.8)	0.46
Kératite bactérienne/fongique	0 (0)	3 (3)	0.8 (0.0 – 16.1)	1.00
Kératite herpétique	4 (25)	10 (11)	2.8 (0.8 – 15.2)	0.12
Maladie auto-immune systémique	0 (0)	3 (3)	0.8 (0.0 – 16.1)	1.00
Grefe de cornée antérieure (%)	6 (38)	50 (54)	0.5 (0.2 – 1.6)	0.29
Nombre de greffes de cornée antérieures	0.5 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 1.3	NA	0.11
Fonte cornéenne précédant l'implantation de la kératoprothèse	3 (19)	6 (7)	3.4 (0.8 – 15.2)	0.12

**Figure 7** - Analyse Kaplan-Meier démontrant la survie sans fonte cornéenne chez 110 yeux ayant reçu une kératoprotèse de Boston type I au Centre Hospitalier de l'Université de Montréal entre 2008 et 2012.





L'analyse des caractéristiques de base des yeux avec et sans fonte n'a pas révélé des rapports de cotes statistiquement significatifs. Néanmoins, on note une tendance vers un risque de fonte accru chez les yeux ayant un diagnostic préopératoire de LSCD [rapport de cotes RC (intervalles de confiance à 95%) : 3.3 (1.1 – 9.7)] ou de kératite herpétique [RC : 2.8 (0.8 – 15.2)]. Au contraire, un diagnostic préopératoire de PCE [RC : 0.9 (0.2 – 4.4)] avait tendance à être plus fréquent chez les yeux sans fonte cornéenne. L'implantation primaire de la B-KPro ainsi qu'un antécédant de fonte cornéenne précédant la B-KPro étaient associés, quoique non statistiquement significatif, au risque de développer une fonte cornéenne suite à l'implantation d'une B-KPro.

La fonte cornéenne était associée à la présence d'une RPM chez 38% des cas [RC: 4.6 (1.5 – 14.0)] et à une kératite infectieuse active ou résolue chez 25% des cas [RC: 18.2 (3.9 – 84.2)] (Tableau 4). La présence de décollement rétinien [RC: 13.8 (3.6 – 52.7)] ou d'un décollement choroidien [RC: 7.4 (2.1 – 262)] était aussi associée à la fonte cornéenne. Quoique ces complications puissent être des facteurs confondants étant associés à la présence d'une RPM, ils pourraient également survenir en tant que conséquences directes de la fuite d'humeur aqueuse et de l'hypotonie.

**Tableau 3 :** Complications (nombre et proportion) suite à l'implantation de la kératoprosthèse de Boston type I, comparant les yeux avec et sans fonte cornéenne postopératoire.

<b>Complications</b>	<b>Yeux avec fonte (N = 16)</b>	<b>Yeux sans fonte (N = 94)</b>	<b>Rapport de cotes (Intervalles de confiance à 95%)</b>	<b>Valeur p</b>
Uvéite	6 (38)	14 (18)	2.7 (0.9 – 8.5)	0.10
Kératite infectieuse	6 (38)	4 (4)	18.2 (3.9 – 84.2)	0.001
Membrane rétroprosthétique	11 (69)	35 (37)	4.6 (1.5 – 14.0)	0.01
Glaucome	6 (38)	55 (59)	0.43 (0.1 – 1.3)	0.11
Décollement de la rétine	7 (44)	6(6)	13.8 (3.6 – 52.7)	0.011
Décollement choroïdien	6 (38)	7 (7)	7.4 (2.1 – 26.6)	0.003
Œdème maculaire kystoïde	1 (6)	11 (12)	0.5 (0.1 – 4.2)	1.9
Membrane épirétinienne	2 (13)	5 (5)	2.5 (0.5 – 14.4)	0.27
Endophtalmie	0 (0)	2 (2)	0.1 – 24.4)	1.0

La fonte cornéenne était associée avec une perte importante de vision. Chez les yeux avec fonte cornéenne, l'acuité visuelle était de 20/50 à mouvement de la main avant le développement de cette complication. Suite à la fonte cornéenne, l'acuité visuelle avait chuté entre 20/200 et aucune perception lumineuse. Trois yeux (19%) ont développé un phthisis et perdu complètement la vision. Une éviscération a été effectuée sur deux de ces yeux phthisiques. Une perte de vision significative s'est aussi développée chez deux yeux additionnels, en raison d'un décollement de rétine inopérable.

### **Chapitre 2.3.4 : Résultats**

L'expérience du CHUM démontre donc que le risque de fonte cornéenne post-B-KPro est significatif et que ce dernier s'accroît avec la durée de suivi postopératoire. Corroborant la littérature existante, les facteurs de risque principaux de la fonte cornéenne chez nos patients étaient la présence d'une RPM ou d'une kératite infectieuse. Les yeux développant ces complications devraient être monitorés de façon rigoureuse afin d'identifier la fonte cornéenne à ses stades précoces.

## **Chapitre 3 : Pathophysiologie et traitement de la fonte cornéenne post-kératoprothèse de Boston type I.**

### **Chapitre 3.1 : Le rôle des métalloprotéinases matricielles**

Bien que plusieurs facteurs puissent contribuer au développement d'une fonte cornéenne, le mécanisme enzymatique final demeure le même. Ainsi, des enzymes de la famille des métalloprotéinases matricielles (MMP) sont responsables de la dégradation du collagène et des protéoglycans stromaux menant à la fonte cornéenne.<sup>58</sup> Les MMP sont des proenzymes de type endopeptidase nécessitant un cofacteur de zinc. Chaque MMP est désignée par au moins deux noms : le premier identifie l'ordre de sa découverte et le deuxième identifie le substrat préférentiel de l'enzyme. Par exemple, la MMP-9 (aussi connue en tant que gélatinase B et collagénase de type IV 92 kDa) est une enzyme importante au niveau de la surface oculaire, étant impliquée dans la guérison épithéliale.

Les MMP ont un rôle important dans la guérison de plaie et dans le remodelage tissulaire. Notamment, cette famille d'enzymes a d'abord été découverte en 1962 via l'identification de la collagénase responsable de la perte de la queue des têtards lors de leur métamorphose.<sup>59</sup> Depuis, les MMP ont été reconnues en tant qu'importants médiateurs dans diverses maladies d'origine inflammatoire, néoplasique ou dégénérative.<sup>60</sup>

La MMP-2 (gélatinase A) est la seule MMP du stroma cornéen sain, s'y retrouvant sous forme proenzyme et formant un complexe avec l'inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase-2 (TIMP-

2).<sup>61</sup> Suite à une lésion, l'épithélium cornéen, les kératocytes et les cellules inflammatoires activées vont chacun contribuer à l'augmentation de la production locale de MMP.<sup>58</sup> Lors du processus de guérison physiologique de la cornée, l'expression de MMP-1 (collagénase interstitielle), de MMP-2 et de MMP-3 (stromélysine-1) est augmentée. Les niveaux d'expression atteignent leur pic environ 1 semaine après la lésion, puis se normalisent sur plusieurs mois.<sup>62,63</sup> Cette surexpression des MMP permet la migration de kératocytes vers le site de la lésion, la prolifération des kératocytes et le remodelage des tissus lésés. L'expression de MMP-9 augmente également, mais de façon plus brève. Le niveau de MMP-9 atteint ainsi son pic 2 jours après la lésion puis devient indétectable au bout de 2 à 4 semaines. Pour sa part, la MMP-9 a son rôle dans la dégradation et régénération de la membrane basale et dans la ré-épithélialisation cornéenne.<sup>63</sup>

Les MMP sont hautement régulées et ce, surtout au niveau de la transcription. Plusieurs cytokines inflammatoires, dont l'interleukine-1 et le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- $\alpha$ ), plusieurs facteurs de croissance, dont le transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) ainsi que d'autres molécules de signalisation, dont le CD147 (ou inducteur des métalloprotéinases matricielles, EMMPRIN) vont induire l'expression de MMP.<sup>64,65</sup> Au niveau post-transcriptionnel, les MMP nécessitent le clivage de leur segment N-terminal pour leur activation enzymatique. Ce clivage peut s'effectuer par d'autres MMP activés ainsi que d'autres enzymes protéolytiques. Par ailleurs, des radicaux libres, libérés par les neutrophiles et macrophages, peuvent activer les MMP via l'attaque d'un résidu cystéine des pro-MMP (le « cysteine switch »).<sup>66,67</sup> Il existe plusieurs inhibiteurs endogènes aux MMP, soit les quatre inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4), l'alpha-2-

macroglobuline et les inhibiteurs RECK.<sup>68</sup> La régulation des MMP demeurent très complexes avec de nombreuses voies de feedback positif ou négatif. Notamment, les MMP peuvent activer ou inhiber leurs protéines régulatrices via leur propre activité de peptidase.

La fonte cornéenne est une réponse pathologique au processus normal de guérison d'une plaie. Alors, la production de MMP devient dérégulée et les niveaux de MMP s'accumulent, menant à une digestion locale de la cornée. Par exemple, Fini *et al* ont démontré une élévation différentielle des niveaux de MMP-9 suite à divers types de lésion chez le rat.<sup>69</sup> Ainsi, une insulte thermique (ayant tendance à évoluer vers la fonte cornéenne) était associée à une élévation excessive de MMP-9 lorsque comparée à une lésion mécanique (ayant tendance à bien guérir). En clinique, des niveaux élevés de MMP-2 et de MMP-8 ont été identifiés dans les larmes de patients souffrant de kératite périphérique ulcérate (PUK).<sup>70,71</sup> Une surexpression de MMP-1 et MMP-8 par l'épithélium a également été démontrée dans des boutons cornéens provenant de patients avec fonte cornéenne associée à l'utilisation de diclofenac topique.<sup>72</sup>

## **Chapitre 3.2 : Implications cellulaires**

Dans la cornée, il existe trois sources cellulaires potentielles pour la production de MMP : l'épithélium, les cellules inflammatoires (plus particulièrement les neutrophiles et macrophages) ainsi que les kératocytes.

Le rôle important de l'épithélium est reconnu depuis les premières études portant sur la fonte cornéenne. En 1969, Slansky *et al* avaient démontré que l'épithélium prélevé chez des patients

avec une ulcération aigüe ou chronique de la cornée avait la capacité de lyser des gels de collagène *in vitro* alors que l'épithélium provenant de contrôles sains ne démontrait pas cette activité collagénolytique.<sup>73</sup> En effet, la MMP-9 est exprimée par les cellules basales du front de migration épithéliale en bordure d'un déficit épithélial.<sup>74</sup> La surexpression épithéliale de MMP-9 au site de déficits épithéliaux chroniques est un mécanisme pouvant faciliter la fonte cornéenne. Justement, la fonte cornéenne clinique s'observe presque toujours dans un contexte de pauvre guérison épithéliale.

Cependant, des études plus récentes ont identifié les macrophages et neutrophiles infiltrants comme source prédominante de MMP menant à la fonte cornéenne.<sup>70</sup> Des études histopathologiques effectuées chez des yeux avec fonte cornéenne active post-B-KPro ont d'ailleurs révélé une infiltration marquée de cellules inflammatoires aigües et chroniques dans les aires de fonte.<sup>75</sup> Similairement, une surexpression de médiateurs inflammatoires produits par les macrophages et neutrophiles, soit le TNF- $\alpha$ , l'interleukine-1 $\beta$  et l'interferon  $\gamma$ , a été localisée dans les zones de fonte d'un différent type de kératoprothèse, l'AlphaCor.<sup>76</sup>

### **Chapitre 3.3 : Stresseurs associés à la kératoprothèse de Boston pouvant déréguler les métalloprotéinases matricielles**

L'implantation d'une B-KPro a le potentiel d'induire divers stress sur la surface oculaire. Plusieurs de ces stresseurs externes ont été associés avec une augmentation des MMP et pourraient ainsi faciliter la pathogenèse de la fonte cornéenne.

En premier lieu, la présence d'une B-KPro altère la surface lisse et régulière de l'œil. Ainsi, la distribution et la détérioration (tear break up) de la couche de larmes ne se fait pas de façon uniforme, pouvant mener à des zones de sécheresse. L'utilisation d'un VC souple de large diamètre permet de minimiser ces irrégularités de sorte à réduire ce stress dessicatif mais ne l'élimine pas. Par ailleurs, la fonction palpébrale et le réflexe de clignement ont souvent été altérés en raison des pathologies oculaires sous-jacentes et des nombreuses chirurgies oculaires ayant mené vers la B-KPro. Les yeux avec B-KPro font donc face à un stress dessicatif significatif. Or, la sécheresse de la surface oculaire et l'hyperosmolarité des larmes (une conséquence de la sécheresse) peuvent induire l'expression des MMP.<sup>77,78</sup>

L'œil est continuellement soumis à des stress mécaniques via les mouvements extraoculaires normaux et le clignement des paupières. Cependant, une augmentation de ces insultes mécaniques, telle que perçue lors du frottement des yeux, augmente le niveau de MMP-13, d'interleukine-6 et de TNF- $\alpha$  dans les larmes et a été impliquée dans l'amincissement et l'ectasie progressive des yeux avec kératocône.<sup>79</sup> En présence d'une B-KPro rigide, l'on peut raisonnablement s'attendre à la présence de friction entre le cylindre optique de la prothèse et le stroma adjacent ainsi qu'entre la plaque antérieure de la prothèse et l'épithélium périprosthétique. La littérature orthopédique a démontré que des débris d'usure peuvent activer les macrophages et mener à la résorption de l'os périprosthétique.<sup>80,81</sup> Une telle rétraction tissulaire pourrait être un phénomène analogue aux changements stromaux (kystes) visualisés à l'aide de l'AS-OCT en marge du cylindre optique de la B-KPro.<sup>12,13</sup>



Enfin, l'implantation d'une B-KPro nécessite l'utilisation de plusieurs gouttes postopératoires. Typiquement, l'instillation d'au moins une goutte d'antibiotique et d'un corticostéroïde est poursuivie à vie. Plusieurs patients devront également utiliser des gouttes additionnelles pour contrôler leur pression intraoculaire. Toutes ces gouttes, via leur ingrédient actif ou leur agent de conservation, ont le potentiel de causer de l'inflammation au niveau de la surface oculaire.<sup>82</sup> Les fluoroquinolones de quatrième génération sont les antibiotiques privilégiés en tant que prophylaxie post-B-KPro. Cependant, l'utilisation de fluoroquinolone topique en présence d'un déficit épithélial cornéen peut augmenter l'expression locale de MMP-2 et de MMP-9.<sup>83</sup> Les analogues de prostaglandines sont des agents extrêmement efficaces pour le contrôle de la pression intraoculaire. Par contre, leur mécanisme d'action repose sur l'induction des MMP afin de remodeler le muscle ciliaire et augmenter l'efflux uvéoscléral de l'humeur aqueuse.<sup>84</sup> Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens topiques sont parfois utilisés pour contrôler l'œdème maculaire postopératoire. Le risque de fonte cornéenne associée à ces agents a bien été documenté.<sup>72,85</sup> Enfin, bien que les corticostéroïdes topiques peuvent réduire l'inflammation menant à l'expression de MMP, ces agents inhibent la synthèse de collagène, pouvant ainsi potentialiser la fonte cornéenne.<sup>86</sup> Des études chez des lapins albinos ont démontré cette duplicité au niveau de la cornée: l'effet anti-inflammatoire des corticostéroïdes s'illustre dans un modèle de lésion par brûlure thermique alors que l'inhibition de la synthèse de collagène s'illustre dans un modèle de lésion mécanique (lacération). En effet, aucun des animaux recevant la prednisolone 1% quatre fois par jour immédiatement après une brûlure thermique n'ont développé une perforation de la cornée alors que le taux s'élevait à 85% chez les animaux du groupe contrôle. Au contraire, l'utilisation de prednisolone 1% suite à une lacération cornéenne menait à une plaie ayant 43% moins de collagène ainsi qu'une force tensile diminuée de 20%.<sup>87</sup>

## **Chapitre 3.4 : Traitement de la fonte cornéenne**

La prise en charge de la fonte cornéenne se fonde sur les trouvailles d'un examen oculaire et d'un bilan systémique complet. En effet, il est important d'exclure une cause infectieuse ou auto-immune à la fonte cornéenne post-B-KPro, car ces dernières changeraient l'approche au traitement.

Le traitement médical est le pilier initial de la prise en charge. Or, il existe peu de médicaments capables d'arrêter ou de renverser le processus de fonte cornéenne. Ainsi, les chirurgies reconstructives s'avèrent souvent essentielles, surtout dans le contexte d'une B-KPro.

### **Chapitre 3.4.1 : Traitement médical**

Le traitement médical de la fonte cornéenne implique l'optimisation de la santé de la surface oculaire. Pour une fonte cornéenne post-B-KPro consistant d'un simple amincissement stromal, sans fuite ou exposition, un traitement conservateur est recommandé. Un VC de large diamètre avec une transmissibilité de l'oxygène (Dk) élevée devrait être proprement ajusté de sorte à prévenir le stress évaporatif et à promouvoir la guérison de l'épithélium. Dans cette même optique, une tarsorrhaphie latérale devrait être considérée. L'utilisation abondante de larmes artificielles sans agent de conservation devrait aussi être encouragée.

L'utilisation de corticostéroïdes topiques devrait être minimisée, voir arrêter. S'ils sont jugés essentiels, les corticostéroïdes topiques traditionnels peuvent être substitués par de la

médroxyprogestérone 1%. La médroxyprogestérone une progestérone synthétique conservant certaines des propriétés anti-inflammatoires des corticostéroïdes tout en agissant comme inhibiteurs des MMP. Lors d'études *in vivo*, la médroxyprogestérone bloquait l'expression des MMP induite par le NF- $\alpha$  et l'interleukine-1 $\beta$ .<sup>87,88</sup> Chez le lapin, l'utilisation de médroxyprogestérone topique suite à une brûlure chimique alcaline réduit l'ulcération cornéenne, mais cette efficacité n'est pas consistante entre les études.<sup>86,89</sup> Encore chez le lapin, la médroxyprogestérone topique supprime l'inflammation associée à la kératite herpétique.<sup>90</sup> Lors d'une étude observationnelle chez des patients ayant reçu une kératoprothèse de type AlphaCor, l'utilisation prophylactique médroxyprogestérone 1% instillée quatre fois par jour n'avait pas d'impact sur le risque global de fonte cornéenne quoique la fonte chez les patients traités avait tendance à survenir plus tardivement.<sup>91</sup> La médroxyprogestérone 1% est utilisée depuis les années 1990 chez des patients avec B-KPro pour ses vertues anti-inflammatoires.<sup>92</sup> Cependant, aucune étude n'a démontré son efficacité dans un contexte de fonte cornéenne.

L'administration d'inhibiteurs des MMP, qu'ils soient topiques ou systémiques, est également recommandée. En raison de leur disponibilité, les tétracyclines systémiques (par exemple, la doxycycline 100 mg 2 fois par jour) sont les plus couramment utilisés. Une formulation topique a également été décrite (doxycycline 0.1% instillé 4 fois par jour) mais reste peu utilisée.<sup>6</sup> Les tétracyclines ont un effet anti-MMP via la chélation du cofacteur zinc des MMP.

Enfin, l'utilisation d'infliximab systémique s'est avérée efficace chez quelques patients ayant une maladie auto-immune comme le SJS, l'arthrite rhumatoïde ou le syndrome de Sjögren et

ayant développé une fonte cornéenne suite à l'implantation d'une B-KPro.<sup>93-95</sup> Similairement, plusieurs rapports de cas témoignent de l'efficacité de l'infliximab systémique dans le traitement de la fonte cornéenne non associée à la B-KPro, en particulier pour la kératite périphérique ulcéraire réfractaire aux traitements standards.<sup>96-99</sup>

### **Chapitre 3.4.2 : Traitement chirurgical**

Le but du traitement chirurgical de la fonte cornéenne est de restaurer l'intégrité structurale du globe oculaire. Il doit donc s'allier au traitement médical plutôt que de le remplacer. Une fonte très localisée peut être adressée avec l'application de colle de cyanoacrylate ou encore via l'utilisation de greffes de membrane amniotique, de greffes de membrane muqueuse ou encore de greffes de cornée tectoniques ou lamellaires. Cependant, ces approches sont souvent vouées à l'échec en raison de la formation de fistules périprothétiques et d'invasion épithéliale dans la chambre antérieure.<sup>75,100</sup> Elles doivent surtout être considérées comme des méthodes temporisantes, en l'attente d'une procédure plus définitive, tels l'échange de la B-KPro utilisant un nouveau greffon support ou encore le remplacement de la B-KPro pour une greffe de cornée pénétrante.<sup>6</sup> Ces approches plus invasives sont néanmoins les seules à rétablir une jonction greffon-B-KPro normale et étanche et à adresser toute RPM sous-jacente.

## **Chapitre 4 : Présentation du premier article**

**Citation :** Robert MC, Arafat SN, Spurr-Michaud S, Chodosh J, Dohlman CH, Gipson IK. Tear Matrix Metalloproteinases and Myeloperoxidase Levels in Patients with Boston Keratoprosthesis Type I. *Cornea*. 2016; 35(7):1008-14.

### **Chapitre 4.1: Problématique**

Les MMP sont impliquées dans la pathophysiologie de la fonte cornéenne et des niveaux élevés de MMP ont été notés dans les larmes de patients ayant des maladies inflammatoires de la surface oculaire.<sup>41,101</sup> En particulier, une élévation significative des MMP-9 et MMP-8 a été détectée dans les larmes de patients avec un diagnostic de SJS ou de pemphigoïde des membranes muqueuses.<sup>41</sup> Ces deux entités sont également associées à un risque accru de fonte cornéenne après l'implantation d'une B-KPro. Néanmoins, aucune étude n'avait investigué les MMP de la surface oculaire dans un contexte de chirurgie de B-KPro antérieure.

### **Chapitre 4.2: Objectifs et hypothèses**

Les objectifs de cette étude étaient de :

1. Évaluer l'impact de la B-KPro sur le profil de MMP des larmes.
2. Identifier les divers facteurs cliniques pouvant prédire une élévation des MMP chez ces patients, en particulier le rôle du diagnostic préopératoire et la présence de fonte cornéenne

3. Explorer les relations entre les différents types de MMP, leur inhibiteur (TIMP-1) et la myéloperoxydase.

Les hypothèses étaient que :

1. La présence d'une B-KPro mène à une augmentation des MMP contenues dans les larmes.
2. Le profil de MMP post-B-KPro varie selon le diagnostic préopératoire. Les MMP des larmes sont élevées en présence de fonte cornéenne.
3. La corrélation entre la MMP-9, la MMP-8 et la myéloperoxydase sera conservée chez les yeux ayant une B-KPro.

### **Chapitre 4.3 : Devis et population à l'étude**

Cette étude observationnelle prospective a été menée selon un devis adaptatif, combinant une composante transversale et une composante longitudinale. Les sujets de l'étude ont été recrutés lors de leurs visites régulières à la clinique de cornée du Massachusetts Eye and Ear Infirmary (MEEI) à Boston. Le consentement et le prélèvement des larmes étaient obtenus consécutivement lors d'une même visite. Des prélèvements additionnels ont été effectués chez un sous-groupe de patients, si leurs visites de suivi concordaient avec la disponibilité du chercheur.

Les critères d'inclusion étaient :

- Age  $\geq$  18 ans
- Présence d'une B-KPro de type I dans un ou les deux yeux depuis plus d'un mois

- Visites cliniques en après-midi (entre 13h00 et 16h00)
  - o Le temps des prélèvements a été limité à l'après-midi afin de contrôler pour de la variation diurne dans l'expression des MMP des larmes.<sup>102,103</sup> La sélection de cette période a été faite pour des raisons logistiques, la clinique de B-KPro du Dr Dohlman étant cédulée les mercredis après-midis.
- Capable de donner un consentement éclairé

Les critères d'exclusion étaient :

- Grossesse ou allaitement
- Chirurgie oculaire depuis moins d'un mois
- Instillation de gouttes ophtalmiques ou manipulation oculaire (par exemple, un échange de VC) dans l'heure précédant le prélèvement des larmes

## **Chapitre 4.4 : Collecte des données**

Les données cliniques de chaque participant ont été colligées par révision complète de leur dossier au MEEI. Les informations suivantes ont été recueillies : sexe, âge, race, diagnostics et chirurgies oculaires antérieures, diagnostics systémiques, médicaments oculaires et systémiques, complications post-B-KPro (fonte cornéenne, RPM, dépôts sur le VC, érosion conjonctivale sur tube de glaucome), date de l'implantation de la B-KPro, date du prélèvement des larmes. La présence et le type de VC ainsi que la présence de fonte cornéenne étaient notées lors de l'examen à la lampe à fente fait le jour du prélèvement. Une photographie du segment antérieure était effectuée chez les patients avec fonte cornéenne active.

## Chapitre 4.5 : Analyses de laboratoire

Les larmes ont été prélevées en utilisant une technique de lavage développée et optimisée par le laboratoire du Dr Gipson afin permettre un échantillonnage adéquat des protéines de la surface oculaire chez des patients produisant peu ou pas de larmes.<sup>104</sup> Cette méthode implique l'instillation de 60 µL de normal salin 0.9% stérile sur la surface oculaire alors que le sujet garde sa tête légèrement penchée vers l'arrière. Le sujet doit alors effectuer une rotation des yeux (de droite à gauche, puis de haut en bas) afin de permettre au salin de venir en contact avec toute la surface oculaire et d'amasser plus de protéines. Une micropipette stérile est utilisée afin de recueillir le liquide du cul-de-sac conjonctival inférieur, qui est ensuite transféré vers un tube de polypropylène et gardé sur glace. Une centrifugation est effectuée de sorte à éliminer les débris mucoïdes et cellulaires. Le surnageant est aliquoté en deux fractions afin de réduire les risques associés au gel-dégel. Tous les échantillons sont conservés à – 80 °C.

La première fraction du surnageant est analysée à l'aide du « Micro BCA Protein Assay Kit » (Thermo Scientific, Rockford, IL). Ce kit breveté permet la quantification des protéines totales dans des échantillons peu concentrés, tels ceux obtenus par lavage de la surface oculaire. La quantification repose sur la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  à du  $\text{Cu}^{1+}$  par les protéines d'un milieu alcalin. Cette réduction s'effectue selon la structure ainsi que le nombre de liens peptidiques et d'acides aminés cystéine, cystine, tryptophane et tyrosine des protéines en solution. Puis, une réaction entre l'acide bicinchoninique (BCA) et le  $\text{Cu}^{1+}$  mène à la formation d'un complexe pourpre, dont l'absorbance à 562 nm est linéaire avec la concentration de protéine.<sup>105</sup>



La deuxième fraction du surnageant est utilisée afin de déterminer le profil enzymatique des larmes. Le contenu des larmes en MMP totales (proenzyme et enzyme active; MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 et MMP-12) est déterminé en utilisant le Fluorokine Human MMP MultiAnalyte Profiling Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) alors que le contenu des larmes en myéloperoxidase et en TIMP-1 est déterminé avec le the Fluorokine Human Cardiac MultiAnalyte Profiling Kit de la même compagnie. L'activité des MMP est déterminée en modifiant le protocole du MMP-9 Fluorometric Drug Discovery Kit (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA). Pour les analyses multianalytes, 2.5 µg de protéines totales, tel que déterminés à l'étape précédente, sont utilisées par puit. Pour l'analyse d'activité des MMP, 1.0 µg de protéines totales sont utilisées par puit. Les analyses sont effectuées en triplicat dans la mesure du possible. Si un échantillon avait insuffisamment de protéines, l'analyse d'activité des MMP était omise.

Le profilage multianalyte des échantillons de larme repose sur la technologie Luminex (Luminex Corporation, Austin, TX). Les analytes d'intérêt sont liés à l'aide de 2 anticorps : le premier anticorps est associé à une bille codée par couleur et le deuxième anticorps est lié à la biotine. Cette liaison forme un « sandwich » bille-anticorps-analyte-anticorps-biotine, auquel on ajoute de la streptavidine conjuguée à la phycoérythrine. La streptavidine lie à la biotine, y ayant une forte affinité. La phycoérythrine est un chromophore rouge. L'échantillon est alors analysé grâce au Bio-Rad Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA), une plateforme basée sur le flux et la détection des différents analytes via 2 lasers. Le premier laser identifie les différentes billes, permettant de distinguer les analytes d'intérêt, et le deuxième laser détecte l'intensité du signal lié à la phycoérythrine, permettant ainsi de quantifier un analyte spécifique à la fois.

Enfin, l'activité des MMP a été déterminée en faisant réagir l'échantillon avec un substrat fluorogénique (OmniMMP RED, Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA). Le substrat est clivé par les MMP actives des larmes, menant à une augmentation progressive de la fluorescence dans l'échantillon. En mesurant cette fluorescence à intervalle régulier (à toutes les minutes sur 45 minutes, avec une énergie d'excitation de 540 nm et d'émission de 590 nm), on peut extraire la pente d'augmentation de la fluorescence. En corrigeant pour le bruit de fond, on peut ainsi calculer l'activité des MMP en tant qu'unités relatives de fluorescence / minute.

## **Chapitre 4.6 : Description de la contribution de chacun des auteurs**

Dans ce premier article, je présente les résultats d'une étude translationnelle sur les MMP, la MPO et le TIMP-1 retrouvés dans les larmes de patients avec B-KPro de type 1. Le projet allie des données cliniques et des données de laboratoire. J'étais responsable de finaliser le protocole, d'effectuer les prélèvements et les analyses de laboratoires chez 80% des yeux inclus dans l'étude, d'effectuer la révision des dossiers cliniques pour tous les patients, de faire l'analyse des données et les tests statistiques. J'ai écrit le manuscrit et préparé toutes les figures. Après avoir coordonné les révisions des co-auteurs, j'étais responsable de la soumission et de la correspondance lors du processus de révision par les paires.

Dr Samer Arafat était un fellow de recherche du laboratoire du Dr Ilene K Gipson avant mon arrivée à Boston. Il a conçu le protocole original et a prélevé les larmes et fait les analyses de

laboratoires chez 20% des yeux incluent dans l'étude. Il a participé à la révision des données de laboratoire et des ébauches du manuscrit.

Sandra Spurr-Michaud est l'assistante du laboratoire au Dr Ilene K Gipson. Elle a collaboré à l'élaboration du protocole et m'a enseigné les techniques de laboratoire nécessaire au projet. Ses conseils ont été essentiels au bon déroulement du projet. Elle a révisé les ébauches du manuscrit.

Dr James Chodosh a participé au recrutement de patients pour cette étude et a aidé dans la détermination des caractéristiques cliniques à soulever lors de la revue des dossiers.

Dr Claes H Dohlman a soulevé l'idée originale ayant mené à ce projet et a été responsable d'orchestrer les volets cliniques et de laboratoire de ce projet. Il a participé activement au recrutement de patients pour cette étude, s'est impliqué dans l'analyse des données et dans la révision du manuscrit.

Dr Ilene K Gipson était responsable du volet laboratoire de ce projet. Elle a fourni les ressources ainsi que guidé et supervisé les analyses en laboratoire et la rédaction du manuscrit.

Le texte intégral de l'article ainsi que ses tableaux et figures sont présentés dans la prochaine section de ce chapitre. Les permissions respectives de tous les auteurs ainsi que de l'éditeur ont été obtenus.

## **Chapitre 4.7 : Tear Matrix Metalloproteinases and Myeloperoxidase Levels in Patients with Boston Keratoprosthesis**

### **Type I.**

Marie-Claude Robert MD,<sup>1,2,3</sup> Samer N Arafat MD,<sup>1,2</sup> Sandra Spurr-Michaud MS,<sup>1</sup> James Chodosh MD MPH,<sup>2</sup> Claes H Dohlman MD PhD,<sup>2</sup> Ilene K Gipson PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Schepens Eye Research Institute, Massachusetts Eye and Ear, Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, Boston, MA

<sup>2</sup> Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, Boston, MA

<sup>3</sup> Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Department of Ophthalmology, Université de Montréal, Montréal, Canada

**Corresponding author and Reprints:** Marie-Claude Robert, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Department of Ophthalmology, 3<sup>rd</sup> Floor, Deschamps Pavillion, 1560 Sherbrooke East, Montreal, Qc H2L 4M1

**Conflict of Interest:** The authors, Robert, Arafat, Chodosh and Dohlman, are full-time academic employees of the Massachusetts Eye and Ear, the manufacturer of the Boston keratoprosthesis.

**Key Words:** Boston keratoprosthesis type 1; matrix metalloproteinase; chemical burn; Stevens-Johnson syndrome; keratolysis; tears.

**Financial support:** This project was funded by the Boston Keratoprosthesis Foundation, the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Fellowship Fund (MCR) and NIH NEI grant EY 03306 (IKG).

## **ABSTRACT**

**Purpose:** To investigate the tear levels of matrix metalloproteinases (MMPs), myeloperoxidase (MPO) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in eyes after Boston keratoprosthesis type I (B-KPro) implantation and to correlate these markers with the prognostic categories for B-KPro outcomes.

**Methods:** Tear washes were collected from forty patients (7 patients with autoimmune disease, 2 patients with chemical burn and 31 patients with other non-cicatrizing diagnoses). Tear washes were analyzed for MMPs, MPO and TIMP-1 levels using multianalyte bead-based enzyme-linked immunosorbent assays. Total MMP activity was determined using a fluorometric assay. The various analytes were compared in relation to the underlying diagnoses leading to B-KPro and other clinical factors.

**Results:** MMP-8, MMP-9 and MPO levels were markedly elevated in eyes with B-KPro. Chemical burn had significantly higher tear MMP-8 and MMP-9 levels compared to non-cicatrizing diseases and higher MMP-9 levels compared to autoimmune diseases. Similar analyte levels were observed in the B-KPro eye and contralateral non B-KPro eye of patients with bilateral diseases. MMP-8, MMP-9 and total MMP activity correlated strongly with each another.

**Conclusions:** MMP-8 and MMP-9 levels in eyes with B-KPro appeared to be related to the underlying ocular surface pathology and not significantly influenced by the presence of a B-KPro.

## **Introduction**

The Boston Keratoprosthesis type I (B-KPro) can provide visual rehabilitation in patients with corneal blindness. However, eyes with more severe ocular surface diseases, particularly cicatrizing diseases, have poorer post-operative outcomes after B-KPro. The increased need for postoperative repair procedures and the faster visual attrition rates observed in these disease categories form the basis for the well-recognized prognostic categories for B-KPro surgery.<sup>1</sup> Eyes with Stevens-Johnson syndrome (SJS) and toxic epidermal necrolysis (TEN) have the poorest outcomes while eyes with mucous membrane pemphigoid and chemical burn have intermediate outcomes when compared to eyes with non-cicatrizing conditions. Most recent case series continue to support this prognostic hierarchy.<sup>2-7</sup> Corneal melting (sterile keratolysis) after B-KPro also occurs in up to 19% of eyes with non-cicatrizing diseases.<sup>8</sup> Corneal melting of the B-KPro carrier grafts is a critically important cause of B-KPro failure as a result of the development of periprosthetic leaks, B-KPro extrusion and several other sight- and globe-threatening complications.<sup>9</sup>

Matrix metalloproteinases (MMP) are enzymes responsible for corneal collagen and extracellular matrix degradation seen in sterile corneal ulceration.<sup>10</sup> A subset of these enzymes, neutrophil collagenase (MMP-8) and gelatinase-B (MMP-9), as well as myeloperoxidase (MPO), a microbicidal enzyme released during the respiratory burst of neutrophils, have been found in high levels in the tears of patients with SJS/TEN and mucous membrane pemphigoid.<sup>11</sup> High tear MMP levels have also been found in several other conditions that may eventually necessitate B- KPro surgery, such as atopic blepharoconjunctivitis,<sup>12</sup> sterile corneal ulceration,<sup>13</sup> fungal keratitis,<sup>14</sup> keratoconus<sup>15</sup> and graft failure.<sup>16</sup> As such, the purpose of this study was to

assess tear levels of MMP, MPO and tissue inhibitor of MMP type 1 (TIMP-1) in eyes with prior B-KPro and to correlate these enzymes with the underlying diagnoses and the B-KPro prognostic categories.

## **Materials and Methods**

This cross-sectional study was approved by the Human Studies Committee at the Massachusetts Eye and Ear Infirmary (MEEI) in Boston, Massachusetts. The tear and statistical analyses were performed at the Schepens Eye Research Institute/Massachusetts Eye and Ear (SERI/MEE) in Boston, Massachusetts. The study procedures complied with the Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA) and adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. Patients were informed of the nature and design of the study prior to recruitment and signed informed consent was obtained.

### ***Study population***

Study participants included patients with prior B-KPro implantations that were followed at the MEEI cornea clinic. Subjects were deemed eligible for inclusion if they were above 18 years of age and had at least one month of stable postoperative follow-up after B-KPro surgery. Subjects were excluded if they had undergone any intraocular surgery in the preceding month. Pregnancy and breastfeeding were additional exclusion criteria. Study participants were recruited and their tears were collected during their regular scheduled visits at the MEEI cornea clinic between January 2013 and May 2014. Additional tears were collected at subsequent clinic visits for a small prospective cohort of participants depending on participant and researcher availability. A complete ocular history and slit lamp examination were performed on the day of tear collection. Slit lamp photographic images were taken of eyes with active corneal melting. Medical records

were reviewed to identify the participants' demographics, prior ocular diagnoses and surgeries, systemic diseases as well as ocular and systemic medications. Patients were grouped by diagnostic category (autoimmune diseases, chemical burns, non-cicatrizing diseases) based on the classic prognostic hierarchy following B-KPro implantation.<sup>1</sup>

### ***Tear collection and processing***

A tear wash method was chosen for collecting tear proteins because it allows harvest of tear fluid from patients with little tear production and increases protein recovery from the ocular surface to allow multiple analyte assays.<sup>17</sup> Tear collection was performed in the afternoon (between 1 and 4 pm) to control for diurnal variation in MMP levels.<sup>18 19</sup> and prior to any ocular surface manipulation such as the instillation of topical anesthetic drops and the cleaning or exchange of the contact lens (CL). The tear wash method involved the instillation of 60 µL of sterile 0.9% saline solution onto the ocular surface using a sterile plastic micropipette. The participants were then instructed to rotate their eyes up, down, nasally and temporally without blinking. This movement allows the saline to contact the different areas of the ocular surface and thus, collect more protein. The tear wash fluid was collected from the inferior fornix using a micropipette, transferred to a sterile polypropylene tube and kept on ice. All samples were centrifuged at 15 000 RPM (21 130 x g) and 4°C for 30 minutes to remove cellular and mucoid debris. Supernatants were recovered and aliquoted using new sterile polypropylene tubes and stored at -80°C for further processing. The tear wash process was performed on both eyes and each eye was analyzed separately.



Given the variable volume yield using the tear wash method, quantification of MMPs, MPO and TIMP-1 was normalized to protein content. Protein concentration of each sample was determined using a Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). Samples were analyzed according to the manufacturer's instructions following a 1:50 or 1:75 dilution of tear sample in diluent.

### ***Analysis of matrix metalloproteinase, myeloperoxidase and tissue inhibitor of matrix***

#### ***metalloproteinase type 1***

Total (proform and active) tear levels of MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 and MMP-12 content were analyzed simultaneously using the Fluorokine Human MMP MultiAnalyte Profiling Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). Tear MPO and TIMP-1 levels were quantified together using the Fluorokine Human Cardiac MultiAnalyte Profiling Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). Samples were processed following the manufacturer instructions and analyzed using a Bio-Rad Bio-Plex analyzer (Bio-Rad, Hercules, CA) powered by Luminex 100 xMAP technology (Luminex Corp., Austin, TX). Median fluorescence intensities were used to calculate the analyte concentrations from a standard curve (in picograms per milliliter) and were standardized to micrograms of total protein loaded in the assay. Analyte levels are reported in pictogram of analyte per microgram of total protein (pg/ $\mu$ g).

#### ***Analysis of total matrix metalloproteinase activity***

As previously described, a modified protocol of the MMP-9 Fluorometric Drug Discovery Kit (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA) was used to quantify total MMP activity.<sup>11</sup> Briefly, the samples were diluted in the provided MMP assay buffer and loaded into a sensoplate black, glass-bottomed 96-well plate (Greiner Bio-One North America, Inc., Monroe, NC). A quenched

OmniMMP RED fluorogenic substrate (Enzo Life Sciences) was added into each well where MMP activity was quantified by the fluorescence intensity emitted over time upon substrate cleavage. Fluorescence was measured at 1-minute intervals for 45 minutes at 540 nm (excitation) and 590 nm (emission) using the Synergy Mx monochromator-based multimode microplate reader (Biotek U.S., Winooski, VT). The slope values were derived from the linear portions of the background and sample curves and total MMP activity was calculated as the sample slope minus the background slope (in relative fluorescence units per minute (RFU/min)) and standardized to microgram of protein loaded in the assay.

### ***Statistical analysis***

Statistical analysis was performed using Stata/SE 13.1 (StataCorp, College Station, TX). Graphics were prepared using Microsoft Excel 2011 (Microsoft, Redmond, WA). Results were reported as means  $\pm$  standard errors of the mean. The non-parametric Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests were used to compare analyte levels across diagnostic categories. The Wilcoxon matched-pairs signed-rank test was used to compare paired data between the two eyes of patients with bilateral disease and unilateral B-KPro as well as those of patients with bilateral B-KPro. Analyte levels were converted to logarithmic values for correlation analyses using the Spearman rank correlation test. Analysis of variance (ANOVA) was used to identify clinical parameters associated with MMP-8, MMP-9 and MPO analyte levels and MMP activity. The regression model included patient age, gender, prognostic category, time elapsed since B-KPro surgery, the presence of a glaucoma drainage device, sterile keratolysis, retroprosthetic membrane or CL deposits, CL type and the use of topical medications (antibiotics, steroids, prostaglandin analogues and/or anti-glaucoma) and/or systemic medications (doxycycline,

statins, angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi) and/or systemic immunomodulation therapy). Univariate and multivariate analyses were performed. A similar multivariate model was built to explore relationships between the different analyte levels and MMP activity. Statistical significance was determined when the two-tailed P values were below the 0.05 threshold.

## **Results**

### ***Study population***

Forty patients participated in this study. The mean age was  $65 \pm 3$  years (range: 26 to 97 years). Sixty one percent of patients were male. Thirty-three patients had a B-KPro in one eye only (unilateral B-KPro) while 7 patients had B-KPro in both eyes (bilateral B-KPro). The underlying diagnoses leading to B-KPro surgery are outlined in Table 1. Twenty-eight patients (70%) had bilateral underlying corneal disease. Of these, seven patients (17.5%) had bilateral B-KPro and twenty-one patients (52.5%) had unilateral B-KPro. Of eyes with bilateral disease and unilateral B-KPro, the contralateral non B-KPro eyes either had no prior corneal surgery (8 eyes), phthisis (5 eyes), corneal transplantation (7 eyes) or Gunderson flap (1 eye).

**Table 1** – Preoperative diagnoses leading to corneal blindness and Boston Keratoprosthesis

Type 1 surgery, organized by prognostic category.

<b>Preoperative Diagnosis</b>	<b>Total Patients N (%)</b>	<b>Total Eyes N (%)</b>
<b>Autoimmune disease</b>	<b>7 (17.5)</b>	<b>8 (17.0)</b>
SJS/TEN	4	4
Atopic/vernal keratoconjunctivitis	3	4
<b>Chemical burns</b>	<b>2 (5.0)</b>	<b>3 (6.4)</b>
<b>Non-cicatrizing diseases</b>	<b>31 (77.5)</b>	<b>36 (76.6)</b>
Corneal edema (PCE, ACE, FECD, CHED, uveitic)	11	13
Post-infectious scarring		
Bacterial (includes syphilis, trachoma)	3	3
Herpetic	4	4
Keratoconus	4	4
Neurotrophic/exposure keratopathy	2	3
Thermal Burn	2	2
Aniridia	1	2
Salzmann nodular degeneration	1	2
Mechanical trauma	1	1
Topical anesthetic abuse	1	1
Mooren’s ulcer	1	1

The interval between B-KPro surgery and tear collection was  $6.9 \pm 0.5$  years (range: 1 month to 15.6 years). At the time of tear collection, all B-KPro eyes were on topical antibiotic prophylaxis, which included any combination of polymyxin B sulfate-trimethoprim (72% of eyes), moxifloxacin (26% of eyes) and/or vancomycin 14 mg/mL with benzalkonium chloride 0.005% (30% of eyes). Fifty-three percent of eyes were on prednisolone acetate 1% at a frequency ranging from once to four times per day. Sixty-two percent of eyes were on topical glaucoma medication at an average of 1.5 medications per eye. Prostaglandin analogues were used in 28% of eyes. Other medications with potential impact on MMP levels included doxycycline (15% of eyes), statins (45% of eyes) and ACEi (36% of eyes).<sup>20 21</sup> Fifteen percent of eyes were on systemic immunomodulatory therapy (2 eyes on prednisone and 5 eyes on mycophenolate mofetil).

Eighteen eyes (38%) had undergone prior glaucoma drainage device implantation. As well, 19 eyes (83%) had a CL in place. Twenty-three percent of CL had visible deposits on the day of tear collection. Previous B-KPro related complications included retroprosthetic membrane in 27 eyes (57%) and sterile keratolysis (melt) in 13 eyes (28%). Four eyes (9%) had active melting at the time of tear collection.

### ***Tear sampling***

The tear wash method yielded an average of  $39 \pm 2$   $\mu$ L of fluid from B-KPro eyes and  $37 \pm 2$   $\mu$ L of fluid from non B-KPro eyes ( $p = 0.89$ ). The average protein concentration of these samples

was  $1.1 \pm 0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  in B-KPro eyes and  $1.6 \pm 0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  in non B-KPro eyes ( $p = 0.61$ ) yielding a total  $44.6 \pm 6.2 \mu\text{g}$  and  $40.3 \pm 5.2 \mu\text{g}$  of protein, respectively ( $p = 0.61$ ).

***Matrix metalloproteinases, myeloperoxidase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase type 1 levels***

Mean tear levels of MMPs, MPO and TIMP-1 from eyes with B-KPro are presented in Figure 1A. Low levels of MMP-1 ( $0.3 \pm 0.1 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ), MMP-2 ( $3 \pm 1 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ), MMP-3 ( $12 \pm 3 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ), MMP-7 ( $34 \pm 5 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ), MMP-12 ( $0 \pm 0 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ) and TIMP-1 ( $32 \pm 2 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ) were detected in the tears of eyes with B-KPro. Conversely, MMP-8 ( $80 \pm 31 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ), MMP-9 ( $291 \pm 77 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ) and MPO ( $244 \pm 33 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ) levels were markedly elevated.

Significant differences were noted in the levels of MMP-2, MMP-8 and MMP-9 when comparing the different prognostic categories. MMP-2 levels in eyes with autoimmune diseases were 5-fold higher than those with non-cicatrizing diseases ( $p = 0.02$ ). MMP-8 and MMP-9 levels were 12- and 7-fold higher, respectively, in eyes with chemical burn when compared to eyes with non-cicatrizing diseases ( $p = 0.02$  for both comparisons).

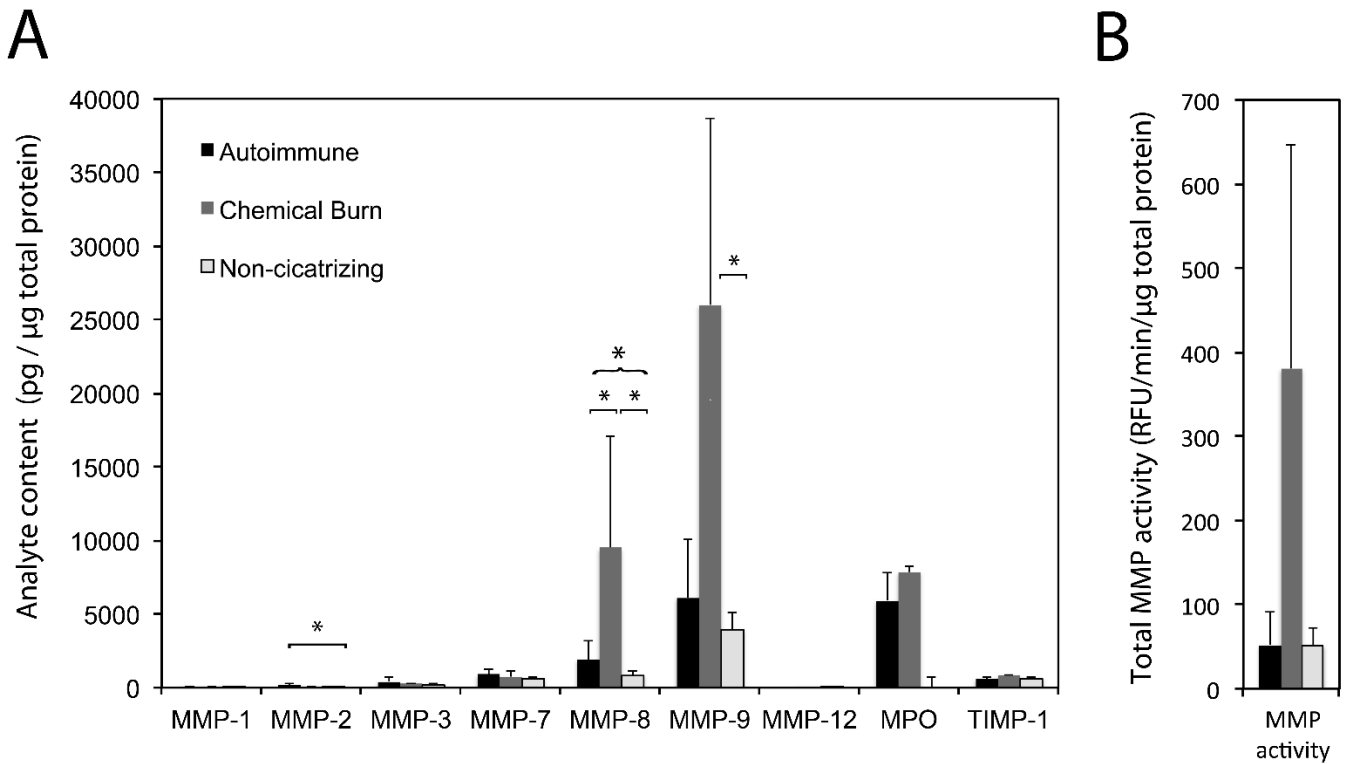
With respect to specific diagnoses across the B-KPro cohort, the highest levels of MMP-8, MMP-9 and MPO were seen in B-KPro eyes with chemical burns ( $474 \pm 376 \text{ pg}/\mu\text{g}$  total protein,  $1300 \pm 635 \text{ pg}/\mu\text{g}$  total protein and  $393 \pm 19 \text{ pg}/\mu\text{g}$  total protein, respectively; 3 eyes), topical anesthetic abuse ( $360 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ,  $1406 \text{ pg}/\mu\text{g}$  and  $554 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ; 1 eye), neurotrophic/exposure keratopathy ( $163 \pm 81 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ,  $549 \pm 217 \text{ pg}/\mu\text{g}$  and  $304 \pm 80 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ; 3 eyes) and SJS/TEN ( $141 \pm 116 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ,  $426 \pm 356 \text{ pg}/\mu\text{g}$  and  $366 \pm 177 \text{ pg}/\mu\text{g}$ ; 4 eyes) . The lowest levels of MMP-8,

MMP-9 and MPO were seen in eyes with keratoconus ( $3 \pm 3$  pg/ $\mu$ g,  $27 \pm 26$  pg/ $\mu$ g and  $21 \pm 20$  pg/ $\mu$ g; 4 eyes), uveitis-induced corneal edema ( $0 \pm 0$  pg/ $\mu$ g,  $7 \pm 2$  pg/ $\mu$ g and  $47 \pm 21$  pg/ $\mu$ g; 2 eyes), mechanical trauma ( $5$  pg/ $\mu$ g,  $31$  pg/ $\mu$ g and  $74$  pg/ $\mu$ g; 1 eye) and aniridia ( $6 \pm 0$  pg/ $\mu$ g,  $19 \pm 5$  pg/ $\mu$ g and  $165 \pm 72$  pg/ $\mu$ g; 2 eyes).

### ***Total matrix metalloproteinase activity***

Total MMP activity is shown in Figure 1B. Although total MMP activity tended to be higher in eyes with chemical burns, there were no statistically significant differences between the classic prognostic categories ( $p = 0.20$ ). The specific diagnoses with the highest total MMP activity were the same as those that exhibited markedly elevated levels of MMP-8, MMP-9 and MPO. These included chemical burns ( $381 \pm 267$  RFU/min/ $\mu$ g; 3 eyes), topical anesthetic abuse ( $495$  RFU/min/ $\mu$ g; 1 eye), neurotrophic/exposure keratopathy ( $244 \pm 16$  RFU/min/ $\mu$ g; 3 eyes) and SJS/TEN ( $103 \pm 71$  RFU/min/ $\mu$ g; 3 eyes). Those with the lowest total MMP activity were atopy ( $0.8 \pm 0.8$  RFU/min/ $\mu$ g; 3 eyes), aniridia ( $0.6 \pm 0.6$  RFU/min/ $\mu$ g; 2 eyes) and keratoconus ( $3.2 \pm 1.8$  RFU/min/ $\mu$ g; 4 eyes).

**Figure 1** –Bar graph showing the means of A) matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, myeloperoxidase (MPO) and tissue inhibitor of MMP-1 (TIMP-1) and B) total MMP activity in the tears of eyes with Boston keratoprosthesis type I (B-KPro). The eyes are grouped according to the established prognostic hierarchy based on underlying diagnosis leading to corneal blindness and B-KPro implantation. All values were standardize to total protein: A) picograms per microgram of total protein and B) relative fluorescent units per minute (RFU/min) per microgram of total protein. Levels were compared across all 3 diagnostic groups using the Kruskal-Wallis test ( { ) while group pairs were compared using the Mann-Whitney U test ( [ ). \* P < 0.05; Error bars represent the standard errors of the mean.

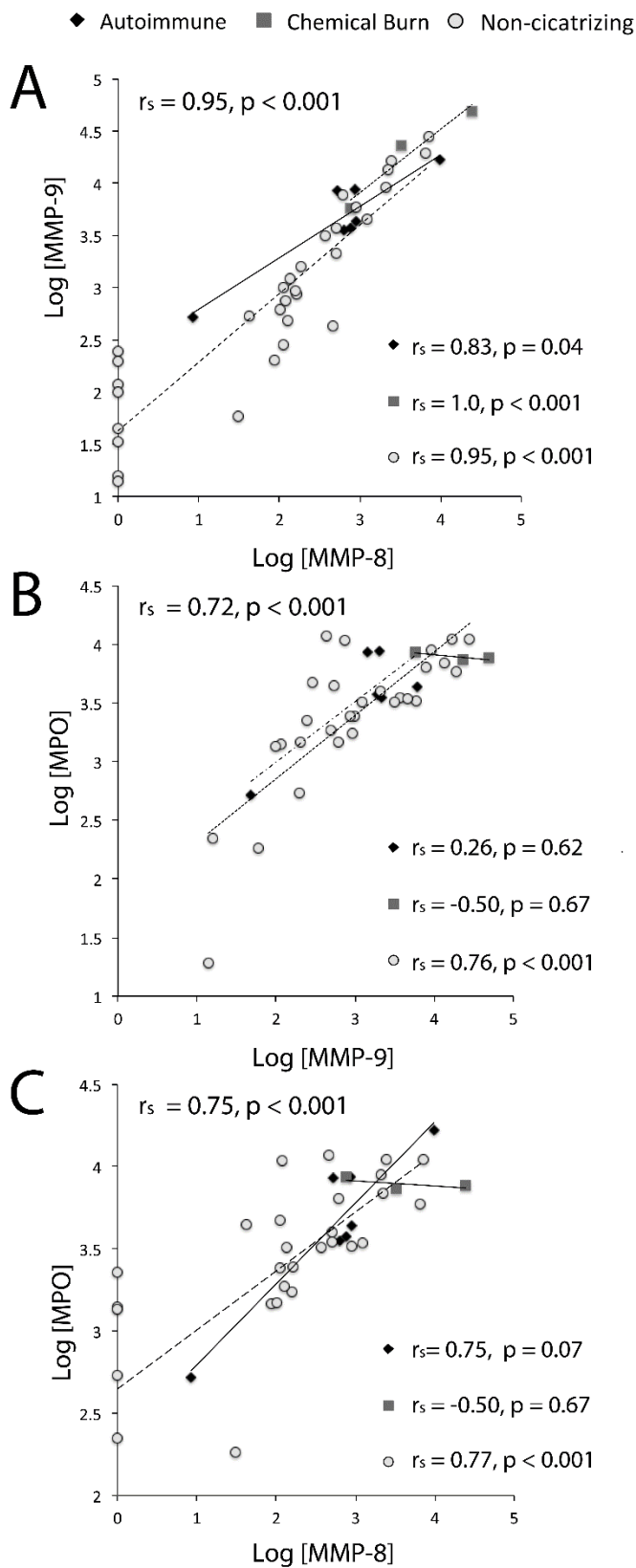




### ***Correlation between tear levels of MMP-8, MMP-9 and MPO***

Figure 2 depicts the correlation between MMP-8, MMP-9 and MPO levels in eyes with B-KPro for all three diagnostic categories. MMP-8 and MMP-9 were highly correlated across all eyes with B-KPro regardless of the diagnostic category ( $r = 0.95$ ,  $p = 0.00$ ). Strong and statistically significant correlations were also found for each of the diagnostic groups.

Strong and statistically significant positive correlation was found between MMP-9 and MPO and between MMP-8 and MPO across all B-KPro eyes and in eyes with non-cicatrizing diseases. The correlation between MMP-9 and MPO in eyes with autoimmune diseases or chemical burn was minimal. The correlation between MMP-8 and MPO was moderate in eyes with autoimmune diseases and minimal in eyes with chemical burn. Interestingly, while positive correlations were seen between MMP-9 and MPO and between MMP-8 and MPO across all B-KPro eyes as well as in the non-cicatrizing and autoimmune diseases subgroups, a negative correlation was obtained for the chemical burn group. Further, statistical significance was not achieved in the autoimmune diseases and chemical burn groups.



**Figure 2** – Scatter graphs illustrating the association between A) matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9; B) MMP-9 and myeloperoxidase (MPO) and C) MMP-8 and MPO. The Spearman rank correlation coefficient ( $r_s$ ) and p value for all eyes is shown in the upper left corner of each graph while values for each diagnostic category are shown down and to the right (autoimmune disease – black diamonds; chemical burn – dark gray squares; non-cicatrizing disease – light gray circles).

### ***Correlation of tear levels of MMP-8 and MMP-9 with TIMP-1 and total MMP activity***

There was no association between tear TIMP-1 level and underlying diagnosis ( $p=0.39$ ). The ratio of MMP-8 to TIMP-1 was higher in cicatrizing disease (SJS/TEN, atopy and chemical burn;  $3.6 \pm 5.9$ ) when compared to non-cicatrizing disease ( $1.7 \pm 3.2$ ) ( $p = 0.61$ ). Conversely, the ratio of MMP-9 to TIMP-1 was lower in cicatrizing disease ( $4.7 \pm 4.0$ ) when compared to non-cicatrizing disease ( $6.9 \pm 12.0$ ) ( $p = 1.00$ ). The ratio of the sum of MMP-8 and MMP-9 to TIMP-1 was  $5.4 \pm 4.5$  in cicatrizing disease and  $10.1 \pm 15.9$  in non-cicatrizing disease ( $p = 0.61$ ). The ratio of the sum of MMP-8 and MMP-9 to TIMP-1 was moderately correlated to total MMP activity ( $r = 0.64$ ,  $p = 0.002$ ).

### ***Regression analysis***

Univariate analysis did not identify any clinical factors with a statistically significant association with MMP-8, MMP-9 and MPO analyte levels or MMP activity. Using multivariate analysis, significant associations between clinical parameters and analyte levels were found for MMP-8 only. Prognostic category was associated with MMP-8 levels ( $p = 0.04$ ). A past or current history of sterile keratolysis was not associated with higher MMP levels.

Multivariate analysis including the levels of each analyte and MMP activity revealed significant association between MMP-8 and MMP-9 levels ( $p < 0.001$ ). MMP-8 and MMP-9 were each associated with total MMP activity ( $p < 0.001$  and  $p=0.003$ , respectively). However, MMP-8, MMP-9 and total MMP activity did not show statistically significant association with MPO ( $p = 0.918$ ,  $p = 0.571$  and  $p = 0.851$ , respectively).

### ***Bilateral disease***

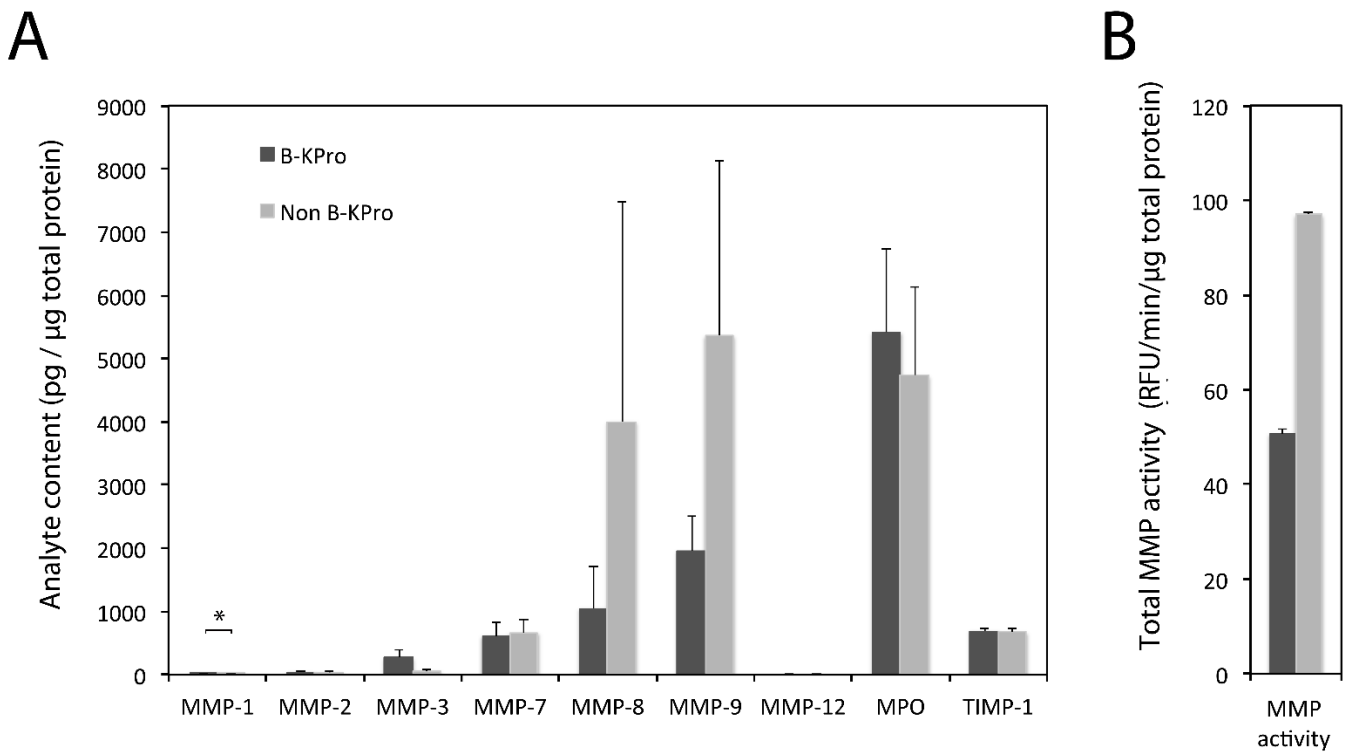
The analyte levels and total MMP activity in the tears of patients with bilateral disease and unilateral B-KPro are shown in Figure 3. Paired data was available for eyes with SJS/TEN (4 eyes), chemical burn (1 eye), vernal keratoconjunctivitis (1 eye), corneal edema (5 eyes), post-infectious scarring (2 eyes), keratoconus (2 eyes) and thermal burn (1 eye). Of these, the contralateral non B-KPro eyes had either had no prior corneal surgery (8 eyes), phthisis (4 eyes) or prior corneal transplantation (4 eyes). MMP-1 levels were 2-fold higher in eyes with B-KPro (0.25 +/- 0.06 pg/ $\mu$ g total protein versus 0.11 +/- 0.02 pg/ $\mu$ g total protein,  $p=0.04$ ). Interestingly, the other MMP levels were not significantly different between the B-KPro eye and contralateral non B-KPro eyes. In addition, both MMP-8 and MMP-9 were higher in the non B-KPro eye. Furthermore, there was no significant difference in analyte levels and total MMP activity between eyes of patients with bilateral disease and bilateral B-KPro (N=7).

### ***Repeat tear sampling analysis***

Tear collection and MMP, MPO and TIMP-1 analysis were performed twice in 17 B-KPro eyes. The interval between repeat tear collections was  $261 \pm 35$  days. Levels of MMP-8 ( $p = 0.34$ ), MMP-9 ( $p = 0.38$ ), MMP-12 ( $p = 1.00$ ), MPO ( $p = 0.38$ ) and TIMP-1 ( $p = 0.29$ ) did not vary significantly between repeat tear collections.

Repeat tear collection and sample analyses were performed on 10 non B-KPro eyes. The interval between tear collections was  $297 \pm 41$  days. There was no statistically significant difference between repeat measurements of MMP-8 ( $p = 0.36$ ), MMP-9 ( $p = 0.58$ ), MMP-12 ( $p = 1.0$ ), MPO ( $p = 0.21$ ) and TIMP-1 (0.35).

**Figure 3** –Bar graph showing the means of A) matrix metalloproteinase (MMP) -1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, myeloperoxidase (MPO) and tissue inhibitor of MMP-1 (TIMP-1) and B) total MMP activity in the tears of patients with bilateral disease but unilateral Boston keratoprosthesis type I (B-KPro). All values were standardized to total protein: A) picograms per microgram of total protein and B) relative fluorescent units per minute (RFU/min) per microgram of total protein. Levels were compared between paired eyes of the same patient using the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. \*P < 0.05; Error bars represent the standard errors of the mean.

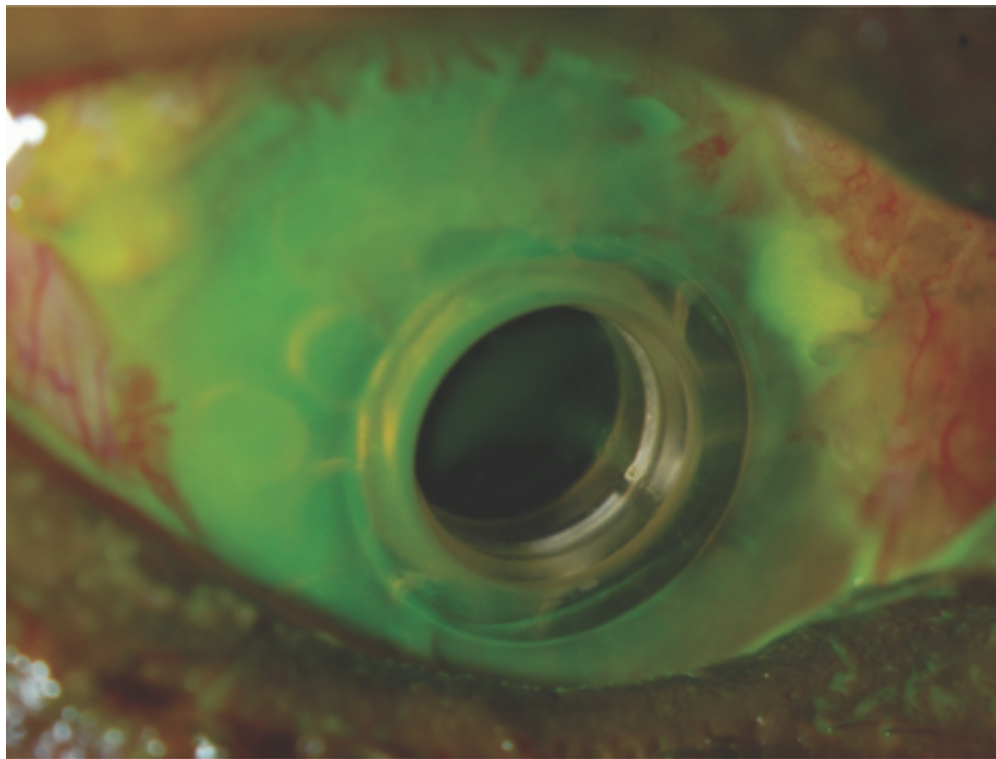


### ***Clinical correlation with sterile keratolysis***

While MMP-8 levels correlated with the prognostic category for B-KPro, no other clinical parameter could be clearly associated with tear MMP levels, including the presence of active corneal melting. Figure 4 illustrates the slit-lamp appearance and MMP levels of three eyes with active corneal melting. In these different examples with clinically significant corneal melt, MMP-8 and MMP-9 levels were variable. Tear collection was performed in one patient with aniridia and extensive corneal melt. At that time, MMP-8, MMP-9 and MPO levels were 128 pg/ $\mu$ g, 487 pg/ $\mu$ g and 1857 pg/ $\mu$ g, respectively. More than one year after the B-KPro surgery was repeated using a crosslinked carrier graft and in the absence of any clinical or optical coherence tomography evidence of melt,<sup>22</sup> the MMP-8, MMP-9 and MPO levels were similar at 64 pg/ $\mu$ g, 434 pg/ $\mu$ g and 2623 pg/ $\mu$ g, respectively.

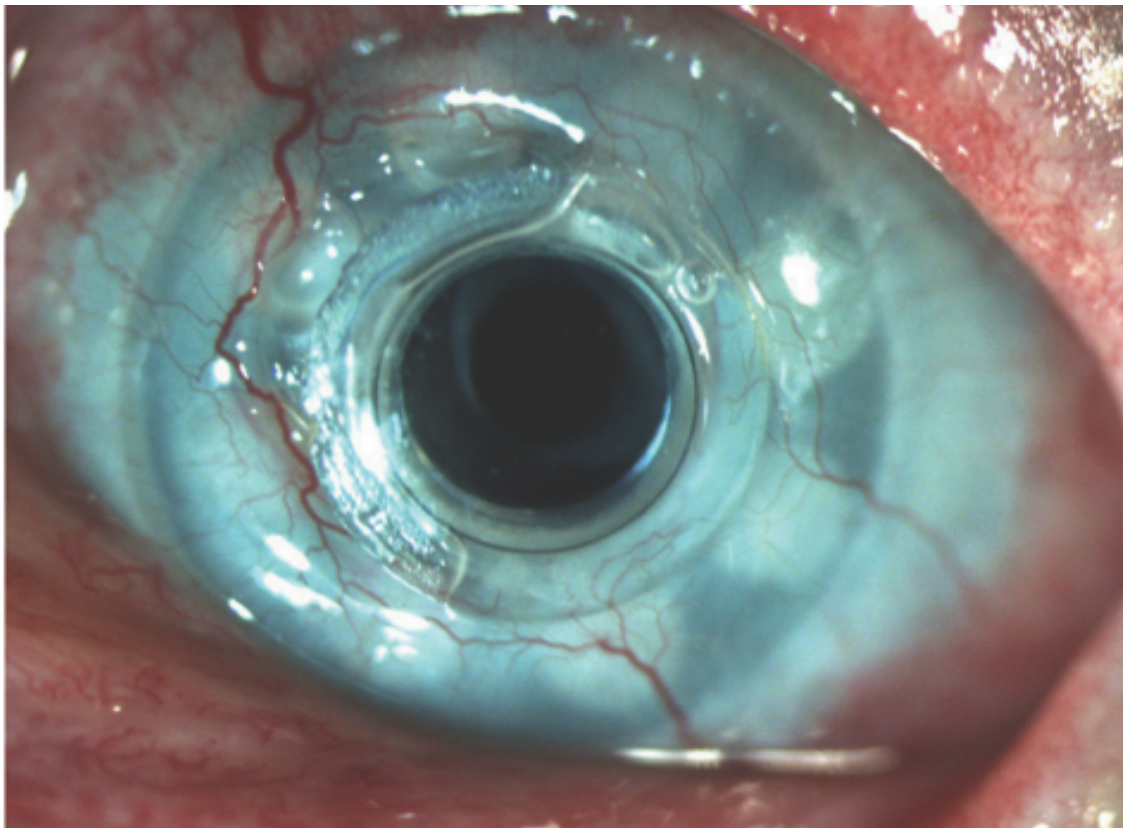
**Figure 4** – Slit lamp photographs of eyes with Boston keratoprosthesis type I (B-KPro) and clinically detectable melt on the day of tear collection. The tear level of matrix metalloproteinase (MMP) -8, MMP-9 and myeloperoxidase (MPO) are shown.

**A)** A 43-year old male with Stevens Johnson syndrome (SJS) developed active melting by postoperative 1 month when tear collection was performed. The MMP-9 level was above the detection limit of the assay (at least 1 489 pg/ $\mu$ g total protein).



MMP-8	MMP-9	MPO
9727 pg/ $\mu$ g	Over detection limit	16657 pg/ $\mu$ g

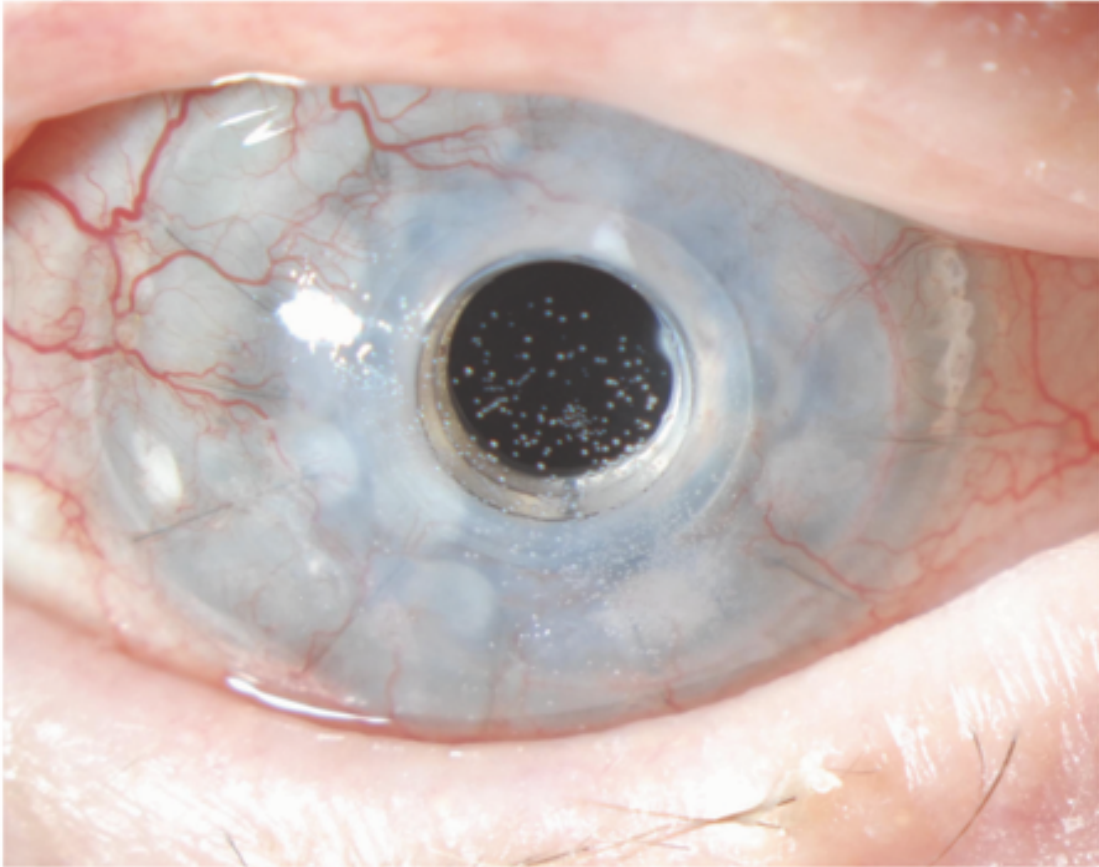
**B)** A 62-year old male with aniridia and bilateral B-KPro developed corneal melting with extensive exposure of the back plate on the day of first tear collection. Shortly after, the patient underwent repeat B-KPro. Tear collection was performed one year later when the patient had a stable ocular surface with no sign of melt. Tear MMP-8, MMP-9 and MPO levels, at 3, 22 and 131 pg/ $\mu$ g total protein, were very similar to those seen in the presence of active melt.



MMP-8	MMP-9	MPO
128 pg/ $\mu$ g	487 pg/ $\mu$ g	1857 pg/ $\mu$ g



C) A 75-year old female with SJS had mild thinning superiorly and contact lens deposits on the day of tear collection.



MMP-8	MMP-9	MPO
623 pg/ $\mu$ g	2176 pg/ $\mu$ g	3519 pg/ $\mu$ g

## **Discussion**

This study is the first to report the MMP, MPO, TIMP-1 and total MMP activity levels in the tears of patients with B-KPro. We identified a correlation between MMP-8 level and the prognostic categories for B-KPro surgery as well the presence of particularly high levels of MMP-8 and MMP-9 in B-KPro eyes with chemical burn. MMP levels in tears may be more closely associated with the underlying diagnosis of ocular surface disease than with the presence of a B-KPro. Furthermore, the presence of clinically significant corneal melt did not clearly correlate with higher MMP levels.

Yaghouti and coworkers established a well-defined prognostic hierarchy for B-KPro where eyes with underlying cicatricial diseases including SJS/TEN, ocular mucous membrane pemphigoid and chemical burn, in this order, had the poorest outcomes following B-KPro implantation. Indeed, it is commonly held that severe and ongoing ocular surface inflammation and the associated overexpression of mediators including MMPs lead to an increased vulnerability to corneal melt, periprosthetic leak and, ultimately, extrusion.<sup>23</sup> Our study identified that, contrary to the above prognostic hierarchy where autoimmune eyes fare the worse, B-KPro eyes with chemical burns had the highest tear levels of MMP-8 and MMP-9; the enzymes that are believed to be released from polymorphonuclear-derived cells and involved in stromal melting. This difference may be explained by the small sample sizes for the individual diagnostic categories and by the increased immunosuppression of patients with autoimmune disease. Indeed, 5 of the 7 patients with autoimmune disease and 0 of the 2 patients with chemical burns were on some form of immunomodulatory therapy.

Specific diagnoses with high tear levels of MMP-8 and MMP-9 included diagnoses with both significant limbal stem cell deficiency and a tendency for ocular surface breakdown. The absence of an epithelial barrier and/or presence of epitheliopathy predispose the exposed underlying stroma to ulceration by MMP dysregulation and their excessive release (and potentially MPO) from inflammatory cells. Conversely, pathologies that tend to spare the ocular surface epithelium had the lowest levels of MMP-8 and MMP-9. Interestingly, the one patient (2 eyes) with aniridia included in this study had low tear MMP levels, despite the presence of limbal stem cell deficiency and significant corneal melting in one eye (Figure 4B). Aniridia-associated keratopathy is a late sequelae of limbal stem-cell deficiency with an incidence of 20%.<sup>24</sup> It has been postulated that the corneal opacification that arises from repeated epithelial erosions and ulcerations may be caused by a deficiency in MMP-9 that results in fibrin accumulation and influx of inflammatory cells into the wound bed via chemotactic stimulus and blood vessel extravasation into the stroma.<sup>25</sup> Therefore, it is possible that corneal melting seen in aniridic patients may be the result of collagenolytic enzymes released primarily from stroma-infiltrating inflammatory cells.

Arafat and colleagues previously reported an association between MMP-8, MMP-9 and MPO in eyes with SJS, ocular mucous membrane pemphigoid as well as post-phacoemulsification controls.<sup>11</sup> Similarly, we demonstrated a strong correlation between tear levels of MMP-8 and MMP-9 across all diagnostic categories ( $r = 0.95$ ,  $p < 0.001$ ). The correlation between tear levels of MMP-8 and MPO ( $r = 0.75$ ,  $p < 0.001$ ) and MMP-9 with MPO ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.001$ ) were moderate and only significant in the non-cicatrizing subgroup. The lack of significance for autoimmune and chemical burn groups is likely related to the limited number of eyes included

in each category. MMP-8 and MMP-9 levels were also correlated with total MMP activity. MPO, while being responsible for MMP activation through the formation of reactive oxygen species, was not associated with total MMP activity.<sup>26</sup> The relationship between MMP-8 and MPO, which are both produced by neutrophils, and MMP-9, which may be produced by both epithelium and inflammatory cells, suggest that neutrophils are the predominant and common source of these enzymes.<sup>10 27</sup> This supports prior studies demonstrating that MMPs accumulated in tears were produced by granulocytes.<sup>28</sup> Indeed, neutrophils migrate from the limbal vasculature toward the sites of epithelial defect.<sup>29</sup> As degranulation products of these activated neutrophils, MMP-8, MMP-9 and MPO are thus likely to accumulate in the tear film and be recovered using the tear wash method. In contrast, epithelial production of MMP-9 is much more localized and found at the front of epithelium migrating to cover the wound bed.<sup>30</sup>

After B-KPro implantation, a “free” epithelial edge generally persists along the periphery of the front plate. This epithelium may either grow above or below the surface of the polymethyl methacrylate (PMMA) front plate.<sup>31</sup> The potential impact of these peri-prosthetic epithelial growth patterns on wound healing mechanisms and MMP-9 expression remain unknown. Further, the impact of the extended contact lens wear and the B-KPro front plate on the migration pattern of ocular surface neutrophils and MMP expression has not yet been elucidated. On the other hand, the presence of stromal inflammation appears to be increased in the presence of a keratoprosthesis. Indeed, implantation of a miniature keratoprosthesis (m-KPro) in the murine model has shown increased expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) as well as increased graft-infiltrating immune cells.<sup>32</sup> The m-KPro model

will likely be instrumental in improving our understanding of changes in the ocular surface microenvironment following B-KPro.

MMP, MPO and TIMP-1 levels were similar between eyes of patients with bilateral disease and unilateral B-KPro (Figure 3). This finding suggests that the tear MMP, MPO and TIMP-1 profile are more influenced by the underlying disease than by the presence or absence of a B-KPro. While the risk of corneal melt after B-KPro is tightly associated with the underlying diagnosis, the relationship between tear MMP level and the presence of corneal melt remains unclear. In this study, four eyes [SJS (2), aniridia (1) and Mooren's ulcer (1)] had varying degrees of clinically significant melt at the time of tear collection. Only one eye, as shown in Figure 4A, had significant elevation in the tear analyte profile. The three other eyes had MMP-8 and MMP-9 levels well below the average of all B-KPro eyes. Furthermore, one eye with globe-threatening corneal melting had an unchanged analyte profile before and one year after repeat B-KPro, in the setting of a stable carrier graft with no evidence of sterile keratolysis. This discrepancy may be explained by local differences in MMP levels. For example, tear MMP levels measured using the tear wash method may be independent from the MMP levels found in the stroma and along the B-KPro stem, where corneal melting occurs. Further, our study did not account for occult corneal melting that can be visible on anterior segment optical coherence tomography but undetectable at the slit lamp.

Another limitation in our study relates to the intrinsic limitations of tear collection methods, which include low tear volume as well as low tear protein recovery. Tear collection was performed using the tear wash method as this approach achieves higher total protein yield when

compared to capillary tear collection.<sup>17</sup> Schirmer strips may also be used to collect tears.<sup>33</sup> However, being similar to impression cytology, this technique collects cell protein and debris from the conjunctival surface in addition to tears. As this introduces bias and inconsistency in the measured tear analyte levels, Schirmer strips may not be a valid method of profiling analytes in tears. Despite the optimization of tear volume and protein recovery from the ocular surface using the tear wash method and the high sensitivity of the multianalyte profiling technique, the analysis of tear composition in samples from individual eyes remains a challenge. In this study, we were unable to obtain satisfactory data for 17% of measurements due to low protein recovery in tears or sampling errors of the multiplex analyzer. Further, because the tear wash method dilutes the tear film and the ocular surface proteins and allows for variable recovery of tear wash volume, the analyte profile is most accurately reported in picograms of analyte per microgram of total protein rather than in volumetric units. Hence, it is not possible to compare our data with other reports using capillary and Schirmer strip tear collection as well as with reports using the existing in-office test for MMP-9 levels.<sup>34</sup> Further studies comparing the yield and reliability of the different tear collection methods may help elucidate the local variation in MMP profile between the tears and ocular surface epithelium in eyes with clinically significant corneal melting.

In conclusion, eyes with B-KPro may have constitutively high tear levels of MMP-8, MMP-9 and MPO even years after the onset of disease and the B-KPro implantation. These analyte levels correlated more with an underlying diagnosis of ocular surface disease than with the presence of a B-KPro. While chronic ocular surface inflammation is associated with a higher clinical risk of corneal melting in B-KPro eyes, high tear MMP levels did not clearly associate

with sterile keratolysis. Tears may have a different profile of mediators when compared to the microenvironment of melting corneas for several reasons, including the presence of a protective contact lens and of the B-KPro itself. As eyes with chronic ocular surface inflammation and higher risk of melt (SJS/TEN, chemical burn) are also those that require visual rehabilitation with a B-KPro the most, further studies are needed to improve our understanding of the pathophysiology of keratoprosthesis-related melt. This knowledge will be crucial in the development of targeted MMP inhibitors to protect high-risk B-KPro eyes from the devastating consequences of corneal melting.

## References

1. Yaghouti F, Nouri M, Abad JC, et al. Keratoprosthesis: preoperative prognostic categories. *Cornea* 2001;**20**(1):19-23.
2. Sayegh RR, Ang LPK, Foster CS, et al. The Boston Keratoprosthesis in Stevens-Johnson Syndrome. *American Journal of Ophthalmology* 2008;**145**(3):438-44.
3. Palioura S, Kim B, Dohlman CH, et al. The Boston keratoprosthesis type I in mucous membrane pemphigoid. *Cornea* 2013;**32**(7):956-61.
4. Pujari S, Siddique S, Dohlman C, et al. The Boston keratoprosthesis type II: the Massachusetts Eye and Ear Infirmary experience. *Cornea* 2011;**30**(12):1298-303.
5. Harissi-Dagher M, Dohlman CH. The Boston Keratoprosthesis in severe ocular trauma. *Can J Ophthalmol* 2008;**43**(2):165-69.
6. Phillips D, Hager J, Goins K, et al. Boston type 1 keratoprosthesis for chemical and thermal injury. *Cornea* 2014;**33**(9):905-9.
7. Cade F, Grosskreutz CL, Tauber A, et al. Glaucoma in eyes with severe chemical burn, before and after keratoprosthesis. *Cornea*, 2011:1322-27.
8. Chang H, Luo Z, Chodosh J, et al. Primary implantation of type I Boston keratoprosthesis in nonautoimmune corneal disease. *Cornea* 2015;**34**(3):264-70.
9. Ciolino JB, Belin M, Todani A, et al. Retention of the Boston keratoprosthesis type 1: multicenter study results. *Ophthalmology* 2013;**120**(6):1195-200.
10. Fini ME, Cook JR, Mohan R. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch Dermatol Res* 1998;**290**:S12-23.



11. Arafat SN, Suelves A, Spurr-Michaud S, et al. Neutrophil collagenase, gelatinase, and myeloperoxidase in tears of patients with Stevens-Johnson syndrome and ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 2014;**121**(1):79-87.
12. Määttä M, Kari O, Tervahartiala T, et al. Elevated expression and activation of matrix metalloproteinase 8 in tear fluid in atopic blepharoconjunctivitis. *Cornea* 2008;**27**(3):297-301.
13. Sakimoto T, Ohnishi T, Ishimori A. Simultaneous study of matrix metalloproteinases, proinflammatory cytokines, and soluble cytokine receptors in the tears of noninfectious corneal ulcer patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014;**252**(9):1451-6.
14. Rohini G, Murugeswari P, Prajna N, et al. Matrix metalloproteinases (MMP-8, MMP-9) and the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in patients with fungal keratitis. *Cornea* 2007;**26**(2):207-11.
15. Lema I, Durán J. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology* 2005;**112**(4):654-9.
16. Barro C, Romanet J, Fdili A, et al. Gelatinase concentration in tears of corneal-grafted patients. *Curr Eye Res* 1998;**17**(2):174-82.
17. Gipson IK, Spurr-Michaud SJ, Senchyna M, et al. Comparison of Mucin Levels at the Ocular Surface of Postmenopausal Women With and Without a History of Dry Eye. *Cornea* 2011;**30**(12):1346-52.
18. Markoulli M, Papas E, Cole N, et al. The diurnal variation of matrix metalloproteinase-9 and its associated factors in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;**53**(3):1479-84.

19. Sack R, Sathe S, Beaton A, et al. Changes in the diurnal pattern of the distribution of gelatinases and associated proteins in normal and pathological tear fluids: evidence that the PMN cell is a major source of MMP activity in tear fluid. *Adv Exp Med Biol* 2002;**506**(Pt A):539-45.
20. Li D, Lokeshwar B, Solomon A, et al. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2001;**73**(4):449-59.
21. Grothusen C, Bley S, Selle T, et al. Combined effects of HMG-CoA-reductase inhibition and renin-angiotensin system blockade on experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2005;**182**(1):57-69.
22. Robert M, Arafat SN, Ciolino J. Collagen cross-linking of the Boston keratoprosthesis donor carrier to prevent corneal meltin in high-risk patients. *Eye Contact Lens* 2014;**40**(6):376-81.
23. Robert M, Dohlman C. A review of corneal melting after Boston Keratoprosthesis. *Semin Ophthalmol* 2014;**29**(5-6):349-57.
24. Tseng S, Li D. Comparison of protein kinase C subtype expression between normal and aniridic human ocular surfaces: implications for limbal stem cell dysfunction in aniridia. *Cornea* 1996;**15**(2):168-78.
25. Mohan R, Chintala S, Jung J, et al. Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J Biol Chem* 2002;**277**(3):2065-72.
26. Henderson B, Tyagi S. Oxidative mechanism and homeostasis of proteinase/antiproteinase in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2006;**41**(6):959-62.

27. Gordon G, Ledee D, Feuer W, et al. Cytokines and signaling pathways regulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in corneal epithelial cells. *J Cell Physiology* 2009;**221**(2):402-11.
28. Smith V, Rishmawi H, Hussein H, et al. Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br J Ophthalmol* 2001;**85**(2):147-53.
29. Wilson S, Mohan R, Mohan R, et al. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res* 2001;**20**(5):625-37.
30. Matsubara M, Zieske J, Fini M. Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;**32**(13):3221-37.
31. Shapiro BL, Cortés DE, Chin EK, et al. High-resolution spectral domain anterior segment optical coherence tomography in type 1 Boston keratoprosthesis. *Cornea* 2013;**32**(7):951-55.
32. Crnej A, Omoto M, Dohlman T, et al. Corneal inflammation after miniature keratoprosthesis implantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;**56**(1):185-9.
33. VanDerMeid K, Su S, Krenzer K, et al. A method to extract cytokines and matrix metalloproteinases from Schirmer strips and analyze using Luminex. *Mol Vis* 2011;**17**:1056-63.
34. Sambursky R, Davitt Wr, Latkany R, et al. Sensitivity and specificity of a point-of-care matrix metalloproteinase 9 immunoassay for diagnosing inflammation related to dry eye. *JAMA Ophthalmol* 2013;**131**(3):24-8.

## **Chapitre 5 : Présentation du deuxième article**

**Citation :** Robert MC, Spurr-Michaud S, Frenette M, Young D, Gipson IK, Dohlman CH. Stability and in vitro toxicity of an infliximab eye drop formulation. *Int J Pharm Compd.* 2014; 18(5) :418-26.

### **Chapitre 5.1: Problématique**

Tel qu'illustré au chapitre 3, les options de traitement de la fonte cornéenne post-B-KPro sont limitées. Plusieurs approches (lubrification, anti-inflammatoires, inhibiteurs des MMP) sont utilisées conjointement afin de maximiser la réponse au traitement. Cependant, le traitement médical seul est souvent insuffisant, nécessitant alors une approche chirurgicale.

Plusieurs rapports de cas ont illustré le potentiel de l'infliximab intraveineux à contrôler la fonte cornéenne associée ou non à la B-KPro.<sup>93-99,106-108</sup> Or, l'utilisation d'infliximab intraveineux offre certains défis. En premier lieu, l'infliximab doit s'administrer en milieu hospitalier pendant plusieurs heures et peut mener à des réactions infusionnelles graves. Cet agent biologique est également associé à de nombreux effets secondaires systémiques incluant des infections sévères, des néoplasies, l'insuffisance cardiaque et l'hépatite. Par ailleurs, bien que certaines étiologies de fonte cornéenne se méritent un traitement immunosuppresseur systémique, il existe souvent un déséquilibre entre l'intensité du traitement requis pour contrôler l'inflammation oculaire versus celui requis pour traiter l'inflammation systémique.

L'utilisation d'infliximab topique (en goutte ophtalmique) permettrait un contrôle local de l'inflammation et la possibilité d'ajuster plus rapidement la posologie selon la réponse clinique. Par ailleurs, l'utilisation d'une goutte ophtalmique minimiserait la dose requise du médicament (diminuant ainsi les coûts associés au traitement) et pourrait être associée à moins d'effets secondaires. Le choix de la concentration d'infliximab 10 mg/mL s'est basé sur une étude préalable utilisant l'infliximab topique 10 mg/mL chez un modèle murin de brûlure chimique.<sup>109</sup> Bien que des concentrations moindres ont été étudiées chez des modèles animaux d'œil sec (0.001%, 0.01% et 0.1%)<sup>110</sup> et de réaction à un corps étranger (1, 2, 4 mg/mL)<sup>111</sup>, l'intention de recherche était d'utiliser l'infliximab topique dans des pathologies très inflammatoires et similaires au modèle de brûlure chimique de Ferrari *et al.* Par ailleurs, en vue des difficultés d'absorption au niveau de la surface oculaire d'un anticorps de large taille (149 kDa), une concentration plus élevée (10 mg/mL) était préconisée.

## **Chapitre 5.2: Objectifs et hypothèses**

Les objectifs de cette étude étaient de développer une goutte d'infliximab 10 mg/mL (1%) pour utilisation chez les humains. Ainsi, la goutte devait se formuler selon les règles de l'United States Pharmacopeia (USP), satisfaire diverses exigences logistiques et ne pas être toxique pour la surface oculaire.

Plus spécifiquement, les objectifs étaient :

1. Démontrer la stérilité de la formulation

2. Démontrer la stabilité physique et biologique de l'infliximab lorsqu'utilisé selon les règles du USP 797 (réfrigération jusqu'à 9 jours et congélation jusqu'à 45 jours)
3. Évaluer la cytotoxicité de la goutte d'infliximab sur les cellules épithéliales cornéolimbiques humaines (HCLE)

L'hypothèse était que la goutte d'infliximab serait stable et non toxique.

### **Chapitre 5.3 : Analyses de laboratoire**

La pharmacie de recherche du MEEI a préparé l'inliximab 1% selon un protocole standard. Une solution contenant seulement le véhicule de la goutte (un mélange 50 :50 de normal salin 0.9% stérile et de Refresh Liquigel) a été préparée à titre de contrôle. Les solutions ont été conservées au réfrigérateur (+4°C) ou au congélateur (-20°C) de sorte à approximer les conditions de conservation de la goutte lors d'un usage « en vraie vie ». Les analyses ont été faites le jour de la formulation, après 9 jours et 45 jours de réfrigération ou congélation.

La stabilité physique a été évaluée via 1) l'apparence physique de la solution, 2) le pH, 3) l'absorbance et la diffusion (scattering) et 4) le patron de migration sur gel d'électrophorèse. L'apparence physique, incluant une appréciation de la couleur et de la clarté (turbidité/formation de précipités) est une façon grossière d'évaluer la stabilité de la solution. Le pH de la solution a été mesuré à l'aide de deux types de papier indicateur de pH disponible commercialement, de sorte à prendre avantage de deux échelles de mesures distinctes. Les mesures d'absorbance et de diffusion de la lumière ont permis d'évaluer plus précisément la formation de particules ou

de précipités dans la solution. Les spectres ultraviolet-visible-infrarouge ont été obtenus avec un spectrophotomètre diode alors que les données de diffusion ont été obtenues à l'aide d'un fluorimètre standard utilisant une lumière d'excitation et de détection (à 90 degrés) de 540 nm. De l'infliximab 1% bouilli (100°C pour 10 secondes) afin de dénaturer les protéines et de causer leur précipitation a été utilisé en tant que contrôle positif, démontrant l'impact de particules sur le spectre d'absorbance (menant à une augmentation de l'absorbance et une diminution de la transmission de la lumière) et la diffusion (augmentation de la lumière défléchie à 90 degrés). Enfin, l'électrophorèse des protéines a été utilisée afin d'évaluer toute dégradation des anticorps d'infliximab lors de la mise en solution ou lors du processus de gel et dégel. L'utilisation d'un détergent (SDS - sodium dodecyl sulfate) et d'un agent réducteur (2-mercaptoethanol) permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire sur le gel. La conservation des bandes originales et l'absence de trainée de protéines de faibles poids moléculaires suggèrent l'absence de dégradation de l'anticorps infliximab.

La stabilité biologique de l'infliximab repose sur sa capacité de lier son antigène, le TNF- $\alpha$ . Ainsi, un protocole d'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) spécifique au TNF- $\alpha$  a été modifié de sorte à quantifier le TNF- $\alpha$  libre et le TNF- $\alpha$  lié à l'infliximab. La solution d'infliximab 1% (diluée afin de demeurer dans l'intervalle de détection de l'ELISA) a d'abord été incubée avec une quantité connue de TNF- $\alpha$  afin de permettre une association anticorps-antigène. Puis, ce mélange a été analysé dans les microcuvettes du kit Quantikine® ELISA Human TNF- $\alpha$  Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) selon les recommandations du fabricant. Le TNF- $\alpha$  lié par l'infliximab est incapable de se lier aux

anticorps de la microcuvette. Il est donc éliminé lors des étapes de rinçage de l'ELISA. Seul le TNF- $\alpha$  libre est capturé dans la microcuvette et lié par l'anticorps secondaire. Ainsi, la réaction colorimétrique entre la peroxidase de raifort conjuguée à l'anticorps secondaire et le tetramethylbenzidine quantifie seulement le TNF- $\alpha$  non lié par l'infliximab. Par arithmétique simple (TNF- $\alpha$  initial - TNF- $\alpha$  libre = TNF- $\alpha$  lié par l'infliximab). L'activité biologique de l'infliximab se présente alors sous forme de pourcentage de TNF- $\alpha$  lié.

L'évaluation de la cytotoxicité a été effectuée sur une lignée cellulaire de la surface oculaire (HCLE). Des cellules confluentes et des cellules pré-confluentes ont été utilisées afin d'approximer les deux scénarios cliniques d'épithélium cornéen normal/complet et d'épithélium cornéen lésé, respectivement. La survie cellulaire a été évaluée séquentiellement sur 4 heures d'exposition à l'infliximab et aux solutions contrôle à l'aide de photographies microscopiques. Par ailleurs, des prélèvements du milieu de culture à 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 3 heures et 4 heures ont été analysés à l'aide du CytoTox 96 Nonradioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI). Cette analyse quantifie le nombre de cellules mortes via leur relâchement de lactate déshydrogénase dans le milieu de culture. Après 4 heures d'exposition, le nombre de cellules viables a été quantifié à l'aide du CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI), un protocole mesurant la conversion colorimétrique de tetrazolium en formazan par les cellules métaboliquement actives. Afin de corriger pour le nombre total de cellules dans chaque milieu de culture, la cytotoxicité a également été calculée en tant que ratio de cellules mortes par rapport aux cellules totales (mortes et viables) après 4 heures d'exposition à l'infliximab.



## **Chapitre 5.4 : Description de la contribution de chacun des auteurs**

Dans ce deuxième article, je présente un manuscrit décrivant une nouvelle goutte ophtalmique constituée d'infliximab 10 mg/mL. L'article rapporte la stérilité, la stabilité chimique et biologique ainsi que la toxicité cellulaire de la goutte suivant les recommandations du *United States Pharmacopeia 797* pour une préparation à risque moyen.

J'ai développé la recette de préparation en collaboration avec la pharmacie de recherche du Massachusetts Eye and Ear Infirmary. Par ailleurs, j'ai développé le protocole d'évaluation de la stabilité chimique de l'infliximab en goutte en collaboration avec Mathieu Frenette, un chimiste spécialisé en spectroscopie. J'ai développé et effectué les manipulations relatives au protocole d'évaluation de la stabilité biologique, en me basant sur la littérature existante et en consultation avec Sandra Spurr-Michaud et Ilene K Gipson. J'ai effectué les expériences de toxicité en collaboration avec Sandra Spurr-Michaud. J'ai fait l'analyse des données de stabilités biologiques et de toxicité ainsi que les tests statistiques associés. J'ai écrit le manuscrit et préparé les figures 1, 3-6. Après avoir coordonné les révisions des co-auteurs, j'étais responsable de la soumission et de la correspondance lors du processus de révision par les paires.

Sandra Spurr-Michaud est l'assistante du laboratoire au Dr Ilene K Gipson. Elle m'a enseigné les techniques de culture cellulaire pour la lignée de cellules épithéliales cornéolimbiques humaines (HCLE) et d'évaluation de la cytotoxicité de la goutte d'infliximab. Les expériences de cytotoxicité et leurs analyses ont été effectuées conjointement par Mme Spurr-Michaud et

moi-même. Elle a participé activement à la révision des ébauches du manuscrit.

Mathieu Frenette a élaboré et effectué l'évaluation de la stabilité chimique par spectroscopie de la goutte d'infliximab. Il a rédigé les sections du manuscrit relatives aux expériences de spectroscopie et a préparé la figure 2.

David Young est pharmacien au Massachusetts Eye and Ear Infirmary. Il a participé au développement de la recette de préparation de la goutte d'infliximab et des aspects logistiques associés. Il a par ailleurs été instrumental à l'application des recommandations du USP 797 dans l'évaluation de la goutte.

Les évaluations de stabilité biologique et de cytotoxicité ont été effectuées au laboratoire du Dr Ilene K Gipson au Schepens Eye Research Institute. Elle a guidé et supervisé ces analyses de laboratoire ainsi que la rédaction du manuscrit.

Le Dr Claes H Dohlman a eu l'idée originale de développer une goutte d'infliximab topique pour utilisation humaine. Il m'a mis en contact avec les personnes appropriées de la pharmacie de recherche afin de débiter les travaux et a supervisé l'ensemble de ce projet de recherche.

Le texte intégral de l'article ainsi que ses tableaux et figures sont présentés dans la prochaine section de ce chapitre. Les permissions respectives de tous les auteurs ainsi que de l'éditeur ont été obtenues.

## **Chapitre 5.5 : Stability and *in vitro* Toxicity of an Infliximab Eye Drop Formulation**

Marie-Claude Robert MD<sup>1</sup>, Sandra Spurr-Michaud MS<sup>1</sup>, Mathieu Frenette PhD<sup>2</sup>, David Young RPh<sup>1</sup>, Ilene K Gipson PhD<sup>1</sup>, Claes H Dohlman MD, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Massachusetts Eye and Ear Infirmary / Schepens Eye Research Institute, Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, Boston, MA

<sup>2</sup> University of Massachusetts – Boston, Department of Chemistry, Boston, MA

**Corresponding author:** Marie-Claude Robert, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, 243 Charles St Boston, MA. Phone : 1-617-573-3240, Fax: 1-617-573-4369. [Marie-Claude.Robert@MEEI.harvard.edu](mailto:Marie-Claude.Robert@MEEI.harvard.edu)

**Reprints:** Claes H Dohlman, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, 243 Charles St Boston, MA. Phone : 1-617-573-3240, Fax: 1-617-573-4369. [Claes.Dohlman@MEEI.harvard.edu](mailto:Claes.Dohlman@MEEI.harvard.edu)

**Conflict of Interest:** There are no conflicting relationships for any of the authors.

**Key Words:** Infliximab, tumor necrosis factor-alpha, eye drop, stability, ELISA

**Financial support:** This project was funded by the Boston Keratoprosthesis Foundation.

## Abstract

The purpose of this study was to develop a novel 10-mg/mL infliximab eye drop, to characterize its physical and biological stability under recommended storage conditions, and to assess the formulation's toxicity to ocular surface epithelium *in vitro*. Infliximab (10 mg/mL) was reconstituted using equal volumes of sterile water and 1% carboxymethylcellulose artificial tears. Aliquots were stored in either a 4°C refrigerator or -20°C freezer for up to 45 days. Physical stability was assessed through monitoring the solution's appearance, pH, ultraviolet-visible-near infrared absorbance and scattering, as well as protein gel electrophoresis. Biological stability was assayed through binding to tumor necrosis factor-alpha using an enzyme-linked immunosorbent assay. *In vitro* cytotoxicity to human corneal-limbal epithelial cells was examined following a 4-hour exposure to the study drug. Refrigerated and frozen infliximab eye drops remained clear and colorless for the duration of study. The formulation's pH (7.0) was comparable to that of the artificial tear vehicle alone. Low levels of ultraviolet-visible-near infrared light absorbance and scattering established the lack of protein precipitate after refrigeration or freezing. Protein gel electrophoresis performed under reducing conditions revealed the presence of two main protein bands of approximately 50 kDa and 25 kDa, representing immunoglobulin G (IgG) heavy and light chains. The migration pattern of the proteins did not change under the different storage conditions and between day 10 and 45 after formulation. Infliximab binding to tumor necrosis factor-alpha remained stable for up to 45 days, with conservation of 101% and 102% of its initial binding activity when refrigerated or frozen, respectively. *In vitro* HCLE cultures showed no increase in cytotoxicity with infliximab treatment when compared to vehicle and culture media controls ( $P > 0.05$ ). Infliximab can be formulated as an eye drop and remains stable when stored in accordance with current regulations

regarding compounded eye drops. The demonstrated physical and biological stability as well as *in vitro* innocuity of this infliximab eye drop formulation may facilitate future clinical investigation targeting tumor necrosis factor-alpha as a modulator of various ocular surface diseases.

## **Introduction**

Infliximab (Remicade; Janssen Biologics B.V., Leiden, The Netherlands) is a chimeric human-mouse monoclonal IgG antibody against tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). Infliximab binds to the E-F loop of TNF- $\alpha$  and, by overlapping with the TNF- $\alpha$  receptor (TNFR)-binding site, blocks the biological function of this cytokine.<sup>1</sup> As a biologic immunomodulator, infliximab is indicated for the treatment of severe systemic inflammatory diseases including rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, Crohn disease, ulcerative colitis, psoriatic arthritis and plaque psoriasis.<sup>2</sup> In addition, there is extensive clinical experience with the use of infliximab in uveitis.<sup>3-5</sup> Systemic administration of infliximab has also been reported to stabilize corneal melting in patients with autoimmune diseases (rheumatoid arthritis, Crohn disease, peripheral ulcerative keratitis) that were recalcitrant to other treatment modalities.<sup>4, 6-9</sup> Our interest in infliximab stems from our clinical experience with this drug in a few patients with rheumatoid arthritis or Stevens-Johnson syndrome and KPro-related sterile keratolysis. Over the years, infliximab was administered intravenously to several end-stage cases of post-KPro melt.<sup>10, 11</sup> The effect of these infusions was dramatic, halting inflammation as well as the melting process.

TNF- $\alpha$  is a pleotropic cytokine that has been identified as a therapeutic target in several ocular diseases. For example, topical formulations of infliximab have been studied in both mouse and rabbit models of ocular surface disease such as chemical burn, dry eye and corneal neovascularization.<sup>12-14</sup> These animal studies support the safety and efficacy of topical infliximab in inflammatory pathology. To date however, the topical use of infliximab in human subjects has not been reported. The logistics of preparing, dispensing and storing the eye drop for human studies are much more complex. Indeed, as a compounded sterile preparation, the

topical infliximab formulation must comply with USP (United States Pharmacopoeia) 797 regulations. For such moderate risk eye drop preparations, these regulations specify a storage limit of 9 days after formulation when refrigerated and of 45 days when frozen. As the stability of reconstituted infliximab solution following freeze-thaw has not been previously reported, the aim of this study was to analyze the physical and biological stability of infliximab when stored at -20°C for up to 45 days. In addition, the toxicity of the refrigerated and frozen formulation was evaluated *in vitro* using a human corneal-limbal epithelial (HCLE) cell line.

## **Materials and methods:**

### ***Infliximab formulation and storage:***

A vial of sterile lyophilized infliximab powder was obtained from Janssen Biologics. As described by the manufacturer, such vials contain 100 mg of infliximab, 500 mg of sucrose, 0.5 mg of polysorbate 80, 2.2 mg of monobasic sodium phosphate, monohydrate and 6.1 mg of dibasic sodium phosphate, dehydrate. The supplied powder does not contain preservatives.<sup>2</sup>

All compounding steps were performed in a sterile hood using aseptic technique. To dissolve the infliximab powder, 5 mL of sterile water without preservative was injected into the manufacturer provided vial, directing the stream of water toward the vial's glass wall. The vial was gently swirled to dissolve the lyophilized powder and allowed to stand for 5 minutes. Following this step, 5 mL of Refresh Liquigel® (Allergan, Irvine, CA) was also injected into the diluted infliximab vial. As 100 mg of infliximab are dissolved in a total 10 mL of fluid, the final concentration was 10 mg/mL or 1%. The infliximab 10 mg/mL solution was aliquoted into

10 x 1 mL eye drop bottles. Half of the bottles were kept in a 4 °C refrigerator and the others were stored in a -20 °C freezer.

Similarly, a 50:50 mixture of sterile water and Refresh® Liquigel artificial tears was aliquoted into 10 x 1 mL eye drop bottles to be used as vehicle control. Refresh® Liquigel contains 1% carboxymethylcellulose sodium, boric acid, calcium chloride, magnesium chloride, potassium chloride, purified water, PURITE® (stabilized oxychloro complex), sodium borate and sodium chloride. Its pH ranges from 7.0 to 7.4. PURITE® is a safe and gentle preservative that breaks down into sodium, chloride, oxygen and water on the ocular surface. The Refresh® Liquigel vehicle bottles were either refrigerated or frozen under the same conditions as the infliximab 10 mg/mL solution.

***Physical stability:***

The solution's appearance, pH, ultraviolet-visible-near infrared (UV-vis-NIR) absorbance and scattering spectra as well as protein migration pattern on gel electrophoresis were monitored over time to evaluate the physical stability of the infliximab eye drop. Frozen aliquots of infliximab and vehicle were thawed on the day of analysis.

Gross appearance of the infliximab solution was assessed through visual observation and digital photography. Because of the small volumes available for testing, pH analysis was performed using pH paper strips. Analysis of pH was performed on days 9, 27 and 45 after compounding. Two types of pH indicator papers were used for this purpose (Whatman pH indicator papers,



Dassel, Germany and ColorpHast pH-indicator strips, EMD Chemicals Gibbstown, New Jersey).

Light absorbance and scattering were used to quantitatively assess the formation of microscopic particles in solution on days 1, 9 and 45 after compounding. Infliximab 10 mg/mL (200  $\mu$ L) was mixed with 350  $\mu$ L of Refresh® Liquigel and 350  $\mu$ L deionized water and placed in a 1 cm pathlength quartz cuvette. The UV-vis-NIR absorbance spectra (250 to 1100 nm) was measured using a HP Agilent 8452 diode-array spectrophotometer (Hewlett-Packard, Andover, Massachusetts). Light scattering was used as complementary measurement of protein precipitation. Light scattering data was acquired using a standard fluorimeter (QuantaMaster™ 300, Photon Technology International, Birmingham, NJ) with 540 nm excitation and detection of scattered light at a 90° angle. After completing the measurements using the clear infliximab solution, the cuvette was then heated at 100°C for 10 seconds, leading to protein precipitation and increased cloudiness of the solution. Absorbance and scattering measurements were repeated using this heated solution to act as a positive control. Deionized water was used as a negative control.

Protein gel electrophoresis was performed on days 10 and 45 after compounding. Samples were prepared using reducing 2x Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, California) with  $\beta$ -mercaptoethanol. Samples of refrigerated and frozen infliximab were loaded at 1.25  $\mu$ g of infliximab per well and run on a Bio-Rad Mini-PROTEAN® TGX™ 4-20% gradient polyacrylamide gel. The gel was stained with GelCode® Blue stain reagent (ThermoScientific, Rockford, Illinois) following the manufacturer's recommendations.

***Biological stability:***

Biological stability was assessed through quantification of infliximab binding to its target, TNF- $\alpha$ , at 0, 9 and 45 days after compounding. A modified commercial sandwich ELISA assay (Quantikine® ELISA Human TNF- $\alpha$  Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) was employed as previously described.<sup>15</sup> This assay is validated for TNF- $\alpha$  concentrations between 15.6 pg/mL and 1,000 pg/mL, a range over which optical density varies linearly with concentration.

Briefly, both the refrigerated and frozen infliximab 10 mg/mL solutions were serially diluted to the following concentrations: 4000 ng/mL, 40 ng/mL and 0.4 ng/mL. Each of these infliximab concentrations was mixed with an equal volume of a known concentration of TNF- $\alpha$  (250 pg/mL). The final concentration of infliximab was thus 2000 ng/mL, 20 ng/mL or 0.2 ng/mL while the final concentration of TNF- $\alpha$  was 125 pg/mL. Calculation of the stoichiometric ratio between infliximab and TNF- $\alpha$  revealed an excess of infliximab molecules in solution for the three highest concentration of infliximab assayed. The stoichiometric ratios were 1880 :1 (4000 ng/mL infliximab : TNF- $\alpha$ ), 18.1:1 (40 ng/mL), and 0.188:1 (0.4 ng/mL).

The infliximab and TNF- $\alpha$  combination was incubated at room temperature for one hour to allow for antibody-antigen binding. The subsequent steps of the assay were performed in accordance with the ELISA immunoassay manufacturer's recommendations. A standard curve using TNF- $\alpha$  concentrations between 0 pg/mL to 250 pg/mL were prepared with each assay. The refrigerated and frozen infliximab dilutions that had previously been allowed to react with TNF- $\alpha$  were loaded in triplicate (200  $\mu$ L per well). The optical density (OD) of each well was

measured immediately after stopping the reaction using wavelengths of 450 nm and 540 nm. The readings at 540 nm were subtracted from those at 450 nm to correct for optical imperfections.

The OD reading correlates directly with the amount of free TNF- $\alpha$  in solution. Free-TNF- $\alpha$  is able to bind to the ELISA microplate. However, TNF- $\alpha$  captured by infliximab will not bind to the microplate antibody and will, instead, be removed during the wash steps of the assay. The amount of free TNF- $\alpha$  in pg/mL was calculated from the standard curve. The original amount of TNF- $\alpha$  allowed to react with infliximab was calculated using the standard curve and 125 pg/mL standards. The biological activity of infliximab was determined as the fraction of TNF- $\alpha$  that was bound by infliximab (measured 125 pg/mL vehicle control minus measured free TNF- $\alpha$ ) over the original amount of TNF- $\alpha$  allowed to react with infliximab (vehicle control containing 125 pg/mL of infliximab).

### ***Cytotoxicity***

The cytotoxicity of the infliximab eye drop was assessed *in vitro* using an immortalized human corneal epithelial (HCLE) cell line.<sup>16</sup> Cells cultured to pre-confluence were used to model cytotoxicity to immature or injured epithelium. Confluent and stratified cultures were used to model cytotoxicity to an intact, stratified epithelial barrier. Pre-confluent HCLE cells were plated in 12-well plates at a density of  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and incubated for 48 hours in a 37°C humidified, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Confluent cells were plated at a density of  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. After reaching confluence, the cell culture medium was supplemented with 10% calf serum

serum and epidermal growth factor to allow for stratification over the subsequent 3 days of culture.

The infliximab solution was diluted 1:50 in unsupplemented cell culture medium (DMEM/F12, Cellgro, MediaTech, Manassas, Virginia) yielding a final infliximab concentration of 200 µg/mL. The infliximab solution had been compounded 60 days prior and kept either refrigerated at 4°C or frozen at -20°C until the day of the exposure. Vehicle, diluted 1:50 in DMEM/F12 and DMEM/F12 alone, were used as negative controls. All cultures and assays were conducted in triplicate.

For the cytotoxicity assay, an aliquot of cell culture supernatant was collected from each well at the following time intervals: 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 3 hours and 4 hours. Total cell numbers were determined after the 4-hour exposure using a terminal cell proliferation assay. For this purpose, the CytoTox 96 Nonradioactive Cytotoxicity Assay and the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI) were used as previously described.<sup>17</sup> The cell number from the cytotoxicity assay quantifies the amount of dead cells that have lysed and released lactate dehydrogenase (LDH) into the cell culture supernatant. The Cell Titer assay yields the number of viable cells in culture at the 4-hour (terminal) time point. Cell culture photography was performed serially after 2-, 3- and 4-hour exposures to monitor for cytopathological effects.

Optical density readings from both the cytotoxicity and Cell Titer assays were converted into cell numbers following determination of a standard curve. The linear equation for the

cytotoxicity standard curve was  $X = (OD - 0.10945) / 3.72406 \times 10^{-5}$  where X is the number of cells and OD is the optical density reading at 490 nm ( $R^2 = 0.9952$ , valid for X = 0 to  $10^5$  cells). Similarly, the linear fit for cell titer was  $X = (OD - 0.0856) / 2.93628 \times 10^{-6}$  ( $R^2 = 0.9777$ , valid for 0 to 300 000 cells).

### ***Data analysis and statistics***

The biological activity of refrigerated and frozen infliximab was compared at each of the 0-, 9- and 45-day time points. To determine if biological activity decreases over time, the amount of TNF- $\alpha$  inhibition was compared for each of the storage conditions (0 versus 9 versus 45 days for refrigerated infliximab and 9 versus 45 days for frozen infliximab).

Cytotoxicity was compared between treatments at each time point (15 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 3 hours and 4 hours). As well, time points were compared within each treatment to assess for increasing cytotoxicity over time. The total number of viable cells after 4-hour exposure was examined for each treatment. To account for potential differences in cell number between wells, cytotoxicity data was reported as the number of dead cells over the amount of total cells (dead + viable) at the 4-hour time point.

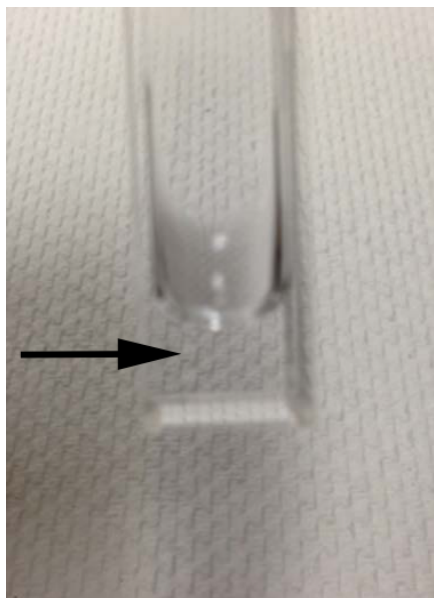
The nonparametric Kruskal-Wallis test was used in all cases. To account for the possibility of errors in inference for multiple comparisons, Dunn's multiple comparisons test was performed for each pair of the testing conditions if the p-value calculated by Kruskal-Wallis was below 0.05. Statistical analysis was performed using InStat 3.10 statistical software (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significance was determined when the 2-tailed P value

exceeded 0.05.

## Results

### *Physical stability*

The infliximab 10 mg/mL eye drop solution was colorless and transparent on the day of compounding. These physical properties were maintained when refrigerated at 4°C or frozen at -20°C for 45 days after compounding (Figure 1).



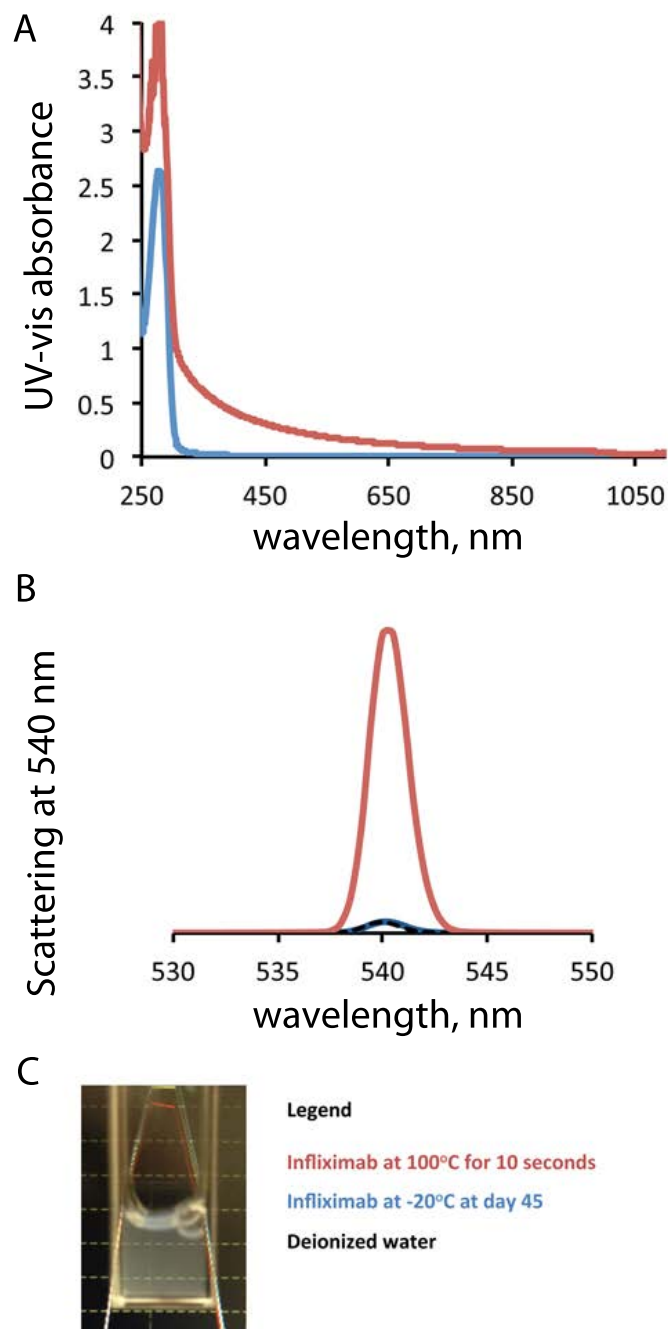
**Figure 1:** Infliximab 10 mg/mL eye drop was thawed placed in a quartz cuvette after freezing at -20°C for 45 days. The solution is clear with no visible particles in suspension, allowing for visualization of the details and pattern of the underlying paper.

The pH of the infliximab solution and the vehicle was 6.9 when using the Whatman pH paper strips and 7.0 when using the ColopHast pH indicator strips. This pH was maintained at days 9, 27 and 45 after compounding. There was no difference in pH between the refrigerated or frozen infliximab and vehicle.

The UV-vis-NIR absorbance and scattering spectra of infliximab stored at 4°C for 1 and 9 days as well as infliximab stored at -20°C for 45 days were superposable. As such, only the spectra obtained at day 45 are shown in figure 2. Infliximab showed an absorbance peak around 250 nm, relating to the typical absorbance of protein at this wavelength range (Figure 2A). The remaining spectra showed negligible baseline absorption, indicating that all visible light gets through the infliximab sample. There was a marked increase in the absorbance of the heated infliximab sample. This increased absorbance is due to the presence of protein precipitates caused by the heat denaturation of infliximab. It served as a control for the validity of this assay as a test for stability (Figure 2C). Similarly, there was minimal scattering of light by the refrigerated or frozen infliximab solution but scattering increased significantly after the sample was heated to 100°C (Figure 2B).

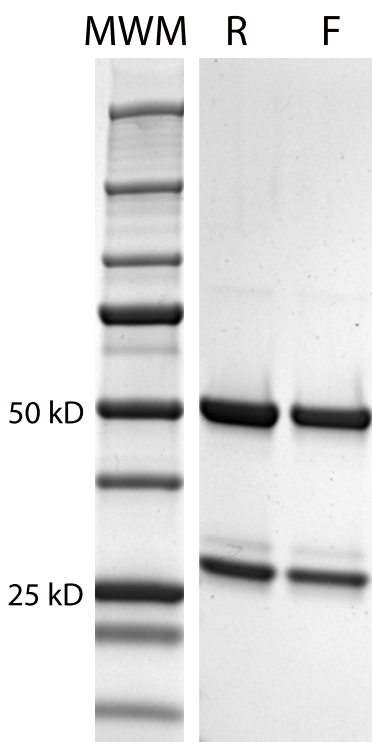
**Figure 2:**

A) Ultraviolet-visible-near infrared (UV-vis-NIR) spectra of the infliximab solution following freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 45 days. The infliximab eye drop (blue tracing) has a negligible baseline, meaning that all visible light gets through the sample. Upon heating for 10 seconds in boiling water (red tracing), the protein precipitates and a corresponding increase in visible absorbance is seen. B) The scatter of visible light (540 nm) at 90 degrees from the incident beam is shown. The infliximab eye drop reveals a low level of scattering while a marked increase is seen after heating. C) Color photograph showing increased cloudiness and opacity of the boiled infliximab positive control. The same experiment was performed using refrigerated infliximab eye drop at 1 and 9 days after formulation. Both UV-vis-NIR and scattering spectra were superposable to those presented here.





The protein gel electrophoresis band pattern was similar for refrigerated and frozen infliximab at days 10 and 45 after formulation. Staining revealed two main bands at approximately 50 kDa and 25 kDa size, which is typical of human immunoglobulin G (IgG). There was an additional faint band between the 100 and 75 kDa molecular weight markers as well as one slightly upstream to the 25 kDa band (Figure 3).



**Figure 3:** Protein gel electrophoresis of the infliximab eye drop after 10 and 45 days of refrigeration (R) or freezing (F). The two main bands, at approximately 50 kDa and 25 kDa size, are typical of human immunoglobulin G heavy and light chains, respectively. The faint bands of higher molecular weight may represent the different migration patterns for the major glycoforms of infliximab.

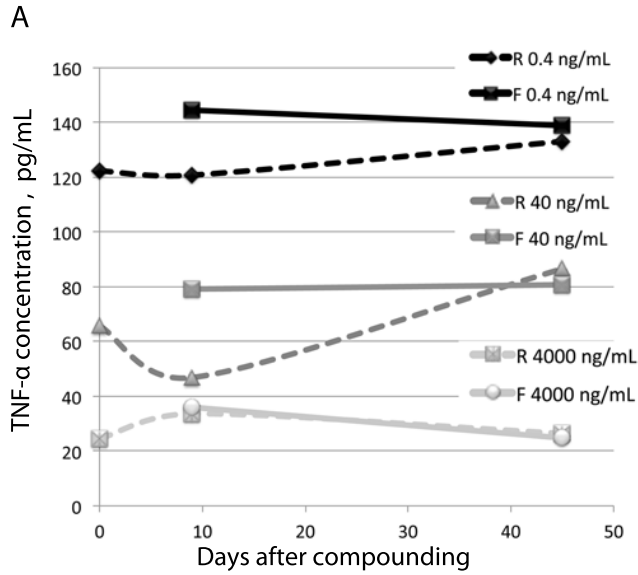
### ***Biological stability***

The binding stability of infliximab to TNF- $\alpha$  following refrigeration or freezing for up to 45 days was monitored using a modified sandwich ELISA assay. Infliximab-bound TNF- $\alpha$  forms a stable complex that does not bind to the antibody-coated ELISA microplate. Consequently,

the assay quantifies the amount of free TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  not bound by infliximab). The biological activity of infliximab can therefore be calculated as the decrease in TNF- $\alpha$  measured by the assay in relation to the known amount of TNF- $\alpha$  initially participating in the reaction with infliximab.

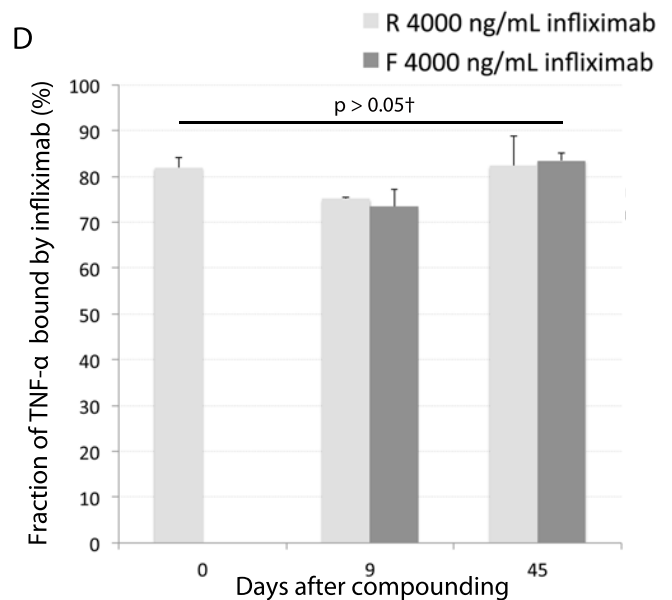
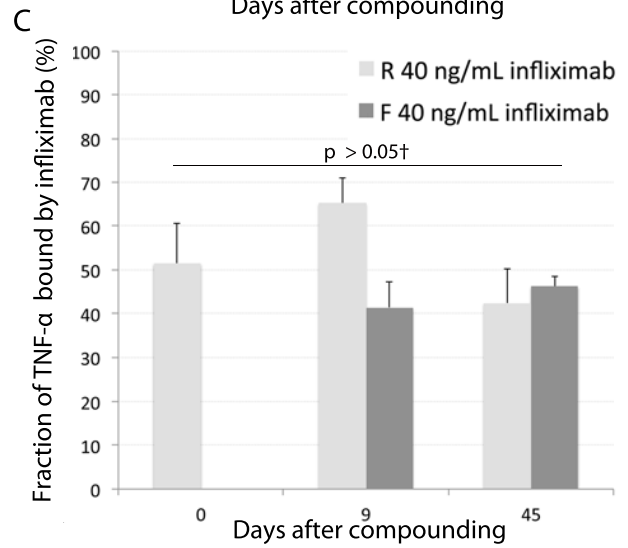
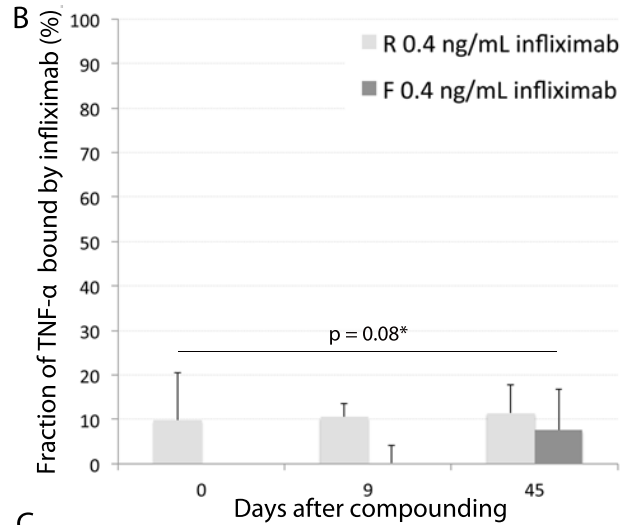
Figure 4 demonstrates the biological stability data of refrigerated and frozen infliximab at 0, 9 and 45 days after compounding. In addition, table 1 provides assessment of TNF- $\alpha$  binding activity using the 4000 ng/mL concentration of infliximab. This concentration was chosen for analysis because of the lower risk of dilution error. As shown in Table 1, the percentage of TNF- $\alpha$  inhibited by refrigerated infliximab (4000 ng/mL) was 82% on day 0, 75% on day 9 and 82% on day 45 ( $p > 0.05$ ). TNF- $\alpha$  inhibition by frozen infliximab (4000 ng/mL) was 73% at day 9 and 83% on day 45 ( $p > 0.05$ ). Therefore, there was no loss of TNF- $\alpha$  inhibition over time for either storage condition. In addition, there was no statistically significant difference in TNF- $\alpha$  inhibition between refrigerated and frozen infliximab for each of the 9- and 45-day time points ( $p > 0.05$ ).

Similar results were obtained with analysis of the 0.4 ng/mL and 40 ng/mL infliximab concentrations. On average, 8% (range 0% to 11%) and 49% (range 42% to 65%) of TNF- $\alpha$  was inhibited using infliximab 0.4 ng/mL and 40 ng/mL, respectively. As before, there was no statistical difference between the different time points and conservation temperature (refrigerated versus frozen) for these dilutions.



**Figure 4** : A) Free tumor necrosis factor-alpha (TNF-  $\alpha$ ) following reaction with infliximab 0.4 ng/mL, 40 ng/mL and 4000 ng/mL, which was either refrigerated (R, complete line) or frozen (F, dashed line). A lower TNF- $\alpha$  concentration indicates more binding by infliximab. B, C and D) Fraction of TNF- $\alpha$  inhibited by infliximab 0.4 ng/mL (B), 40 ng/mL (C) and 4000 ng/mL (D) when refrigerated for 0, 9 or 45 days (R, pale gray) and when frozen for 9 or 45 days (F, dark gray). P-values are shown.

\* Kruskal-Wallis test † Dunn's multiple comparisons test.



**Table 1. Biological Stability of Topical Infliximab Formulation When Refrigerated or Frozen for 45 Days.**

Variable <sup>a</sup>	Storage Time (Days)					P-value <sup>b</sup>
	0	9		45		
	Refrigerated	Refrigerated	Frozen	Refrigerated	Frozen	
Measured TNF- $\alpha$ concentration, mean +/- SD (pg/mL)	25 +/- 3	34 +/- 0.3	36 +/- 5	26 +/- 10	25 +/- 2	>0.05
TNF- $\alpha$ consumed, mean +/- SD (pg/mL) <sup>c</sup>	111 +/- 3	101 +/- 0.3	99 +/- 5	124 +/- 10	125 +/- 2	>0.05
Percentage of TNF- $\alpha$ consumed by reaction with infliximab <sup>d</sup>	82 +/- 2	75 +/- 0.2	73 +/- 4	82 +/- 6	83 +/- 2	>0.05
Percentage of initial infliximab activity remaining <sup>e</sup>	100	92	90	101	102	

<sup>a</sup>Means and SDs calculated from triplicate assays

<sup>b</sup>Dunn's multiple comparisons test

<sup>c</sup>The consumption of TNF- $\alpha$  was calculated by subtracting the TNF- $\alpha$  concentration measured in the vehicle control (containing 125 pg/mL of TNF- $\alpha$ ) from the TNF- $\alpha$  concentration of samples where TNF- $\alpha$  125 pg/mL was reacted with infliximab.

<sup>d</sup>The percentage of TNF- $\alpha$  consumed by infliximab was calculated by dividing the amount of TNF- $\alpha$  consumed by the TNF- $\alpha$  concentration in the vehicle control.

<sup>e</sup>The percentage of initial infliximab activity remaining was calculated by dividing the percentage of TNF- $\alpha$  consumed by the percentage of TNF- $\alpha$  consumed at baseline (day 0, 82%).

*Note: TNF- $\alpha$  consumption by infliximab and thus, the integrity of antibody-antigen binding, was quantified using a validated enzyme-linked immunosorbent assay.*

SD = standard deviation; TNF- $\alpha$  = tumor necrosis factor alpha

### ***Cytotoxicity***

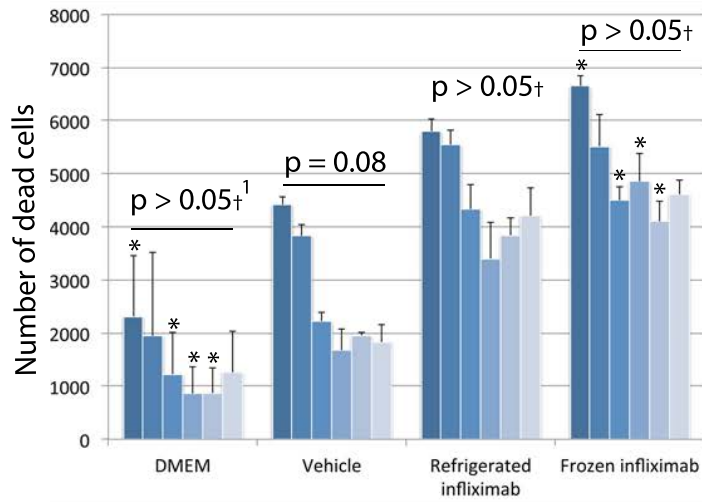
There was no significant difference in cytotoxicity for the different treatments (DMEM/F12, vehicle, refrigerated infliximab or frozen infliximab) for either pre-confluent or confluent and stratified HCLE cells (Figure 5A and 5B). Further, there was no significant increase in cytotoxicity over time for pre-confluent cells exposed to any treatment. While Figure 5B illustrates a potential increase in cytotoxicity over time for confluent cells, this difference was not statistically significant. Normal desquamation of apical stratified cells from the cultures may be responsible for this apparent increase in cell death. As seen in Figure 5C, there were only minimal differences in the total viable cell number after 4 hours of treatment ( $p = 0.35$  and  $p = 0.58$ , for pre- and post-confluent cells, respectively). Dead cells represented  $1.8 \pm 2.0\%$  (DMEM/F12) to  $5.3 \pm 0.7\%$  (frozen infliximab) of total pre-confluent cells ( $p > 0.05$ ) and  $15.8 \pm 1.8\%$  (DMEM/F12) to  $24.4 \pm 2.4\%$  (refrigerated infliximab) of total confluent cells ( $p > 0.05$ ) (Figure 5D). Light microscopy of pre-confluent and confluent, stratified cell cultures did not detect any cytopathologic effect of infliximab when compared to controls (Figure 6).

**Figure 5:** *In vitro* cytotoxicity and cell number of human corneal-limbal epithelial (HCLE) cells exposed to refrigerated or frozen infliximab 200 µg/mL, vehicle or culture medium (DMEM/F12). A) Cytotoxicity, represented the number of dead cells, to pre-confluent cells exposed to each treatment for 15 and 30 minutes as well as 1, 2, 3 and 4 hours. There was no increase in cytotoxicity over time except for (1) the DMEM exposure comparing 15 minutes to 3 hours. Asterisks (\*) indicate statistically significant differences in cytotoxicity between DMEM and frozen infliximab at 15 minutes, 1, 2 and 3 hours but not at other time points. B) Cytotoxicity to confluent cells under the same exposures as in A). The apparent increase in cytotoxicity over time was not statistically significant except for (2) the refrigerated infliximab exposure comparing 30 minutes to 4 hours. The asterisk indicates a statistically significant difference in cytotoxicity between DMEM and frozen infliximab at 30 minutes only. These statistically significant differences are not consistent with other time points measured. C) Cell number of pre-confluent and confluent, stratified HCLE cells following 4-hour exposure to each treatment. D) Cytotoxicity after 4-hour exposure relative to total cell count (dead + viable cells) demonstrating no significant increase of cytotoxicity after exposure to vehicle, refrigerated or frozen infliximab when compared to standard cell culture medium.

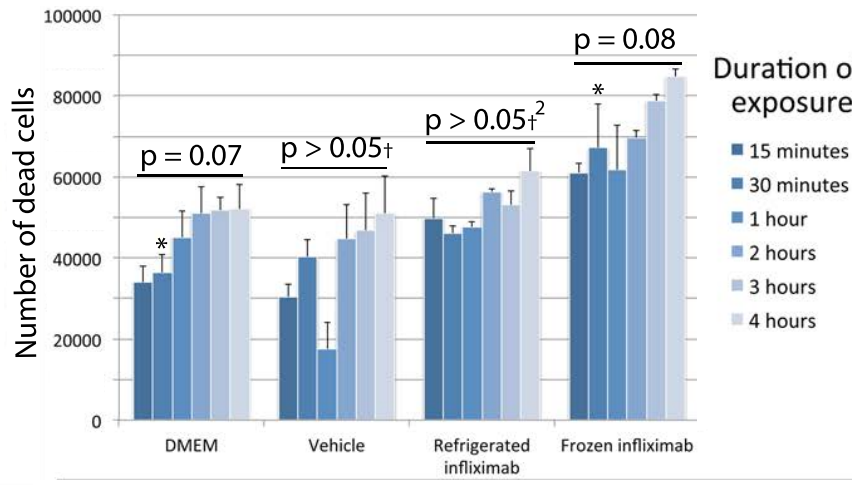
Voir page suivante pour la figure

**Figure 5 :**

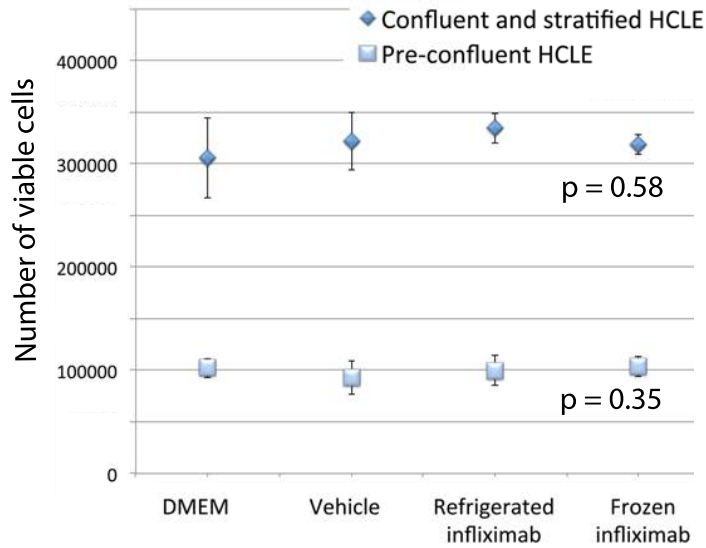
**A - Cytotoxicity, pre-confluent HCLE cultures**



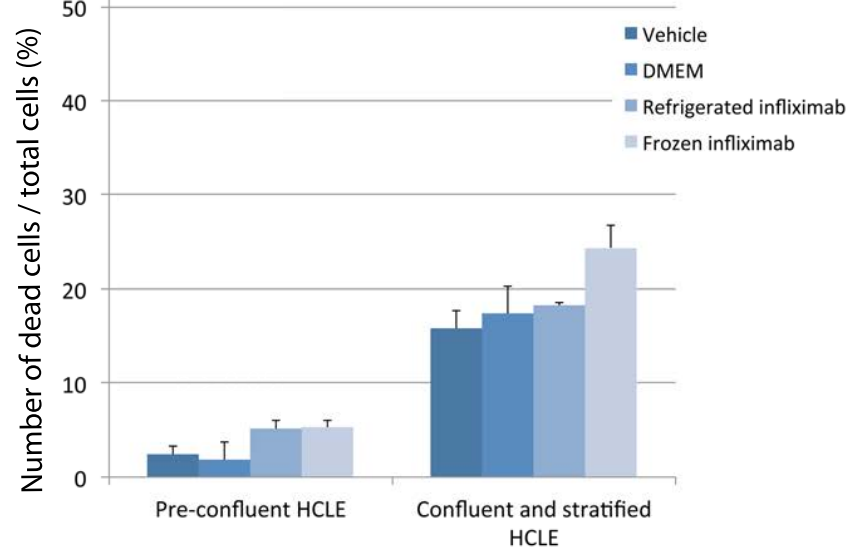
**B - Confluent and stratified cultures**



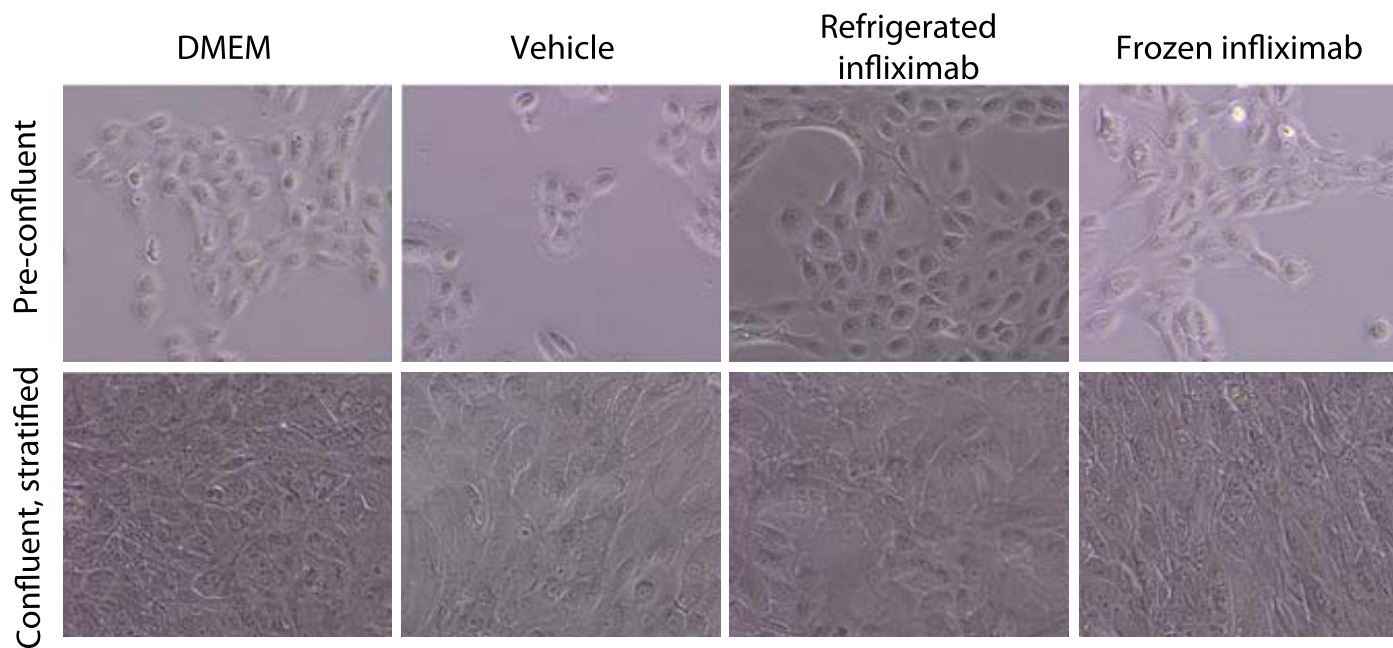
**C - Cell number**



**D - Cytotoxicity in relation to total cell number**



**Figure 6** : Confluent and pre-confluent cell culture photographs (10X) demonstrating the similar cellular morphology following a 4-hour exposure to DMEM, vehicle, refrigerated infliximab or frozen infliximab.



## Discussion

We describe the formulation of a novel infliximab (10 mg/mL) eye drop and demonstrate that it is physically and biologically stable when prepared and stored under current federal regulations (USP 797) that specify a storage limit of 9 days when refrigerated and of 45 days when frozen. Further, we establish that the infliximab eye drop is non-toxic to cultured ocular surface epithelium when compared to cell culture media and vehicle controls.



Demonstration of a stable and non-toxic infliximab eye drop is relevant as there is increasing interest in TNF- $\alpha$  as a therapeutic target for several ocular surface diseases. Indeed, several case reports support the use of intravenous infliximab to stabilize severe corneal inflammation and keratolysis such as seen in peripheral ulcerative keratitis (PUK) and KPro-related melt.<sup>6-11</sup>

As the eye is readily accessible for the direct delivery of therapeutics, many eye diseases are treated locally, using eye drops or periocular injections. As such, alternative routes of infliximab administration have already been considered for the treatment of ocular conditions. For example, human studies have investigated the use of intravitreal infliximab for the treatment of refractory choroidal neovascular membranes and diabetic macular edema.<sup>18, 19</sup> Unfortunately, intravitreal infliximab failed to show a beneficial effect and provoked severe uveitis in approximately 40% of patients. A moratorium has been recommended against the use of intravitreal infliximab outside of well-designed trials.<sup>20</sup> To our knowledge, the use of topical infliximab eye drops has only been studied in animal models. For example, topical 10 mg/mL infliximab proved to have pleotropic beneficial effects in a mouse model of alkali burn. These included reductions in corneal opacity, perforation as well as eyelid fibrosis when compared to saline only.<sup>12</sup> Using immunofluorescence microscopy, the researchers demonstrated good corneal penetration of topical infliximab when the epithelium is inflamed or disrupted by chemical burn or mechanical removal. While non-toxic to the ocular surface, infliximab did not penetrate mouse corneas with intact epithelium. In a mouse model of dry eye, treatment with topical infliximab 0.01 and 0.1% improved tear volume, corneal surface regularity and goblet cell density while decreasing the levels of inflammatory cells and cytokines.<sup>14</sup> In another study, topical infliximab prevented neovascularization of rabbit corneas following the placement of a

central suture.<sup>14</sup> These animal studies suggest that the topical use of infliximab is safe and beneficial for a wide variety of ocular surface disease. However, to date, human studies are lacking.

According to the manufacturer's recommendations, infliximab should be infused intravenously within 3 hours of preparation. However, previous investigations have demonstrated the stability of infliximab under different storage conditions. Ikeda *et al.* determined that infliximab was stable when stored in polyvinyl chloride (PVC) bags at 4°C for 14 days.<sup>15</sup> These investigators discuss the importance of assessing the stability of monoclonal antibodies through quantification of binding activity to their respective target molecules. As well, they describe and validate the ELISA-based protocol used in the current study. Beer *et al.* demonstrated the stability of 10 mg/mL infliximab for up to six weeks when refrigerated at 4°C.<sup>21</sup> The purpose of this latter study was to facilitate drug compounding for intravitreal use. While these studies establish the stability of refrigerated infliximab over several weeks, our study is the first to demonstrate the stability of infliximab in an eye drop formulation following freeze-thaw. We further characterized the eye drop formulation's physical and biological stability. Gross appearance, pH, UV-vis-NIR absorbance and scattering and protein gel electrophoresis, as well as TNF- $\alpha$  binding, remained stable after refrigeration or freezing for up to 45 days. *In vitro* cytotoxicity did not differ significantly from that of standard HCLE cell culture media nor from the eye drop's artificial tear vehicle. The importance of this demonstration lies in the current legislation regarding compounded drugs and eye drops. To be practical and cost-effective, prolonged refrigeration and freezing of drug formulations will be required to proceed with human studies using infliximab eye drops. Indeed, while the animal studies presented above suggest a benefit

of topical infliximab eye drops, only human studies will establish the exact role of TNF- $\alpha$  modulation in the treatment of ocular surface diseases.

Notably, dry eye disease has been associated with elevated levels of TNF- $\alpha$  in tears.<sup>22</sup> *In vitro* studies have shown that TNF- $\alpha$  induces ectodomain release of the membrane-associated mucins MUC1 and MUC16 which may lead to increased tear film instability, earlier break up time and impaired ocular surface barrier function.<sup>23</sup> TNF- $\alpha$  is also a potent inducer of matrix metalloproteinases (MMP), which lead to corneal matrix degradation, ulceration and melting.<sup>24</sup> <sup>26</sup> Inhibition of MMPs may explain the remarkable effect of intravenous infliximab in melting corneal disorders such as PUK. In the cornea, TNF- $\alpha$  recruits and mobilizes antigen presenting Langerhans cells at the limbus and induces their migration into the central cornea.<sup>27</sup> As such, TNF- $\alpha$  inhibition may have an important role in mediating corneal allograft rejection.<sup>28, 29</sup>

The topical administration of infliximab for such diseases may have several advantages. First, an eye drop delivers high concentrations of the medication locally while exposing the patient to significantly lower doses. Punctal occlusion may decrease systemic absorption, further reducing the risk of systemic adverse events such as opportunistic infections and malignancy. Also, the topical administration of infliximab, in contrast to intravenous administration, does not require prolonged infusions in a hospital setting and spares the patient from the risk of infusion reactions.

## **Conclusion**

In conclusion, we describe the formulation of a stable and non-toxic infliximab eye drop. Investigations using topical infliximab in animal models also suggests that topical administration is safe and effective for several ocular surface diseases. However, well-designed human subjects research are needed to substantiate these preliminary findings.

**Acknowledgments:** The authors want to thank Judy Yee and Christine Finn from the MEEI pharmacy who were instrumental in the development of the infliximab eye drop formulation.

## References:

1. Liang S, Dai J, Hou S et al. Structural basis for treating tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-associated diseases with the therapeutic antibody infliximab. *J Biol Chem* 2013; 288(19): 13799-807.
2. [No author listed]. Remicade prescribing information. [Jansen Biotech Inc. website] 2013. Available at <http://www.remicade.com/shared/product/remicade/prescribing-information.pdf>. Accessed February 27th 2014.
3. Suhler EB, Smith JR, Wertheim MS et al. A prospective trial of infliximab therapy for refractory uveitis: preliminary safety and efficacy outcomes. *Arch Ophthalmol* 2005;123(7):903-12.
4. Levy RA, Andrade FA, Foeldvari I. Cutting-Edge Issues in Autoimmune Uveitis. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2011;41(2):214-23.
5. Levy-Clarke G, Jabs D, Read R et al. Expert Panel Recommendations for the Use of Anti-Tumor Necrosis Factor Biologic Agents in Patients with Ocular Inflammatory Disorders. *Ophthalmology* 2014;121(3):785-96.e3.
6. Pham M, Chow CC, Badawi D, Tu EY. Use of Infliximab in the Treatment of Peripheral Ulcerative Keratitis in Crohn Disease. *Am J Ophthalmol* 2011; 152(2): 183-8.e2.
7. Thomas JW, Pflugfelder SC. Therapy of progressive rheumatoid arthritis-associated corneal ulceration with infliximab. *Cornea* 2005; 24(6): 742-4.

8. Odorcic S, Keystone EC, Ma JJK. Infliximab for the treatment of refractory progressive sterile peripheral ulcerative keratitis associated with late corneal perforation: 3-year follow-up. *Cornea* 2009; 28(1): 89-92.
9. Antao SF, Ayoub T, Tahir H, Parmar DN. Stabilization of Bilateral Progressive Rheumatoid Corneal Melt with Infliximab. *Case Rep Ophthalmol Medicine* 2012; 2012: 1-3.
10. Dohlman J, Foster C, Dohlman CH. Boston Keratoprosthesis in Stevens-Johnson syndrome: A case to prevent tissue necrosis. *Digital Journal of Ophthalmology* 2009; 15(1).
11. Dohlman C, Dudenhofer E, Khan B, Dohlman J. Corneal blindness from end-stage Sjögren's syndrome and graft-versus-host disease. In: Sullivan D, Stern M, Tsubota K et al, eds. *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 3*. New York, NY: Kluwer / Plenum Publishers; 2002: 1335-8.
12. Ferrari G, Bignami F, Giacomini C et al. Safety and Efficacy of Topical Infliximab in a Mouse Model of Ocular Surface Scarring. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(3): 1680-8.
13. Kim JW, Chung SK. The effect of topical infliximab on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea* 2013; 32(2): 185-90.
14. Li Z, Choi W, Oh H-J, Yoon KC. Effectiveness of topical infliximab in a mouse model of experimental dry eye. *Cornea* 2012; 31 Suppl 1: S25-31.
15. Ikeda R, Vermeulen LC, Lau E et al. Stability of infliximab in polyvinyl chloride bags. *Am J Health Syst Pharm* 2012; 69(17):1509-12.

16. Gipson I, Spurr-Michaud S, Argüeso P et al. Mucin gene expression in immortalized human corneal-limbal and conjunctival epithelial cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(6): 2496-506.
17. Ament J, Spurr-Michaud S, Dohlman C, Gipson I. The Boston Keratoprosthesis: comparing corneal epithelial cell compatibility with titanium and PMMA. *Cornea* 2009; 28(7): 808-11.
18. Wu L, Arevalo JF, Hernandez-Bogantes E et al. Intravitreal Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibitors for Neovascular Age-Related Macular Degeneration Suboptimally Responsive to Antivascular Endothelial Growth Factor Agents: A Pilot Study from the Pan American Collaborative Retina Study Group. *J Ocul Pharmacol Ther* 2013; 29(3):366-71.
19. Wu L, Hernandez-Bogantes E, Roca J et al. Intravitreal Tumor Necrosis Factor Inhibitors in the Treatment of Refractory Diabetic Macular Edema: a pilot study from the Pan-American Collaborative Retina Study Group. *Retina* 2011; 31(2): 298-303.
20. Pulido JS, Pulido JE, Michet CJ, Vile R. More questions than answers: a call for a moratorium on the use of intravitreal infliximab outside of a well-designed trial. *Retina* 2010; 30(1): 1-5.
21. Beer PM, Wong SJ, Schartman JP et al. Infliximab stability after reconstitution, dilution, and storage under refrigeration. *Retina* 2010; 30(1):81-4.
22. Lam H, Bleiden L, de Paiva C et al. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol* 2009; 147(2): 198-205.

23. Albertsmeyer A, Kakkassery V, Spurr-Michaud S et al. Effect of pro-inflammatory mediators on membrane-associated mucins expressed by human ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res* 2010; 90(3): 444-51.
24. Li D-Q, Lokeshwar BL, Solomon A et al. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2001;73(4): 449-59.
25. Ma JJK, Dohlman CH. Mechanisms of corneal ulceration. *Ophthalmol Clin N Am* 2002; 15: 27-33.
26. Fini ME, Cook JR, Mohan R. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch Dermatol Res* 1998; 290: S12-23.
27. Dekaris I, Zhu SN, Dana MR. TNF-alpha regulates corneal Langerhans cell migration. *J Immunol*; 1999. p. 4235-9.
28. Yamada J, Streilein JW, Dana MR. Role of Tumor Necrosis Factor Receptors Tnfr-I (P55) and Tnfr-II (P75) in Corneal Transplantation. *Transplantation* 1999; 68(7):944-9.
29. Qian Y, Dekaris I, Yamagami S, Dana MR. Topical soluble tumor necrosis factor receptor type I suppresses ocular chemokine gene expression and rejection of allogeneic corneal transplants. *Arch Ophthalmol* 2000; 118(12):1666-71.



## Chapitre 6 : Discussion

Le premier article publié dans le cadre de ce mémoire tente d'éclaircir certains aspects de la pathophysiologie de la fonte cornéenne post-B-KPro. Bien que les MMP sont les effecteurs de la fonte cornéenne, l'effet de la B-KPro sur ces enzymes n'avait jamais été investigué. La première étape était de quantifier le profil des MMP au niveau des larmes de patients avec B-KPro. Les larmes sont un liquide biologique facilement accessible dont le prélèvement entraîne un risque minimal envers le patient et le niveau des MMP des larmes avait déjà été corrélé avec diverses pathologies inflammatoires de la surface oculaire.<sup>71,112-114</sup>

Cette étude a démontré une corrélation entre le niveau de MMP-8 et les catégories pronostiques déjà bien établies pour la chirurgie de B-KPro.<sup>40</sup> Également, des élévations significatives des MMP-8 et MMP-9 ont été retrouvées chez les yeux ayant un antécédent de brûlure chimique. De concert avec la littérature antérieure, une corrélation entre les niveaux de MMP-8 et de MMP-9 a été démontrée. Enfin, de façon plus surprenante, cette étude suggère que la présence d'une B-KPro ainsi que la présence de fonte cornéenne active associée à la B-KPro ont une influence minimale sur la teneur en MMP des larmes.

Les niveaux de MMP étaient plus élevés parmi les étiologies présentant une certaine instabilité épithéliale et donc, une production de MMP de source épithéliale. Toutefois, la corrélation des niveaux de MMP-8 et de MMP-9 suggère que les neutrophiles sont la source prédominante de production de MMP au niveau des larmes. Ces constatations peuvent être conciliées du fait que

la présence d'un déficit épithélial cornéen entraîne la migration de neutrophiles provenant des vaisseaux limbiques et donc, une potentielle contribution de ces deux types cellulaires.<sup>115</sup> Les MMP relâchées par les neutrophiles ont une plus grande probabilité de se retrouver dans les larmes, en raison de cette migration neutrophilique sur la surface oculaire. Au contraire, les MMP produites par l'épithélium sont plus localisées, étant relâchées en marge de déficit épithéliaux. Des futures études devront se pencher sur les rôles distincts des neutrophiles et de l'épithélium tout en prenant compte des différents microenvironnements créés par la présence d'un VC en port continu et d'une B-KPro. Ces différences pourraient expliquer pourquoi certains yeux avec fonte cornéenne active avaient des profils de MMP relativement bénins. Quoique logistiquement plus difficile, de futures études devraient corrélérer les MMP des larmes avec l'expression locale de MMP en appliquant, par exemple, la zymographie *in situ* sur des spécimens de cornée-B-KPro explantés lors de réparation chirurgicale de fonte. Enfin, cette étude pourrait servir de tremplin vers des études thérapeutiques appliquant non seulement des inhibiteurs des MMP, mais également des inhibiteurs neutrophiliques comme traitement de la fonte cornéenne. En particulier, le nouveau modèle murin de B-KPro miniature sera instrumental pour répondre à ces questions de pathophysiologie et dans le développement d'approches ciblées au traitement de la fonte cornéenne post-B-KPro.<sup>116-118</sup> Entre autres, l'utilisation de greffon-support dont le collagène a été réticulé est une approche novatrice présentement en investigation pour augmenter la résistance aux MMP et à la fonte cornéenne post-B-KPro.<sup>119,120</sup>

Le deuxième article présente la formulation d'une goutte d'infliximab 1% ainsi que les données de stabilité et de toxicité qui y sont associées. Ces travaux ont mené à l'obtention d'un statut de

Investigational New Drug (IND) de la part de la Food and Drug Administration des Etats-Unis et d'une lettre de non objection de la part de Santé Canada afin d'investiguer l'utilisation de l'infliximab 1% comme prophylaxie de la fonte cornéenne post-B-KPro chez des patients à haut risque. Par ailleurs, une deuxième étude pour l'utilisation de l'infliximab 1% comme traitement de la fonte cornéenne active non associée à la B-KPro est en développement.

Les bénéfices attendus d'une utilisation locale d'infliximab a d'ailleurs mené au développement d'un système de livraison du médicament à base de polymère. Par rapport aux gouttes topiques, les avantages de ce système sont au niveau de la compliance du patient et de la biodisponibilité du médicament. En effet, le polymère est capable de relâcher l'infliximab sur une période d'au moins un mois et pourrait ainsi être simplement remplacé lors des visites cliniques chez l'ophtalmologiste. Par ailleurs, la diffusion continue de l'infliximab du polymère permet d'accroître le temps de résidence du médicament sur la surface oculaire et donc de maximiser la pénétration des anticorps dans la cornée.<sup>121</sup> Des résultats prometteurs de cette approche ont été obtenus chez des modèles animaux de brûlure chimique. À plus long terme, ce polymère sera investigué dans le traitement de l'inflammation oculaire post-chirurgicale (incluant la B-KPro) et pour sa capacité de livrer des agents biologiques outre les anti-TNF- $\alpha$  au niveau de la surface oculaire.

## Conclusion

Les modifications apportées au design, à la sélection et au suivi postopératoire des patients ont nettement amélioré le pronostic des patients recevant une B-KPro depuis l'approbation de cette prothèse en 1992. L'introduction de fenestrations dans la plaque postérieure favorisant la nutrition du greffon support, le port continu d'un VC souple protégeant la surface oculaire et l'utilisation d'une prophylaxie antibiotique réduisant le risque de complications infectieuses ont sans doute réduit la survenue de fonte cornéenne post-B-KPro.<sup>55,57,122</sup> Cependant, la fonte cornéenne post-B-KPro demeure une complication commune et sous-estimée des chirurgiens de la cornée. La fonte cornéenne peut atteindre 24% des yeux lorsque que le suivi s'échelonne sur plus de 5 ans.<sup>16</sup> Localement, la fonte cornéenne a compliqué le cours postopératoire de 14% des yeux ayant reçu une B-KPro au CHUM sur un suivi moyen de 31 mois. Cette valeur s'apparente bien aux séries de cas ayant une durée de suivi similaire.

La pathophysiologie de la fonte cornéenne repose sur l'expression et l'activation de MMP produites par l'épithélium cornéen et les cellules inflammatoires. Bien que l'implantation d'une B-KPro offre plusieurs mécanismes pouvant augmenter les MMP oculaires, les MMP des larmes semblent surtout dépendre du diagnostic oculaire sous-jacent et non de la présence d'une B-KPro. Bien que nos connaissances de la pathophysiologie de la fonte cornéenne post-B-KPro se soient améliorées en adressant les problèmes de nutrition et de dessiccation cornéenne, des études additionnelles seront requises afin de développer des inhibiteurs des MMP sécuritaires et efficaces pour prévenir et traiter cette complication.

## Bibliographie

1. Structure and function of the external eye and cornea. In: Sutphin J, Dana M, Florakis G, Hammersmith K, Reidy J, Lopatynsky M, eds. *Basic and Clinical Science Course: External Disease and Cornea 2009-2010*. Singapore: American Academy of Ophthalmology; 2009:15-33.
2. Nishida T. Basic Science: Cornea, sclera, and ocular adnexa anatomy, biochemistry, physiology and biomechanics. In: Krachmer J, Mannis M, Holland E, eds. *Cornea*. Vol 1. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005.
3. Dua H, Faraj L, Said D, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*. 2013;120(9):1778-1785.
4. Whitcher J, Srinivasan M, Upadhyay M. Corneal blindness: a global perspective. *Bulletin of the World Health Organization*. 2001;79:214-221.
5. Aldave A, Kamal K, Vo R, Yu F. The Boston type I keratoprosthesis: improving outcomes and expanding indications. *Ophthalmology*. 2009;116(4):640-651.
6. Robert M, Dohlman C. A review of corneal melting after Boston Keratoprosthesis. *Semin Ophthalmol*. 2014;29(5-6):349-357.
7. Khan B. Boston Keratoprosthesis: Design, Materials, and Manufacturing. In: Cortina M, de la Cruz J, eds. *Keratoprotheses and Artificial Corneas: Fundamentals and Surgical Applications*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2015:45-49.
8. Robert M, Harissi-Dagher M. Indications and Contraindications of Boston KPro Types I and II. In: Cortina M, de la Cruz J, eds. *Keratoprotheses and ARTificial Corneas*:

*Fundamentals and Surgical Applications*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2015:51-65.

9. Utine C, Tzu J, Akpek E. Clinical features and prognosis of Boston type 1 keratoprosthesis-associated corneal melt. *Ocular Immunology & Inflammation*. 2011;19(6):413-418.
10. Ciolino JB, Belin M, Todani A, Al-Arfaj K, Rudnisky C, Boston Keratoprosthesis Type 1 Study Group. Retention of the Boston keratoprosthesis type 1: multicenter study results. *Ophthalmology*. 2013;120(6):1195-1200.
11. Najem K, Sebag M, Harissi-Dagher M. Boston keratoprosthesis type 1 device leak. *Can J Ophthalmol*. 2014;49(1):106-108.
12. Shapiro BL, Cortés DE, Chin EK, et al. High-resolution spectral domain anterior segment optical coherence tomography in type 1 Boston keratoprosthesis. *Cornea*. 2013;32(7):951-955.
13. Fernandez A, Radcliffe N, Sippel K, et al. Boston type I keratoprosthesis-donor cornea interface evaluated by high-definition spectral-domain anterior segment optical coherence tomography. *Clin Ophthalmol*. 2012;6:1355-1359.
14. Grassi C, Cruzat A, Taniguchi E, et al. Periprosthetic tissue loss in patients with idiopathic vitreous inflammation after the Boston keratoprosthesis. *Cornea*. 2015;34(11):1378-1382.
15. Belin M, Güell J, Grabner G. Suggested guidelines for reporting keratoprosthesis results: Consensus opinion of the Cornea Society, Asia Cornea Society, EuCornea, PanCornea, and the KPRO Study Group. *Cornea*. 2016;35(2):143-144.

16. Lekhanont K, Thaweessit P, Muntham D, Chuckpaiwong V, Vongthongsri A. Medium-term outcomes of Boston type 1 keratoprosthesis implantation in Bangkok, Thailand. *Cornea*. 2014;33(12):1312-1319.
17. Patel A, Wu E, Ritterband D, Seedor J. Boston type 1 keratoprosthesis: the New York Eye and Ear experience. *Eye*. 2012;26(3):418-425.
18. Chan C, LoVerde L, Qiang J, Nordlund M, Holland E. Incidence, risk factors, and surgical management of Boston type 1 keratoprosthesis corneal melts, leaks, and extrusions. *Cornea*. 2016;35(8):1049-1056.
19. Dunlap K, Chak G, Aquavella JV, Myrowitz E, Utine CA, Akpek E. Short-term visual outcomes of Boston type 1 keratoprosthesis implantation. *Ophthalmology*. 2010;117(4):687-692.
20. Robert M, Harissi-Dagher M. Boston type 1 keratoprosthesis: the CHUM experience. *Can J Ophthalmol*. 2011;46(2):164-168.
21. Chew HF, Ayres BD, Hammersmith KM, et al. Boston Keratoprosthesis Outcomes and Complications. *Cornea*. 2009;28(989-996).
22. Shihadeh W, Mohidat H. Outcomes of the Boston keratoprosthesis in Jordan. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2012;19(1):97-100.
23. Aldave AJ, Sangwan VS, Basu S, et al. International Results with the Boston Type I Keratoprosthesis. *Ophthalmology*. 2012;119(8):1530-1538.
24. Noel C, Isenberg J, Goldich Y, et al. Type 1 Boston keratoprosthesis: outcomes at two Canadian centres. *Can J Ophthalmol*. 2016;51(2):76-82.

25. de la Paz M, Stoiber J, de Rezende Couto Nascimento V, et al. Anatomical survival and visual prognosis of Boston type I keratoprosthesis in challenging cases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2014;252(1):83-90.
26. de Rezende Couto Nascimento V, de la Paz M, Rosandic J, et al. Influence of primary diagnosis and complications on visual outcome in patients receiving a Boston type 1 keratoprosthesis. *Ophthalmic Res*. 2014;52(1):9-16.
27. Alexander J, Basak S, Padilla M, Yu F, Aldave A. International outcomes of the Boston type I keratoprosthesis in Stevens-Johnson syndrome. *Cornea*. 2015;34(11):1387-1394.
28. de Oliveira L, Pedreira Magalhães F, Hirai F, de Sousa L. Experience with Boston keratoprosthesis type 1 in the developing world. *Can J Ophthalmol*. 2014;49(4):351-357.
29. Kosker M, Suri K, Rapuano C, et al. Long-term results of the Boston keratoprosthesis for unilateral corneal disease. *Cornea*. 2015;34(9):1057-1062.
30. Greiner MA, Li JY, Mannis MJ. Longer-term vision outcomes and complications with the Boston type 1 keratoprosthesis at the University of California, Davis. *Ophthalmology*. 2011;118(8):1543-1550.
31. Aravena C, Boxkurt T, Yu F, Aldave A. Long-term outcomes of the Boston type I keratoprosthesis in the management of corneal limbal stem cell deficiency. *Cornea*. 2016;Epub ahead of print.
32. Chang H, Luo Z, Chodosh J, Dohlman C, Colby K. Primary implantation of type I Boston keratoprosthesis in nonautoimmune corneal diseases. *Cornea*. 2015;34(3):264-270.



33. Salvador-Culla B, Kolovou P, Arzeno L, Martínez S, López M. Boston keratoprosthesis type I in chemical burns. *Cornea*. 2016;35(6):911-916.
34. Goins K, Kitzmann A, Greiner M, et al. Boston type 1 keratoprosthesis: Visual outcomes, device retention, and complications. *Cornea*. 2016;Epub ahead of print.
35. Duignan E, Ní Dhubhghaill S, Malone C, Power W. Long-term visual acuity, retention and complications observed with the type-I and type-II Boston keratoprostheses in an Irish population. *Br J Ophthalmol*. 2015;Epub ahead of print.
36. Srikumaran D, Munoz B, Aldave A, et al. Long-term outcomes of Boston type 1 keratoprosthesis implantation: a retrospective multicenter cohort. *Ophthalmology*. 2014;121(11):2159-2164.
37. Bradley J, Hernandez E, Schwab I, Mannis M. Boston type 1 keratoprosthesis: the University of California Davis experience. *Cornea*. 2009;28(3):321-327.
38. Muñoz-Gutierrez G, Alvarez de Toledo J, Barraquer R, et al. Post-surgical visual outcome and complications in Boston type 1 keratoprosthesis. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2013;88(2):56-63.
39. Hager J, Phillips D, Goins K, et al. Boston type 1 keratoprosthesis for failed keratoplasty. *Int Ophthalmol*. 2016;36(1):73-78.
40. Yaghouti F, Nouri M, Abad JC, Power WJ, Doane MG, Dohlman CH. Keratoprosthesis: preoperative prognostic categories. *Cornea*. 2001;20(1):19-23.
41. Arafat S, Suelves A, Spurr-Michaud S, et al. Neutrophil collagenase, gelatinase, and myeloperoxidase in tears of patients with Stevens-Johnson syndrome and ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology*. 2014;121(1):79-87.

42. Palioura S, Kim B, Dohlman C, Chodosh J. The Boston keratoprosthesis type I in mucous membrane pemphigoid. *Cornea*. 2013;32(7):956-961.
43. Sayegh RR, Ang LPK, Foster CS, Dohlman CH. The Boston Keratoprosthesis in Stevens-Johnson Syndrome. *American Journal of Ophthalmology*. 2008;145(3):438-444.
44. Chan CC, Holland EJ. Infectious keratitis after Boston type 1 keratoprosthesis implantation. *Cornea*. 2012;31(10):1128-1134.
45. Kim M, Yu F, Aldave A. Microbial keratitis after Boston type I keratoprosthesis implantation: incidence, organisms, risk factors, and outcomes. *Ophthalmology*. 2013;120(11):2209-2216.
46. Riley M. Glucose and oxygen utilization by the rabbit cornea. *Exp Eye Res*. 1969;8(2):193-200.
47. Turss R, Friend J, Dohlman C. Effect of a corneal fluid barrier on the nutrition of the epithelium. *Exp Eye Res*. 1970;9(2):254-259.
48. Thoft R, Friend J, Dohlman C. Corneal glucose flux. II. Its response to anterior chamber blockage and endothelial damage. *Arch Ophthalmol*. 1971;86(6):685-691.
49. Bourges J, Trong T, Ellies P, Briat B, Renard G. Intrastromal corneal ring segments and corneal anterior stromal necrosis. *J Cataract Refract Surg*. 2003;29(6):1228-1230.
50. Harissi-Dagher M, Khan BF, Schaumberg DA, Dohlman CH. Importance of nutrition to corneal grafts when used as a carrier of the Boston Keratoprosthesis. *Cornea*. 2007;26(5):564-568.

51. Lee W, Shtein R, Kaufman S, Deng S, Rosenblatt M. Boston keratoprosthesis: Outcomes and complications: A report by the American Academy of Ophthalmology. *I22*. 2015;7(1504-11).
52. Stacy R, Jakobiec F, Michaud N, Dohlman C, Colby K. Characterization of retrokeratoprosthetic membranes in the Boston type 1 keratoprosthesis. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(3):310-316.
53. Hou J, Sivaraman K, de la Cruz J, Lin A, Cortina M. Histopathological and immunohistochemical analysis of melt-associated retroprosthetic membranes in the Boston type 1 keratoprosthesis. *JAMA Ophthalmol*. 2014;132(9):1133-1136.
54. Sivaraman KR, Hou JH, Allemann N, de la Cruz J, Cortina MS. Retroprosthetic Membrane and Risk of Sterile Keratolysis in Patients With Type I Boston Keratoprosthesis. *Am J Ophthalmol*. 2013;155(5):814-822.e812.
55. Harissi-Dagher M, Beyer J, Dohlman C. The role of soft contact lenses as an adjunct to the Boston keratoprosthesis. *Int Ophthalmol Clin*. 2008;48(2):43-51.
56. Dohlman C, Dudenhoefer E, Khan B, Morneault S. Protection of the ocular surface after keratoprosthesis surgery: the role of soft contact lenses. *CLAO*. 2002;28(2):72-74.
57. Kammerdiener L, Speiser J, Aquavella J, et al. Protective effect of soft contact lenses after Boston Keratoprosthesis. *Br J Ophthalmol*. 2016;100(4):549-552.
58. Fini ME, Cook JR, Mohan R. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. *Arch Dermatol Res*. 1998;290:S12-23.
59. Gross J. How tadpoles lose their tails: path to discovery of the first matrix metalloproteinase. *Matrix Biol*. 2004;23(1):3-13.

60. Khokha R, Murthy A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(9):649-665.
61. Brown DM, Chwa M, Escobar M, Kenney M. Characterization of the major matrix degrading metalloproteinase of human corneal stroma. Evidence for an enzyme/inhibitor complex. *Exp Eye Res*. 1991;52(1):5-16.
62. Girard M, Matsubara M, Kublin C, Tessier M, Cintron C, Fini M. Stromal fibroblast synthesize collagenase and stromelysin during long-term tissue remodeling. *J Cell Sci*. 1993;104(4):1001-1011.
63. Matsubara M, Girard M, Kublin C, Cintron C, Fini M. Differential roles for the two gelatinolytic enzymes of the matrix metalloproteinase family. *Dev Biol*. 1991;147(2):425-439.
64. Li D-Q, Lokeshwar BL, Solomon A, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC. Regulation of MMP-9 Production by Human Corneal Epithelial Cells. *Experimental Eye Research*. 2001;73(4):449-459.
65. Kim H-S, Shang T, Chen Z, Pflugfelder SC, Li D-Q. TGF- $\beta$ 1 stimulates production of gelatinase (MMP-9), collagenases (MMP-1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research*. 2004;79(2):263-274.
66. Maeda H, Okamoto T, Akaike T. Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biol Chem*. 1998;379(2):193-200.
67. Van Wart H, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(14):5578-5582.

68. Baker A, Edwards D, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002;1(115):3719-3727.
69. Fini M, Parks W, Rinehart W, et al. Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury. *Am J Pathology.* 1996;149(4):1287-1302.
70. Smith V, Rishmawi H, Hussein H, Easty D. Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(2):147-153.
71. Smith V, Hoh H, Easty D. Role of ocular matrix metalloproteinases in peripheral ulcerative keratitis. *Br J Ophthalmol.* 1999;83(12):1376-1383.
72. O'Brien TP, Li QJ, Sauerburger F, Reviglio VE, Rana T, Ashraf MF. The role of matrix metalloproteinases in ulcerative keratolysis associated with perioperative diclofenac use. *Ophthalmology.* 2001;108(4):656-659.
73. Slansky H, Gnädinger M, Itoi M, Dohlman C. Collagenase in corneal ulcerations. *Arch Ophthalmol.* 1969;82(1):108-111.
74. Matsubara M, Zieske J, Fini M. Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32(13):3221-3237.
75. Dudenhofer EJ, Nouri M, Gipson IK, et al. Histopathology of explanted collar button keratoprotheses: a clinicopathologic correlation. *Cornea.* 2003;22(5):424-428.
76. Coassin M, Zhang C, Green W, Aquavella J, Akpek E. Histopathologic and immunologic aspects of alphacor artificial corneal failure. *Am J Ophthalmol.* 2007;144(5):699-704.
77. Corrales R, Stern M, De Paiva C, Welch J, Li D, Pflugfelder S. Desiccating stress stimulates expression of matrix metalloproteinases by the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(8):3293-3302.

78. Li D, Chen Z, Song X, Luo L, Pflugfelder S. Stimulation of matrix metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(12):4302-4301.
79. Balasubramanian S, Pye D, Willcox M. Effects of eye rubbing on the levels of protease, protease activity and cytokines in tears: relevance in keratoconus. *Clin Exp Optom.* 2013;96(2):214-218.
80. Purdue P, Koulouvaris P, Nestor B, Sculco T. The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis. *HSS J.* 2006;2(2):102-113.
81. Syggelos S, Aletras A, Smirlaki I, Skandalis S. Extracellular matrix degradation and tissue remodeling in periprosthetic loosening and osteolysis: focus on matrix metalloproteinases, their endogenous tissue inhibitors, and the proteasome. *Biomed Res Int.* 2013;Epub:1-18.
82. Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(4):312-334.
83. Sharma C, Velpandian T, Baskar S, Ranjan B, Bihari V, Ghose S. Effect of fluoroquinolones on the expression of matrix metalloproteinase in debrided cornea of rats. *Toxicol Mech Methods.* 2011;21(1):6-12.
84. Schachschabel U, Lindsey J, Weinreb R. The mechanism of action of prostaglandins on uveoscleral outflow. *Curr Opin Ophthalmol.* 2000;11(2):112-115.
85. Reviglio V, Rana T, Li Q, Ashraf M, Daly M, O'Brien T. Effects of topical nonsteroidal antiinflammatory drugs on the expression of matrix metalloproteinases in the cornea. *J Cataract Refract Surg.* 2003;29(5):989-997.

86. Phillips K, Arffa R, Cintron C, et al. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization. *Arch Ophthalmol.* 1983;101(4):640-643.
87. Zhou H, Kimura K, Orita T, Nishida T, Sonoda K. Inhibition by medroxyprogesterone acetate of interleukin-1 $\beta$ -induced collagen degradation by corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;28(53):7.
88. Fitton J, Ziegelaar B, Hicks C, et al. Assessment of anticollagenase treatments after insertion of a keratoprosthesis material in the rabbit cornea. *Cornea.* 1998;17(1):108-114.
89. Newsome N, Gross J. Prevention by medroxyprogesterone of perforation in the alkali-burned rabbit cornea: inhibition of collagenolytic activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977;16(1):21-31.
90. Lass J, Berman M, Campbell R, Pavan-Langston D, Gage J. Treatment of experimental herpetic interstitial keratitis with medroxyprogesterone. *Arch Ophthalmol.* 1980;98(3):520-527.
91. Hicks CR, Crawford GJ. Melting after keratoprosthesis implantation: the effects of medroxyprogesterone. *Cornea.* 2003;22(6):497-500.
92. Dohlman C. Postoperative regimen and repair of complications after keratoprosthesis surgery. *Refract Corneal Surg.* 1993;9:198.
93. Dohlman J, Foster C, Dohlman CH. Boston Keratoprosthesis in Stevens-Johnson syndrome: A case of using infliximab to prevent tissue necrosis. *Digital Journal of Ophthalmology.* 2009;15(1).

94. Dohlman C, Dudenhofer E, Khan B, Dohlman J. Corneal blindness from end-stage Sjögren's syndrome and graft-versus-host disease. In: Sullivan D, Stern M, Tsubota K, Dartt D, Sullivan R, Bromberg B, eds. *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 3*. New York: Kluwer / Plenum Publishers; 2002:1335-1338.
95. Robert M, Črnež A, Shen L, et al. Infliximab after Boston keratoprosthesis in Stevens-Johnson syndrome: An update. *Ocul Immunol Inflamm*. 2016;Epub ahead of print.
96. Antao S, Ayoub T, Tahir H, Parmar D. Stabilization of bilateral progressive rheumatoid corneal melt with infliximab. *Case Rep Ophthalmol Med*. 2012;173793:1-3.
97. Pham M, Chow CC, Badawi D, Tu EY. Use of Infliximab in the Treatment of Peripheral Ulcerative Keratitis in Crohn Disease. *American Journal of Ophthalmology*. 2011;152(2):183-188.e182.
98. Thomas JW, Pflugfelder SC. Therapy of progressive rheumatoid arthritis-associated corneal ulceration with infliximab. *Cornea*. 2005;24(6):742-744.
99. Odorcic S, Keystone EC, Ma JJK. Infliximab for the treatment of refractory progressive sterile peripheral ulcerative keratitis associated with late corneal perforation: 3-year follow-up. *Cornea*. 2009;28(1):89-92.
100. Utine CA, Tzu JH, Akpek EK. Clinical Features and Prognosis of Boston Type I Keratoprosthesis-associated Corneal Melt. *Ocul Immunol Inflamm*. 2011;19(6):413-418.
101. Sakimoto T, Ohnishi T, Ishimori A. Simultaneous study of matrix metalloproteinases, proinflammatory cytokines, and soluble cytokine receptors in the tears of noninfectious corneal ulcer patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2014;252(9):1451-1456.



102. Markoulli M, Papas E, Cole N, Holden B. The diurnal variation of matrix metalloproteinase-9 and its associated factors in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(3):1479-1484.
103. Sack R, Sathe S, Beaton A, Bogart B, Lew G. Changes in the diurnal pattern of distribution of gelatinases and associated proteins in normal and pathological tear fluids: evidence that the PMN cell is a major source of MMP activity in tear fluid. *Adv Exp Med Biol.* 2002;506(Pt A):539-545.
104. Gipson I, Spurr-Michaud S, Senchyna M, Ritter Rr, Schaumberg D. Comparison of mucin levels at the ocular surface of postmenopausal women with and without a history of dry eye. *Cornea.* 2011;30(12):1346-1352.
105. Smith P, Krohn R, Hermanson G, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85.
106. Atchia I, Kidd C, Bell R. Rheumatoid arthritis-associated necrotizing scleritis and peripheral ulcerative keratitis treated successfully with infliximab. *J Clin Rheumatol.* 2006;12(6):291-293.
107. Angioi K, Kaminsky P, Peyrin-Biroulet L. Infliximab for severe peripheral ulcerative keratopathy revealing Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(3):866-867.
108. Oh J, Kim M, Wee W. Infliximab for progressive peripheral ulcerative keratitis in a patient with juvenile rheumatoid arthritis. *Jpn J Ophthalmol.* 2011;55(1):70-71.
109. Ferrari G, Bignami F, Giacomini C, Franchini S, Rama P. Safety and efficacy of topical infliximab in a mouse model of ocular surface scarring. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(3):1680-1688.

110. Li Z, Choi W, Oh H, Yoon K. Effectiveness of topical infliximab in a mouse model of experimental dry eye. *Cornea*. 2012;31(Suppl 1):S25-31.
111. Kim J, Chung S. The effect of topical infliximab on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea*. 2013;32(2):185-190.
112. Chotikavanich S, de Paiva C, Li D, et al. Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in dysfunctional tear syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(7):3203-3209.
113. Määttä M, Kari O, Tervahartiala T, et al. Elevated expression and activation of matrix metalloproteinase 8 in tear fluid in atopic blepharoconjunctivitis. *Cornea*. 2008;27(3):297-301.
114. Määttä M, Kari O, Tervahartiala T, et al. Tear fluid levels of MMP-8 are elevated in ocular rosacea - treatment effect of oral doxycycline. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006;244(8):957-962.
115. Wilson S, Mohan R, Mohan R, Ambrósio RJ, Hong J, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res*. 2001;20(5):625-637.
116. Crnej A, Omoto M, Dohlman T, Dohlman C, Dana R. Corneal inflammation after miniature keratoprosthesis implantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;56(1):185-189.
117. Crnej A, Omoto M, Dohlman T, et al. Effect of penetrating keratoplasty and keratoprosthesis implantation on the posterior segment of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(4):1643-1648.

118. Crnej A, Omoto M, Dohlman T, et al. A novel murine model for keratoprosthesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(6):3681-3685.
119. Robert M, Arafat S, Ciolino J. Collagen cross-linking of the Boston keratoprosthesis donor carrier to prevent corneal melting in high-risk patients. *Eye Contact Lens.* 2014;40(6):376-381.
120. Arafat S, Robert M, Shukla A, Dohlman C, Chodosh J, Ciolino J. UV cross-linking of donor corneas confers resistance to keratolysis. *Cornea.* 2014;33(9):955-959.
121. Robert M, Frenette M, Zhou C, et al. A drug delivery system for administration of anti-TNF- $\alpha$  antibody. *Transl Vis Sci Technol.* 2016;5(2):11.
122. Durand ML, Dohlman CH. Successful prevention of bacterial endophthalmitis in eyes with the Boston keratoprosthesis. *Cornea.* 2009;28(8):896-901.