



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 5325](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID%3A5325)

To cite this version :

Tessier, Julie. *Étude histologique des populations granulocytaires éosinophiliques et mastocytaires de la conjonctive oculaire du chien*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVV, 2012, 76 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

**ETUDE HISTOLOGIQUE DES POPULATIONS GRANULOCYTAIRES
EOSINOPHIQUES ET MASTOCYTAIRES DE LA CONJONCTIVE OCULAIRE
DU CHIEN**

A notre Président de Thèse,

Monsieur le professeur Pierre FOURNIE

Professeur des universités

Praticien hospitalier

Ophthalmologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A notre Jury de Thèse,

Madame le docteur Isabelle RAYMOND-LETRON

Maître de Conférences de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse

Histologie - Anatomie pathologique

Qui nous a guidé et conseillé dans l'élaboration de ce travail.

Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

Monsieur le Professeur Alain REGNIER

Professeur de l'Ecole Nationale vétérinaire de Toulouse

Physiopathologie oculaire

Qui nous a soutenu et éclairé dans ce travail,

Qui nous fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.

Qu'il trouve ici nos sincères remerciements et toute notre reconnaissance.

Au docteur Jean-Yves DOUET

Pour son aide précieuse à la réalisation de ce travail et sa disponibilité exemplaire,
Sincères remerciements.

A Isabelle,

Pour sa disponibilité, même les jours fériés et en famille, pour nos appels de dernières
minutes,
Sincères remerciements.

A toute l'équipe du laboratoire d'anatomie pathologique
Pour leur accueil chaleureux, leur professionnalisme, et leur patience,
Merci.

A toute l'équipe d'ophtalmologie,

les Docteurs Julien CHARRON, Valentina GUIDICI, Marielle MENTEK, Cécile
VERHAEGHE

Pour avoir eu la gentillesse de nous aider lors du recrutement des cas et dans la réalisation des
prélèvements.

A ma famille,

Parce qu'il n'y a rien de plus important, et qu'on y revient toujours.

A mes parents, pour leur amour inconditionnel,

A ma mère, pour m'avoir montré que tout est possible quand on se bat. Tu n'as plus rien à prouver aujourd'hui...

A mon père, pour tout cet amour qui me rend plus forte, tu es l'homme et le père idéal.

A mon frère, le plus gentil du monde. Apprends moi.

A Philippe, pour cet air que tu te donne qui me fait tant rire, merci d'être là.

A Françoise, pour tout ce bonheur apporté, merci.

A Emilie, petite sœur.

A mami' Vet. Pillier infatigable de notre belle famille. Merci pour cette enfance bénie que tu nous as permis d'avoir. Et aussi à ce grand père que je n'ai pas connu.

A Mami Monique et papi Gérard, pour leur soutien et leur présence à tout instant.

A Josie, ma deuxième maman.

A mes cousins,

A Gwen, sans toi je n'en serai pas là...

A Tikro, à notre enfance, à notre parcours, notre vie ensemble. Combien je t'admire...

A Marie et Fanny, Vincent, Marc, Noël, Julien, Rémi, Mathieu, Jean et Noémie, que de souvenirs heureux.

A mes oncles et tantes, pour tout ce qui nous lie, et nous liera toujours.

A Germain, pour avoir toujours été là, et malgré tout. QCEDDCT

A ta famille, si belle, et dans laquelle je suis si bien.

A Thibault, pour m'avoir guidé aussi bien sur le plan professionnel que personnel et à Severin pour m'avoir montré qu'il fallait osé.

A mes amis,

A Marine et Caroline, amies d'enfance qui marquent à jamais une vie.

A Anais, pour tout.

A So, à notre bulle impénétrable, à notre amitié si particulière, et à tout ce qu'il nous reste à partager.

A Emilie, entre joies et peines, pas assez de mots...

Ma pin's, à notre rencontre. Duo sportif de choc reconnu par, et devant tous, un beau jour de trail en Aveyron!

Aurélie, à cette joie de vivre que tu nous a donné tous les jours,

Laurie, à ce caractère si fort et si fragile à la fois. Embraque un jour.. !

Laura, rencontre tardive mais heureuse! Et Sarita, notre beauté espagnole!

Elise, l'asociale de Paris 6, à nos débuts à l'école, désabusées, un martini à la main dans ton appart de 20 m², et à toutes ces discussions qu'on a continuées au château..

A Edouard, « E-douard ! »,

Lili, à ce premier regard trompeur que tu m'as lancé, pauvre trousse... A gad ! et à Capbreton !

Et ce Jerem !?

A Fabien, pour ta finesse légendaire et ce côté mauvais garçon que tu aimes te donner, mais surtout pour tout le reste...

A Steve, quelle rencontre... Roi du fourneau et de l'aspi! « laisse ! Je vais le faire ! » J'ai trouvé la clé trop tard.. Et tu nous manques déjà.

Antonio, à notre quignon de pain (rassi d'ailleurs ! Je t'avais pas dit!?), mais qui à soudé notre amitié, pour longtemps j'espère.

Merci à tous les 3 d'avoir pris soin de moi...

Manon, à notre belle année en colloc, à ce rire communicatif qu'on a tant aimé entendre.

A Julien, ou Michou, pour avoir été là un soir, et ne pas être parti... Je n'en dis pas plus.

A Gaston et Hélène, Aline, que j'ai rencontré trop tard, à grande Manon et Morgane, si pétillantes,    Marie-Laure, il nous en restait des sommets pourtant.. Au Mont Blanc, et surtout aux Pyrénées !

A Pinpin, merci pour ta générosité.

A miramar, parce que quand même, on a bien rigolé...

A Vincent et Claire, doux souvenir d'une spi. A Sarah, et à tous les autres de la promo que je n'ai pas eu la chance d'apprécier.

A Brice, pour ce qu'on a vécu,

A mes docs, quelles belles années, vous êtes parti trop tôt.

A mes poulots, et à mes petits poulots que je n'ai pas assez connu. Pardon Maylis.

A Djo ! Ma Rouuum !

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	28
Partie I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	30
HISTOLOGIE DE LA CONJONCTIVE DU CHIEN.....	32
A. Histologie topographique :	32
1. La conjonctive palpébrale ou tarsale.....	32
2. La conjonctive bulbaire.....	32
3. La conjonctive des culs-de-sac conjonctivaux ou du fornix	33
4. La caroncule et la membrane nictitante	33
5. Le sac lacrymal	34
B. Structure histologique de la conjonctive oculaire du chien	37
1. La conjonctive.....	37
a. La conjonctive palpébrale.....	37
b. Le fornix	37
c. La conjonctive bulbaire	38
d. Les cellules caliciformes à mucus	38
e. Le chorion et les formations lymphoïdes.....	38
f. La caroncule	39
2. La membrane nictitante.....	39
3. La vascularisation et innervation	39
C. Histologie fonctionnelle de la conjonctive oculaire du chien	45
1. Un épithélium riche en cellules à mucus	45
2. Les formations lymphoïdes du chorion.....	46
INDICATIONS ET RÉALISATION DES BIOPSIES CONJONCTIVALES	48
A. Indications.....	48
1. Histopathologie générale de la conjonctive :	48
2. Principales indications de la biopsie	48
B. Réalisation.....	49
1. Matériel	49
2. Méthode.....	49

Partie II. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....	50
A. Matériel et méthode	51
1. Animaux.....	51
a. Sélection des cas	51
b. Identification des animaux et anamnèse.....	51
c. Consentement des propriétaires	51
2. Technique utilisée pour la biopsie conjonctivale	52
a. Matériel.....	52
b. Technique de prélèvement.....	52
3. Technique histologique	52
a. Fixation	52
b. Réalisation des blocs de paraffine	53
c. Coupes au microtome	53
d. Coloration des lames	54
4. Lecture et quantification	54
B. Résultats.....	58
1. Population de l'étude :	58
2. Qualité des biopsies.....	61
3. Surface des biopsies	61
4. Comptages des granulocytes éosinophiles	62
5. Comptages des mastocytes.....	63
C. Discussion	72
1. Intérêt de l'étude	73
2. Nombre de cas inclus à l'étude	74
3. Composition de l'échantillon	75
4. Taille et représentativité de l'échantillon.....	75
5. Qualité du prélèvement conjonctival	76
6. Lecture.....	77
7. Résultats	77
CONCLUSION.....	79

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : topographie des différentes régions de la conjonctive [9]	35
Figure 2 : représentation schématique de la troisième paupière [10].....	35
Figure 3 : sac lacrymal sur coupe d'œil de chat nouveau-né [11]	36
Figure 4 : coupes histologiques de la conjonctive palpébrale à la jonction cutanéomuqueuse (A, H&Ex100) et de sa transformation en épithélium stratifié cylindrique avec cellules à mucus (B, H&Ex400) [11].....	41
Figure 5 : coupe histologique dans la région du fornix (H&Ex100) [11]	41
Figure 6 : coloration rouge fuchsia des vacuoles des cellules à mucus sur coupe histologique de la conjonctive dans la portion tarsale (A.P.S x400) [11]	42
Figure 7 : coupe histologique montrant les cellules à mucus de la conjonctive bulbaire de la membrane nictitante au contact de l'épithélium cornéen (A.P.S x400) [11]	42
Figure 8 : répartition des cellules à mucus sur coupe histologique [14]	43
Figure 9 : formations lymphoïdes sur coupes histologiques de conjonctive (H&Ex100) [11]	43
Figure 10 : coupe histologique de la membrane nictitante du chien dans la portion non glandulaire (H&Ex100) [11].....	44
Figure 11 : vascularisation de la conjonctive [20]	44
Figure 12 : les glandes lacrymales du chien [8]	47
Figure 13 : composition du film lacrymal [24]	47
Figure 14 : détourage virtuel d'une biopsie pour en déterminer le périmètre et la surface	66
Figure 15 : mastocytes dans le chorion superficiel (M.G.Gx400)	66
Figure 16 : mastocytes dans le chorion profond (M.G.Gx400)	67
Figure 17 : mastocytes dans le chorion profond, à la proximité des vaisseaux (M.G.Gx1000)	67

Tableaux

Tableau 1 : anamnèse des chiens prélevés pour biopsie conjonctivale.....	59
Tableau 2 : périmètre et surface des biopsies.....	61
Tableau 3 : Résultats du comptage des éosinophiles du chorion et des vaisseaux	63
Tableau 4 : Résultats du comptage des mastocytes.....	65

TABLE DES ABREVIATIONS

A.P.S. : Acide Périodique de Schiff

E.N.V.T : École Nationale Vétérinaire de Toulouse

C.H.U.V : Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire

F : femelle

h : heure

H&E. : Hémalun-éosine

Ig : Immunoglobuline

K.C.S. : Kérato-conjonctivite sèche

mm : millimètre

M : mâle

M.G.G. : May-Grunwald-Giemsa

Moy : Moyenne

Med : Médiane

n° : numéro

OD : œil droit

OG : œil gauche

RAS : rien à signaler

µm : micromètre

INTRODUCTION

Les biopsies conjonctivales représentent un prélèvement tissulaire courant en pratique vétérinaire, et incontournable dans un certain nombre d'indications. Elles permettent notamment de préciser un diagnostic étiologique ou lésionnel dans le contexte des conjonctivites chroniques ou récidivantes rebelles au traitement, ou dans les suspicions de processus néoplasiques [1, 2].

L'interprétation des modifications lésionnelles, dans les cas d'atteintes sévères ou tumorales, ne pose pas de problème particulier. Par contre, l'observation de modifications lésionnelles moins marquées, notamment de nature inflammatoire, est parfois beaucoup plus délicate et doit se référer à une valeur de référence « normale ».

Une des questions alors fréquemment posée est celle de la signification de la présence d'un contingent cellulaire, et de son abondance. A partir de quel moment considère-t-on ces observations comme significatives d'un état pathologique ?

Pour répondre à cette question, au vu du manque crucial de données dans la littérature, il nous a paru intéressant de réaliser une étude expérimentale prospective visant à définir, à partir d'un lot de biopsies conjonctivales réalisées chez des animaux ayant un examen ophtalmologique tout à fait normal, et en particulier dénué d'atteinte conjonctivale, l'abondance des contingents de granulocytes éosinophiliques et de mastocytes dans le chorion de la conjonctive.

A notre connaissance, aucune étude histologique n'a permis de déterminer la valeur seuil à partir de laquelle le nombre de granulocytes éosinophiliques et de mastocytes était significativement augmenté. La plupart des études ont été réalisées en cytologie et une seule a comparé la cytologie de la conjonctive oculaire d'un chien sain et d'un chien atteint de conjonctivite. De là, il a été admis qu'à partir d'un seul granulocyte éosinophilique, le prélèvement était pathologique [3].

L'objectif de notre étude est de comptabiliser sur biopsie, le nombre de cellules inflammatoires et plus particulièrement de granulocytes éosinophiliques et de mastocytes dans un échantillon de chien témoin. Ceci, afin d'établir des valeurs de référence dans la conjonctive oculaire saine du chien. Ainsi, nous pourrions connaître les populations inflammatoires résidentes de façon permanente dans la conjonctive oculaire du chien et cela nous permettrait de poser des bases pour le diagnostic histologique de conjonctivite.

Notre étude est divisée en deux grandes parties :

La première partie, bibliographique, traite de l'histologie de la conjonctive du chien ainsi que des indications et de la réalisation de la biopsie conjonctivale.

La deuxième partie concerne l'étude histologique expérimentale réalisée pour ce travail de thèse.

Partie I. ÉTUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

HISTOLOGIE DE LA CONJONCTIVE DU CHIEN

A. Histologie topographique :

La tunique conjonctive est une muqueuse fine et transparente permettant la transition entre la peau et la cornée. Elle tapisse la face rostrale du globe oculaire et la face postérieure des paupières.

Différentes zones de la conjonctive sont identifiables à faible grossissement (Figure 1).

1. La conjonctive palpébrale ou tarsale

Elle débute au niveau de la fente palpébrale et recouvre toute la face palpébrale postérieure [4]. Elle est subdivisée en deux portions : la portion marginale qui représente la zone de transition avec la peau, et la portion tarsale, qui tapisse la face postérieure de la paupière.

2. La conjonctive bulbaire

Elle fait suite à la conjonctive palpébrale et se prolonge sur le segment antérieur du globe. Elle est également subdivisée en 2 portions :

- La portion sclérale, très lâchement unie à la sclère et l'épiscière sous-jacentes, du fait d'un tissu conjonctif abondant, qui la rend très mobilisable et permet les mouvements du globe,
- La portion limbique ou péricornéenne, souvent pigmentée et adhérente au bulbe [5].

3. La conjonctive des culs-de-sac conjonctivaux ou du fornix

Les conjonctives palpébrale et bulbaire sont reliées par les culs-de-sacs conjonctivaux inférieur et supérieur qui se rejoignent dans la zone des commissures médiales et latérales. La conjonctive des culs-de-sac ou du fornix est formée de la réflexion de la muqueuse sur elle-même. ce qui forme un sac aveugle. A cet endroit, la conjonctive est lâche et présente souvent des plis ou des petits enroulements. Les canaux excréteurs des glandes lacrymales principales, accessoires et de la membrane nictitante débouchent dans les culs-de-sac conjonctivaux [6].

Au niveau du fornix dorsal, la conjonctive est supportée par une extension antérieure du faisceau musculaire des muscles élévateurs supérieur de la paupière et du muscle rectus dorsal. Cette bande musculaire mobilise la conjonctive lâche du fornix avec le globe et prévient sa retombée sur la cornée [7].

4. La caroncule et la membrane nictitante

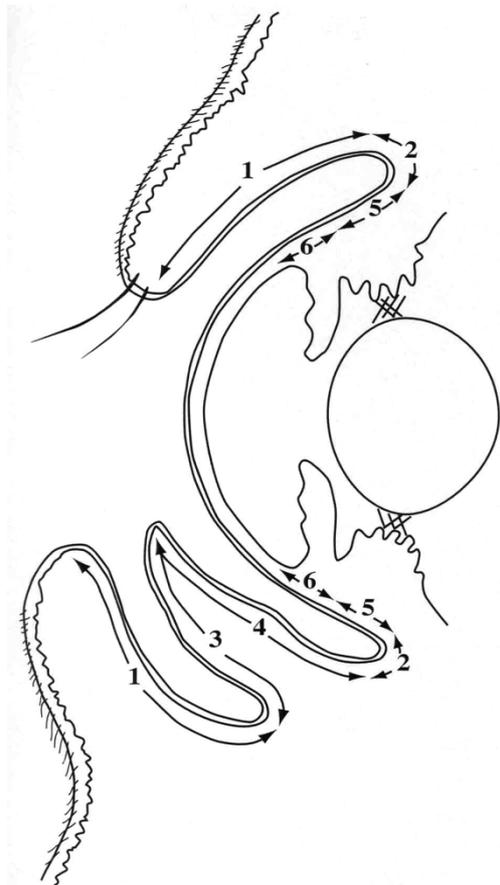
Dans l'angle médial de l'œil, la conjonctive est modifiée par la formation de la caroncule, petite excroissance charnue dans l'angle médial de l'œil et par la membrane nictitante (Figure 2). La membrane nictitante ou troisième paupière est un grand pli de conjonctive qui fait protrusion du côté nasal au dessus de la surface antérieure du globe. Elle est fortifiée par une lame cartilagineuse en forme de T, dont la barre horizontale est parallèle au bord libre de la membrane nictitante et la barre verticale est entourée des glandes lacrymales et de tissu conjonctivo-adipeux profond [5].

Le stroma de la membrane nictitante est un tissu conjonctif fibreux, riche en tissu glandulaire et lymphoïde. Il est plus épais sur la face palpébrale que sur la face bulbaire. Il est plus dense et collagénique vers le bord libre. Il est richement vascularisé et contient des formations lymphoïdes folliculaires éparses, notamment sur la face bulbaire.

Chez le chien comme chez la plupart des animaux domestiques, la mobilité de la membrane nictitante est passive, puisqu'il n'y a pas de muscle mobilisant la membrane nictitante sur la surface de la cornée. Le mouvement est donc indirect et résulte de la contraction du muscle oculaire rétracteur qui attire le globe vers le fond de l'orbite, déplace le corps adipeux, qui à son tour, pousse la membrane nictitante sur la cornée [7].

5. Le sac lacrymal

C'est l'espace clos délimité en avant de la cornée lorsque les paupières sont fermées (Figure 3). Il est rempli du liquide lacrymal qui apporte une protection mécanique et visuelle à l'œil. En effet, les paupières closent filtrent 60 à 70 % de l'intensité lumineuse. Le sac lacrymal permet aussi une oxygénation de la cornée [8].



- 1- conjonctive palpébrale
- 2- fornix
- 3- face antérieure de la membrane nictitante
- 4- face postérieure de la membrane nictitante
- 5- conjonctive bulbaire
- 6- limbe

Figure 1 : topographie des différentes régions de la conjonctive [9]

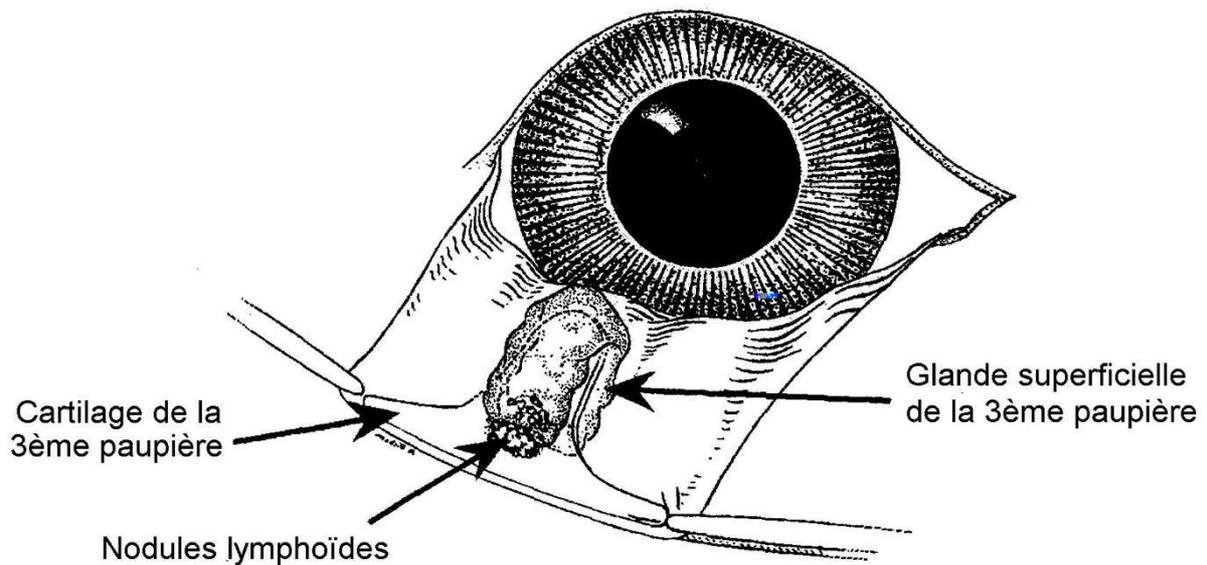


Figure 2 : représentation schématique de la troisième paupière [10]



- ① paupière, versant cutané
- ② soudure palpébrale
- ③ conjonctive palpébrale
- ④ tarse
- ⑤ cul-de-sac conjonctival
- ⑥ membrane nictitante
- ⑦ conjonctive bulbaire
- ⑧ cornée
- ⑨ sac lacrymal

Figure 3 : sac lacrymal sur coupe d'œil de chat nouveau-né [11]

B. Structure histologique de la conjonctive oculaire du chien

La conjonctive est une muqueuse semblable aux autres muqueuses du corps. Elle est composée d'un épithélium qui repose sur du tissu conjonctif lâche et hautement vascularisé appelé chorion ou *lamina propria*.

L'épithélium est stratifié pavimenteux non kératinisé et comporte, en plus des cellules épithéliales, des cellules à mucus, des cellules de Langerhans, occasionnellement des mélanocytes (Hendrix 2007).

Le tissu conjonctif est riche en fibroblastes, lymphocytes et plasmocytes, quelques mastocytes et macrophages sont également présent ainsi que des nodules lymphoïdes isolés ou en agrégats [12].

1. La conjonctive

a. *La conjonctive palpébrale*

Elle est composée d'un épithélium stratifié pavimenteux puis cylindrique avec cellules caliciformes [12].

Dans la portion marginale, l'épithélium stratifié pavimenteux kératinisé de l'épiderme se transforme en un épithélium conjonctival stratifié pavimenteux non kératinisé, au niveau du canal d'abouchement de la glande de Meibomius (Figure 4).

Puis, en s'éloignant de l'extrémité palpébrale, son épaisseur diminue, et les cellules pavimenteuses deviennent de type cylindrique. Parallèlement, apparaissent les cellules à mucus qui sont très abondantes jusqu'au fornix [13].

b. *Le fornix*

Dans la région du fornix, l'épithélium est de type stratifié cylindrique avec des cellules caliciformes (Figure 5). Il surplombe un tissu conjonctival lâche, et présente souvent des enroulements ou des plis qui permettent un déplacement libre lors des mouvements oculaires

C'est dans cette région que les cellules à mucus sont les plus nombreuses, en particulier dans les régions nasal et médial inférieur [1].

c. La conjonctive bulbaire

A partir du fornix, la conjonctive borde la surface du globe, formant la conjonctive bulbaire. Elle est composée d'un épithélium stratifié cubique puis stratifié pavimenteux, avec des cellules caliciformes. Ces cellules disparaissent dans l'épithélium cornéen, qui est de type pavimenteux, stratifié non kératinisé très homogène et régulier, participant de ce fait à la transparence cornéenne [1].

d. Les cellules caliciformes à mucus

Les cellules à mucus sont facilement repérables car caractérisées par leur forte positivité à la réaction à l'A.P.S. qui colore le mucus en rouge fuchsia (Figure 6).

Leur distribution et leur densité varie selon la zone de la conjonctive observée. En effet, elles sont peu présentes au sein de l'épithélium de la conjonctive bulbaire (Figure 7), et proche de zéro dans la région périlimbique. Elles sont en revanche très nombreuses dans le fornix, et principalement dans le fornix nasal et médian inférieur. Elles le sont un peu moins dans la région temporale du fornix et dans l'épithélium tarsal (Figure 8) [14].

e. Le chorion et les formations lymphoïdes

Le chorion est d'épaisseur variable selon les zones considérées : pratiquement virtuel dans la région limbique où la conjonctive est très adhérente à la capsule de Tenon, il est abondant dans la portion sclérale et le fornix. Il repose en profondeur sur le tissu conjonctif sous-conjonctival [13].

Il comprend deux couches [15] :

- une couche superficielle, nommée « adénoïde » ou glandulaire, qui est en fait un tissu conjonctivo-vasculaire lâche comprenant différents types cellulaires et où se localisent les formations lymphoïdes. Cette couche contient de nombreux lymphocytes qui, lorsqu'ils sont stimulés par des antigènes, forment des follicules lymphoïdes actifs et interviennent dans la synthèse locale d'anticorps [1]. Ces follicules sont présents

partout dans la conjonctive, mais ils sont particulièrement nombreux à la surface bulbaire de la membrane nictitante [16] (Figure 9).

- une couche profonde fibreuse et dense, contenant des fibres collagéniques et élastiques, des nerfs et des vaisseaux sanguins [17].

f. La caroncule

La caroncule est une zone de transition entre l'épithélium conjonctival palpébral et la peau adjacente, dans la zone médiale de l'œil. Elle a une structure histologique de conjonctive modifiée avec un épithélium stratifié pavimenteux kératinisé contenant des poils, des glandes sébacées, des acini de glandes lacrymales, des lobules de tissu adipeux, occasionnellement des fibres musculaires, et rarement du cartilage [6].

2. La membrane nictitante

Les faces externe palpébrale et interne bulbaire sont couvertes par un épithélium stratifié pavimenteux, formant des petits festons et possédant de nombreuses cellules caliciformes (Figure 10). Les cellules à mucus sont d'autant plus nombreuses que l'on s'éloigne de l'extrémité libre de la nictitante [14]. Vers sa pointe, les cellules caliciformes ne sont plus observées, et l'épithélium est souvent pigmenté.

3. La vascularisation et innervation

La conjonctive est richement vascularisée (**Figure 11**).

- les arcs palpébraux supérieurs donnent des artéριοles formant le « plexus rétro-tarsien » qui irrigue la conjonctive palpébrale. Des arcs palpébraux supérieurs et inférieurs partent aussi des artères conjonctivales postérieures, qui irriguent les culs-de-sac et la conjonctive bulbaire.
- Les artères ciliaires antérieures prolongent les rameaux musculaires de l'artère ophtalmique et donnent principalement le grand cercle artériel de l'iris. Elles délèguent cependant, juste avant de traverser la sclère, les artères conjonctivales antérieures. Elles irriguent le limbe et la périphérie cornéenne et jouent un rôle dans la nutrition de la cornée. À cet endroit elles forment les boucles marginales. C'est depuis

ces boucles que le bourgeonnement endothélial se produit en réponse à une affection cornéenne, donnant naissance à une vascularisation cornéenne superficielle. Les boucles marginales reçoivent en arrière les anastomoses des artères conjonctivales postérieures [12].

De ce fait, la congestion des artères conjonctivales postérieures et antérieures revêt une clinique et une signification différentes, respectivement dans des pathologies à point de départ conjonctival ou uvéal.

- Les veines conjonctivales forment un réseau dense, drainé par les veines palpébrales et les veines ciliaires antérieures.
- Les vaisseaux lymphatiques de la conjonctive sont organisés en deux réseaux: un réseau superficiel et un réseau profond.
- le réseau superficiel, sous épithélial, est satellite des capillaires sanguins,
- le réseau profond draine le réseau superficiel vers les commissures médiales et latérales, au niveau desquelles il rejoint les lymphatiques des paupières. Le drainage de la commissure latérale se fait dans les nœuds lymphatiques parotidiens alors que les régions médiales le font dans les nœuds lymphatiques sous maxillaires.

La sensibilité de la conjonctive est très vive. Elle est assurée, dans la partie bulbaire péricornéenne par les nerfs ciliaires [18]. Ailleurs, elle dépend des nerfs zygomatofacial, zygomatotemporal, frontaux, lacrymaux infra- et supratrochléaires [19].

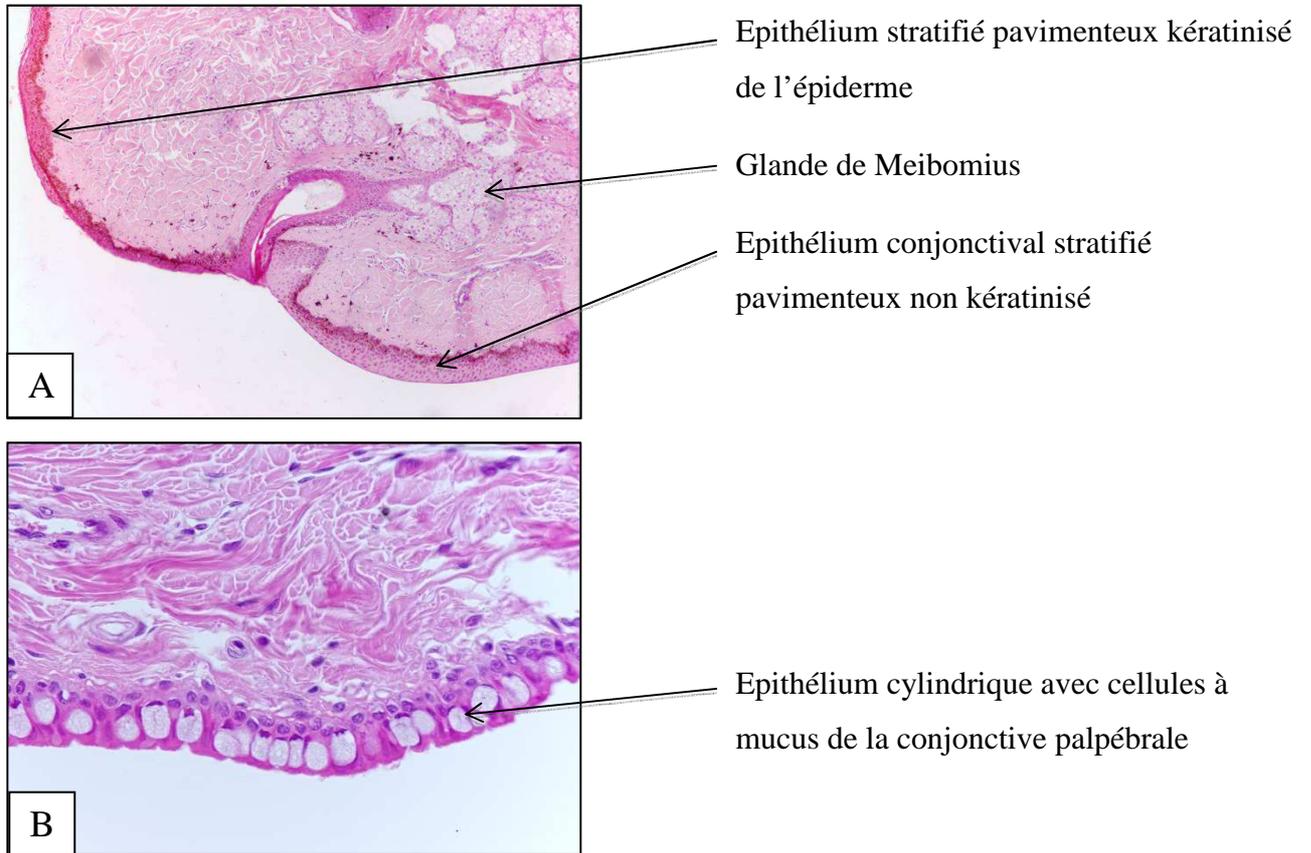


Figure 4 : coupes histologiques de la conjonctive palpébrale à la jonction cutanéomuqueuse (A, H&Ex100) et de sa transformation en épithélium stratifié cylindrique avec cellules à mucus (B, H&Ex400) [11]

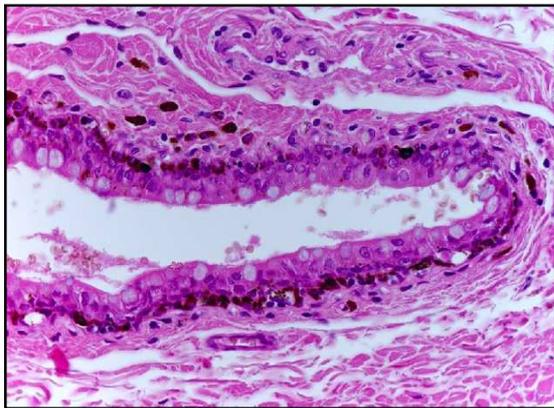


Figure 5 : coupe histologique dans la région du fornix (H&Ex100) [11]

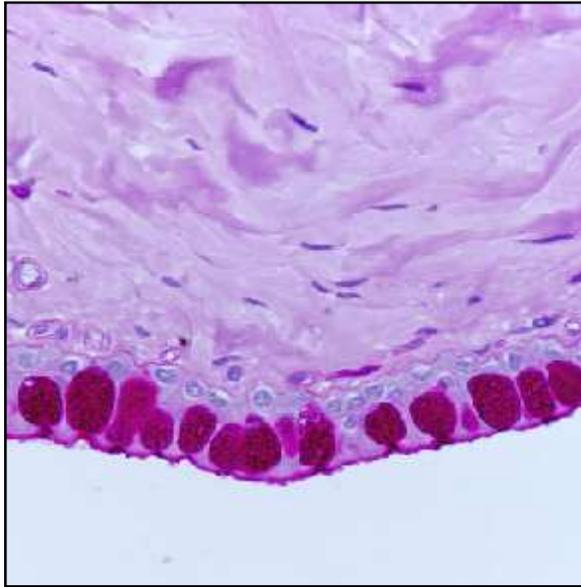


Figure 6 : coloration rouge fuchsia des vacuoles des cellules à mucus sur coupe histologique de la conjonctive dans la portion tarsale (A.P.S x400) [11]

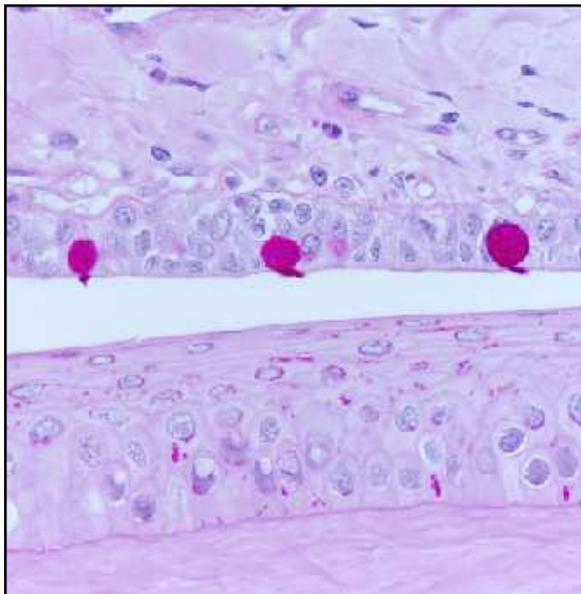


Figure 7 : coupe histologique montrant les cellules à mucus de la conjonctive bulbaire de la membrane nictitante au contact de l'épithélium cornéen (A.P.S x400) [11]

Nasal Médial Temporale

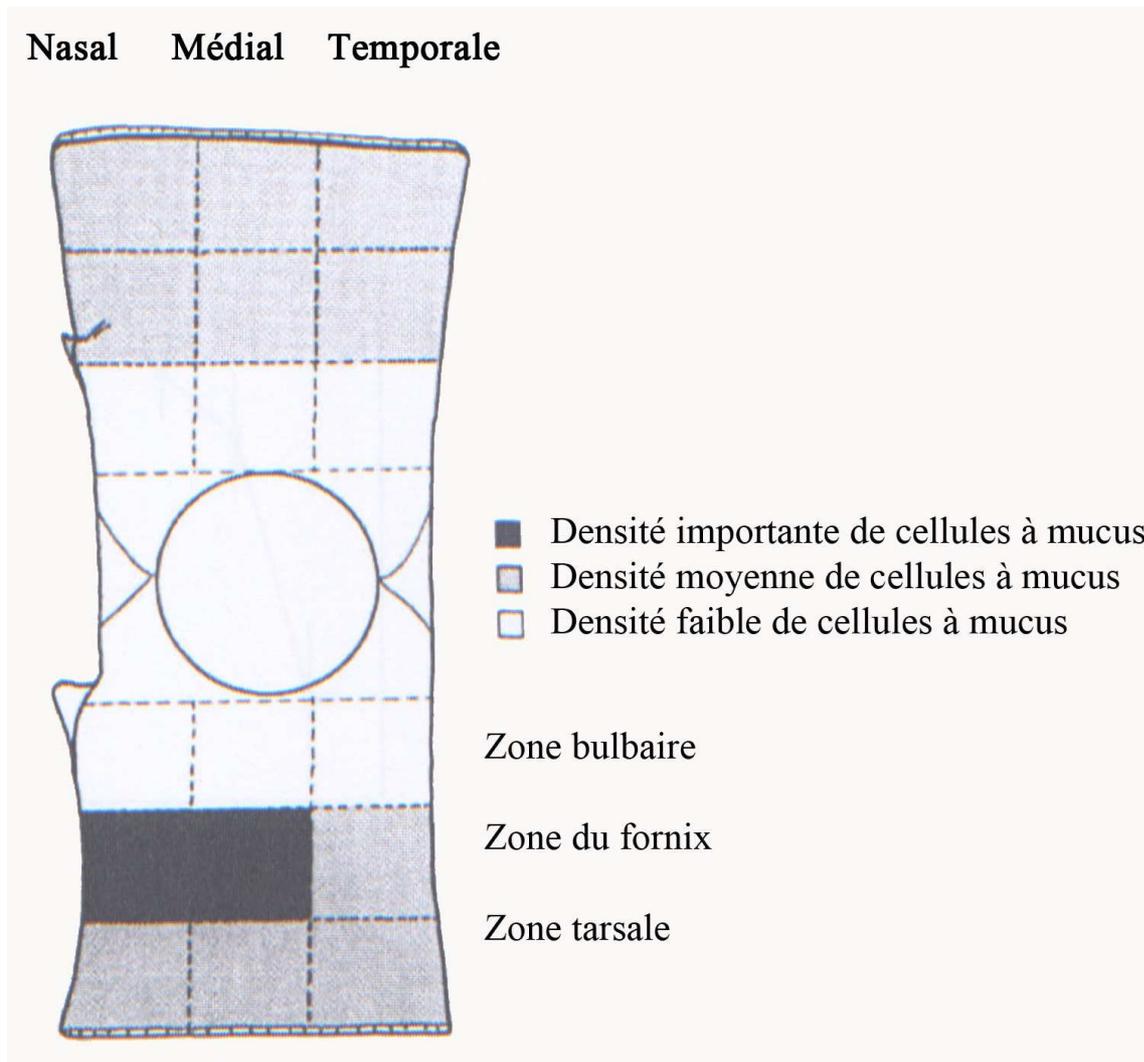


Figure 8 : répartition des cellules à mucus sur coupe histologique [14]

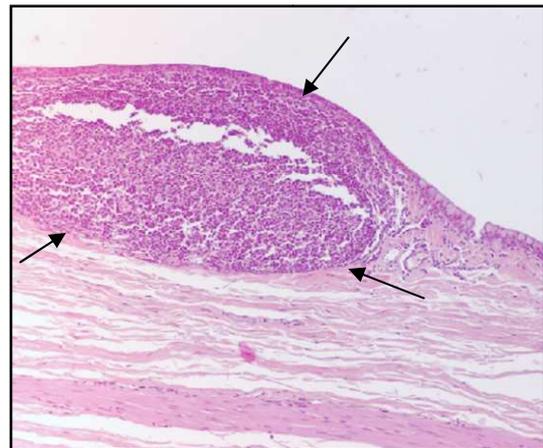
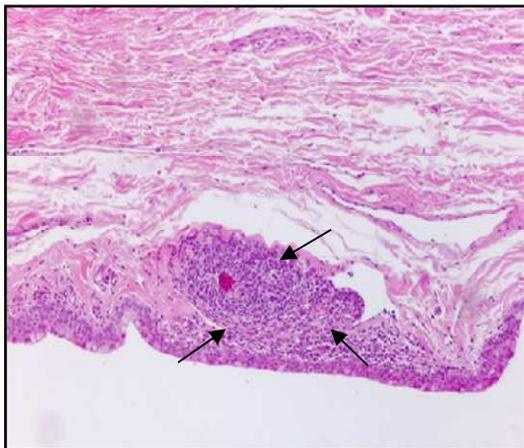


Figure 9 : formations lymphoïdes sur coupes histologiques de conjonctive (H&Ex100) [11]

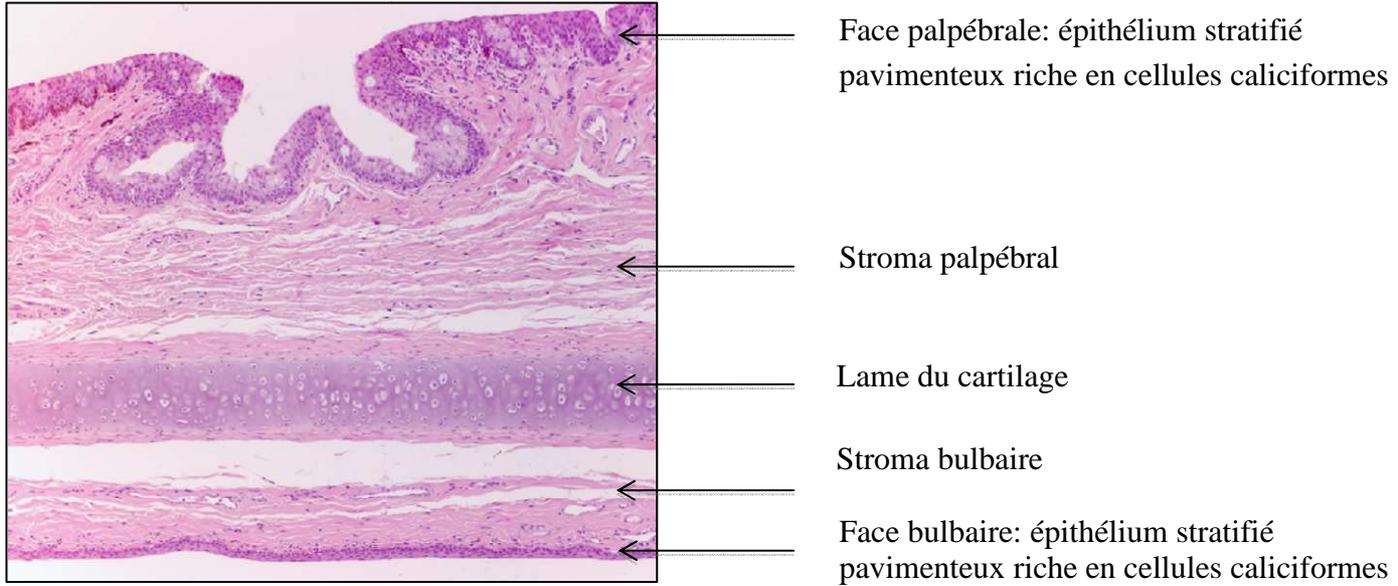


Figure 10 : coupe histologique de la membrane nictitante du chien dans la portion non glandulaire (H&Ex100) [11]

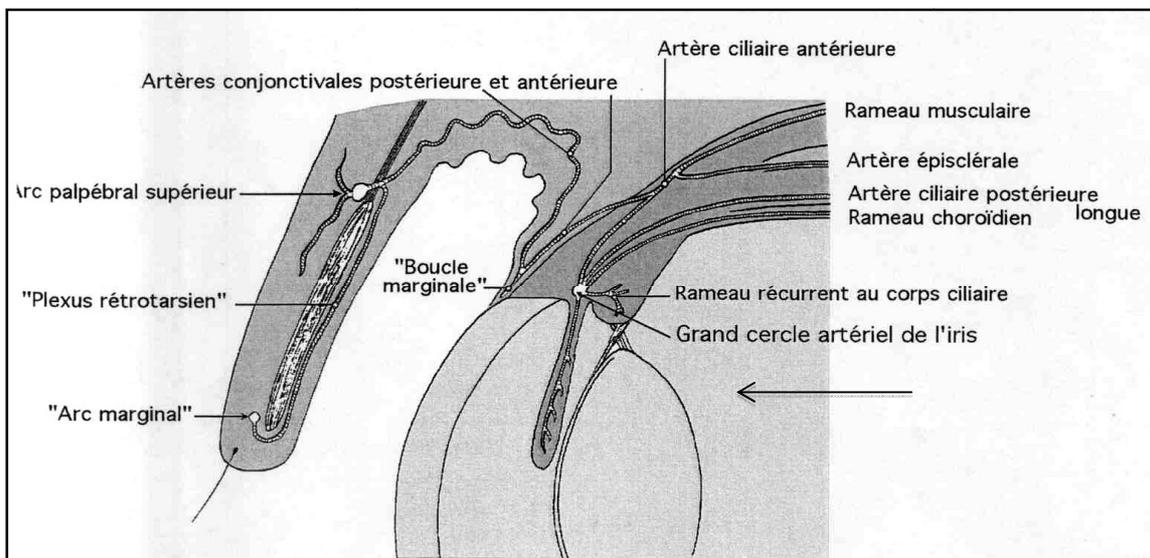


Figure 11 : vascularisation de la conjonctive [20]

C. Histologie fonctionnelle de la conjonctive oculaire du chien

De part sa localisation, la conjonctive est la plus exposée des muqueuses corporelles [12].

1. Un épithélium riche en cellules à mucus

Comme tous les épithéliums, la conjonctive est d'abord une barrière mécanique contre les agressions extérieures, agents physiques, corps étrangers, gaz irritants...

La membrane nictitante, mobilisée comme un essuie glace, contribue à étaler et à répartir uniformément le liquide lacrymal sur la surface cornéenne. Le film lacrymal piège les petits corps étrangers et draine les micro-organismes vers les points lacrymaux où ils sont éliminés. Lors de traitement il véhicule aussi les médicaments [21, 22].

La conjonctive participe à la production de ce liquide lacrymal par l'abondance des cellules à mucus au sein de l'épithélium et des glandes lacrymales (Figure 12).

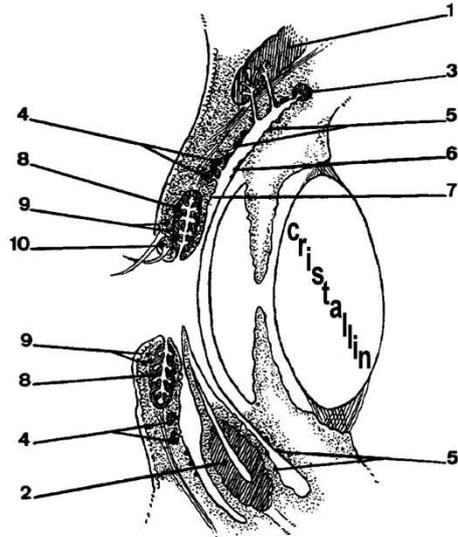
Le liquide lacrymal est composé de 3 phases. Une couche aqueuse produite par les glandes lacrymales (principales, accessoires et nictitantes) qui est intercallée entre une couche mucineuse et une couche lipidique. La couche mucineuse adhère à la cornée et la rend hydrophile. Elle est produite par les cellules à mucus de la conjonctive et abaisse la tension superficielle du film précornéen ce qui lui permet de s'étaler à sa surface et d'y attacher le film lacrymal. La couche lipidique, sécrétée par les glandes de Meibomius, contribue également à l'abaissement de cette tension mais elle limite surtout l'évaporation des larmes (Figure 13).

De plus, une protection immunologique spécifique existe. En effet, le film lacrymal contient de manière physiologique des leucocytes qui proviennent des vaisseaux du limbe et de la conjonctive et du lysozyme qui lui procure une action anti-bactérienne. Leur quantité augmente lors d'irritation ou d'infection oculaire.

L'immunité locale met principalement en jeu les IgA sécrétoires contenues dans la couche aqueuse mais surtout retenues dans le mucus au contact de l'épithélium cornéen. [14].

2. Les formations lymphoïdes du chorion

Le chorion conjonctival, du fait de la présence des formations lymphoïdes éparses appartenant au M.A.L.T. (Mucosal Associated Lymphoid Tissue), représente un système de défense immunitaire sentinelle, qui permet une mobilisation importante des cellules lymphocytaires et sécrétrices d'antigènes localement [23].



- | | |
|--|-----------------------|
| 1 : glande principale | } Sécrétion aqueuse |
| 2 : glande nictitante | |
| 3 : glandes de Krause | |
| 4 : glandes de Wolfring | |
| 5 : cellules caliciformes (« en gobelet ») | } Sécrétion mucinique |
| 6 : glandes de Manz | |
| 7 : cryptes de Henlé | |
| 8 : glandes de Meibomius | } Sécrétion lipidique |
| 9 : glandes de Moll | |
| 10 : glandes de Zeis | |

Figure 12 : les glandes lacrymales du chien [8]

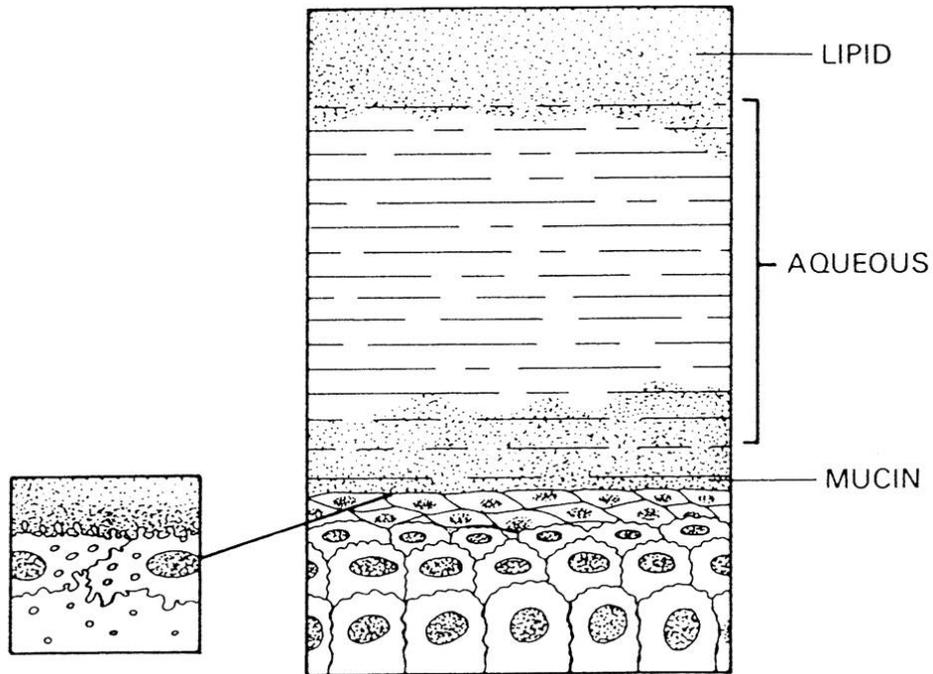


Figure 13 : composition du film lacrymal [24]

INDICATIONS ET RÉALISATION DES BIOPSIES CONJONCTIVALES

La biopsie conjonctivale est un examen complémentaire relativement facile à réaliser et pourtant assez peu utilisé en médecine vétérinaire.

A. Indications

1. Histopathologie générale de la conjonctive :

Les modalités lésionnelles de la muqueuse conjonctivale sont identiques à celle des autres muqueuses de l'organisme. Lors de conjonctivite aiguë, l'on peut observer une congestion active accompagné d'un œdème sévère, avec ou non la présence d'un écoulement oculaire. S'il y a passage à la chronicité, le nombre de cellules à mucus augmente, et on observe une hyperplasie des cellules épithéliales voire une métaplasie squameuse. Les lymphocytes et granulocytes neutrophiles infiltrent le chorion et l'épithélium, les follicules lymphoïdes sont activés. Il est alors difficile de déterminer la cause primaire de la conjonctivite à l'aide d'un simple frottis conjonctival [13].

2. Principales indications de la biopsie

La biopsie est un examen complémentaire très informatif pour certaines pathologies et qui complète parfois la cytologie conjonctivale. En effet, lorsque celle-ci n'a pas fait avancer le diagnostic ou que les traitements mis en œuvre pour traiter la conjonctivite n'ont pas été efficaces, il est judicieux de réaliser un prélèvement biopsique de conjonctive.

Les principales indications de la biopsie conjonctivale sont :

- les conjonctivites chroniques ou kératoconjonctivites chroniques, récalcitrante aux traitements
- les lésions conjonctivales pour lesquelles la cytologie n'a pas permis d'établir un diagnostic positif
- les néoformations conjonctivales, qui peuvent être de nature inflammatoire ou néoplasique
- les conjonctivites éosinophiliques féline [1].

- les suspicions de déficience du film lacrymal mucinique [14].

B. Réalisation

1. Matériel

La biopsie ne nécessite qu'une petite quantité de matériel et elle peut même être réalisée sur animal vigile ce qui lui confère un avantage certain.

- Le collyre anesthésique local :

Le prélèvement ne nécessite qu'une anesthésie locale profonde réalisée avec les collyres anesthésiques classiques : Tétracaïne 0,1% ND et Novésine ND [25]. Parfois, il peut s'avérer nécessaire de réaliser un bloc auriculo-palpébral voir une anesthésie générale si l'animal est trop agité ou que la douleur est trop importante.

- Les instruments de prélèvement :

Ce prélèvement ne requiert qu'une pince à bord mousse et des ciseaux à ténatomie. Puis, la biopsie est déposée délicatement à plat dans une cassette à biopsie ou sur un support plat. L'ensemble est conservé dans un flacon de formol à 10% et envoyé à un laboratoire spécialisé dans les plus brefs délais [25].

2. Méthode

Sur animal vigile, un collyre anesthésique local est instillé à raison d'une goutte toutes les 30 secondes pendant 3 minutes pour réaliser une anesthésie locale profonde suffisante à la réalisation de la biopsie [26]. Une fois l'anesthésie obtenue, la tête de l'animal est maintenue par un assistant et la paupière est éversée. A l'aide de la pince, la conjonctive à prélever est soulevée et une biopsie est alors réalisée en coupant avec les ciseaux à ténatomie au niveau de la base de la partie conjonctivale délicatement soulevée. Si la biopsie n'est pas consécutive à l'apparition d'une masse, la biopsie est réalisée à l'endroit où la conjonctive est la plus lâche, c'est à dire au niveau de la conjonctive bulbaire. C'est une zone facilement mobilisable et manipulable (Gelatt 1974). La cicatrisation se fait par seconde intention après une simple pression au niveau de la zone prélevée pour éviter les saignements [25]. Lorsque cette biopsie a pour but le retrait d'une masse et que l'exérèse est supérieure à 1cm de diamètre, une suture est effectuée pour éviter les symblépharons iatrogènes. Il est parfois conseillé de faire une application pré et post-opératoire de phényléphrine 10% pour contrôler les saignements [7].

Partie II. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

A. Matériel et méthode

1. Animaux

a. Sélection des cas

Les cas sélectionnés sont des chiens présentés en consultation d'ophtalmologie au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (C.H.U.V.) de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (E.N.V.T) entre septembre 2010 et juin 2011. La biopsie est réalisée sur une conjonctive saine. L'animal doit n'avoir reçu ni traitement local sur l'œil prélevé ni traitement par voie systémique pendant minimum un mois avant la date du prélèvement.

Les cas sélectionnés concernent des animaux devant subir une opération chirurgicale avec anesthésie générale sur l'un des yeux, l'autre œil ne présentant aucune pathologie conjonctivale.

b. Identification des animaux et anamnèse

Dix sept cas sont retenus. Pour chacun d'eux, la race, le sexe, et l'âge sont enregistrés.

L'anamnèse et les commémoratifs sont recueillis lors de la consultation et un examen clinique général et ophtalmologique minutieux sont effectués.

c. Consentement des propriétaires

L'autorisation de prélèvement d'un échantillon conjonctival est obtenue auprès du propriétaire de chacun des animaux sélectionnés, après information détaillée. La fiche remplie et signée par le propriétaire comporte les éléments suivants :

- Informations concernant l'animal : nom, race, âge, sexe
- Informations concernant le propriétaire : nom, adresse, numéro de téléphone
- Nature de l'intervention et/ou motif de consultation, et sa date
- Consentement éclairé du propriétaire avec accord pour le prélèvement.

Une fiche vierge est fournie en annexe (Annexe 1).

2. Technique utilisée pour la biopsie conjonctivale

a. Matériel

Le prélèvement ne nécessite que peu de matériel. Seule une pince à bords mousse et de petits ciseaux courbes ont été utilisés. La biopsie obtenue est conservée dans un flacon de formol à 10% contenant au moins neuf fois le volume du tissu à fixer. Il est transféré au service d'Anatomie-Pathologie de l'E.N.V.T. dans les 24 heures, accompagné d'une fiche de commémoratif et du consentement éclairé du propriétaire.

b. Technique de prélèvement

Les prélèvements sont réalisés sous anesthésie générale lors d'une chirurgie sur l'œil non prélevé, au niveau du cul de sac conjonctival inférieur dans sa partie nasale. Il s'agit de la zone où la conjonctive oculaire est la plus lâche. La paupière est éversée et la partie de la conjonctive à prélever est délicatement soulevée avec la pince à bords mousse. Une petite biopsie est alors réalisée en coupant au niveau de la base de la partie conjonctivale soulevée grâce à des petits ciseaux courbes.

La cicatrisation de la partie de conjonctive excisée se fait par seconde intention et une légère pression au niveau du prélèvement permet d'éviter les saignements [25].

3. Technique histologique

a. Fixation

La fixation est réalisée en immergeant immédiatement la biopsie prélevée dans une grande quantité de formol à 10% tamponné à la neutralité. La fixation a pour but d'éviter l'autolyse des tissus, très rapide pour les structures oculaires. Pour cela, on utilise généralement un fixateur chimique, le formol à 10% tamponné à la neutralité étant le plus utilisé en médecine vétérinaire [27]. La fixation, en plus d'inactiver les systèmes enzymatiques en particulier responsables de l'autolyse, permet de préserver la morphologie cellulaire et tissulaire, d'augmenter la consistance du tissu pour faciliter la coupe et de potentialiser la coloration en

améliorant la captation des substances colorantes. De plus, elle stabilise les composants architecturaux tissulaires dans les conditions le plus proches de celles rencontrées *in vivo*. Le processus de fixation est généralement achevé sous 24 à 48 heures.

b. Réalisation des blocs de paraffine

Il s'agit de faire passer les tissus du formol à la paraffine pour réaliser des blocs, puis des rubans, étalés enfin sur des lames de verre.

- Première étape : l'imprégnation

L'inclusion en paraffine des échantillons nécessite d'en extraire l'eau en suivant les étapes de déshydratation effectuées par un automate d'imprégnation en paraffine (HMP 110-MICROM). Pendant un cycle de 15h, les prélèvements sont plongés dans des bains successifs d'éthanol puis rincés dans un bain de solvant organique, le toluène. Ils peuvent ensuite être plongés dans un bain de paraffine liquide à 62°C qui va imprégner profondément le tissu et vont ensuite durcir lors du refroidissement.

- Deuxième étape : l'enrobage

La biopsie imprégnée de paraffine est placée au centre d'un moule rempli de paraffine liquide chaude (60°C), puis le tout est ensuite placé sur une plaque de refroidissement (4°C). La solidification de la paraffine permet de démouler le bloc ainsi obtenu (tissu et paraffine) pour permettre la réalisation des sections histologiques ultérieures.

c. Coupes au microtome

Une fois la paraffine solidifiée, chaque bloc est coupé à l'aide d'un microtome (HM 325-MICROM). Les sections font trois à quatre micromètres d'épaisseur et forment un ruban. Ce dernier est étalé à la surface d'un bain marie à 37°C (GFL 1052, Sodipro) puis, les sections d'intérêt sont pêchées sur des lames de verre superfrost plus (Labonord). Celles ci permettent une meilleure adhésion de la coupe à son support. Les lames placées sur un porte lame sont ensuite séchées à l'étuve pendant 2h à 54°C.

Pour chaque bloc, trois lames blanches sont réalisées afin de pouvoir réaliser les différentes colorations d'intérêt.

d. Coloration des lames

Trois colorations histochimiques sont réalisées pour chacun des prélèvements. Elles permettent de mettre en évidence et de différencier les structures cellulaires et tissulaires. La coloration à l'Hémalun Eosine (H&E) est la coloration utilisée en routine pour l'histologie. Elle permet d'identifier les granulocytes neutrophiles, les granulocytes éosinophiles, les lymphocytes et plasmocytes présents dans l'épithélium, le chorion et les lumières vasculaires. Le dénombrement des mastocytes dans le chorion se fait sur les lames colorées au May-Grunwald Giemsa (M.G.G.). La réaction à l'acide périodique de Schiff (A.P.S.) permet de distinguer clairement, grâce à une coloration rouge fuchsia, les cellules à mucus de l'épithélium, la basale de l'épithélium et des vaisseaux sanguins du chorion, et les granulations cytoplasmiques des granulocytes neutrophiles.

- Coloration des lames à l'Hémalun Eosine

Les lames sont colorées selon le protocole classique de l'E.N.V.T. (Annexe 2). Cette coloration est la plus utilisée en routine en histologie et histopathologie animales.

- Coloration des lames à l'acide périodique de Schiff (A.P.S.)

La réaction à l'A.P.S. est réalisée selon le protocole classique du laboratoire (Annexe 3).

- Coloration des lames au May-Grunwald Giemsa (M.G.G)

De la même façon, les lames ont été colorées selon le protocole réalisé au laboratoire en routine (Annexe 4). Cette coloration va nous permettre de dénombrer les mastocytes présents sur les biopsies.

4. Lecture et quantification

La lecture des lames histologiques est réalisée en microscopie photonique sur un microscope Nikon (Eclipse E400) équipé d'une tête d'enseignement et muni d'objectifs Apo plan x1, x4, x10, x40, et x100.

Une première lecture est faite à faible grossissement pour évaluer la qualité technique de la lame et en préparer de nouvelles si nécessaire.

Des clichés photographiques sont réalisés grâce à une caméra numérique (DS-Fi1, Nikon) branchée sur le microscope et reliée à l'ordinateur (logiciel de capture et de traitement de l'image : NiS-element, Nikon).

Les lames sont identifiées puis numérisées (Plateforme Imag'in de l'institut Universitaire du Cancer, Centre Hospitalier Universitaire Toulouse Purpan). Le périmètre et la surface de chacune des biopsies a est ensuite évalués sur les lames virtuelles (logiciel Panomarc viewer, 3Dhistech) (Photographie A, Isabelle Raymond-Letron 2011).

Le dénombrement des cellules est effectué à l'aide d'un compteur manuel à l'objectif x40, puis à l'immersion. Pour les granulocytes éosinophiles, le comptage est réalisé sur l'H&E. La localisation des cellules est prise en compte. Nous avons défini 3 secteurs distincts : l'épithélium conjonctival, le chorion (excepté les lumières vasculaires) et la lumière des vaisseaux du chorion. Les mastocytes sont dénombrés sur les lames colorées au M.G.G., dans le chorion de la muqueuse.

Les cellules d'intérêt sont identifiées et distinguées des autres types cellulaires, sur les coupes histologiques, grâce à des critères d'identification morphologiques microscopiques brièvement exposés ci-après [28] :

- Les lymphocytes

Ce sont les plus petites cellules de la lignée blanche et constituent 20 à 50% de la population leucocytaire dans le sang circulant du chien. Ce sont de petites cellules rondes, bien colorées, entourées d'une mince couronne de cytoplasme basophile et non granulaire. Le rapport nucléocytoplasmique dépend de son stade d'activité. Lorsqu'ils sont matures, le rapport nucléoplasmique diminue et le cytoplasme bleu foncé et l'arcoplasme, zone du cytoplasme de couleur rose clair au contact du noyau, apparaissent. Le noyau violet foncé occupe la quasi totalité du cytoplasme, il est typiquement arrondi mais légèrement indenté [28].

- Les plasmocytes

Ils sont responsables de la synthèse des anticorps. Ils se caractérisent par un gros noyau granulaire et un cytoplasme de grande taille coloré en violet. Cette coloration violette est due à la coloration basophile du réticulum endoplasmique rugueux largement présent dans le cytoplasme et aux anticorps acidophiles [28].

- Les granulocytes neutrophiles

Ce sont les leucocytes les plus nombreux dans le sang circulant. Ce sont des cellules rondes de 12 à 15µm de diamètre dont le noyau peu volumineux, allongé et surtout polylobé est caractéristique. Le noyau peut avoir jusqu'à 5 lobes, qui sur une coupe, peuvent avoir l'aspect de noyaux séparés les uns des autres. Chez la plupart des mammifères et notamment chez le chien, le cytoplasme est pâle et acidophile. En effet, il est ponctué par un grand nombre de petites granulations primaires azurophiles et secondaires qui peuvent être mises en évidence grâce à un marqueur histochimique pour la phosphatase alcaline [15]. Les neutrophiles sont des cellules très mobiles et sont attirés par la présence d'organisme, en particulier des bactéries.

- Les granulocytes éosinophiles

Les granulocytes éosinophiles représentent 1 à 6% des leucocytes circulants. Leur nombre subit des variations diurnes, le maximum se situant le matin et le minimum l'après-midi [28]. Ils restent dans la moelle osseuse plusieurs jours puis circulent moins d'une heure dans les vaisseaux chez le chien. La majorité d'entre eux gagne ensuite les organes, peau, muqueuses. Ils sont un peu plus gros que les neutrophiles, 12 à 18 µm de diamètre, avec un cytoplasme riche en granulations plus ou moins éosinophiliques, pouvant tirer sur le gris orangé avec des plages incolores chez le chien [15]. Ils possèdent souvent un noyau bilobé qui peut être masqué par les granulations. Ce sont ces granulations qui nous permettent de les distinguer des granulocytes neutrophiliques. Les granulocytes éosinophiles sont attirés par les substances libérées par les basophiles et les mastocytes, en particulier l'histamine, ce qui nous amène à être particulièrement vigilants à leur présence lorsque l'on décompte les mastocytes et inversement [28].

- Les mastocytes

A l'examen en microscopie optique des coupes histologiques de conjonctive oculaire de chiens, les mastocytes sont comptés sur les lames colorées à la coloration M.G.G. Ils sont difficilement identifiables sur les colorations histologiques de routine en raison de l'hydrosolubilité de leurs granules très basophiles qui tend à les faire disparaître au cours de la préparation tissulaire. Ce sont des cellules rondes de grande taille, 20 à 25 μm de diamètre, à noyau rond non segmenté, avec un rapport nucléocytoplasmique moyen et contenant des granulations basophiles remplissant largement le cytoplasme. Ces dernières peuvent aller jusqu'à recouvrir le noyau. Les mastocytes sont des cellules du tissu conjonctif trouvées en particulier dans la peau, au niveau de la muqueuse gastro-intestinale, de la séreuse bordant la cavité péritonéale et autour des vaisseaux sanguins. Dans la conjonctive, elles s'observent dans le chorion [28]. Ainsi, nous avons porté une attention toute particulière aux alentours des vaisseaux lors de la lecture des lames.

Dans notre étude, nous n'avons dénombré que les mastocytes dont le noyau est visible. En effet, sur les lames histologiques, si la coupe ne passe pas par le noyau, seuls des fragments cytoplasmiques contenant plus ou moins de granulations sont observés, et sont parfois plus difficiles à identifier formellement. Pour améliorer la reproductibilité des comptages, nous avons choisi de ne compter que les mastocytes avec un noyau visible et dont les contours cytoplasmiques sont nets.

B. Résultats

1. Population de l'étude :

L'échantillon d'étude regroupe des chiens de toutes races, répartis en 8 mâles et 9 femelles âgés de 5 mois à 14 ans. L'âge moyen des animaux est de 4,3 ans +/- 4 mois avec une médiane à 3 ans. Les motifs de consultation sont variés mais dans tous les cas une chirurgie sous anesthésie générale était indispensable (Tableau 1).

Tableau 1 : anamnèse des chiens prélevés pour biopsie conjonctivale.

Lame	Race	Sexe	Age (années)	Motif de consultation	Œil	Remarques
10P471	Cocker	M	7	Suture cornéenne OD suite à un traumatisme	OG	
10P472	Spitz	F	11	Luxation du cristallin dans la chambre postérieure et glaucome OD	OG	OG: foyer de cataracte
11P33	Carlin	F	2	Cathétérisme des voies lacrymales OG	OD	
11P34	Beauceron	M	2	Cathétérisme des voies lacrymales OD	OG	
11/55	Pointer	M	0,4	Luxation de la glande nictitante OG	OD	
11/63	West Highland Terrier	F	4	dacryocystite OG	OD	décembre 10: chirurgie de cathétérisme des voies lacrymales OD février 11: prélèvement OD
11/64	Bouledogue Anglais	M	4	Luxation de la glande nictitante OG	OD	OD: légère hyperhémie conjonctivale, léger entropion canthus interne
11/95	Leonberg	F	3	Cataracte nucléaire dense OD	OG	décembre 08: phacoémulsification OG février 2011: prélèvement OG

11/106	Berger belge grœnendael	F	5	Exérèse d'adénome des glandes de meibomius OD	OG	
11/107	Bichon	M	1	Luxation de la glande nictitante OG	OD	
11/116	Cairn terrier	F	14	Masse paupière droite	OG	
11/117	Bouvier bernois	M	2	Entropion bilatéral	OG	février 2011 : chirurgie OG mars 2011 : prélèvement OG
11/217	Bleu de Gascogne	F	1	Eversion du cartilage sur OG	OD	
11/249	Berger Allemand	M	4	Plaie palpébrale sur le bord libre inférieur OD	OG	
11/261	Croisé	F	9	Adénome des glandes de Meibomius OG : cryothérapie	OD	mars 2011 : cathétérisme des voies lacrymales avril 2011 : prélèvement OD
11/333	Rottweiler	F	2	Entropion inféro- latéral OG	OD	
11/334	Terre-neuve	M	1	Luxation de la glande lacrymale accessoire OG	OD	Euryblépharon bilatéral, hyperhémie modérée
Moyenne des âges =	4,258823529					
Ecart-type des âges =	3,871540201					
Médiane des âges =	3					

2. Qualité des biopsies

Les biopsies étant réalisées par différents opérateurs, nous avons tout d'abord évalué la qualité des échantillons afin de valider leur inclusion à notre étude. Les critères d'appréciations évalués sont :

- une taille suffisante,
- un épithélium conjonctival intègre, bordant une face de la biopsie
- une épaisseur suffisante, en profondeur, de chorion conjonctival.

Toutes les biopsies réalisées ont répondu à ces critères de qualité et sont incluses à l'étude.

3. Surface des biopsies

Les résultats du périmètre et de la surface de chacune des biopsies identifiées sur les coupes sont fournis dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2 : périmètre et surface des biopsies

Lame	périmètre (mm)	surface (mm ²)
10P471	11,4128	2,137 686 6
10P472	11,6015	2,027 058 5
11P33	8,8969	0,591 102
11P34	18,6025	12,178 957 5
11/55	7,1932	1,319 054 8
11/63	8,8447	1,541 540 7
11/64	14,5387	4,475 551 1
11/95	14,3533	2,170 506
11/106	13,751	3,902 805 2
11/107	11,2939	2,191 971 5
11/116	16,566	3,452 279
11/117	13,3871	2,506 190 6
11/ 217	11,9404	2,943 543 4
11/249	14,1373	4,122 444 9
11/261	8,6024	3,219 060 6
11/333	9,3584	1,372 162 1
11/334	13,1923	1,860 514 6
Moyenne =	12,21602353	3,059 554 65
Ecart-type =	3,05	2,582146136
Médiane =	11,9404	2,19

Les valeurs des périmètres sont comprises entre 7,19 mm pour la lame 11/55 et 18,60 mm pour la lame 11P34. La moyenne des périmètres des biopsies est de 12,22 mm et la médiane à 11,94.

Les surfaces sont comprises entre 0,59 mm² pour la 11P33 et 4,48 mm² pour la lame 11/64. La moyenne des surfaces est de 3,06 mm² et la médiane à 2,19 (Figure 14).

Ces valeurs sont relatives aux échantillons tissulaires fixés et inclus en paraffine, donc ayant subi une rétraction de leur volume inhérente à ce mode de préparation (jusqu'à 50% selon les tissus). Elles reflètent donc une bonne qualité de prélèvement (quantité de tissu appréciable).

4. Comptages des granulocytes éosinophiles

Des granulocytes éosinophiles ne sont retrouvés que sur 2 des 17 biopsies examinées. Pour la lame 10P471, un cocker mâle de 7 ans venu à la clinique pour être opéré de la paupière droite suite à un traumatisme, nous comptons 2 éosinophiles dans le chorion (et 2 mastocytes). Pour la 11/116, une femelle Cairn terrier de 14 ans opérée pour une masse sur l'œil droit, un éosinophile est mis en évidence (et 67 mastocytes) Pour cette biopsie, il y a donc 0,29 éosinophiles par mm². (Tableau 3). Par ailleurs, l'analyse histopathologique de la masse sur l'œil controlatéral n'a pas été réalisée.

Le nombre moyen d'éosinophiles par mm² est de 0,072 avec une médiane à 0.

Ces résultats sont difficiles à exploiter en raison du très faible nombre d'éosinophiles observés. En revanche, on peut retenir que pour quasiment 90% des animaux, aucun granulocyte éosinophile n'est dénombré sur la biopsie.

Tableau 3 : Résultats du comptage des éosinophiles du chorion et des vaisseaux

Lame	Nombre d'éosinophiles dans le chorion	Nombre d'éosinophiles intravasculaires	Nombre d'éosinophiles par mm ²
10P471	2	0	0,935590839
10P472	0	0	0
11P33	0	0	0
11P34	0	0	0
11/55	0	0	0
11/63	0	0	0
11/64	0	0	0
11/95	0	0	0
11/106	0	0	0
11/107	0	0	0
11/116	0	1	0,289663726
11/117	0	0	0
11/ 217	0	0	0
11/249	0	0	0
11/261	0	0	0
11/333	0	0	0
11/334	0	0	0
Moyenne =	0,117647059	0,058823529	0,072073798
Ecart-type =	0,48507125	0,242535625	0,233308613
Médiane =	0	0	0

5. Comptages des mastocytes

Les données brutes de comptage des mastocytes réalisées par les deux lecteurs sont données en annexe (Annexe **MMM**)

Elle montre peu de différence dans les valeurs trouvées.

Les mastocytes sont observés dans 2 localisations principales du chorion de la conjonctive. D'une part dans la zone la plus superficielle, sous épithéliale, et d'autre part, dans les zones

péri-vasculaires du chorion profond. Quelques mastocytes sont aussi observés de façon isolée dans les autres zones du chorion (Figure 15, Figure 16 et Figure 17). Le nombre de mastocytes présent au sein du chorion est remarquablement variable d'un prélèvement à l'autre. Sur 17 biopsies, le nombre de mastocytes varie de 1,5 à 166 avec une moyenne de 26,21 mastocytes par biopsie et une médiane à 13 (Tableau 4).

La lame 10P471 sur laquelle nous avons dénombré le plus petit nombre de mastocytes présente 0,70 par mm^2 . Pour ce qui est de la 11P34 qui en compte 166, le nombre de mastocytes est de 13,63 par mm^2 .

Sur la biopsie 11P33 avec la plus petite surface, 7 mastocytes sont comptés sur 0,591 mm^2 soit 16,07 par mm^2 contre 8 sur la plus grande la 11/64, avec 4,476 mm^2 soit 1,79 mastocytes par mm^2

Tableau 4 : Résultats du comptage des mastocytes

Lame	Moyenne du nombre de mastocytes (établie par 2 lecteurs, M.G.G)	Nombre de mastocytes au mm ²
10P471	1,5	0,70
10P472	23	11,35
11P33	9,5	16,07
11P34	166	13,63
11/55	8,5	6,44
11/63	2	1,30
11/64	8	1,79
11/95	13	5,99
11/106	19	4,87
11/107	23	10,49
11/116	62,5	18,10
11/117	30	11,97
11/ 217	25,5	8,66
11/249	9	2,18
11/261	8	2,49
11/333	25	18,21
11/334	12	6,45
Moyenne =	26,20588235	8,275882353
Ecart-type =	38,78831123	4,973287197
Médiane =	13	6,45

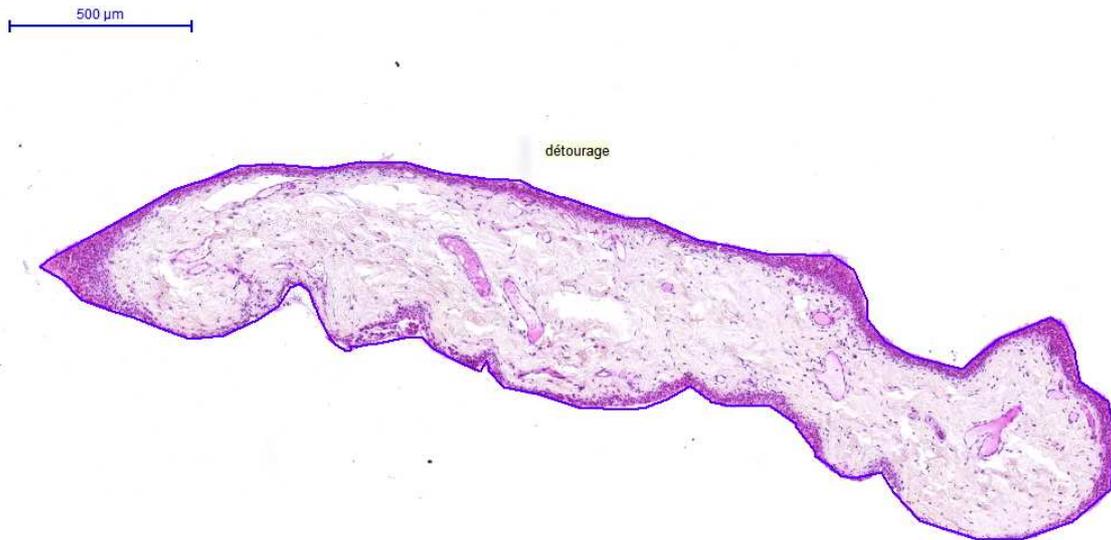


Figure 14 : détourage virtuel d'une biopsie pour en déterminer le périmètre et la surface

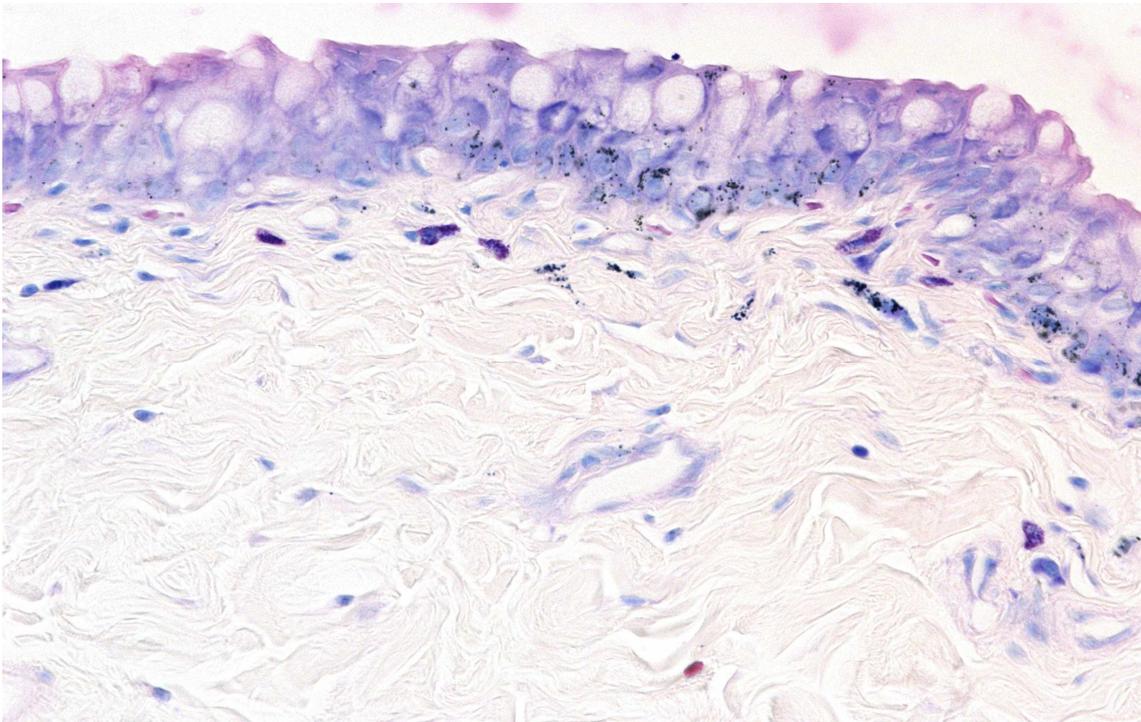


Figure 15 : mastocytes dans le chorion superficiel (M.G.Gx400) (Raymond-Letron 2011)

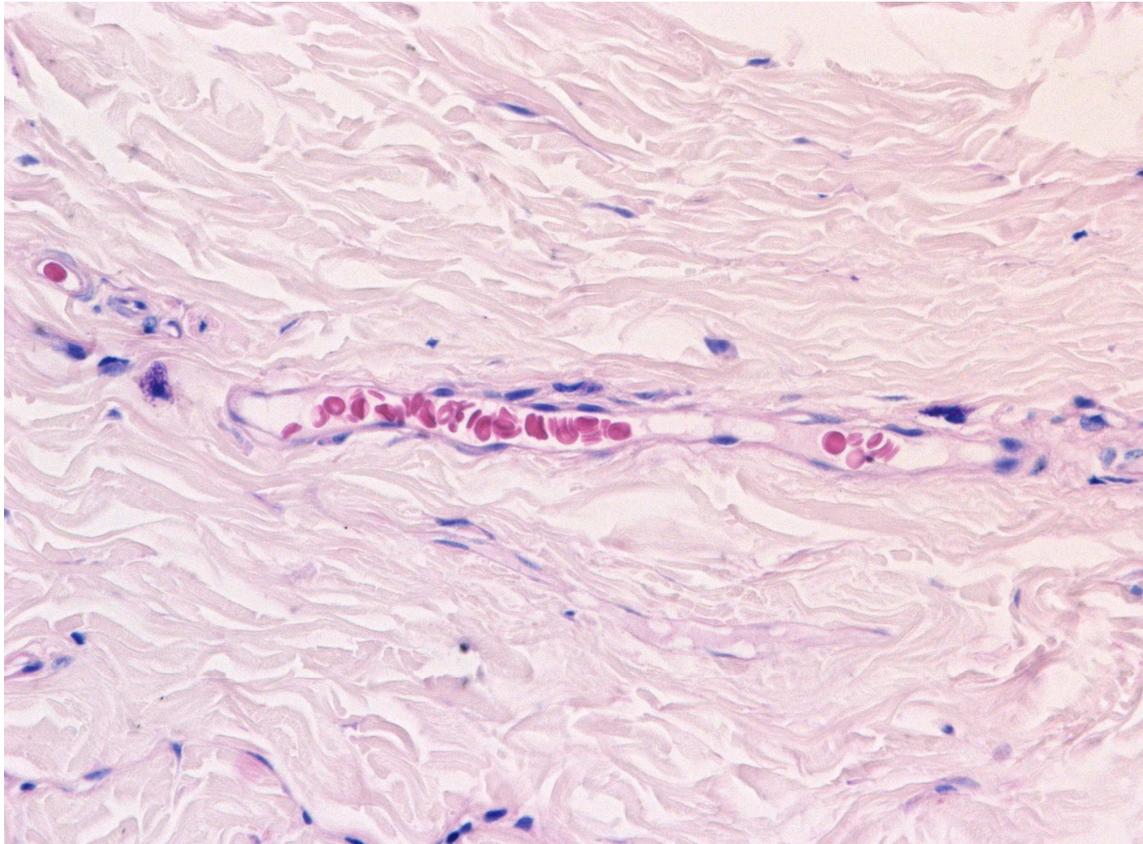


Figure 16 : mastocytes dans le chorion profond (M.G.Gx400) (Raymond-Letron 2011)

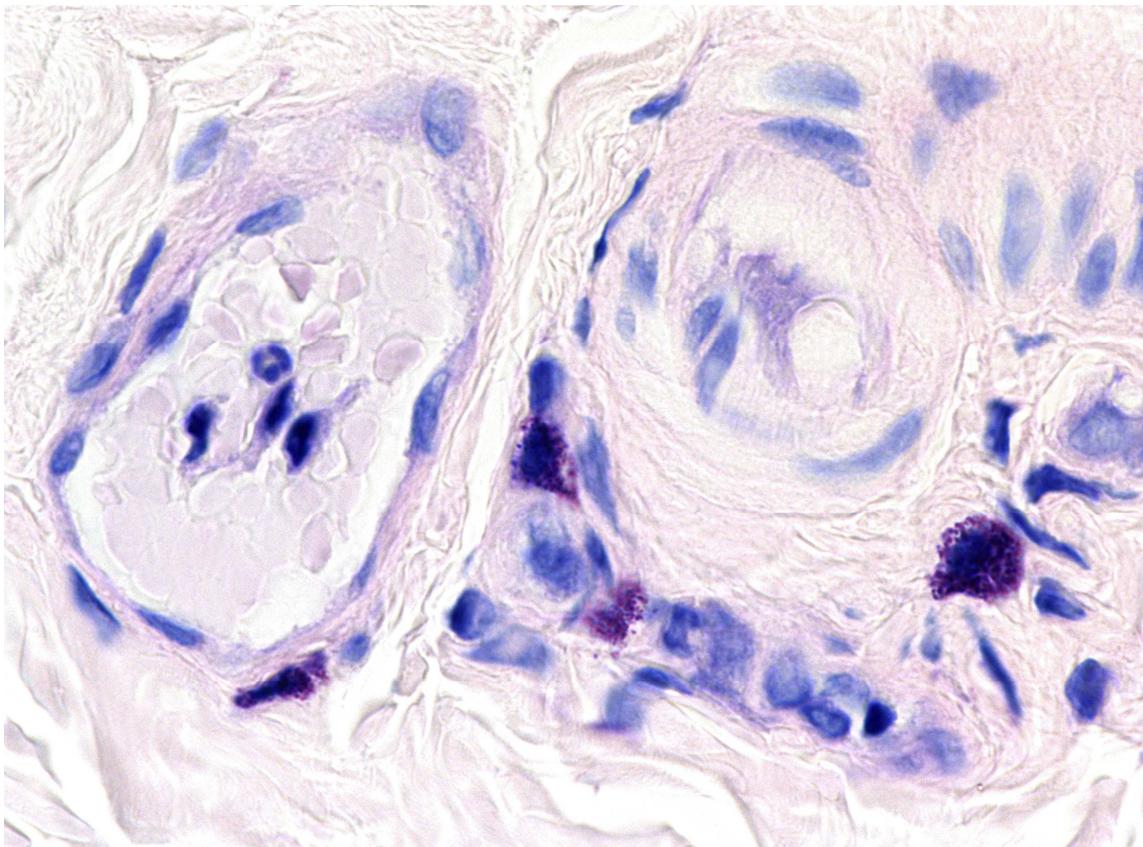


Figure 17 : mastocytes dans le chorion profond, à la proximité des vaisseaux (M.G.Gx1000) (Raymond-Letron 2011)

Echantillon de l'étude :

Nombres de cas inclus à l'étude

Composition de l'échantillon- représentativité

Choix de la technique de prélèvement sous AG

La question d'une modification de l'aspect des biopsies éventuellement introduit par l'anesthésie locale lors des prélèvements de routine en consultation n'a pas pu être évaluée. En effet, nos prélèvements se faisant sous anesthésie générale, aucun anesthésique topique n'a été introduit dans l'œil. Il n'y a donc pas eu d'instillation d'anesthésique topique dans l'œil et donc pas de réaction allergique induite possible. Par contre, en routine, le prélèvement est réalisé sur chien vigile en introduisant de la Tétracaïne 0,1% ND ou de la Novésine ND ce qui, chez certains chiens pourrait éventuellement engendrer une modification tissulaire. Ces éléments pourront faire éventuellement faire l'objet d'une étude ultérieure si nécessaire.

Choix de la localisation du site de prélèvement

Le site de réalisation de la biopsie a été déterminé avec les cliniciens et selon les recommandations de la littérature afin de correspondre au site de prélèvement fait en pratique courante. En effet, comme précisé dans la première partie de ce travail, la muqueuse conjonctivale présente une structure différente selon les localisations. Il est donc possible que les populations cellulaires diffèrent également un peu selon les sites de prélèvement.

Qualité des prélèvements obtenus

Les prélèvements n'ont pas toujours pu être réalisés par le même opérateur ce qui peut constituer un biais pour notre étude. Mais le lieu et le mode de prélèvement étant bien défini par le protocole au préalable, ce ne semble pas avoir impacté notre étude, et notamment la qualité des biopsies soumises pour l'étude.

Les valeurs obtenues de périmètre et la surface des biopsies incluses à l'étude montrent un caractère relativement homogène et satisfaisant des prélèvements réalisés pour ce travail.

Lecture

Les valeurs des comptages obtenues dans notre étude sont issues de la moyenne des comptages de deux lecteurs indépendants, sur les mêmes coupes tissulaires. Les critères de

lecture précis ont été prédéfinis dans une grille de lecture afin que les résultats issus des deux lectures soient le plus cohérent possible (Annexe 5). Ainsi seuls les mastocytes et les éosinophiles dont le noyau était visible sont comptés. Les résultats bruts montrent une très bonne corrélation entre les différents lecteurs, indépendante de l'expérience. Ils montrent donc la validité des résultats pour l'utilisation par d'autres lecteurs en routine.

Lecture sur les lames en verres versus virtuelles

Résultats obtenues

Choix des unités de surface : champ microscopique versus mm²

Les populations dénombrées dans notre étude étant a priori peu représentées dans la conjonctive saine, il ne nous a pas été possible de compter sur des champs microscopiques à l'objectif x40, ce qui est en routine la technique la plus utilisée. Nous avons donc choisi de dénombrer nos populations cellulaires sur l'ensemble du prélèvement biopsique pour chacun des cas, et de ramener ces valeurs à une unité de surface (1 mm²) par la suite.

Les mesures de périmètres et de surfaces ont donc été réalisées sur les lames virtuelles, après les avoir fait scanner sur la plateforme du CHU de Toulouse Purpan. Le logiciel de lecture des lames virtuelles (Panoramic viewer) comporte ensuite les outils nécessaires aux mesures morphométriques de base comme les longueurs et surfaces. Par contre, pour l'identification fine des cellules et leur comptage, l'examen conventionnel avec un microscope photonique permet une meilleure définition, et les variations de la vis micrométriques sont indispensables à une bonne identification des granulations cytoplasmiques des granulocytes éosinophiles.

Périmètre et surface

Les valeurs de périmètre et de surface, même si elles sont variables, montrent que les biopsies étaient toute d'une taille suffisante, et jugée de bonne qualité technique pour l'étude. En routine, les biopsies obtenues sont parfois de taille beaucoup plus restreinte.

Les valeurs de périmètre n'ont pas été corrélées à la surface des biopsies car l'examen morphologique montre que la conjonctive, sous l'effet de la rétraction post-exérèse et post-fixation peut prendre une surface lisse ou au contraire très plissée. Le périmètre va alors être plus faible ou plus élevé respectivement, pour une surface presque identique.

Dénombrement des éosinophiles

Le dénombrement des éosinophiles, en raison de leur très grande rareté, n'a pas été ramené à une unité de surface. L'élément conclusif de l'étude est donc que tout granulocyte éosinophilique présent sur une biopsie conjonctivale doit donc être considéré comme significatif, quelle que soit sa localisation, intravasculaire ou dans le chorion conjonctival.

Il n'a pas non plus été possible, pour les mêmes raisons, de corréler l'abondance du contingent éosinophilique à celui des mastocytes.

La question de l'utilité d'un marquage histochimique ou immunohistochimique spécifique de cette population pour leur dénombrement a été soulevée en début d'étude. Il existe en effet des colorations histochimiques, comme le Rouge Sirius, qui colore spécifiquement les granulations des éosinophiles et permet de mieux les distinguer des granulocytes neutrophiles. Chez l'homme, des marquages immunohistochimiques (**Bonini**) spécifiques sont également disponibles pour le marquage des granulocytes éosinophiles mais ne sont pas validés chez l'animal. Ces techniques spécifiques, si elles augmentent la spécificité de la détection de ces cellules, ne correspondent pas à la réalité de la lecture histopathologique de routine et ne pourraient pas être appliquée sur les biopsies. Il nous a donc paru plus intéressant d'effectuer une lecture dans es conditions de lecture de routine, c'est-à-dire sur les lames à l'Hemalun-éosine.

Dénombrement des mastocytes

Le dénombrement des mastocytes a par contre été réalisé sur une coloration spécifique permettant une meilleure mise en évidence des granulations cytoplasmiques caractéristiques de ces cellules, pour deux raisons :

- d'une part parce que le May-Grunwald Giemsa fait partie des colorations histochimiques de routine, très rapide et très peu couteuse

- d'autre part parce que si l'œil du pathologiste confirmé est capable d'identifier un mastocyte sur une lame en Hemalun-éosine, cela est plus délicat dans un certain nombre de cas pour une analyse par un lecteur moins expérimenté.

Les résultats sont intéressants et montrent que la population des mastocytes dans le chorion conjonctival se répartit dans deux zones principales : d'une part dans la zone très superficielle, sous épithéliale, et d'autre part, dans les zones périvasculaires plus profondes du chorion. Ces deux localisations sont également celles qui sont décrites pour les mastocytes du derme chez le chien (**ref kirk**). Les mastocytes sont beaucoup moins souvent observés dans les autres localisations du chorion conjonctival. Les cellules sont par ailleurs soit isolées, soit en petit groupe de quelques (2-3 à 5-6) cellules.

Le nombre de mastocytes apparait très variable selon les prélèvements et semble donc dépendante de l'individu prélevé. Nos résultats indiquent des valeurs comprises entre 0,2 et 18 mastocytes par mm², avec une moyenne de xx et une médiane de xx. Ces valeurs sont inférieures aux valeurs déterminées dans le derme chez le chien

Il n'a pas été possible dans notre échantillon d'identifier des critères de variation de ces valeurs. Pour préciser si certains critères semblent avoir une incidence, un effectif plus important d'animaux serait nécessaire. Il pourrait également être intéressant d'apprécier le caractère « race dépendant » du nombre de mastocyte de la conjonctive dans des études ultérieures. Des études pourront également dans le futur s'intéresser aux variations de la population mastocytaire dans certains états pathologiques, comme les conjonctivites éosinophiliques par exemple.

CONCLUSION

Notre travail de thèse constitue une étude préliminaire réalisée à partir de 17 prélèvements biopsiques pour l'évaluation des populations de granulocytes éosinophiles et de mastocyte dans la conjonctive normale du chien. Cette étude contribue à une meilleure caractérisation de l'histologie de la conjonctive du chien. Elle montre la significativité de l'observation de granulocytes éosinophiles dans le matériel biopsique conjonctival. Le contingent mastocytaire reste plus délicat à apprécier du fait de sa grande variabilité chez l'animal normal. Des études ultérieures sur un nombre plus important de prélèvements s'avèrent nécessaire pour mieux comprendre les variations des cette population cellulaire.

1. Taille et représentativité de l'échantillon

Sur les 17 chiens prélevés, un chien avait un granulocyte éosinophile visible dans un vaisseau et un autre en avait deux dans le chorion. Il serait toutefois intéressant de continuer les prélèvements sur un échantillon plus grand, dans le but de confirmer notre première estimation. Dans ce cas, nous pourrions nous interroger quant à la nécessité de réaliser des examens complémentaires plus poussés qu'un simple examen oculaire, aussi minutieux soit-il. En effet, une prise de sang pour rechercher une éosinophilie éventuelle paraît intéressante. La conjonctive oculaire étant une muqueuse richement vascularisée, une forte éosinophilie sans conjonctivite, pourrait être à l'origine de leur présence au sein d'un prélèvement .

L'étude de Bonini [29] sur les éosinophiles et l'œil en médecine humaine met en évidence que chez les patients atteints de kérato-conjonctivite sèche (KCS), les éosinophiles et les produits des éosinophiles ne sont pas seulement accumulés dans les tissus mais sont aussi détectés (par cytométrie de flux et immunohistochimie avec Ac monoclonal EG2) dans les vaisseaux périphériques. On peut donc, à juste titre, se demander si, à l'inverse, une éosinophilie systémique ne pourrait pas être à l'origine d'accumulation d'éosinophiles dans la conjonctive oculaire saine du chien. Même si d'après Lavach [3], chez l'homme, une éosinophilie systémique n'est pas associée à la présence d'éosinophiles dans la conjonctive oculaire, une recherche chez le chien pourrait faire l'objet d'une prochaine étude. Aussi, le nombre d'éosinophiles systémiques subissant des variations diurnes, il aurait pu être intéressant de noter l'heure du prélèvement. Dans notre étude, les biopsies ont pour la plupart été réalisées le matin, lors des plages horaires chirurgicales du service d'ophtalmologie de l'E.N.V.T.

C. Discussion

Les populations dénombrées dans notre étude étant a priori peu représentées dans la conjonctive saine, il ne nous a pas été possible de compter sur des champs microscopiques au x40, ce qui est en routine la technique la plus utilisée. Nous avons donc fait la mesure de la surface de la biopsie sur lame numérisée, afin de pouvoir ramener nos comptages à une unité de périmètre et de surface.

1. Contexte et intérêt de l'étude

Comme nous l'avons indiqué en introduction, dans les ouvrages ou articles consacrés à l'histologie de la conjonctive, il n'existe que très peu de références spécifiques d'une espèce donnée [6, 14]. Dans ce contexte, les modifications lésionnelles microscopiques de la conjonctive sur biopsie sont évaluées par rapport à des données générales d'histologie et soumises à l'expérience du pathologiste qui réalise la lecture. Les aspects lésionnels sévères ou typiques, notamment inflammatoires, ne posent pas de problème, mais les modifications lésionnelles plus légères et subtiles peuvent parfois être plus délicates à interpréter. C'est en particulier le cas lors d'observation d'un contingent anormalement important de granulocytes éosinophiles. Il en est de même pour la population mastocytaire. A partir de quel moment peut-on parler d'élévation de ce contingent cellulaire, de lésion mastocytose ou de mastocytome conjonctival débutant ? Quelle signification peut-on donner de façon objective à ces observations ?

De nombreuses biopsies conjonctivales posent ces problèmes d'interprétation diagnostique, notamment dans le contexte des allergies oculaires. Un certain nombre de chiens atopiques présentent des signes modérés de conjonctivite, avec observation de quelques éosinophiles sur les biopsies conjonctivales réalisées. Mais à partir de quel moment doit on conclure à une signification pathologique ?

Les éléments de réponse évoqués dans la littérature sont résumés :

- pour l'histopathologie aux considérations de Dubielzieg, qui dans son ouvrage de référence mentionne d'une part que les éléments morphologiques qui évoquent un diagnostic spécifique de conjonctivite sont rares [2] et d'autre part que lors de conjonctivite, l'hypersensibilité est évoquée quand il y a « augmentation relative » du nombre de mastocytes [2].
- pour la cytologie, à l'étude assez ancienne de Lavach, dans laquelle il détermine une valeur seuil dite pathologique pour les granulocytes éosinophiles. A partir d'un éosinophile décompté sur la cytologie conjonctivale, le prélèvement est considéré comme pathologique et une conjonctivite allergique est évoquée [3].

C'est dans cette problématique que s'inscrit ce travail de thèse vétérinaire, pour tenter de donner un début de réponse objective à ces questions posées au quotidien. Quelle est la population de granulocytes éosinophiles et de mastocytes dans les biopsies conjonctivales de tissu non pathologique chez le chien ?

Pour les biopsies cutanées, bien plus nombreuses en routine histopathologique vétérinaire, des études ont permis de déterminer la valeur normale du contingent de mastocytes, en fonction de l'espèce. Ainsi, chez le chien, le derme présente de façon physiologique 4 à 12 mastocyte par champs au grossissement x400, et 200 mastocyte par mm² de peau examinée. Ces données permettent donc d'évaluer toute augmentation (ou diminution) notable de la population mastocytaire, dans différents contextes pathologiques [30, 31].

2. Nombre de cas inclus à l'étude

Notre étude a été menée sur 1 an, dont 6 mois consacrés au recueil des prélèvements. Cela peut sembler peu, mais différents éléments de l'étude se sont avérés restrictifs :

- le premier concerne la certitude exigée d'une absence de traitement, local ou systémique durant le mois précédent la réalisation de la biopsie. Les chiens présentés en consultation d'ophtalmologie sont pour certains des cas référés par un confrère, ou encore suivi depuis un certains temps, et donc ne sont pas exempts de traitements, local ou systémique, la plupart du temps.

- le deuxième élément a été de décider de prélever uniquement des chiens destinés à une chirurgie oculaire. Ce choix a été fait afin d'obtenir des biopsies n'ayant été soumises à aucun collyre anesthésique, susceptible éventuellement de produire des modifications légères chez certains chiens, de garantir un geste répétable dans des conditions standardisées et de s'assurer qu'il n'y avait aucune complication à la biopsie puisque les animaux étaient ensuite revus dans le cadre de leur suivi post-chirurgical.

- le troisième élément a été le choix de ne pas inclure d'animaux juste décédés ou euthanasiés afin de garantir les commémoratifs, l'absence de traitement ainsi que l'examen général et l'examen ophtalmologique complet des cas inclus à l'étude.

Ces éléments ont donc réduit le nombre de cas potentiellement recrutés pour l'étude, dans le souci d'exploiter une série de cas très standardisée.

Dans la littérature, Pour la détermination d'intervalle de référence XXXX, il est nécessaire, d'après les recommandations internationales, d'avoir au minimum 120 sujets (réf). Notre étude incluse un nombre de cas inférieur, du fait d'éléments restrictifs exposés ci-dessus, ce qui est donc largement au dessous de ces standards. Cependant, nos résultats apportent déjà des éléments valables de description. En effet, ils sont en accord avec les études déjà

réalisées, il existe bien une grande variabilité inter-individuelle dans le nombre de mastocytes présent au sein de la conjonctive saine, et la présence d'éosinophiles est exceptionnelle.

3. Composition de l'échantillon

La population de notre étude comprend un panel varié de races et d'âges d'animaux. Le ratio mâle/femelle est proche de 1. Dans un premier temps, il nous a semblé opportun de recruter de la façon la plus large possible. Il pourrait cependant être intéressant de réaliser par la suite des études plus ciblées en tenant compte de la race. Certaines d'entre elles sont connues pour être prédisposées à des affections éosinophiliques (chiens nordiques) ou mastocytaires (boxers), ou à des états atopiques (boxer, golden retriever) [32]. Il serait intéressant de savoir si cela influence les populations résidentes de granulocytes éosinophiles et mastocytaires dans la conjonctive.

La population de l'étude, réalisée sur chiens de propriétaires et donc de race et d'âge varié diffère de l'approche que l'on peut retrouver pour certaines études histologiques dans lesquelles les animaux utilisés sont des animaux de laboratoire, donc presque exclusivement des chiens beagles jeunes, entretenus en animalerie. Il nous a semblé plus intéressant de travailler sur une population plus proche de la population cible des examens biopsiques histopathologique en routine, et plus éthique de n'avoir pas recours à des animaux d'expérimentation.

Il serait intéressant de regarder si l'âge des chiens qui influence les résultats. Cependant, la composition de notre échantillon est telle que nous ne pouvons pas y répondre. Nous avons en effet 15 chiens considérés comme adultes, un Cairn Terrier de 14 ans et un chiot âgé de moins de 6 mois.

4. Taille et représentativité de l'échantillon

Pour la détermination d'intervalle de référence **XXXX**, il est nécessaire, d'après les **recommandations internationales, d'avoir au minimum 120 sujets (réf)**. Notre étude ne fait référence qu'à 17 cas, ce qui est donc largement au dessous de ces standards. Cependant, nos résultats apportent déjà des éléments valables de description. En effet, ils sont en accord avec les études déjà réalisées, il existe bien une grande variabilité inter-individuelle dans le nombre de mastocytes présent au sein de la conjonctive saine, et la présence d'éosinophiles est

exceptionnelle. Sur les 17 chiens prélevés, un chien a un granulocyte éosinophile visible dans un vaisseau et un autre en a deux dans le chorion. Il serait toutefois intéressant de continuer les prélèvements sur un échantillon plus grand, dans le but de confirmer notre première estimation. Dans ce cas, nous pourrions nous interroger quant à la nécessité de réaliser des examens complémentaires plus poussés qu'un simple examen oculaire, aussi minutieux soit-il. En effet, une prise de sang pour rechercher une éosinophilie éventuelle paraît intéressante. La conjonctive oculaire étant une muqueuse richement vascularisée, une forte éosinophilie sans conjonctivite, peut être à l'origine de leur présence au sein d'un prélèvement. L'étude de Bonini [29] sur les éosinophiles et l'œil en médecine humaine met en évidence que chez les patients atteints de kérato-conjonctivite sèche (KCS), les éosinophiles et les produits des éosinophiles ne sont pas seulement accumulés dans les tissus mais sont aussi détectés dans les vaisseaux périphériques. On peut donc, à juste titre, se demander si, à l'inverse, une éosinophilie systémique ne pourrait pas être à l'origine d'accumulation d'éosinophiles dans la conjonctive oculaire saine du chien. Même si, d'après Lavach [3], chez l'homme, une éosinophilie systémique n'est pas associée à la présence d'éosinophiles dans la conjonctive oculaire, une recherche chez le chien pourrait faire l'objet d'une prochaine étude. Aussi, le nombre d'éosinophiles systémiques subissant des variations diurnes, il aurait pu être intéressant de noter l'heure du prélèvement. Dans notre étude, les biopsies ont pour la plupart sont réalisées le matin, lors des plages horaires chirurgicales du service d'ophtalmologie de l'E.N.V.T.

5. Qualité du prélèvement conjonctival

Les prélèvements n'ont pas toujours pu être réalisés par le même opérateur ce qui peut constituer un biais pour notre étude. Mais le lieu et le mode de prélèvement étant bien défini au préalable, ce fait impacte peu sur la qualité de nos biopsies.

L'anamnèse et les commémoratifs sont pour chaque cas consciencieusement notés, de sorte que l'œil prélevé n'ait pas eu de traitement pouvant interférer avec les résultats obtenus. En effet, tout œil ayant reçu dans le mois précédent la chirurgie, une antibiothérapie ou un traitement antiviral qui pourrait inhiber le développement des cultures, ou encore une corticothérapie qui aurait pu modifier la cytologie, a été exclu de l'étude.

Lavach [3] rapporte dans son article sur la cytologie normale et inflammatoire de la conjonctive du chien et du chat qu'il existe des cas avérés de conjonctivite allergique associés

à l'administration d'atropine chez l'homme. En revanche, toujours chez l'homme, la conjonctivite induite par l'ésérine ou la pilocarpine n'est pas associée à une infiltration éosinophilique. Il semble, d'après nos recherches, que peu de travaux soient fait à ce propos chez l'animal. Dans l'article de Lavach [3], aucun animal avec des signes apparents de toxicoses liées aux médicaments n'a été observé dans l'étude.

La question d'une modification de l'aspect des biopsies éventuellement introduit par l'anesthésie locale lors des prélèvements de routine en consultation n'a pas pu être évaluée. En effet, nos prélèvements se faisant sous anesthésie générale, aucun anesthésique topique n'est introduit dans l'œil. Il n'y a donc pas eu d'instillation d'anesthésique topique dans l'œil et donc pas de réaction allergique induite possible. **Par contre, en routine, le prélèvement est réalisé sur chien vigile en introduisant de la Tétracaïne 0,1% ND ou de la Novésine ND ce qui, chez certains chiens peut engendrer une conjonctivite et biaiser les résultats obtenus (ref).**

6. Lecture

Les valeurs des comptages obtenues dans notre étude sont issues de la moyenne des comptages de deux lecteurs indépendants, sur les mêmes coupes tissulaires. Les critères de lecture précis ont été prédéfinis dans une grille de lecture afin que nos résultats coïncident au maximum (Annexe 5). Ainsi seuls les mastocytes et les éosinophiles dont le noyau est visible sont comptés. Les résultats bruts montrent une très bonne corrélation entre les différents lecteurs, indépendante de l'expérience. Ils montrent donc la validité des résultats pour l'utilisation par d'autres lecteurs.

7. Résultats

Les données sur le périmètre et la surface des biopsies incluses à l'étude montrent un caractère relativement homogène et satisfaisant des prélèvements réalisés pour ce travail.

Notre étude met en évidence une grande variabilité inter-individuelle du nombre de mastocytes présents de façon physiologique au sein de la conjonctive saine du chien. En effet, le nombre de mastocytes varie entre 0,7 à 18,21 par mm² de biopsie avec une moyenne par mm² de biopsie à 1,86 mastocytes, et une médiane de 6,45 mastocytes par mm² de biopsie.

Le périmètre et la surface ne semblent pas influencer nos résultats. En effet, le plus petit nombre de mastocytes n'est pas compté sur la lame présentant ni le plus petit périmètre ni la plus petite surface. En revanche, la lame sur laquelle nous avons dénombré 166 mastocytes correspond bien à la lame avec le plus grand périmètre mais pas à la plus grande surface.

Il semble que le sexe n'influence pas non plus ces variations. En revanche, il serait intéressant de regarder l'âge des chiens qui pourrait influencer nos résultats mais la composition de notre échantillon est telle que nous ne pouvons pas y répondre. Nous avons 15 chiens considérés comme adultes, qu'un Cairn Terrier de 14 ans et qu'un chiot âgé de moins de 6 mois. Nous n'avons dans notre étude pas assez de cas pour s'intéresser à une race en particulier. En effet, nous n'avons pas prélevé deux chiens de la même race. Un travail identique pourrait être mené sur les labradors ou les goldens retriever, races prédisposés à l'atopie.

De plus, il apparaît que le nombre de mastocytes présent au sein de la biopsie n'est pas corrélé à celui des éosinophiles.

Une étude menée sur les éosinophiles et l'œil en humaine [29] compare le nombre de cellules inflammatoires présentes dans la conjonctive oculaire de patients sains et de patients atteints de kérato-conjonctivite sèche. Les biopsies conjonctivales colorées à l'Hemalun Éosine puis par immunohistochimie mettent en évidence une augmentation significative ($P < 0,01$) des éosinophiles (25 \pm 10 éosino/mm² dans l'épithélium et 112 \pm 37cellules/mm² dans le chorion), des mastocytes (entre 8 et 30/champs au x40) et des lymphocytes (entre 10 et 100 par champs au x40) chez les patients atteint de KCS alors que chez les sujets sains, les mastocytes et lymphocytes restent présents bien qu'en moindre nombre (entre 0 et 10 masto/champs au grossissement 40 et entre 10 et 40 lymphocytes). Aucun éosinophile n'est visible (1 \pm 0,2 cellules/mm² dans le chorion et 0 dans l'épithélium).

CONCLUSION

Cette étude montre l'aspect normal de la conjonctive à partir de matériel biopsique. Elle coïncide avec l'étude de Lavach, réalisé sur des frottis conjonctivaux qui conclut à une normalité avec zéro ou proche de zéro pour les éosinophiles.

En ce qui concerne les mastocytes, il existe une grande variabilité inter-individuelle qui demande à être plus étudiée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hendrix DV. Canine Conjunctiva and Nictitating Membrane. In: *Veterinary Ophthalmology*. (ed. Gelatt KN, VMD). 4ème ed. Blackwell Publishing, 2010; 662-670.
2. Dubielzig RR, Ketring KL, McLellan GJ, Albert D. *Veterinary Ocular Pathology* Saunders Elsevier, Edinburgh, 2010.
3. Lavach JD, Thrall MA, Benjamin MM, Severin GA. Cytology of normal and inflamed conjunctivas in dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1977; 170: 722-727.
4. Bacha WJ, Bacha LM. *Color Atlas of Veterinary Histology*. 2nd ed. Williams & Wilkins compagny, Philadelphia, 2000.
5. Banks WJ. In: *Applied Veterinary Histology*. (ed. Reinhardt RW). 3rd ed. George Stamathis, St Louis: Mosby Year Book, 1993; 484.
6. Samuelson DA. *Textbook of Veterinary Histology*. Saunders Elsevier ed. Penny Rudolph, 2007.
7. Slatter A. Eye and adnexa. In: *Textbook of small animal surgery*. W.B.Saunders Compagny Edition ed, Philadelphia, 1990; 1287-1487.
8. Severin GA. Eyelids anatomy. In: *Severin's Veterinary Ophthalmology Notes*. (ed. collins F). 3rd ed, 1998; 151-152.
9. Jongh O. Pathologie de la conjonctive et de la membrane nictitante. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*. 1997; 3 Supplément: 65-74.
10. Gelatt KN. *Veterinary ophthalmology*. 2nd ed., Philadelphia, 1991.
11. Raymond-Letron I. Histologie de la conjonctive et de la membrane nictitante, C.E.S. d'Ophthalmologie Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. 2010.
12. Dellmann H.D, Eurell J. Eye. In: *Textbook of veterinary histology*. (ed. Cann C). 5ème ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1998; p 343-344.
13. Hendrix DV. Canine Conjunctiva and Nictitating Membrane. In: *Veterinary ophthalmology*. (ed. Gelatt KN). Fourth ed. Blackwell, Florida, 2007; 662-675.
14. Moore CP, Wilsman NJ, Nordheim EV, Majors LJ, Collier LL. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1987; 28: 1925-1932.
15. Eurell JA, Frappier BL. *Textbook of veterinary histology*. 6th ed. Blackwell, 2006.
16. Maggs DJ. Third eyelid. In: *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. (ed. Slatter A). Saunders ELSEVIER, 2008; 151-156.
17. Hendrix DV. Canine Conjunctiva and Nictitating Membrane. In: *Veterinary ophthalmology*. (ed. Blackwell P), 2007; 662-675.
18. Hendrix DVH. Canine Conjunctiva and Nictitating Membrane. In: *Veterinary ophthalmology*. (ed. Blackwell P), 2007; 662-675.
19. Lignereux Y. Eléments d'anatomie ophtalmologique du chien *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*. 1997; 32 (supplément 4): 7-20.
20. Lignereux Y. ophtalmologie du chien. *Prat Med Chir Anim Comp*. 1997 tome 32, supplément au n°4,.
21. Nichols BA, Chiappino ML, Dawson CR. Demonstration of the mucous layer of the tear film by electron microscopy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1985; 26: 464-473.
22. Holly FJ. Tear film physiology. *International ophthalmology clinics*. 1987; 27: 2-6.
23. Giuliano EA, Moore CP, Phillips TE. Morphological evidence of M cells in healthy canine conjunctiva-associated lymphoid tissue. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2002; 240: 220-226.
24. Crispin SM. *The pre-ocular tear film and conditions of the conjunctiva and cornea*. British small animal veterinary association ed. Peterson-Jones S.M & Crispin S.M., 1993.

25. Maggs DJ. Conjunctiva. In: *Textbook of Small Animal Surgery*. (ed. Saunders RA). Third Edition ed, 2003; 1340-1486.
26. Slatter D. *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. Saunders Company ed., Philadelphia, 2001.
27. Stevens A, Lowe J. Techniques utilisées en histologie et en biologie cellulaire. In: *Histologie*. (ed. Pradel), 1993.
28. Young B, Heath JW. *Weather's Functional Histology. A text and colour Atlas* Harcourt, 2000.
29. Bonini S, Magrini L, Rotiroti G, Lambiase A, Tomassini M, Rumi C. The eosinophil and the eye. *Allergy*. 1997; 52: 44-47.
30. Muller GH, Kirk MD. *Small Animal Dermatology*. 6th ed. Muller and Kirk, Philadelphia, 2001.
31. Welle M. Distribution, density and heterogeneity of canine and bovine skin mast cells depending on fixation techniques. In: *Advance in Veterinary Dermatology III*. Butterworth-Heinemann ed. Kwochka KW, Boston, 1998.
32. Jaeger K, Linek M, Power HT, Bettenay SV. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Veterinary Dermatology*. 2009; 21: 119-123.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Fiche de consentement éclairé du propriétaire

Annexe 2 : coloration à l'Hémalun-Eosine (H&E)

Annexe 3 : coloration à l'Acide périodique – réactif de Schiff (A.P.S.)

Annexe 4 : Coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG)

Annexe 5 : Grille de lecture des lames

Annexe 6 : Résultats des deux lectures de comptage pour les mastocytes

ANNEXES

Annexe 1 : Fiche de consentement éclairé du propriétaire

FICHE DE RENSEIGNEMENTS : ETUDE HISTOLOGIQUE DE LA CONJONCTIVE DU CHIEN DU SAIN

ETIQUETTE DOSSIER

INFORMATIONS ANIMAL :

Date :.....

Motif de consultation ou d'intervention :

CONSENTEMENT :

J'autorise un prélèvement de conjonctive sur mon/mes chiens, dans le cadre d'un travail expérimental, visant à étudier l'histologie de la conjonctive du chien sain.

Les informations fournies resteront confidentielles et le prélèvement sera anonyme.

Fait à Toulouse, le.....

Le propriétaire :

Le vétérinaire

Annexe 2 : coloration à l'Hémalun-Eosine

C'est la technique la plus couramment utilisée en histologie et en anatomie pathologique de routine.

Principe et objectifs :

Il s'agit d'une coloration bichromique. Le colorant basique, l'hématoxyline, colore les structures acides en bleu violacé. Les noyaux, les ribosomes et le réticulum endoplasmique rugueux ont une forte affinité pour ce colorant en raison de leur richesse respective en ADN et en ARN. En revanche, l'éosine est un colorant acide qui colore les structures basiques en rouge ou en rose. La plupart des protéines cytoplasmiques sont basiques, le cytoplasme des cellules apparaît donc habituellement coloré en rose ou rouge rosé. En général, lorsque cette coloration est appliquée à des cellules animales, les noyaux sont colorés en bleu violet et les cytoplasmes en rose ou rouge.

Mode opératoire :

Première étape : déparaffinage

- 5 minutes dans le toluène

Seconde étape : réhydratation

- 5 minutes dans l'alcool absolu (API – Toulouse)
- 5 minutes alcool à 95°(API – Toulouse)
- 5 minutes sous eau du robinet
- éponger les lames

Troisième étape : coloration et montage

- 1'30 minute dans le colorant hémalun (colorant nucléaire)
- rincer à l'eau : ajouter 3 gouttes d'ammoniaque et laisser couler l'eau
- nettoyer les contours avec du papier
- 3 secondes dans le colorant éosine ; rincer en faisant des bains rapides dans l'eau

- alcool à 95° décolore l'éosine, laisser assez longtemps si les lames sont trop roses.
- Passage à l'alcool absolu
- Toluène (ADL- PROCNILAB-LORMONT)

Résultats

Les noyaux sont colorés en bleu et les cytoplasmes en rose.

Produits :

Hémalun de MAYER réactif de RAL (LABONORD – TEMPLENARDS)

Eosine à 2% : éosine jaunâtre 1g (LABONORD – TEMPLENARDS)

érythrosine 1g (LABONORD – TEMPLENARDS)

eau distillée 100 ml

Annexe 3 : coloration à l'Acide périodique – réactif de Schiff (A.P.S.)

Principe et objectifs :

Réaction permettant de visualiser les groupements alpha glycols des cellules mononuclées du système phagocytaire. Le P.A.S. colore les complexes d'hydrates de carbone en rouge foncé, classiquement appelé magenta.

Processus en deux phases :

Oxydation par l'acide périodique des glycols ; formation de deux aldéhydes voisins.

Mise en évidence de ces groupes d'aldéhydes par le réactif de Schiff (fushine décolorée).

Mode opératoire :

- Déparaffinage et hydratation
- Acides périodiques au 1/100 10 minutes
- Rinçage à l'eau distillée plusieurs fois. Essuyer la lame.
- Dans une boîte de Laverant, placer la lame de prélèvement vers le bas dans le réactif de Schiff 10 minutes
- Rinçage à l'eau courante tiède 3 fois
- Essuyer la lame. Coloration à l'Hémalun 20 secondes
- Déshydratation, passage au toluène et montage

Résultats :

Substance A.P.S. positive colorée en rouge-violacé plus ou moins intense.

La mucine produite par les cellules caliciformes est colorée en magenta par cette technique.

Annexe 4 : Coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG)

Principe et objectif :

L'action des ions acides et basiques obtenus après dissociation par de l'eau neutre de deux colorants alcooliques le May Grünwald (éosine – bleu de méthylène) et le Giemsa (éosine – azur de méthylène) sur les éléments cellulaires complémentaires permet d'obtenir quatre affinités : trois orthochromatiques (acidophile, basophile et neutrophile) et une métachromatique (azurophile). Cette coloration nous permettra de mettre en évidence plus facilement les mastocytes.

Processus et mode opératoire :

- Passer dans le lugol faible pendant 20 minutes
- Puis dans une solution aqueuse d'hyposulfite de sodium à 5% pendant 5 minutes
- Laver à l'eau distillée
- Placer dans le colorant de May-Günwald dilué (pH 6,8) pendant 15 minutes à l'étuve à 37°C
- Sans laver, placer dans le colorant de Giemsa dilué pendant 25 minutes à l'étuve à 37°C
- Laver à l'eau distillée
- Différencier dans de l'eau acétifiée
- Bien égoutter la lame sur du papier avant de déshydrater
- Déshydrater dans un mélange à parties égales d'éthanol absolu et d'acétone
- Toluène. Monter au baume

Résultats :

Une bonne coloration met en évidence l'action complémentaire de tous les composants de deux colorants. Elle est jugée sur un élément neutrophile, les mastocytes dans notre cas. Le noyau est coloré en rouge violet, rose si la coloration est réussie. Ils sont souvent violets tirant sur le bleu. Les cytoplasmes basophiles ou acidophiles. Les granulations des éosinophiles sont orangées, celles des neutrophiles sont roses sales, et celles des basophiles sont violet foncées.

Produits :

- Lugol faible : Lugol ordinaire 3mL
Iodure de potassium 2g
Eau distillée 100 mL
- Lugol ordinaire : Iode 1g
Iodure de potassium 2g
Eau distillée 100 mL
- Colorant de MG : Un volume de MG (solution modifiée selon MG pour la
microscopie – MERCK)
Quatre volumes d'eau tamponnée
- Colorant de Giemsa : Giemsa Biolyon 1 mL
Eau tamponnée 19 mL
- Eau acétifiée : acide acétique 5 – 6 gouttes
Eau distillée 100 mL

Annexe 5 : Grille de lecture des lames

Lame	Date	Lecteur
Surface		
Longueur de muqueuse observée		
Epithélium		
	PNN	
	Eosino	
	Lympho	
Chorion		
Superficie hors vaisseau	Agrégats lymphoïdes	
	Lympho/plasmo	
	PNN	
	Eosino	
MGG	Mastocytes	
Lumières vasculaires		
	Nb où cellules	
	Lympho	
	PNN	
	Eosino	

Annexe 6 : Résultats des deux lectures de comptage pour les mastocytes