

ETUDE DE LA CYTOLOGIE CONJONCTIVALE DU CHEVAL SAIN

I. PREMIERE PARTIE : DONNEES SUR LA CYTOLOGIE CONJONCTIVALE	9
1. PRESENTATION GENERALE DE L'ORGANISATION ANATOMIQUE DE LA CONJONCTIVE.....	9
1.1. Anatomie macroscopique de la conjonctive	9
1.2. Anatomie microscopique de la conjonctive.....	10
1.2.1. Organisation générale.....	10
1.2.1.1. Histologie de la conjonctive	10
1.2.1.2. Les glandes de la conjonctive palpébrale.....	12
1.2.1.3. Les glandes de la membrane nictitante.....	13
1.2.1.4. Le film lacrymal précornéen	14
1.2.2. Description des cellules d'un frottis conjonctival après coloration.....	15
1.2.2.1. Les cellules de la conjonctive	15
1.2.2.2. Les autres cellules.....	18
1.2.3. Eléments non cellulaires pouvant être observés sur un frottis	19
1.2.3.1. Noyaux nus et débris kératinisés.....	19
1.2.3.2. Grains de mélanine	19
1.2.3.3. Flore normale de la conjonctive.....	20
2. METHODES DE COLORATION EN CYTOLOGIE	20
2.1. Les différents protocoles de coloration	20
2.2. Comparaison des différentes techniques	21
2.2.1. La coloration automatique « Hema Tek »	21
2.2.2. La coloration de May-Grünwald/Giemsa.....	21
2.2.3. La coloration Diff-Quik/Cam-Quik	21
2.2.4. La coloration au bleu de méthylène	22
2.3. Conclusion sur les différentes méthodes de coloration	22

2.4. Recommandations pour la coloration des lames.....	22
3. ETUDE DES SECRETIONS CONJONCTIVALES.....	23
3.1. Méthode de prélèvement.....	23
3.2. Traitement de l'échantillon.....	23
3.3. Renseignements apportés par cette méthode.....	23
3.4. Sécrétion conjonctivale non pathologique	24
3.5. Intérêt de cette méthode.....	24
4. METHODES DE PRELEVEMENT DES CELLULES CONJONCTIVALES	24
4.1. Les différents instruments et leur utilisation.....	26
4.1.1. Le coton-tige	26
4.1.2. Spatule arrondie de chimie de 3 mm	26
4.1.3. Micro-spatule de chimie de 3 mm	27
4.1.4. La spatule de Kimura.....	27
4.1.5. La cytobrosse	28
4.2. Comparaison des différents instruments	29
4.2.1. Quantité de cellules prélevées.....	29
4.2.2. Distribution des cellules	30
4.2.3. Intégrité des cellules	31
4.3. Bilan d'utilisation des différents instruments et conclusion sur les méthodes de prélèvement de la conjonctive	32
5. AUTRE METHODE DE PRELEVEMENT CONJONCTIVAL : LA TECHNIQUE D'EMPREINTE.....	34
5.1. Principe	34
5.1.1. Matériel.....	34
5.1.2. Réalisation pratique	34
5.1.3. Traitement du filtre	35

5.1.3.1. Méthode de transfert	35
5.1.3.2. Méthode de transparisation	35
5.2. Intérêts et limites de cette méthode.....	36
6. CONCLUSION : INDICATIONS CLINIQUES DE LA CYTOLOGIE	
CONJONCTIVALE.....	36
6.1. Les utilisations fréquentes du frottis conjonctival.....	36
6.2. Les autres utilisations du frottis conjonctival.....	37
6.2.1. Utilisation du frottis conjonctival en bactériologie.....	37
6.2.2. Utilisation du frottis conjonctival en mycologie	37
6.2.3. Utilisation du frottis conjonctival en virologie.....	38
6.2.4. Utilisation du frottis conjonctival en immunologie.....	38
6.2.5. Utilisation du frottis conjonctival en PCR (polymerase chain reaction)	38
II. DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE DE LA CYTOLOGIE	
CONJONCTIVALE D'UNE POPULATION DE CHEVAUX SAINS EN REGION	
TOULOUSAINNE	39
1. MATERIELS ET METHODES.....	39
1.1. Animaux de l'étude	39
1.2. Méthode de prélèvement.....	40
1.2.1. Préparation de l'animal	40
1.2.2. Réalisation pratique du frottis	42
1.2.3. Etalement du frottis.....	43
1.2.4. Fixation du frottis.....	44
1.2.5. Identification de l'échantillon	44
1.3. Protocole de coloration suivi pour l'étude	44
1.4. Montage des lames	45
1.5. Lecture des lames	45

1.5.1. Appréciation de la qualité des lames	45
1.5.1.1. Qualité de la coloration.....	45
1.5.1.2. Qualité de l'étalement.....	45
1.5.2. Méthode de lecture	46
1.5.2.1. Evaluation qualitative des frottis	46
1.5.2.2. Approche quantitative des frottis	47
2. RESULTATS	48
2.1. Appréciation de la qualité des prélèvements cytologiques	48
2.1.1. Evaluation qualitative	48
2.1.2. Analyse quantitative.....	51
2.2. Descriptif quantitatif d'une cytologie conjonctivale	52
2.2.1. En nombre absolu.....	52
2.2.2. En pourcentage	61
2.3. Descriptif cytologique	68
3. DISCUSSION	68
3.1. Méthode de préparation d'un frottis conjonctival	68
3.2. Population cellulaire rencontrée lors d'un frottis conjonctival chez le cheval.....	69
4. CONCLUSION	70

Figure 1: Régions de la conjonctive.....	10
Figure 2 : Coupe histologique de conjonctive palpébrale (Leeson and Leeson 1979).....	12
Figure 3 : Les glandes palpébrales (Stevens and Lowe 1993).....	13
Figure 4 : Glandes et cellules à l'origine du film lacrymal précornéen (Gelatt 2000)	14
Figure 5: Cellules en colonne et à mucus chez un chien (Prasse and Winston 1999)	16
Figure 6 : Cellules conjonctivales superficielles chez un chat (Jégou and Liotet 1991)....	17
Figure 7 : Cellules superficielles pigmentées chez un chat (Jégou and Liotet 1991).....	17
Figure 8 : Cellules conjonctivales intermédiaires chez un chien (Jégou and Liotet 1991)	17
Figure 9 : Cellules basales, intermédiaires et superficielles	18
Figure 10 : Cellule en voie de kératinisation et polynucléaire neutrophile (Jégou and Liotet 1991)	18
Figure 11 : Spatule de Kimura (T.Ramsey 1994)	27
Figure 12 : Prélèvement à la spatule de Kimura (T.Ramsey 1994)	28
Figure 13 : Cytobrosse	28
Figure 14 : Instillation de l'anesthésique local	41
Figure 15 : Exposition de la troisième paupière.....	42
Figure 16 : Prélèvement à la cytobrosse	43
Figure 17 : Notation des lames sur les 3 critères.....	48
Figure 18 : Notation de la cellularité des lames	48
Figure 19 : Notation de la distribution des lames.....	49
Figure 20 : Notation de l'intégrité cellulaire des lames.....	49
Figure 21 : Evaluation quantitative des lames	50
Figure 22 : Nombre moyen de cellules superficielles par cheval	53
Figure 23 : Nombre moyen de cellules intermédiaires par cheval	53
Figure 24 : Nombre moyen de cellules profondes	54
Figure 25 : Nombre moyen de cellules à mucus.....	54
Figure 26 : Nombre moyen de cellules cylindriques par cheval.....	55
Figure 27 : Nombre moyen de lymphocytes par cheval.....	55
Figure 28 : Nombre moyen de plasmocytes par cheval.....	56
Figure 29 : Nombre moyen de granulocytes neutrophiles par cheval.....	56
Figure 30 : Nombre moyen d'éosinophiles par cheval.....	57
Figure 31 : Nombre moyen de mastocytes.....	57
Figure 32 : Nombre moyen de lymphoblastes par cheval.....	58

Figure 33 : Bilan du nombre moyen de cellules lors d'un frottis conjonctival chez le cheval	58
Figure 34 : Pourcentage de cellules superficielles.....	61
Figure 35 : Pourcentage de cellules intermédiaires.....	61
Figure 36 : Pourcentage de cellules profondes	62
Figure 37 : Pourcentage de cellules à mucus.....	62
Figure 38 : Pourcentage de cellules cylindriques	63
Figure 39 : Pourcentage de lymphocytes	63
Figure 40 : Pourcentage de plasmocytes	64
Figure 41 : Pourcentage de granulocytes neutrophiles	64
Figure 42 : Pourcentage d'éosinophiles.....	65
Figure 43 : Pourcentage de mastocytes	65
Figure 44 : Pourcentage de lymphoblastes	66
Figure 45 : Pourcentage moyen des différents types cellulaires lors d'un frottis conjonctival chez le cheval.....	66

INTRODUCTION

La cytologie est l'étude morphologique d'amas cellulaires ou de cellules isolées, sorties de leur contexte tissulaire.

L'examen cytologique est utilisé en routine dans différents domaines tels que la cancérologie, la dermatologie ou encore l'ophtalmologie.

La cytologie conjonctivale consiste en la récolte d'un échantillon de cellules de la conjonctive de l'œil, l'analyse puis l'interprétation de celles-ci. Cet examen est pour le vétérinaire une étape essentielle au diagnostic étiologique des conjonctivites et entre en compte au niveau pronostic.

Les échantillons à analyser en cytologie sont recueillis rapidement et leur méthode de prélèvement ne présente la plupart du temps que très peu, voire aucun risque pour le patient.

C'est un examen complémentaire qui ne coûte pas cher et qui permet souvent une interprétation médicale alors que le client se trouve encore en salle d'examen.

Trois étapes techniques précèdent et conditionnent la lecture et l'interprétation des lames. Ce sont la récolte des cellules, l'étalement de l'échantillon sur la lame et la méthode de coloration

Dans cette étude, nous allons nous intéresser plus particulièrement à la cytologie conjonctivale, c'est à dire à l'étude des cellules de la partie conjonctive de l'œil.

En matière de cytologie conjonctivale, nous avons très peu de références concernant l'espèce équine. Ces références paraissent pourtant nécessaires, étant donné l'importance des affections du segment antérieur de l'œil du cheval auquel la conjonctive appartient. Les paupières sont la partie de l'œil qui est la plus exposée et elles sont donc sujettes à des infections mais sont aussi relativement faciles à examiner.

Comme pour les autres espèces animales, dont le chien et le chat, l'intérêt de définir une population cellulaire normale de la conjonctive oculaire du cheval est avant tout une aide au diagnostic.

En effet, la cytologie conjonctivale est la méthode de choix pour le diagnostic des conjonctivites ainsi que pour leur suivi. On l'utilise aussi fréquemment lorsque l'on suspecte un problème tumoral.

Cette étude concernera uniquement les aspects normaux de la cytologie conjonctivale de l'œil du cheval, en posant des bases pour la comparaison avec des frottis pathologiques.

Cet exposé sera donc divisé en deux grandes parties :

La première partie fera le point sur les connaissances anatomiques de la conjonctive ainsi que sur les précédentes études qui ont été réalisées sur le même sujet.

La deuxième partie concernera plus précisément l'étude que nous avons réalisée.

I. PREMIERE PARTIE : données sur la cytologie conjonctivale

1. Présentation générale de l'organisation anatomique de la conjonctive

1.1. Anatomie macroscopique de la conjonctive

La conjonctive est une des entités principales des structures annexes de l'œil, au même titre que les paupières et l'appareil lacrymal. (Stevens and Lowe 1993)

C'est une muqueuse très vascularisée qui commence au bord libre de la paupière, tapisse la face postérieure de la paupière (conjonctive palpébrale), se réfléchit au niveau du fornix et revêt la portion antérieure de la sclère (conjonctive bulbaire). (Clerc 1997; Francart and Clerc 1981; T.Ramsey 1994)

La conjonctive recouvre aussi les faces antérieure et postérieure de la membrane nictitante ; elle peut être considérée comme un pli de conjonctive recouvrant un morceau de cartilage qui est élastique chez le cheval. (Banks 1993)

On distingue ainsi deux sortes de revêtement conjonctival :

La conjonctive palpébrale qui borde la surface interne des paupières, le fornix et la face antérieure de la troisième paupière.

La conjonctive bulbaire qui recouvre la surface antérieure du globe jusqu'à la limite cornéenne (le limbe) et la surface postérieure de la troisième paupière. (Jongh 1994)

La conjonctive est recouverte par le film lacrymal, réparti sur la surface du globe oculaire par les mouvements des paupières supérieures et inférieures et de la membrane nictitante. (Francart and Clerc 1981)

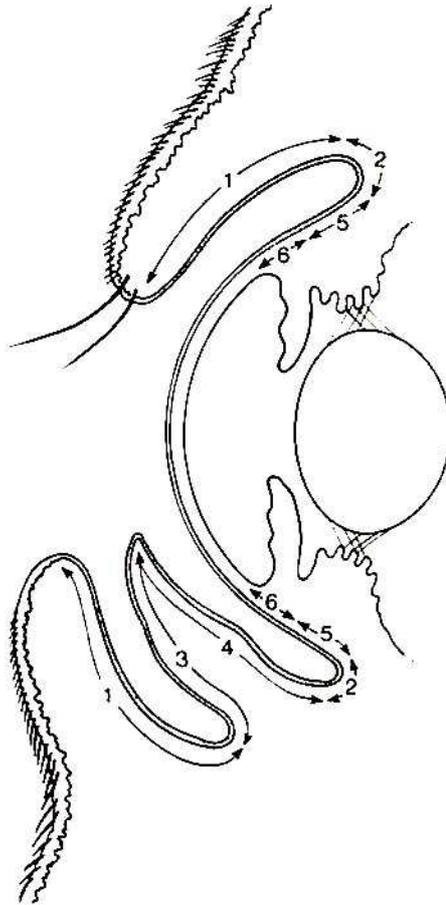


Figure 1: Régions de la conjonctive

1- conjonctive palpébrale ; 2- fornix ;
 3- face antérieure de la membrane nictitante ; 4- face postérieure de la membrane
 nictitante ; 5- conjonctive bulbaire ; 6- limbe (Slatter 1990)

1.2. Anatomie microscopique de la conjonctive

1.2.1. Organisation générale

1.2.1.1. Histologie de la conjonctive

La conjonctive est une membrane muqueuse constituée d'un épithélium non kératinisé.

La conjonctive palpébrale est constituée d'un **épithélium pseudostratifié cylindrique**.

La conjonctive bulbaire est constituée d'un **épithélium stratifié pavimenteux**.

On trouve des nodules lymphoïdes répartis sur la surface bulbaire de la membrane nictitante. (Banks 1993; Curiel, Moore et al. 1992; Jongh 1994)

L'épithélium conjonctival bulbaire est arrangé en couches cellulaires : on trouve les cellules immatures au niveau de la membrane basale et les cellules matures exposées en surface.(Lavach, M.A.Thrall et al. 1977).

L'épithélium de la **conjonctive bulbaire** est composé de trois couches : (Francart and Clerc 1981; Jongh 1994) :

- La couche des **cellules superficielles squameuses**,
- la couche des **cellules polyédriques intermédiaires**, et
- la couche des **cellules cubiques basales**.

L'épithélium de la **conjonctive palpébrale** est composé de **cellules colonnaires** et de **cellules à mucus dites caliciformes**, réparties isolément ou en amas dans l'épithélium, surtout au niveau de la région du fornix ou sur la surface palpébrale de la membrane nictitante. On en trouve moins au niveau de la conjonctive bulbaire.

L'épithélium conjonctival repose sur un tissu de collagène contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi qu'un certain nombre de cellules immunocompétentes (des lymphocytes). Ce tissu conjonctif est appelé « **lamina propria** » ou « **chorion** ».

La présence de cellules kératinisées est anormale sauf si ce sont des cellules qui proviennent du limbe palpébral. (Curiel, Moore et al. 1992)

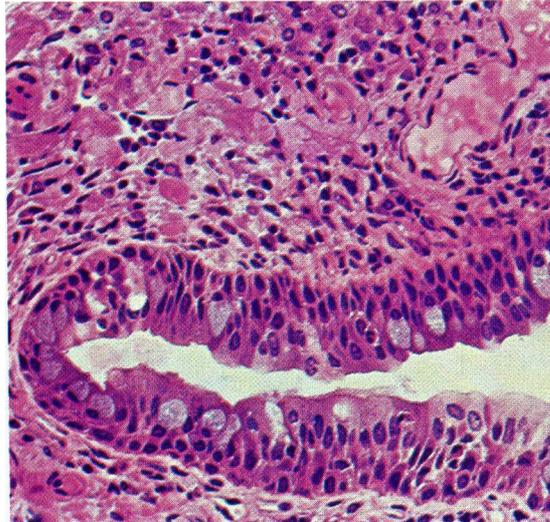


Figure 2 : Coupe histologique de conjonctive palpébrale (Leeson and Leeson 1979)

1.2.1.2. Les glandes de la conjonctive palpébrale

Au niveau de la conjonctive palpébrale, on trouve 3 types de glandes : (Stevens and Lowe 1993; Regnier 2002)

Les glandes de Meibomius sont de type sébacé et sécrètent une substance riche en lipides qui permet la diminution de l'évaporation du film lacrymal qui protège et lubrifie la cornée ; elles sont situées verticalement au niveau du tarse (lame fibreuse de collagène maintenant les paupières tendues) et leurs conduits excréteurs débouchent le long du limbe palpébral postérieur, en arrière des cils.

Les glandes de Krause sont des glandes lacrymales accessoires de type tubulo-acineux qui sont situées dans le cul-de-sac conjonctival.

Les glandes de Wolfring sont des glandes lacrymales accessoires situées juste au dessus du feuillet du tarse, à sa périphérie.

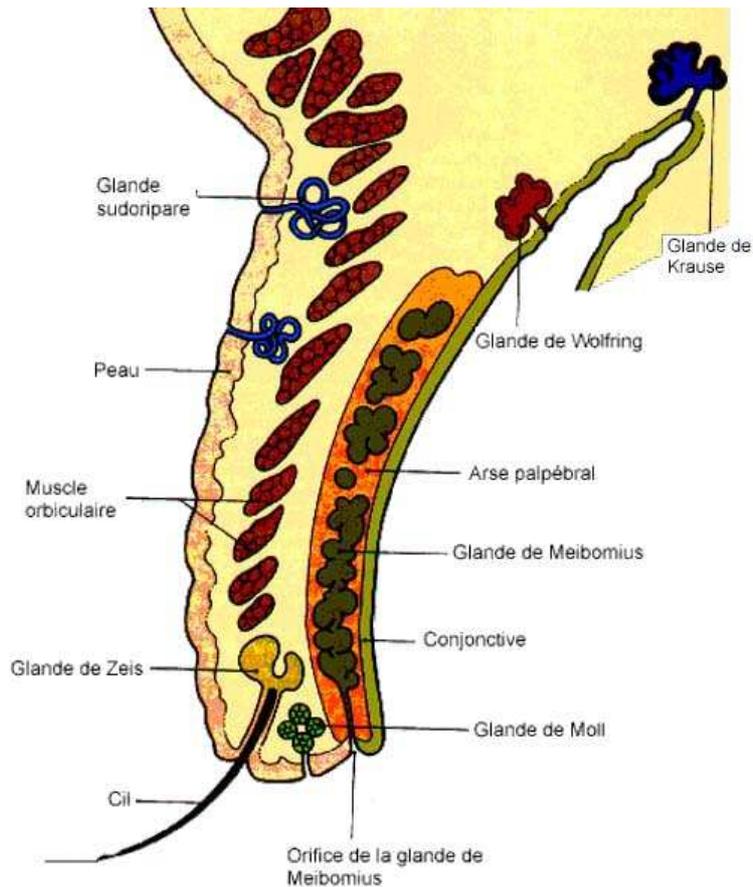


Figure 3 : Les glandes palpébrales (Stevens and Lowe 1993)

1.2.1.3. Les glandes de la membrane nictitante

(Lavach 1990; Regnier 2002)

On trouve aussi 2 types de glandes lacrymales au niveau de la membrane nictitante :

La glande superficielle ou « **glande nictitante** » adhère à la partie verticale du cartilage ; elle est lobulée, composée d'acini de type séreux et participe à la sécrétion du film lacrymal.

La glande profonde ou « **glande de Harder** », très développée chez le cheval a une sécrétion qui peut être huileuse, muqueuse, séro-muqueuse ou mixte.

1.2.1.4. Le film lacrymal précornéen

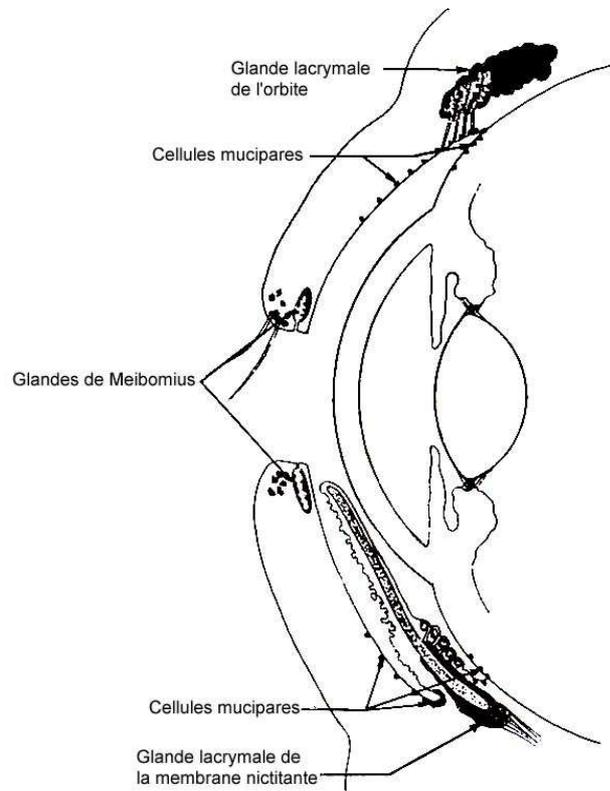


Figure 4 : Glandes et cellules à l'origine du film lacrymal précornéen (Gelatt 2000)

Le film lacrymal précornéen mesure à peu près 7 μm d'épaisseur et peut être divisé en trois couches fonctionnelles : (Banks 1993)

- La **couche superficielle** est constituée de lipides sécrétés par les glandes de Meibomius. Son rôle est de limiter l'évaporation de la couche aqueuse qui est située dessous.

- La **couche aqueuse** est principalement constituée de la sécrétion des glandes lacrymales et nictitante, elle est hydrophile et lipophobe. Son rôle est principalement nutritif et protecteur en permettant à l'oxygène et aux cellules immunitaires qu'elle contient d'atteindre la cornée. Les larmes permettent aussi de chasser les corps

étrangers du sac conjonctival et de lubrifier les faces palpébrale et cornéenne de la conjonctive.

- La **couche muqueuse** est constituée de mucoprotéines sécrétées par les cellules mucipares ; elle est lipophile et hydrophobe. Elle se situe entre la couche aqueuse et la cornée.

Le film lacrymal précornéen contient aussi des cellules desquamées de l'épithélium conjonctival, des cellules et de la fibrine provenant des vaisseaux, du chorion de la conjonctive et des corps étrangers tels pollen, micro-organisme...

1.2.2. Description des cellules d'un frottis conjonctival après coloration

Le peu de données de la littérature assimile les cellules conjonctivales normales de l'œil du cheval à celles décrites chez le chien et le chat.(Curiel, Moore et al. 1992)

Dans les chapitres suivants, seront présentés les caractères morphologiques des cellules épithéliales recensées chez le chien et le chat.

1.2.2.1. Les cellules de la conjonctive

(Clerc 1997; Francart and Clerc 1981; Jégou and Liotet 1991; Curiel, Moore et al. 1992; Jongh 1994)

Sur un frottis, on retrouve les cellules des différentes régions de la conjonctive :

- **Cellules cylindriques** : elles sont grandes, colonnaires (15 à 20 μm), avec un cytoplasme discrètement basophile. Le noyau est basal. Ces cellules peuvent être ciliées.

- **Cellules à mucus** : elles sont de grande taille et leur noyau est refoulé à la périphérie par des vacuoles cytoplasmiques de mucus, nombreuses ou unique. Le mucus peut apparaître bleu très pâle, rouge violacé ou incolore. (Curiel, Moore et al. 1992; Jongh 1994)

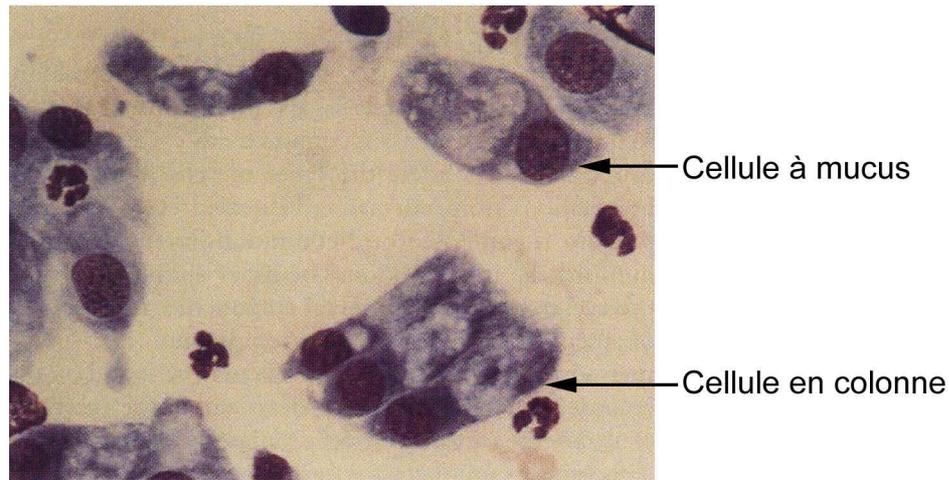


Figure 5: Cellules en colonne et à mucus chez un chien (Prasse and Winston 1999)

- **Cellules de l'assise superficielle** : elles sont de grande taille, polyédrique, à faible rapport nucléocytoplasmique, avec un cytoplasme clair. Le noyau est central et la chromatine est très dense. On peut rencontrer des croissants de mélanine autour du noyau, surtout dans les races à robe foncée. Ces grains de mélanine apparaissent vert foncé à marron noirâtre.

- **Cellules de l'assise intermédiaire** : elles sont plus petites que les précédentes, plus rondes ou ovales que polyédriques, avec un rapport nucléocytoplasmique moyen et un cytoplasme légèrement plus basophile. Le noyau est central et la chromatine est dense. On peut également observer des grains de mélanines dans leur cytoplasme.

- **Cellules de l'assise basale** : elles sont généralement plus petites que les précédentes et très souvent associées en tapis. Le rapport nucléocytoplasmique est plus élevé que dans les deux précédents types cellulaires. Le noyau est central et présente une chromatine dense. Le cytoplasme apparaît basophile soutenu. On peut également observer des grains de mélanines dans leur cytoplasme.

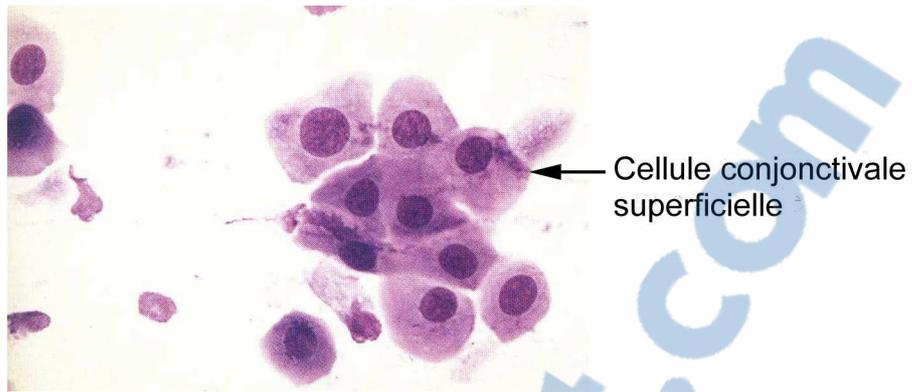


Figure 6 : Cellules conjonctivales superficielles chez un chat (Jégou and Liotet 1991)

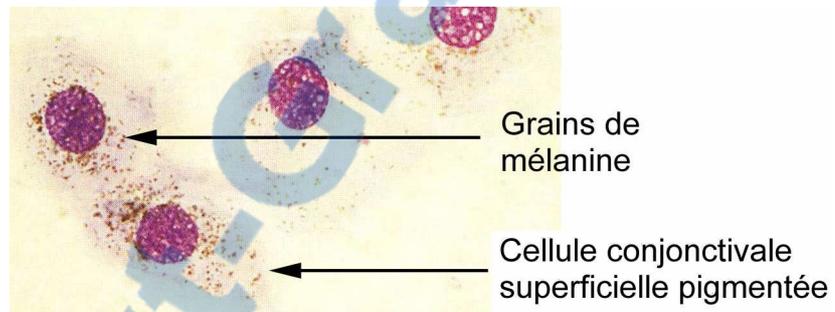


Figure 7 : Cellules superficielles pigmentées chez un chat (Jégou and Liotet 1991)

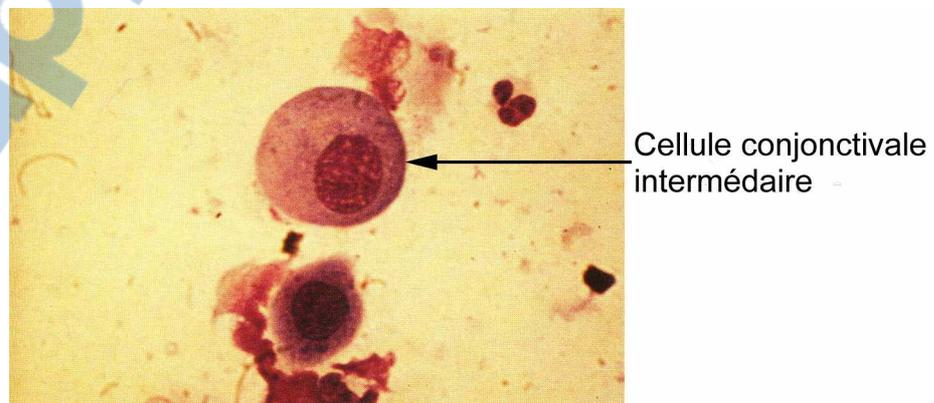


Figure 8 : Cellules conjonctivales intermédiaires chez un chien (Jégou and Liotet 1991)

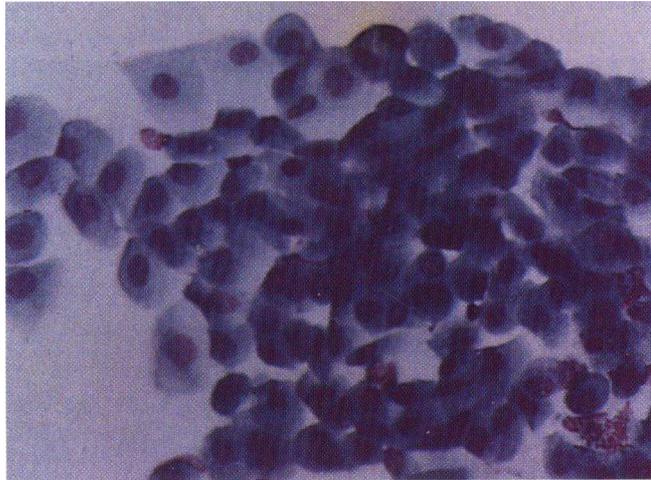


Figure 9 : Cellules basales, intermédiaires et superficielles non kératinisées de la conjonctive bulbaire d'un chien (Prasse and Winston 1999)

1.2.2.2. Les autres cellules

Cellules kératinisées : elles ont un cytoplasme bleu-violacé à rose pourpre. Leur noyau est souvent absent, picnotique ou dégénéré. (Curiel, Moore et al. 1992)

On peut aussi trouver des lymphocytes, des monocytes, des neutrophiles ou d'autres cellules sanguines.

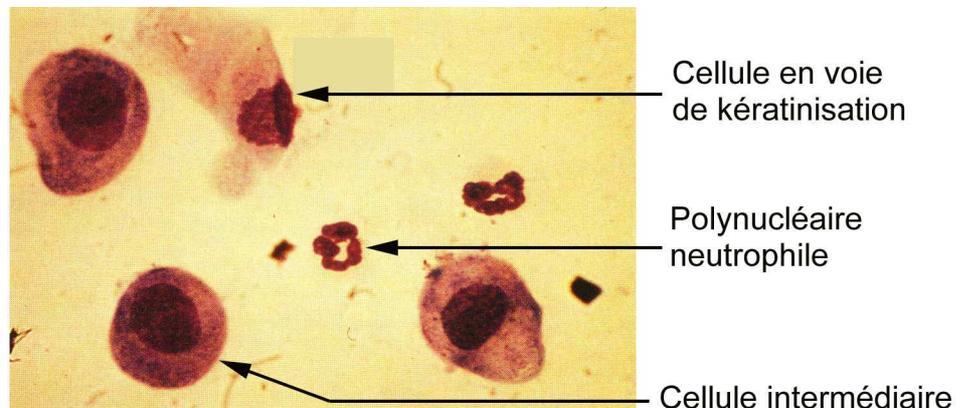


Figure 10 : Cellule en voie de kératinisation et polynucléaire neutrophile (Jégou and Liotet 1991)

1.2.3. Éléments non cellulaires pouvant être observés sur un frottis

Différents éléments autres que des cellules peuvent être aussi observés sur le frottis. Il peut s'agir, de noyaux nus, de débris kératinisés ou bien de bactéries.

1.2.3.1. Noyaux nus et débris kératinisés

Les noyaux nus sont de la même couleur que les noyaux des cellules mais ont une forme très variable. Ils vont de la forme normale du noyau d'une cellule intacte à des plages de grande taille, plus ou moins bien délimitées et qui peuvent même former des filaments sur le fond du frottis.

Les débris kératinisés (écailles de poils, cils) et les squames ont une forme géométrique aux bords anguleux et leur couleur est rose à violette foncé.

Le mucus est peu coloré et de couleur bleu pâle

A la périphérie, des arborisations colorées en mauve peuvent exceptionnellement apparaître : il s'agit des protéines lacrymales qui se sont colorées après cristallisation lors du séchage à l'air. (Jégou and Liotet 1991; Trumel and Dossin 2001-2002)

1.2.3.2. Grains de mélanine

Des grains de mélanine intracytoplasmiques sont communs dans les cellules épithéliales collectées dans les zones conjonctivales pigmentées. Ces granules apparaissent vert-foncé à marron-noir.

1.2.3.3. Flore normale de la conjonctive

Certaines bactéries peuvent être isolées de manière normale sur un œil sain, elles apparaissent le plus souvent bleutées à violacées sous forme de bacilles ou de coques.

Chez le cheval, la flore normale résidente est formée principalement de germes Gram+, aérobies et non pathogènes tels des staphylocoques, de corynebactéries ou de Bacillus. Elle contient aussi des champignons microscopiques tels Penicillium, Alternaria et Cladosporidium.

Ces organismes sont néanmoins retrouvés dépendamment, du lieu et de la saison. (Whitley, Burgess et al. 1983; Whitley 1984; Curiel, Moore et al. 1992; Speirs and Wrigley 1997).

2. Méthodes de coloration en cytologie

2.1. Les différents protocoles de coloration

Différents protocoles de coloration ont été comparés lors d'une étude réalisée sur les cytologies cornéenne et conjonctivale : la coloration automatique « Hema Tek », la coloration au May-Grünwald/Giemsa, la coloration « Diff-Quik / Cam Quik » et la coloration au bleu de méthylène. (Bauer 1999)

Seule la coloration au bleu de méthylène appartient au groupe de coloration de type « Papanicolaou. » Ce type de coloration donne une très bonne coloration du noyau et des détails cytoplasmiques. Par contre cette technique ne donne pas de bonne coloration du cytoplasme mais elle permet de suivre les changements au niveau du noyau puisqu'elle permet de visualiser parfaitement les détails nucléaires et nucléolaires.

Les autres méthodes de coloration font partie des colorations de type « Romanowsky. »

Ce sont des colorations bon marché, faciles à préparer, à conserver et à utiliser.

Ces colorations permettent d'identifier correctement les cellules inflammatoires, néoplasiques, les bactéries, les champignons et les inclusions cytoplasmiques. Il est

facile de reconnaître et de différencier les coques et les bâtonnets. (Curiel, Moore et al. 1992)

La coloration du noyau n'est pas aussi précise qu'avec les colorations de type « Papanicolaou » mais est suffisante pour distinguer certains processus anormaux.

2.2. Comparaison des différentes techniques

2.2.1. La coloration automatique « Hema Tek »

Elle donne des échantillons de bonne qualité malgré quelques dépôts de colorant regrettables. Néanmoins, cet appareil ne représente pas un investissement justifiable pour un cabinet vétérinaire, à moins que ce cabinet ne pratique beaucoup de travail de laboratoire.

2.2.2. La coloration de May-Grünwald/Giemsa

Elle donne des lames de très bonne qualité. Cette technique ne présente plus les mêmes problèmes de dépôt de colorant que la précédente. Elle est très facile d'emploi et donne de bons détails cytoplasmiques et une bonne image du noyau.

2.2.3. La coloration Diff-Quik/Cam-Quik

Cette méthode de coloration est très bien connue de tous les vétérinaires praticiens car c'est sûrement la plus utilisée dans les cabinets privés. Elle se présente sous forme de kit, facile à utiliser, peu onéreux et qui permet une lecture rapide des lames tout en donnant de bons détails cytoplasmiques et nucléaires. Cependant, la coloration de May-Grünwald Giemsa est de meilleure qualité et permet de conserver les lames.

L'avantage majeur de cette méthode est de pouvoir être utilisée durant la consultation.

2.2.4. La coloration au bleu de méthylène

C'est probablement la coloration la plus facile et la plus rapide à utiliser. La solution n'est pas chère mais elle doit être filtrée régulièrement pour enlever les précipités de coloration qui compromettraient sérieusement la qualité de la lame colorée. De plus, cette solution ne dure pas longtemps car elle s'évapore facilement.

2.3. Conclusion sur les différentes méthodes de coloration

Il apparaît que, pour l'utilisation du vétérinaire praticien, les kits de coloration rapide ainsi que le bleu de méthylène sont les plus faciles à utiliser, les plus rapides et les moins onéreux.

Cependant, pour notre étude, nous souhaitons conserver les échantillons réalisés ; nous avons donc besoin d'une coloration qui ne se détériore pas avec le temps. De plus, nous n'avons pas besoin de distinguer les détails du noyau mais plutôt de bien visualiser le cytoplasme (taille, couleur...) ainsi que d'éventuels micro-organismes présents sur notre frottis.

C'est pourquoi il nous a semblé justifié de colorer nos échantillons avec la coloration de May-Grünwald/Giemsa étant donné que c'était celle qui répondait le mieux à nos besoins.

2.4. Recommandations pour la coloration des lames

Certains problèmes de mauvaise qualité de coloration peuvent être évités en respectant certaines règles simples :

- il faut utiliser des solutions colorantes nouvellement préparées ou bien filtrées auparavant,
- il faut colorer les étalements cytologiques le plus tôt possible après les avoir fixés à l'air,

- et, il faut faire attention à ne pas toucher avec les doigts la surface de la lame ou bien la surface colorée à aucun moment.

3. Etude des sécrétions conjonctivales

A l'inverse du frottis conjonctival, les sécrétions contiennent principalement des cellules mortes qui proviennent de la desquamation de l'épithélium conjonctival ainsi que des cellules ayant migré par diapédèse.(Clerc 1997; Bleuer-Elsner 1992)

3.1. Méthode de prélèvement

L'animal ne doit avoir reçu aucun traitement. On ne doit avoir utilisé aucun collyre : ni colorant vital, ni anesthésique et on ne doit pas avoir réalisé de test de Schirmer.

On utilise pour le prélèvement une anse de platine identique à celle utilisée par les bactériologistes. Elle est simplement déposée dans l'angle interne de l'œil pour recueillir la sécrétion. L'anse est stérilisée après chaque utilisation par chauffage sur un bec Bunsen.

3.2. Traitement de l'échantillon

Le prélèvement est ensuite étalé sur une lame porte-objet propre et dégraissée, par un mouvement circulaire. La coloration est réalisée au May-Grünwald-Giemsa.

3.3. Renseignements apportés par cette méthode

Cette méthode permet d'observer des cellules épithéliales, des cellules à mucus ainsi que des cellules résultant de l'inflammation : polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, histiocytes, macrophages, lymphocytes, ainsi que des bactéries.

3.4. Sécrétion conjonctivale non pathologique

On trouve des cellules desquamées en voie de lyse, des polynucléaires neutrophiles altérés et quelques histiocytes. On trouve en plus des bactéries qui proviennent de la flore saprophyte des conjonctives.

3.5. Intérêt de cette méthode

C'est une méthode simple, rapide et bon marché qui peut être réalisée au chevet du malade. D'après les auteurs, l'étude des sécrétions conjonctivales serait plus spécifique que le frottis conjonctival pour le diagnostic des allergies oculaires. (Clerc 1997; Bleuer-Elsner 1992)

De plus, elle peut aussi orienter le vétérinaire vers une infection virale en présence de pus stérile et d'une réaction lymphohistiocytaire.

Ces arguments nous amènent à penser qu'il faudrait systématiquement procéder au recueil des sécrétions conjonctivales avant même de réaliser tout frottis de raclage. Néanmoins, il faut réaliser ce prélèvement avant tout acte thérapeutique ou à visée diagnostique pour ne pas modifier les résultats.

4. Méthodes de prélèvement des cellules conjonctivales

Pendant longtemps, on a considéré la spatule de Kimura comme étant l'instrument de choix pour la cytologie conjonctivale. En 1990, des auteurs ont commencé à s'intéresser à la cytobrosse utilisée d'ordinaire en gynécologie humaine pour les frottis cervicaux. Ils ont obtenu de bons résultats en cytologie oculaire avec cet instrument, qui a commencé à être utilisé en médecine vétérinaire en 1992. (Tsubota, Kajiwara et al. 1990; Anagnostopoulou-Fotinopoulou R. Rammon-Kinia 1991; Bauer, Spiess et al. 1996)

D'autres instruments peuvent aussi être utilisés pour réaliser un frottis conjonctival. Il s'agit de coton-tige, de spatules et de lames de bistouri. (Bauer, Spiess et al. 1996 ; Willis

1997). Ces différents instruments ont fait l'objet d'études menées respectivement par ces deux auteurs.

BAUER et *al* ont étudié les avantages et les inconvénients des différents instruments à partir de prélèvements réalisés à l'aide de coton-tige, de spatule de chimie arrondie de 3 mm, de micro-spatule de chimie de 3 mm et de cytobrosse afin de distinguer la meilleure méthode de collecte des cellules conjonctivales.

Avant chaque prélèvement, le cul-de-sac conjonctival est débarrassé de tout mucus ou saleté à l'aide d'un coton-tige puis les paupières sont maintenues en position ouverte jusqu'à ce que le prélèvement soit réalisé.

Dans cette étude, les auteurs se sont d'abord intéressés au coût et à la facilité de se procurer chacun des instruments, puis à leur éventuel effet traumatique et enfin à leur plus ou moins facile degré de manipulation.

Ensuite, ils se sont intéressés à la quantité de cellules prélevées avec chacune des méthodes, à leur distribution sur la lame et à leur intégrité.

Willis et *al* ont quant à eux comparé des frottis réalisés avec une spatule de Kimura et une cytobrosse. La cytobrosse utilisée était la « Microbrush® : IDE Interstate, Amityville, NY » qui est une tige en plastique de 8 cm de long surmontée de poils non absorbant de 3-4 mm de long en nylon à son extrémité. La spatule de Kimura qui était utilisée est de la marque « Spatula Platinum Kimura : Storz Instrument Company, St. Louis, MO ».

Dans cette étude, des prélèvements conjonctivaux ont été réalisés sur 20 chiens et 15 chats sans affection oculaire apparente ainsi que sur 15 chiens et 9 chats présentant des signes cliniques de conjonctivite.

Le prélèvement à l'aide de la cytobrosse a été réalisé sur la conjonctive palpébrale inférieure de l'œil droit alors que le frottis réalisé à l'aide de la spatule de Kimura a été effectué sur la conjonctive palpébrale inférieure de l'œil gauche.

Les auteurs se sont principalement intéressés à la facilité de la réalisation du prélèvement, au nombre de cellules collectées, à la distribution des cellules ainsi qu'à leur intégrité.

4.1. Les différents instruments et leur utilisation

4.1.1. Le coton-tige

Les cotons-tiges ont l'avantage d'être peu coûteux et faciles à se procurer. De plus, ils sont simples d'emploi et sûrs à manipuler.

Un facteur important à prendre en compte est la qualité du coton-tige, c'est à dire la solidité avec laquelle le coton est attaché à la tige en plastique. En effet, plus cette attache est forte et plus le prélèvement sera de bonne qualité étant donné que l'on retrouvera peu de fibres de coton sur la lame.

D'après Bauer et *al*, l'utilisation de collyre anesthésique n'est pas nécessaire pour le prélèvement de cellules à partir de la conjonctive palpébrale. Le coton tige est roulé 3 ou 4 fois sur la surface à prélever en appuyant modérément, puis il est de même tamponné sur la lame en verre. Les cellules sont ensuite séchées à l'air libre en agitant la lame.

Il n'a pas été noté de différence pour les prélèvements effectués avec un coton-tige humidifié ou non.

4.1.2. Spatule arrondie de chimie de 3 mm

On peut se procurer cette spatule par l'intermédiaire des entreprises de fabrication de matériel de chimie. Elle n'est pas chère, elle est à la fois arrondie, plate et facile d'emploi. C'est un matériel d'une grande précision, puisque rigide, et qui est donc idéal à utiliser sur des animaux de petite taille. (Oiseaux, Nouveaux Animaux de Compagnie...) Elle s'avère être moins dangereuse à utiliser qu'une lame de scalpel.

D'après Bauer et *al*, l'œil est anesthésié localement à l'aide d'un collyre et l'excès de mucus est débarrassé du sac conjonctival. Ensuite, la spatule est délicatement frottée perpendiculairement à la surface à prélever toujours dans la même direction quatre ou cinq fois selon que l'on souhaite ou non obtenir des cellules des couches profondes de l'épithélium, jusqu'à l'obtention d'un petit amas cellulaire à l'extrémité de la spatule. Les cellules sont transférées sur la surface de la lame porte-objet et étalées en un petit cercle de 1 cm ou bien en petites lignes et séchées à l'air.

Il faut particulièrement prendre soin de ne pas appuyer trop fort ou bien d'étaler trop rapidement le prélèvement pour ne pas abîmer les cellules.

4.1.3. Micro-spatule de chimie de 3 mm

L'extrémité de cette spatule est pointue et aiguisée comme une lame de couteau. Ceci représente un des inconvénients majeurs de cet instrument ; il faut envisager un risque non négligeable d'accident. L'utilisation de cet instrument est quasiment à bannir sur des animaux très nerveux comme les chevaux.

Cependant, l'avantage de cette extrémité pointue est que l'on peut réaliser des prélèvements bien précis dans de petites zones bien définies.

Cette spatule est utilisée pour prélever de fines tranches de tissu sur la conjonctive.

Ensuite, les amas cellulaires sont déposés de la même façon que précédemment tout en prenant soin de ne pas écraser les cellules.

4.1.4. La spatule de Kimura



Figure 11 : Spatule de Kimura (T.Ramsey 1994)

C'est une spatule en platine qui a été spécialement conçue pour récolter des cellules conjonctivales. Traditionnellement, c'est cette spatule que l'on utilise pour récolter les cellules conjonctivales par frottis de raclage.

Son extrémité est arrondie et elle est assez facile d'utilisation. Elle doit être stérilisée à l'aide d'une flamme et rapidement refroidie avant utilisation.

Son inconvénient majeur est qu'elle n'est pas disponible rapidement et qu'elle coûte cher. (Bauer 1999)

Bien que l'hydrochlorure de propocaïne soit connu comme étant toxique pour les surfaces épithéliales, une coloration au rose Bengale n'a pas montré de cellules dégénératives suite à l'application d'une seule goutte de collyre anesthésique. Willis et *al* ont donc considéré que cette administration n'avait pas de conséquence sur l'intégrité des cellules récoltées au cours de l'étude.



Figure 12 : Prélèvement à la spatule de Kimura (T.Ramsey 1994)

4.1.5. La cytobrosse



Figure 13 : Cytobrosse

La cytobrosse se commande facilement, est peu onéreuse et elle est facile d'emploi.

Bauer et *al* ont utilisé une cytobrosse identique à celle dont on se sert en gynécologie humaine pour réaliser des frottis cervicaux.

Elle est utilisée sans le danger que représente l'utilisation d'instruments rigides. Cette étude a prouvé que la cytobrosse était l'instrument le plus facile et le plus sûr à utiliser : on peut s'attendre à des prélèvements de grande cellularité, de bonne distribution et de bonne intégrité cellulaire.

Willis et *al* ont décrit que même les chats présentent peu de réactions de défense lors de la réalisation du frottis, ce qui les amène à penser que l'utilisation de la cytobrosse provoque très peu d'irritation chez l'animal prélevé.

Dans la technique décrite par Willis et *al*, la cytobrosse était tournée à peu près cinq fois dans le même sens au contact de la conjonctive palpébrale inférieure. Ensuite, l'extrémité de la cytobrosse était roulée délicatement sur la lame, sans frotter pour ne pas créer de lésion cellulaire.

Bauer a procédé de la même manière mais il conseille de faire 3 à 4 tours complets de cytobrosse sur la conjonctive. De même, il insiste sur le fait que l'étape la plus délicate quant à la conservation de l'intégrité cellulaire est le transfert des cellules de la cytobrosse à la lame de verre.

4.2. Comparaison des différents instruments

Dans chacune des deux études, les lames réalisées avec les différents instruments, ont toutes été examinées au microscope à différents grossissements. Des objectifs de grossissement *4 et *10 ont été utilisés pour évaluer la distribution des cellules sur la lame et pour avoir une impression d'ensemble de la cellularité de la lame.

Ensuite, des objectifs de grossissement *20, *50 et *100 ont été utilisés pour l'examen des zones de forte concentration cellulaire afin de juger de l'intégrité cellulaire des lames et d'observer plus minutieusement les cellules une à une.

4.2.1. Quantité de cellules prélevées

La quantité de cellules prélevées au coton-tige sur une conjonctive saine est faible. Ce nombre s'avère en revanche nettement supérieur lorsqu'il s'agit de conjonctives présentant une lésion.

Avec une spatule arrondie de chimie de 3 mm, la quantité de cellules prélevées est satisfaisante. Cette quantité est encore plus satisfaisante avec une micro-spatule de chimie de 3 mm ; on obtient un grand nombre de cellules.

Pour estimer la cellularité, Willis et *al* ont compté les cellules sur 3 champs de microscope observés au grossissement *20 ; le nombre de cellules comptabilisé a été ensuite divisé par 3.

La spatule de Kimura a procuré une quantité de cellules satisfaisante. Sur un champ de microscope observé au grossissement *20, on a en moyenne 30 cellules présentes aussi bien chez le chien que chez le chat.

La quantité de cellules prélevées à la cytobrosse était satisfaisante. Néanmoins, le nombre de cellules était significativement plus petit que celui obtenu avec la spatule de Kimura : elle était en moyenne de 13 cellules conjonctivales indifféremment chez le chien et le chat sur un champ de microscope observé au grossissement *20.

Par contre, pour les prélèvements réalisés sur des chiens et des chats présentant des signes cliniques de conjonctivite, le nombre de cellules recueillies a été sensiblement supérieur au nombre de cellules prélevées avec la spatule de Kimura : le nombre de cellules présentes sur la lame est passé à 32 cellules en moyenne chez le chien, et à 53 cellules en moyenne chez le chat.

4.2.2. Distribution des cellules

La distribution des cellules prélevées et étalées sur la lame au coton-tige est bonne.

En revanche, la distribution des cellules avec la spatule arrondie de chimie de 3 mm n'est pas satisfaisante ; la difficulté à étaler le prélèvement sur la lame avec cet instrument est d'ailleurs un des désavantages majeurs de cette méthode. Il en est de même pour la micro-spatule de chimie de 3 mm.

Dans l'étude de Willis et *al*, la spatule de Kimura n'a pas permis une distribution des cellules homogène. Les auteurs avaient fréquemment des « paquets » de cellules qui correspondaient à une superposition de couches cellulaires et qui se traduisaient, après coloration, par des zones plus foncées. Cet excès de coloration semblait pouvoir gêner le diagnostic dans la mesure où des inclusions cytoplasmiques n'auraient pas été visibles. Il a donc semblé évident que la tendance à la formation de « paquets » lors de l'utilisation de la spatule de Kimura pouvait réduire la qualité du diagnostic.

Par contre, la distribution des cellules à la cytobrosse était bonne. Le gros avantage de la cytobrosse est qu'elle a permis d'obtenir une seule couche cellulaire uniformément

étalée sur la lame. Il en a résulté une coloration uniforme de l'échantillon ainsi prélevé. Willis et al ont en partie expliqué cette bonne distribution cellulaire par la propriété des poils de nylon qui sont chargés négativement et qui retiennent donc peu les cellules. La conséquence est qu'un nombre adéquat de cellules est déposé sur la lame de verre, car peu de cellules sont retenues par les poils.

4.2.3. Intégrité des cellules

L'intégrité des cellules est conservée avec le coton-tige.

Par contre, avec la spatule arrondie de chimie de 3 mm, l'intégrité cellulaire est mauvaise. Beaucoup de cellules présentes sont endommagées du fait de la difficulté à étaler les cellules. Il en est de même avec la micro-spatule de chimie de 3 mm. Beaucoup de cellules sont abîmées.

Pour la spatule de Kimura et la cytobrosse, l'intégrité des cellules conjonctivales a été évaluée par Willis et al sur un nombre de 100 cellules qui ont été observées au grossissement *40 et qui ont été classées selon deux catégories : acceptable ou non acceptable. Ont été considérées comme acceptables, les cellules qui contenaient un noyau et un cytoplasme intacts et qui faisaient partie d'un groupe de cellules étalées en une couche.

L'intégrité des cellules récoltées à l'aide de la spatule Kimura a semblé être bonne : sur 100 cellules observées au grossissement *40, en moyenne 81 cellules conjonctivales chez le chien et 76 cellules chez le chat ont été classées dans la catégorie acceptable.

Avec la cytobrosse, les cellules n'ont pas été abîmées. Chez le chien comme chez le chat, les auteurs ont évalué à 82 sur 100 et à 77 sur 100, le nombre de cellules jugées acceptables.

4.3. Bilan d'utilisation des différents instruments et conclusion sur les méthodes de prélèvement de la conjonctive

Willis et al/ nous ont rappelé ce qu'un bon échantillon de cellules conjonctival doit être : une couche unique de cellules avec un nombre de cellules optimal, ainsi que des cellules présentant une parfaite intégrité cellulaire.

De plus, la récolte de l'échantillon ne doit pas entraîner de lésion oculaire.

Le coton-tige est apparu être l'outil idéal pour les conjonctives très endommagées.

C'est probablement l'instrument le mieux adapté lorsque l'on a affaire à un œil très affecté et que l'on craint une lésion iatrogène.

Il faut néanmoins faire attention à ne pas trop appuyer l'extrémité du coton-tige sur la lame lors du transfert des cellules pour ne pas les endommager.

Les spatules de 3 mm de chimie sont des instruments qui procurent un grand nombre de cellules mais qui demandent beaucoup de dextérité pour étaler le prélèvement sur la lame sans détruire un grand nombre de cellules. Par conséquent, ces instruments ont montré une mauvaise distribution cellulaire et un haut degré de destruction cellulaire.

De plus, c'est avec ces instruments, en particulier avec la spatule pointue, que le risque de lésions iatrogènes est le plus grand. Ces instruments sont donc à utiliser avec la plus grande précaution lorsque l'on a affaire à des animaux imprévisibles ou nerveux et surtout avec les chevaux.

Par contre, elles peuvent se révéler être utiles lors de prélèvements minutieux sur de tout petits yeux comme ceux des oiseaux.

La spatule de Kimura permet l'obtention d'un grand nombre de cellules et présente l'avantage de ne pas entraîner de destruction cellulaire significative.

Cependant, l'inconvénient majeur est que les lames ainsi réalisées présentent des cellules en couches superposées, ce qui est un obstacle conséquent au diagnostic. Des « paquets » de cellules peuvent empêcher la détection d'inclusions cytoplasmiques déterminantes dans le cas de certaines conjonctivites.

La cytobrosse est la méthode la plus satisfaisante concernant tous les caractères étudiés.

Le nombre de cellules prélevées est légèrement inférieur à celui observé avec la spatule de Kimura mais la distribution cellulaire est bien meilleure car elle présente une couche cellulaire uniformément répartie sur la lame de verre. L'intégrité cellulaire est tout à fait satisfaisante et est équivalente à celle trouvée lors de l'utilisation du coton-tige.

D'autre part, l'apparence des cellules serait plus facilement analysée grâce au faible taux de chevauchement cellulaire.

Cependant, on doit particulièrement faire attention à ne pas la faire tourner trop brutalement sur la lame lors du transfert des cellules pour ne pas entraîner de détériorations cellulaires. C'est aussi au moment de l'étalement des cellules sur la lame que réside l'étape la plus délicate.

Il existe aussi d'autres avantages à l'utilisation de la cytobrosse qui ont été rapportés par la cytologie conjonctivale humaine. Elle procurerait des échantillons avec plus de cellules provenant de couches profondes de l'épithélium conjonctival tout en n'entraînant que très peu d'effraction tissulaire. Il a été rapporté par les patients humains que l'irritation locale causée par la cytobrosse était égale voire moindre que celle causée par l'utilisation de coton-tige. Cependant, il n'existe pas d'étude comparant objectivement le degré d'irritation provoqué par la cytobrosse et le coton-tige.

Il a d'autre part été démontré par Bauer que si la cytobrosse est placée immédiatement après utilisation dans de l'eau et ensuite soigneusement lavée avec un jet d'eau sous pression et séchée ensuite à l'aide d'un jet d'air comprimé, celle-ci était débarrassée de toute cellule. En suivant cette méthode, il est donc possible de réutiliser la cytobrosse après désinfection à l'alcool à 70° et rinçage avec de l'eau stérile. Cependant, tout ceci apparaît comme être beaucoup d'effort en regard du faible prix des cytobrosses et de la facilité à se les procurer.

Le seul désavantage de la cytobrosse selon Bauer et *al* est que l'extrémité portant les poils est trop longue par rapport à la surface conjonctivale des animaux de petite taille tels les oiseaux, les nouveaux animaux de compagnie, les chiots ou les chatons. Dans ce

cas, il est possible de couper la moitié des poils de la cytobrosse sur la longueur, voire même de les raccourcir légèrement au besoin. Il est aussi possible de couder l'extrémité de la tête de la cytobrosse à angle droit de manière à utiliser exclusivement la longueur désirée.

La taille de la cytobrosse ne pose aucun problème d'utilisation pour des gros animaux comme le cheval. Nous n'avons donc pas eu besoin de modifier la taille des poils de la cytobrosse pour notre étude.

5. Autre méthode de prélèvement conjonctival : la technique d'empreinte.

5.1. Principe

La technique d'empreinte a pour but de prélever les cellules superficielles, en conservant l'arrangement et l'architecture des cellules. Cette méthode consiste en un prélèvement sous forme d'empreinte, du tissu qui nous intéresse, ce qui correspond en fait à une véritable microbiopsie.(Clerc 1997; Bleuer-Elsner 1992)

5.1.1. Matériel

Le matériel utilisé est un filtre millipore, qui est normalement destiné à l'ultrafiltration. C'est un filtre millipore GSWP qui mesure 30 mm de diamètre.

5.1.2. Réalisation pratique

Chaque filtre circulaire est coupé en deux demi-lunes de même taille.

Certains auteurs procèdent à un lavage en plongeant les filtres dans l'eau chaude distillée à 80°C pendant 20 minutes ; cela est sensé procurer une meilleure adhérence du filtre sur la conjonctive. Cependant, tous les auteurs ne procèdent pas à ce lavage

étant donné que l'on obtient une adhésion similaire lorsque l'on applique la surface mate sur la conjonctive et non la surface brillante.

L'œil de l'animal est anesthésié localement à l'aide d'un collyre (Novésine®) et le demi-filtre est déposé sur la conjonctive bulbaire à l'aide d'une pince.

Il est possible de n'utiliser qu'un seul site de prélèvement (dans le quadrant supérieur) ou bien plusieurs sites qui correspondent aux quatre quadrants.

Puis, on retire le filtre au bout de quelques secondes à l'aide d'une pince ; souvent, la conjonctive se soulève à ce moment, preuve d'une bonne adhérence. Le tapis cellulaire superficiel adhérent au filtre est emmené lorsque l'on décolle ce dernier.

On transfère alors l'empreinte et le filtre dans du formol à 10 %.

5.1.3. Traitement du filtre

5.1.3.1. Méthode de transfert

On retire l'empreinte du formol très rapidement et on dépose la face cellulaire sur la lame porte-objet soigneusement dégraissée. Après avoir laissé sécher à l'air, on retire le filtre, les cellules restent sur la lame par adhérence. C'est sûrement l'étape la plus délicate de la manipulation car il s'agit de ne pas laisser sécher le filtre trop longtemps, de peur qu'il ne reste collé à la lame mais de le laisser sécher assez longtemps pour que le filtre, encore humide, ne retienne pas les cellules.

Une astuce consiste à retirer le filtre lorsque, en regardant sous la lame, on voit des zones sèches et des zones humides.

5.1.3.2. Méthode de transparence

Ici, le principe est de colorer les cellules sur le filtre puis à le rendre transparent pour laisser passer la lumière du microscope.

On plonge le filtre préalablement conservé dans le formol à 10 %, dans de l'eau distillée pour que les cellules se réhydratent et prennent la coloration désirée parmi le

panel de colorations que l'on peut utiliser. Puis on plonge le filtre dans une série d'alcools de plus en plus concentrés, jusqu'à l'alcool absolu.

Le filtre, alors parfaitement déshydraté est maintenant plongé dans le xylène ou le toluène jusqu'à transparisation totale.

5.2. Intérêts et limites de cette méthode

Le site de prélèvement que représente la conjonctive bulbaire est difficilement accessible chez les animaux et en particulier chez le cheval. Il faudra le plus souvent passer par une tranquilisation qui pourrait fausser les résultats.

Les informations recueillies grâce à une telle technique ne présentent pas d'intérêt actuellement pour les animaux ; en médecine humaine, cette méthode est surtout utilisée pour des problèmes de sécheresse oculaire ainsi qu'en contactologie.

L'étude des sécrétions et des frottis suffit amplement à l'étude cytologique de la conjonctive et l'empreinte conjonctivale ne nous apporterait que peu de renseignements supplémentaires.

Pour cette raison, nous ne réaliserons pas de prélèvements par empreinte chez le cheval, car il nous faudrait non seulement tranquilliser les animaux mais aussi recourir à des méthodes de traitement du filtre compliquées, tout cela pour ne pas obtenir d'informations supplémentaires par rapport au frottis conjonctival.

6. Conclusion : indications cliniques de la cytologie conjonctivale.

6.1. Les utilisations fréquentes du frottis conjonctival

La cytologie conjonctivale est utilisée principalement dans le cadre du diagnostic des **conjonctivites** aiguës ou chroniques, afin de connaître l'étiologie d'une affection

conjonctivale et pour contrôler les effets et le suivi du traitement. On doit néanmoins réaliser cet examen avant toute thérapeutique susceptible de modifier la réaction cytologique.

On utilise aussi la cytologie conjonctivale pour la détection et le suivi des **tumeurs de la conjonctive** comme par exemple le carcinome épidermoïde.

6.2. Les autres utilisations du frottis conjonctival (Francart 1982, Curiel 1992)

6.2.1. Utilisation du frottis conjonctival en bactériologie

En cas d'infection de la conjonctive, il est possible de mettre en évidence des bactéries par examen direct de la lame après coloration de Gram.

Le frottis conjonctival est aussi utilisé pour la récupération puis la mise en culture des bactéries présentes au niveau de la conjonctive.

6.2.2. Utilisation du frottis conjonctival en mycologie

De même, il est possible de mettre en évidence la présence de champignons par examen direct de la lame obtenue par étalement du frottis conjonctival, après coloration, ainsi que de mettre en culture le prélèvement effectué. Généralement les champignons sont colorés au PAS (Periodic Acid Schiff) mais il existe un colorant fluorescent appelé Cellufluor qui est absorbé rapidement par la chitine, élément constitutif de la paroi des cellules fongiques. Les champignons apparaissent alors jaune-vert sur un fond rouge-orange à l'observation au microscope équipé d'une ampoule à ultra-violet ; cette méthode est actuellement reconnue comme étant la plus sensible pour le dépistage des champignons.

6.2.3. Utilisation du frottis conjonctival en virologie

Les virus sont recherchés sur un frottis comme dans n'importe quel tissu. La structure de particules virales peut être observée dans les cellules à l'aide d'un microscope électronique à balayage.

6.2.4. Utilisation du frottis conjonctival en immunologie

Il est possible d'appliquer les techniques immunologiques de diagnostic, reconnues sûres et précises, lors d'affections oculaires à répercussion sur la conjonctive.

Elles consistent principalement en la mise en évidence d'anticorps spécifiques par immunofluorescence directe et indirecte. Néanmoins, cette technique est rarement utilisée chez le cheval.

6.2.5. Utilisation du frottis conjonctival en PCR (polymerase chain reaction)

Des agents spécifiques responsables de conjonctivites peuvent être détectés par PCR à partir d'échantillons récoltés par frottis conjonctival.

II. DEUXIEME PARTIE : étude expérimentale de la cytologie conjonctivale d'une population de chevaux sains en région Toulousaine

1. Matériels et Méthodes

1.1. Animaux de l'étude

Le but de cette étude était de définir la population normale des cellules conjonctivales d'un cheval en bonne santé.

Pour cela on a prélevé des cellules sur une population de 20 chevaux qui ne présentaient aucun signe d'affection oculaire.

La majorité de ces chevaux résidait au centre hippique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, les autres étaient des chevaux d'une écurie proche de Toulouse, le haras de Saiguède.

Avant chaque prélèvement, il a été réalisé un examen de l'œil afin de s'assurer qu'aucun des animaux n'avait d'affection oculaire cliniquement décelable.

Le tableau suivant recense les caractères de cet échantillon de population :

Rang	Nom	Sexe	Age	Race
1	Jument de travaux pratiques de l'ENVT	Femelle	7 ans	Cheval de selle français
2	Emancipée	Femelle	12 ans	Anglo-arabe
3	Capitant	Hongre	14 ans	Cheval de selle français
4	Diva	Femelle	13 ans	Anglo-arabe
5	Evans	Hongre	12 ans	Anglo-arabe de complément
6	Dardevil	Hongre	13ans	Cheval de selle français
7	Soirée	Femelle	20 ans	Cheval de selle français
8	Djinn	Hongre	13 ans	Cheval de selle français
9	Gamin	Hongre	10 ans	Anglo-arabe
10	Jivago	Hongre	7 ans	Selle français
11	Ursus	Hongre	18 ans	Cheval de selle français
12	Horizon	Hongre	9 ans	Selle français
13	Ikanos	Hongre	8 ans	Selle français
14	Laius	Hongre	5 ans	Anglo-arabe
15	Facélia	Femelle	11 ans	Anglo-arabe
16	Mirage	Hongre	18 ans	Anglo-arabe
17	Dasyure	Hongre	13 ans	Selle français
18	Borsalino	Hongre	15 ans	Selle français
19	Tarass	Hongre	19 ans	Anglo-arabe
20	Kador	Hongre	8 ans	Selle français

1.2. Méthode de prélèvement

1.2.1. Préparation de l'animal

Pour plus de facilité au moment du prélèvement cellulaire, la surface oculaire a été anesthésiée à l'aide d'une solution d'oxybuprocaine (la Novésine®).

L'anesthésique était contenu dans une seringue de 2 ml qui était montée avec une aiguille dont la partie métallique avait été cassée.

Le manipulateur n'avait plus qu'à instiller sous pression et à distance quelques gouttes dans l'œil du cheval, en prenant soin d'appuyer le tranchant de la main sur le côté du chanfrein afin d'éviter tout danger de contact entre l'extrémité de la seringue et l'œil du cheval si ce dernier bougeait la tête.



Figure 14 : Instillation de l'anesthésique local

Une fois l'œil anesthésié, on a préparé la surface à prélever en la débarrassant de tout excédent de mucus ou de saletés à l'aide d'un coton-tige que l'on a glissé dans le cul-de-sac conjonctival inférieur. On a effectué trois ou quatre rotations complètes dans le même sens. Cette opération a été renouvelée si le premier coton-tige nous a paru très sale.

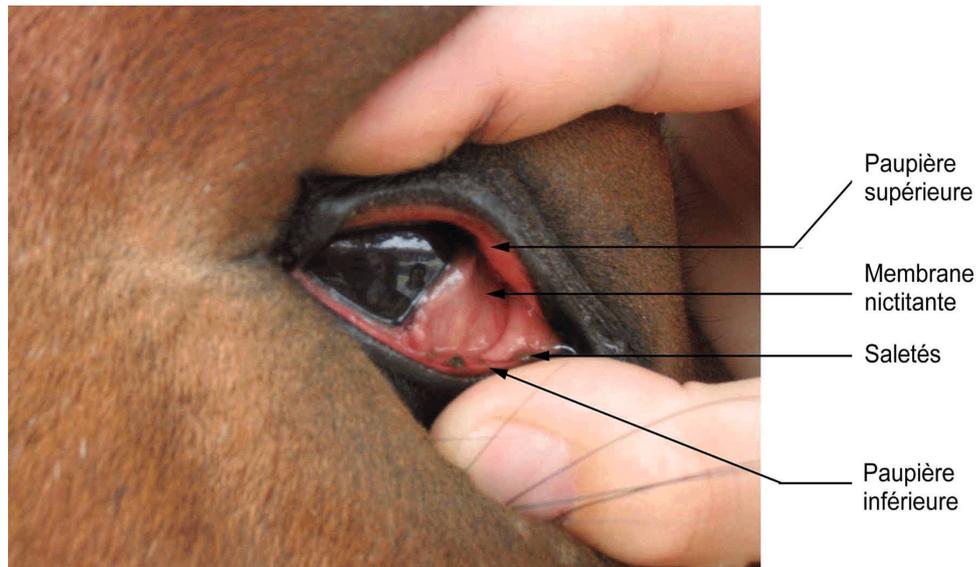


Figure 15 : Exposition de la troisième paupière

1.2.2. Réalisation pratique du frottis

Chaque prélèvement a nécessité la collaboration d'un aide qui maintenait le cheval immobile. Au besoin, nous avons utilisé des moyens de contention efficaces tels le pli de peau sur l'encolure.

Ensuite, le manipulateur tenait d'une main la cytobrosse de façon tangentielle à l'œil du cheval et de l'autre main maintenait l'œil ouvert. Cela a été réalisé en posant le pouce sur la paupière inférieure et l'index sur la paupière supérieure, tout en repoussant le globe avec l'index afin de faire saillir la membrane nictitante, pour avoir accès au cul de sac conjonctival inférieur.

Ensuite, la cytobrosse a été introduite dans le cul-de-sac conjonctival inférieur, parallèlement à la surface muqueuse, et elle a été tournée trois ou quatre fois sur elle-même dans le même sens de rotation.



Figure 16 : Prélèvement à la cytobrosse

1.2.3. Etalement du frottis

Immédiatement après avoir collecté les cellules dans le cul-de-sac conjonctival inférieur, on a étalé celles-ci sur une lame porte-objet que l'on a pris soin de nettoyer et de dégraisser avant l'étalement. Si la lame était sale, elle a été nettoyée à l'éthanol.

La réalisation pratique de cette étape se faisait en roulant la cytobrosse plusieurs fois sur la lame, dans le même sens que celui adopté pour le prélèvement de la conjonctive.

Cette étape était la plus délicate pour l'obtention d'un frottis de bonne qualité car il fallait faire attention de ne pas piquer les poils sur la lame au risque d'abîmer les cellules prélevées.

En résumé, le but de cette opération était de préparer un échantillon de bonne qualité, facilement interprétable, ce qui impliquait de réaliser une couche unique de cellules séchant rapidement sur la lame.

1.2.4. Fixation du frottis

Une fois le prélèvement étalé sur la lame, celle-ci a été agitée afin qu'en séchant à l'air, les cellules adhèrent parfaitement à la lame en verre.

Il faut éviter de souffler sur la lame pour la sécher car cela pourrait contaminer l'échantillon avec des cellules de la cavité buccale ou bien des bactéries.

1.2.5. Identification de l'échantillon

Les lames de verre ont été identifiées à l'aide d'un crayon à papier.

L'identification concernait d'une part l'identité du cheval et le côté de l'œil prélevé et d'autre part, l'ordre d'étalement de la lame, si c'est la première lame qui a été étalée avec la cytobrosse ou non.

1.3. Protocole de coloration suivi pour l'étude

Les lames ont été posées sur un porte-lame et recouvertes avec la première solution de May-Grünwald qui a été laissée pendant 4 minutes.

Les lames ont ensuite été rincées à l'eau courante afin d'enlever tout excédent de colorant. On a pris soin de nettoyer la face dépourvue de cellules à l'aide d'un chiffon humide pour éviter tout dépôt de colorant qui occasionnerait une gêne pour la lecture.

On a ensuite recouvert ces lames à l'aide d'une préparation de Giemsa diluée au 10^{ème}. On a laissé cette solution en place pendant 5 minutes puis on a rincé cette préparation de la même manière que précédemment.

On a séché les lames à l'aide d'un papier buvard.

1.4. Montage des lames

Par souci de conservation des colorations, il a été convenu de protéger les échantillons par montage d'une lamelle sur la lame porte-objet.

Cette lamelle a été fixée à l'aide d'une colle répartie sur toute sa surface puis appliquée tout contre la lame en verre, trempée auparavant dans un solvant, ce qui a permis une meilleure répartition de la colle en évitant la présence de bulles d'air qui auraient pu gêner la lecture de la lame.

1.5. Lecture des lames

1.5.1. Appréciation de la qualité des lames

La qualité des lames a été appréciée successivement à différents grossissements afin de s'assurer qu'un nombre satisfaisant de cellules correctement étalées et non endommagées était présent sur la lame.

1.5.1.1. Qualité de la coloration

Concernant, la coloration, on a regardé si l'échantillon présentait de gros amas de colorant ou non et on a apprécié la couleur des cellules dans leur ensemble. Cette observation a été faite à faible grossissement (*10) en balayant la lame.

1.5.1.2. Qualité de l'étalement

On s'est intéressé à deux paramètres qui sont la cellularité d'une part et la distribution des cellules d'autre part.

On a considéré que la cellularité était mauvaise si le nombre total de cellules par lame était inférieur à 20.

La distribution des cellules était considérée comme mauvaise si on avait de nombreux amas cellulaires, et comme bonne si elle était homogène et sans superposition cellulaire.

1.5.2. Méthode de lecture

1.5.2.1. Evaluation qualitative des frottis

On a procédé à une évaluation des lames ainsi réalisées afin de s'assurer que l'on disposait d'un matériel correct pour l'interprétation des différentes populations cellulaires. Pour pouvoir comparer la qualité de nos lames à celles réalisées dans les précédentes études utilisant la cytobrosse comme outil de prélèvement, nous avons évalué les lames de la même manière.

Nous avons choisi au hasard 10 animaux et nous avons évalué la qualité de deux lames par animal correspondant chacune à un œil différent.

On a ainsi attribué une note de 1 à 3 pour les critères cellularité de la lame, distribution cellulaire et intégrité cellulaire. (Bauer, Spiess et al. 1996; Bauer 1999)

Nombre de cellules	Note
Plus de 20 cellules, mais pas assez pour permettre de conclure sur l'état de l'animal.	1
Un nombre de cellule suffisant a été obtenu pour permettre de donner une impression sur l'état du tissu examiné mais plus de cellules seraient souhaitables.	2
Nombre plus que satisfaisant de cellules, ce qui permet facilement de conclure sur l'état du tissu examiné	3

Distribution des cellules	Note
Cellules « en paquet », ce qui rend l'examen individuel des cellules impossible	1
La plupart des cellules sont « en paquet » mais il y a quelques zones où les cellules sont visibles individuellement	2
Quelques zones de « paquets » mais la plupart des zones procure une bonne visualisation de la morphologie individuelle des cellules.	3

Degré de destruction cellulaire	Note
La majorité des cellules sont endommagées avec moins de 1/5 des cellules intactes	1
Assez de cellules intactes présentes pour évaluer le tissu mais elles représentent encore moins de la moitié des cellules récoltées.	2
La majorité des cellules récoltées sont intactes avec peu de signes de dommage mécanique	3

On a de plus examiné les lames au grossissement *10 pour évaluer la distribution cellulaire.

Les zones de forte concentration cellulaire ont ensuite été observées au grossissement *20 et les cellules présentes sur le champ ont été comptabilisées ; on a réalisé ce comptage sur 3 champs et on a divisé le nombre total de cellules comptabilisées par 3 afin d'obtenir une moyenne.

L'intégrité cellulaire a été évaluée sur 100 cellules épithéliales examinées au grossissement *40. Chaque cellule a été jugée acceptable ou bien inacceptable, selon que la cellule présentait un noyau et un cytoplasme intacts et non déformés, et qu'elle appartenait à une couche unicellulaire ou non. (Willis, Bounous et al. 1997)

1.5.2.2. Approche quantitative des frottis

Le but de cette étude étant de déterminer le type des cellules rencontrées sur un frottis conjonctival de cheval en bonne santé, on a décidé de comptabiliser le nombre de cellules selon leur nature à partir de 300 cellules pour chaque oeil de chaque cheval de l'étude.

On a classé les cellules comptabilisées en cellule épithéliale superficielle, cellule épithéliale intermédiaire, cellule épithéliale profonde, cellule à mucus, cellule cylindrique, lymphocyte, plasmocyte, granulocyte neutrophile, granulocyte éosinophile, mastocyte et lymphoblaste.

2. Résultats

2.1. Appréciation de la qualité des prélèvements cytologiques

2.1.1. Evaluation qualitative

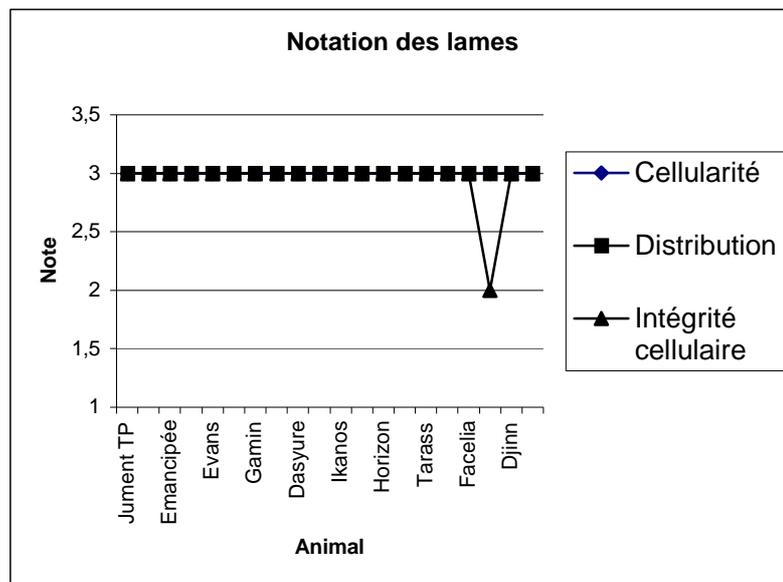


Figure 17 : Notation des lames sur les 3 critères

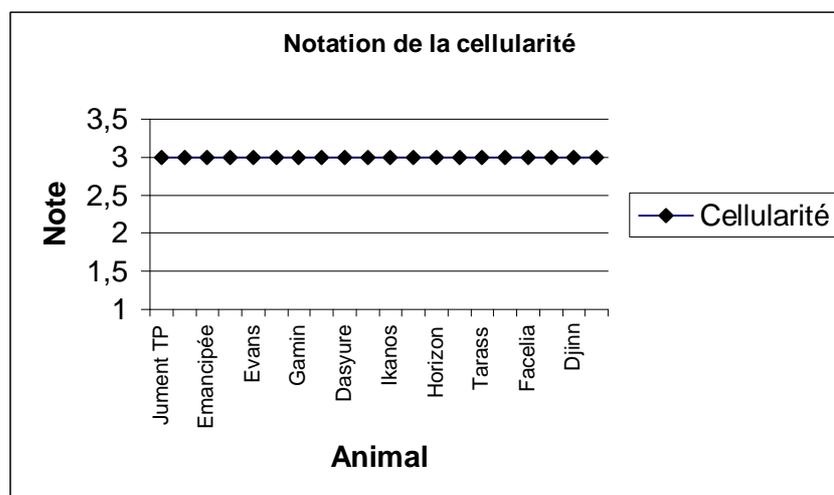


Figure 18 : Notation de la cellularité des lames

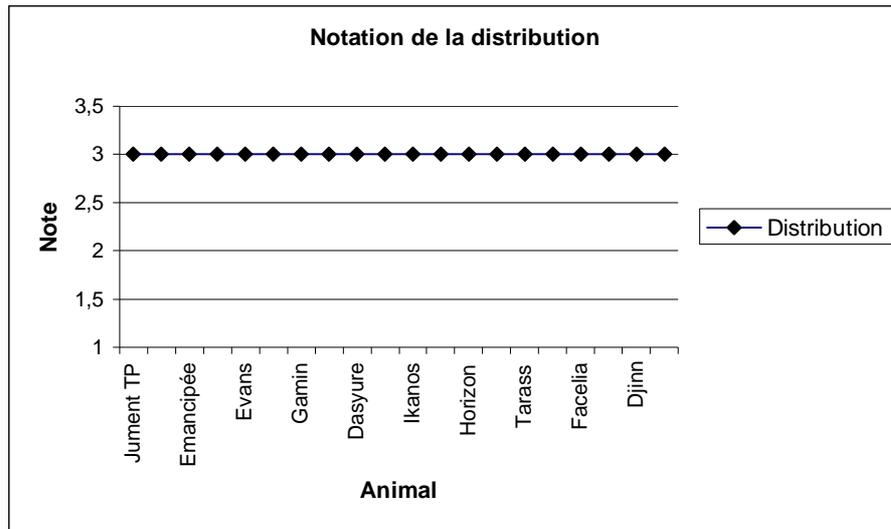


Figure 19 : Notation de la distribution des lames

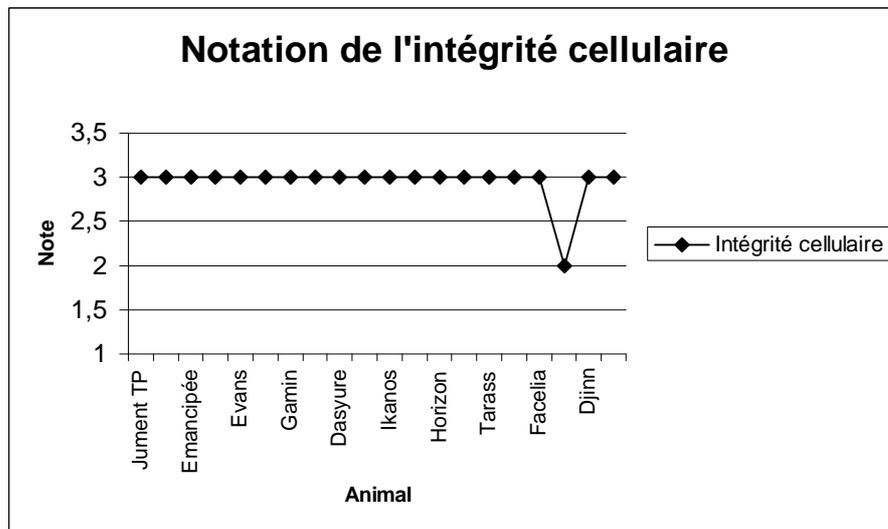


Figure 20 : Notation de l'intégrité cellulaire des lames

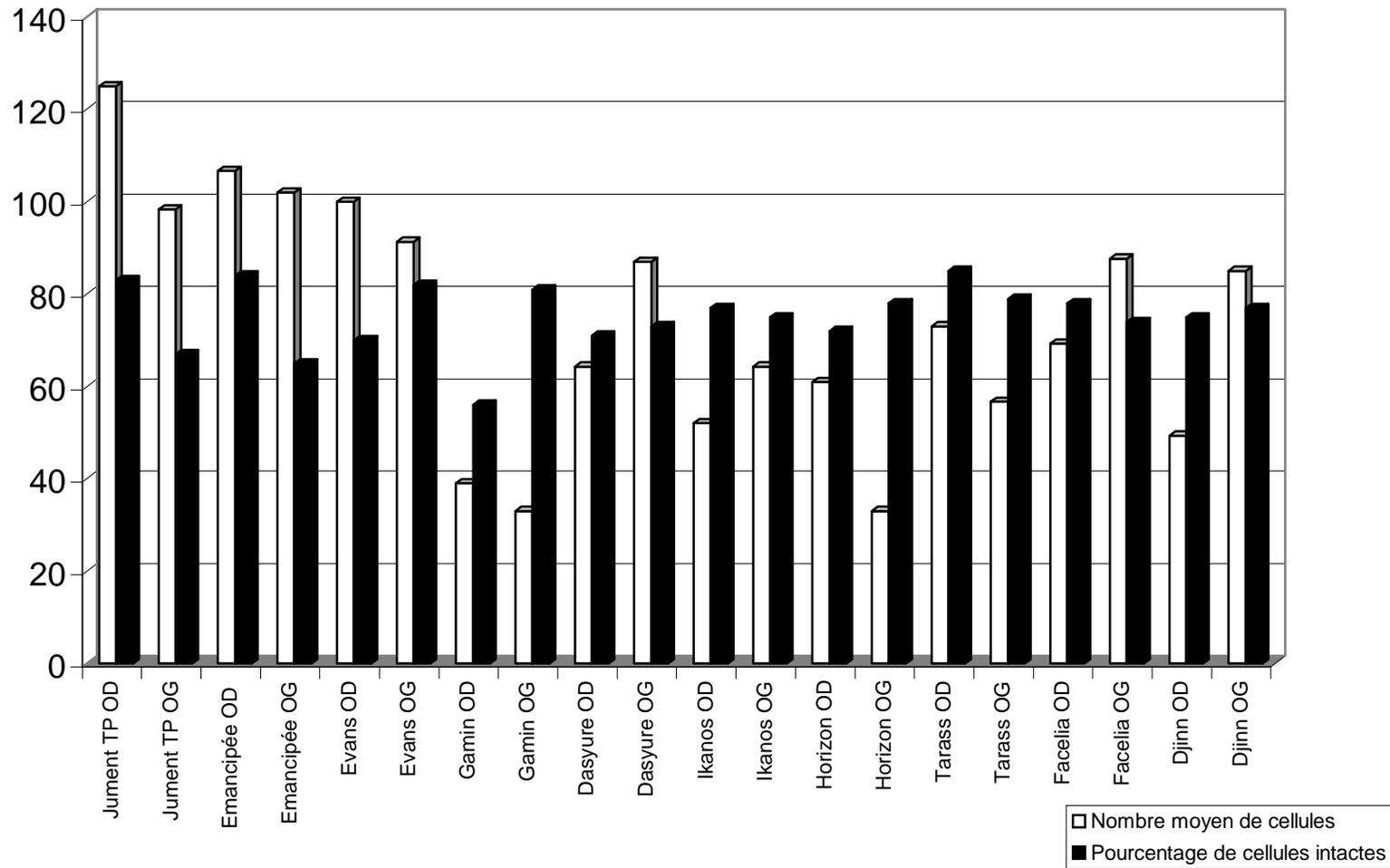


Figure 21 : Evaluation quantitative des lames

Globalement, les 20 lames examinées ont été de qualité similaire si l'on se réfère aux tables de notations utilisées par Bauer et al.

Toutes les lames ont obtenu une note de 3, note maximale, pour ce qui est de la cellularité, de la distribution cellulaire et de l'intégrité cellulaire. Une seule lame était de moins bonne qualité, concernant l'intégrité cellulaire, puisqu'elle n'a obtenu que 2, note qui traduit que moins de la moitié des cellules présentes étaient intactes mais que l'échantillon était néanmoins exploitable.

Si l'on s'intéresse au graphique tracé à partir de la méthode d'évaluation des lames utilisée par Willis, Bounous *et al* (Figure n°22), on s'aperçoit que le nombre moyen de cellules par champ microscopique au grossissement *20 allait de 35-40 cellules à 120 selon les lames, avec une moyenne de 73 cellules. Les champs de plus faible cellularité peuvent être expliqués par le fait que nous avons choisi de compter les cellules aux endroits de plus forte cellularité mais ne présentant ni amas cellulaires, ni cellules superposées, c'est à dire des endroits de bonne distribution cellulaire.

En ce qui concerne l'intégrité cellulaire, toutes les lames présentaient une population de cellules jugées « acceptables » supérieure à 50 % avec une moyenne de 71 %.

Il apparaît donc, à la vue de cette étude quantitative des cellules récoltées lors de nos frottis, que nous avons réalisé des lames de bonne qualité pour ce qui est des trois critères de cellularité, distribution et intégrité cellulaire.

A partir de cette constatation, il nous a alors été possible de procéder au typage des cellules observées sur ces frottis.

2.1.2. Analyse quantitative

On a fait la moyenne entre le nombre de cellules lues sur chaque œil, droit et gauche, pour chaque cheval.

On a constaté qu'une moyenne de 323,6 cellules avait été analysée pour l'œil droit et de 316,55 cellules pour l'œil gauche.

La quantité de cellules analysée pour chaque œil était quasiment identique, soit à peu près 300 cellules, nombre que l'on s'était fixé comme objectif.

On a ainsi émis l'hypothèse qu'il n'y avait pas de différence significative entre les cellules prélevées dans l'œil droit et dans l'œil gauche d'un cheval. Cette hypothèse a été vérifiée par le test statistique de Mann-Whitney qui compare les moyennes entre l'œil droit et l'œil gauche.

On a testé les 3 populations les plus représentées, c'est à dire les cellules épithéliales conjonctivales superficielles, intermédiaires et profondes. Pour chacune de ces trois populations testées on a respectivement obtenu $U = 136.500$ avec $p = 0.084$, $U = 239.500$ avec $p = 0.285$ et $U = 194.000$ avec $p = 0.871$.

Dans les 3 cas on a un $p > 0,05$, et en conséquence les moyennes observées entre l'œil droit et l'œil gauche n'étaient pas significativement différentes. On peut donc travailler en faisant la moyenne des cellules comptées sur l'œil droit et sur l'œil gauche et avoir une moyenne de cellules par cheval.

2.2. Descriptif quantitatif d'une cytologie conjonctivale

2.2.1. En nombre absolu

On a fait la moyenne par type cellulaire des cellules de l'œil droit et de l'œil gauche pour chaque cheval.

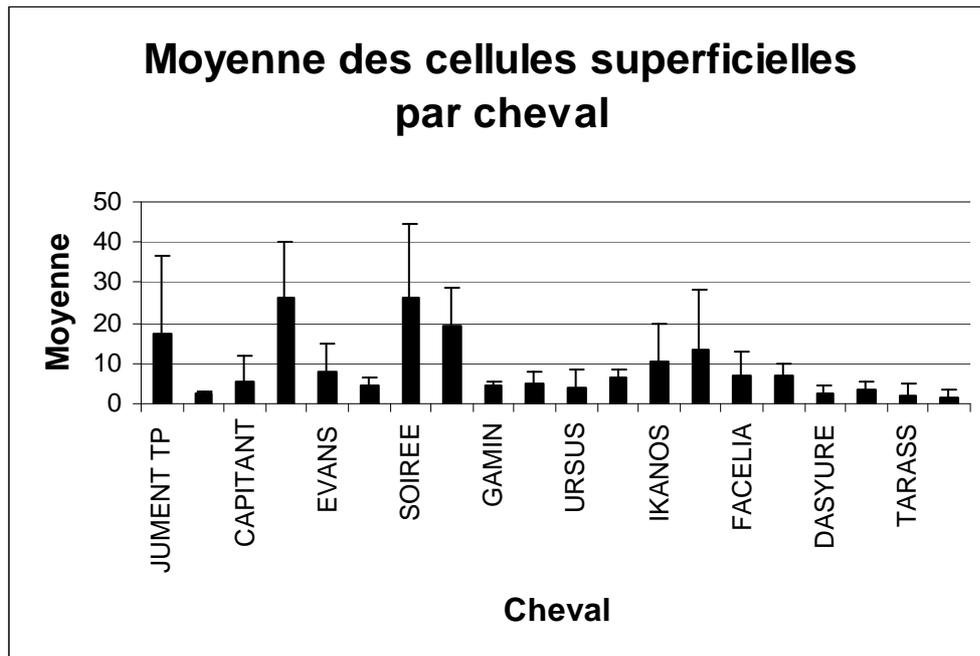


Figure 22 : Nombre moyen de cellules superficielles par cheval

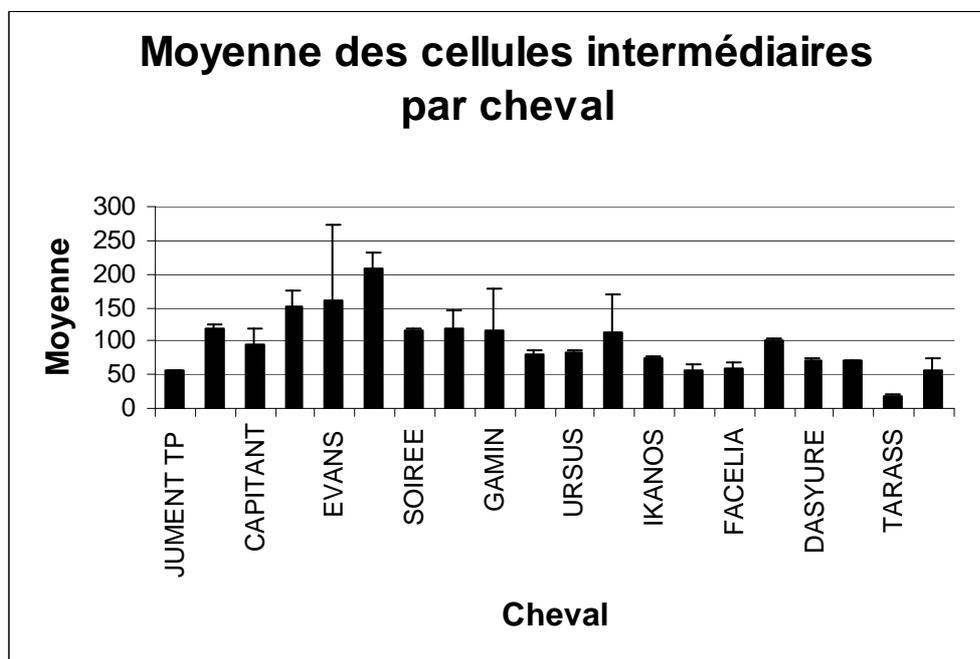


Figure 23 : Nombre moyen de cellules intermédiaires par cheval

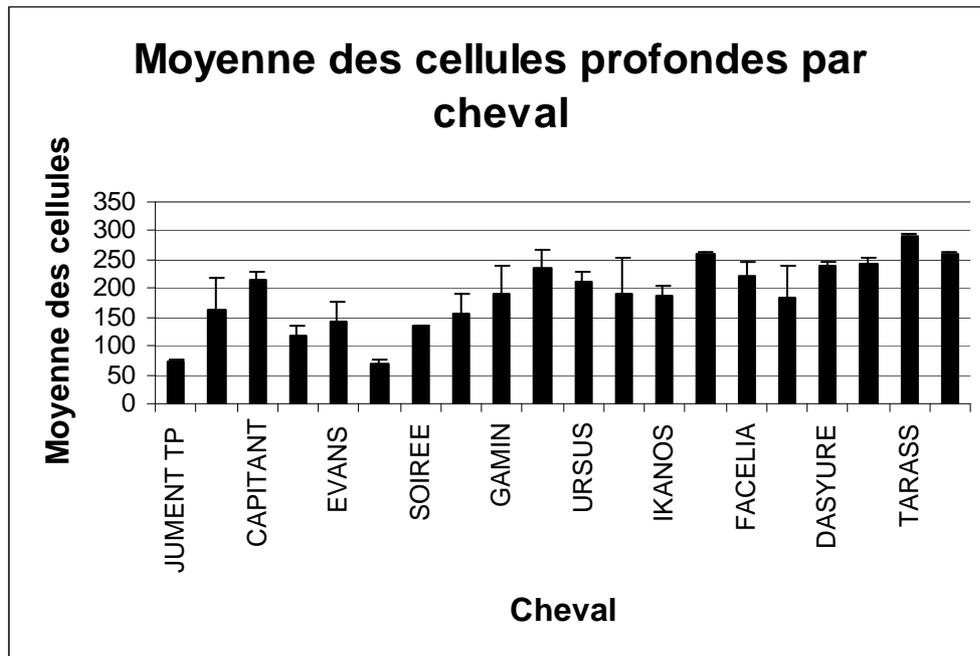


Figure 24 : Nombre moyen de cellules profondes

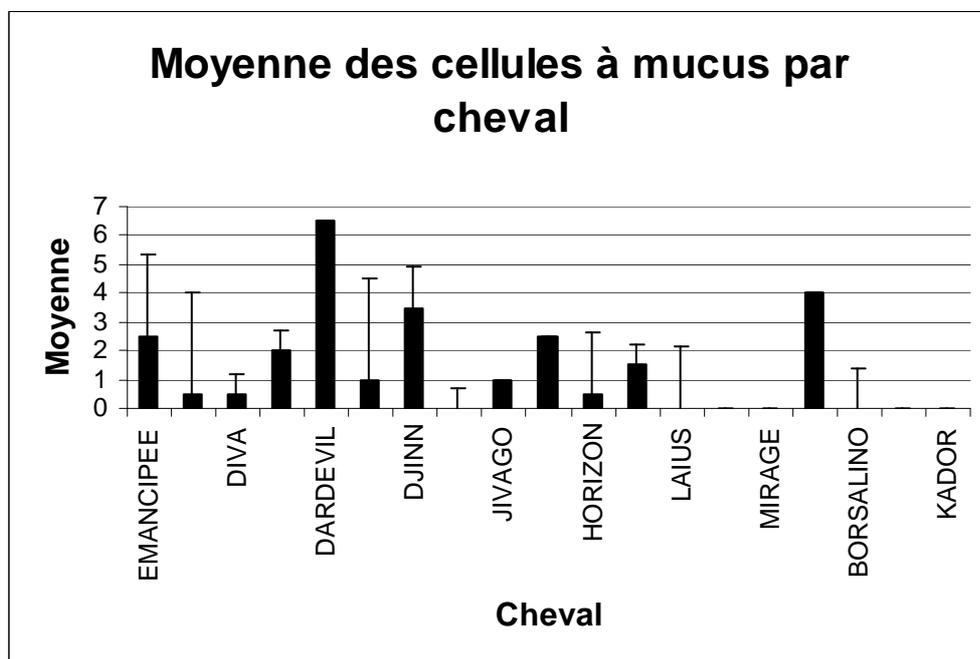


Figure 25 : Nombre moyen de cellules à mucus

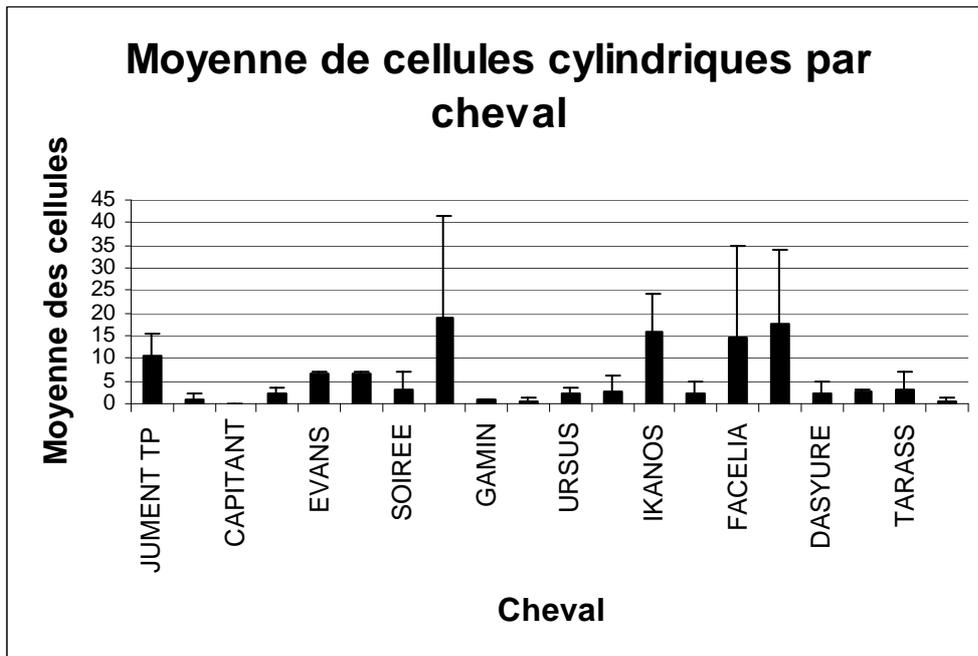


Figure 26 : Nombre moyen de cellules cylindriques par cheval

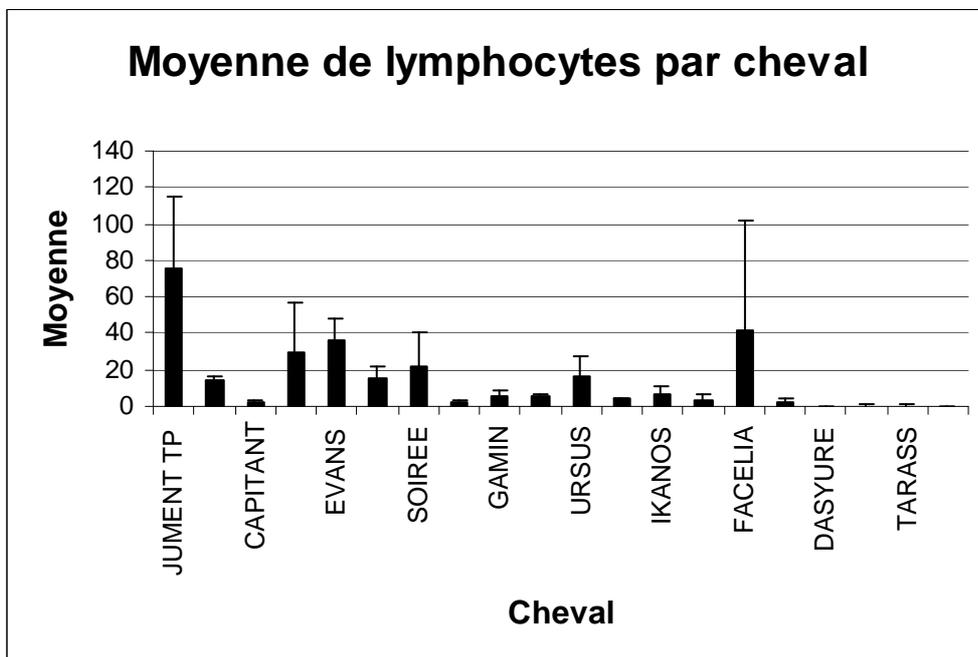


Figure 27 : Nombre moyen de lymphocytes par cheval

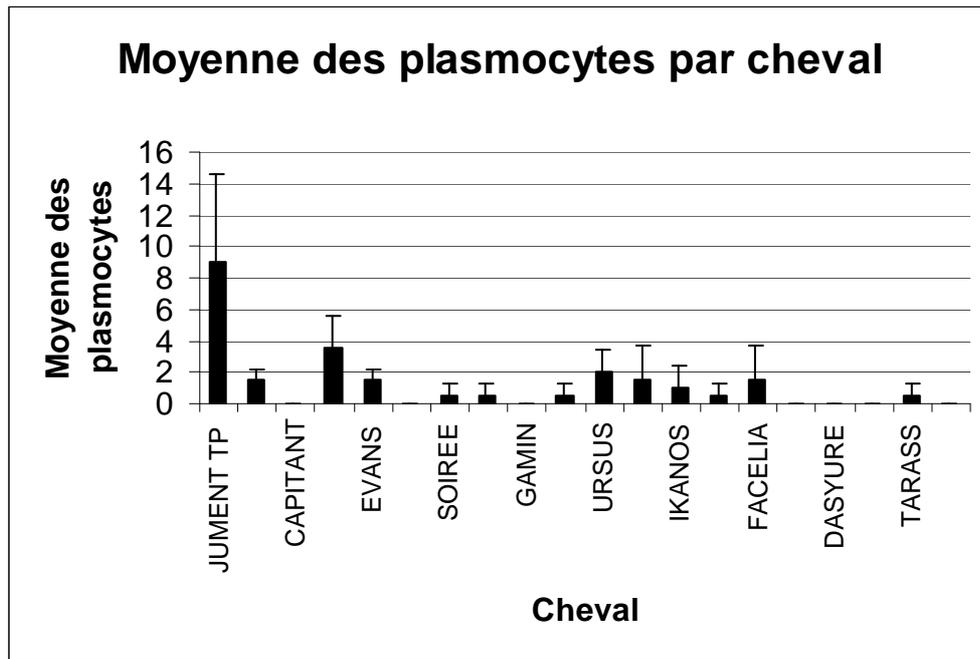


Figure 28 : Nombre moyen de plasmocytes par cheval

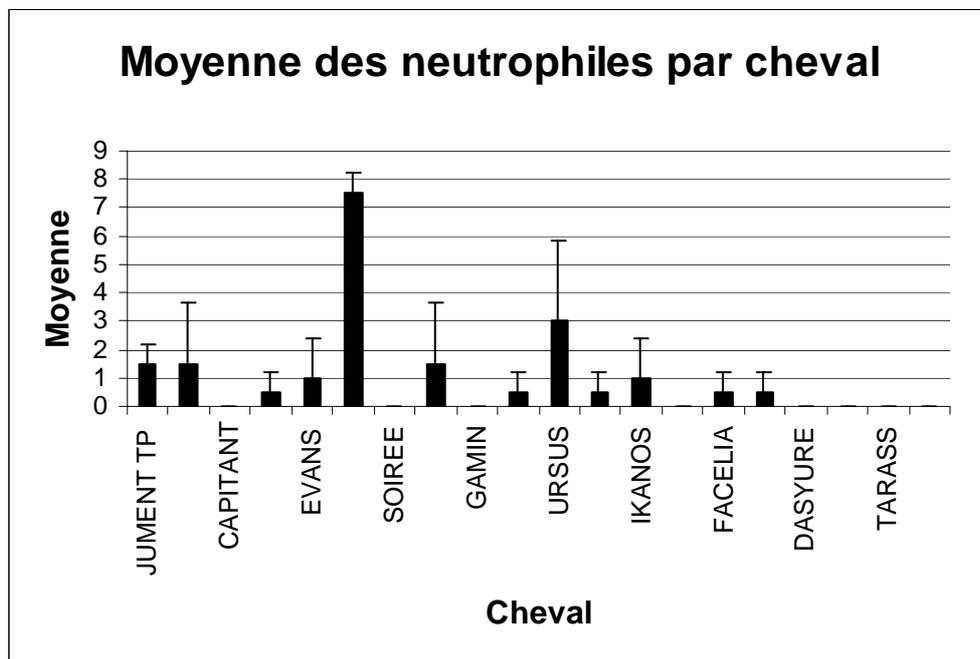


Figure 29 : Nombre moyen de granulocytes neutrophiles par cheval

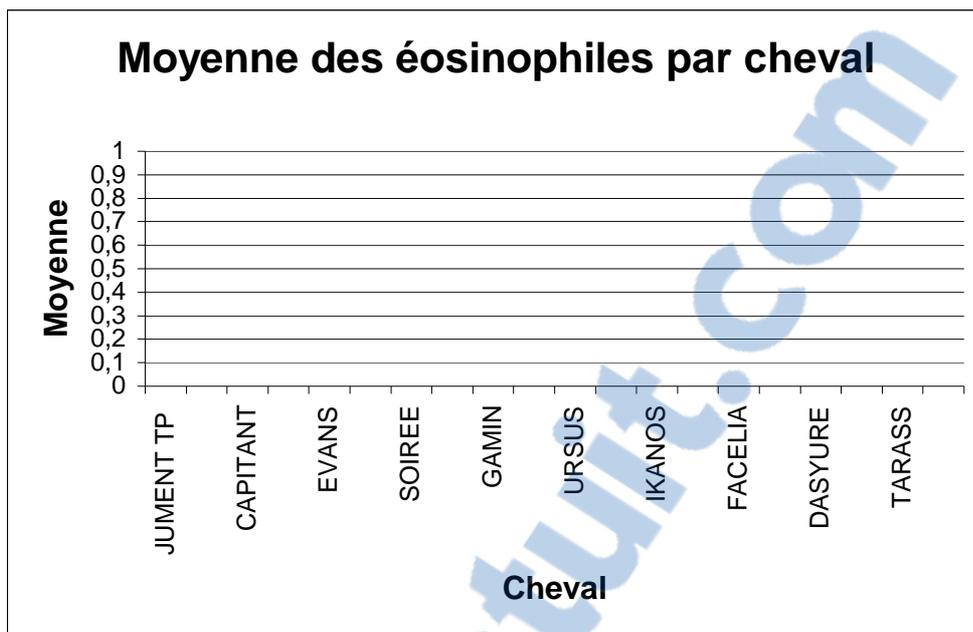


Figure 30 : Nombre moyen d'éosinophiles par cheval

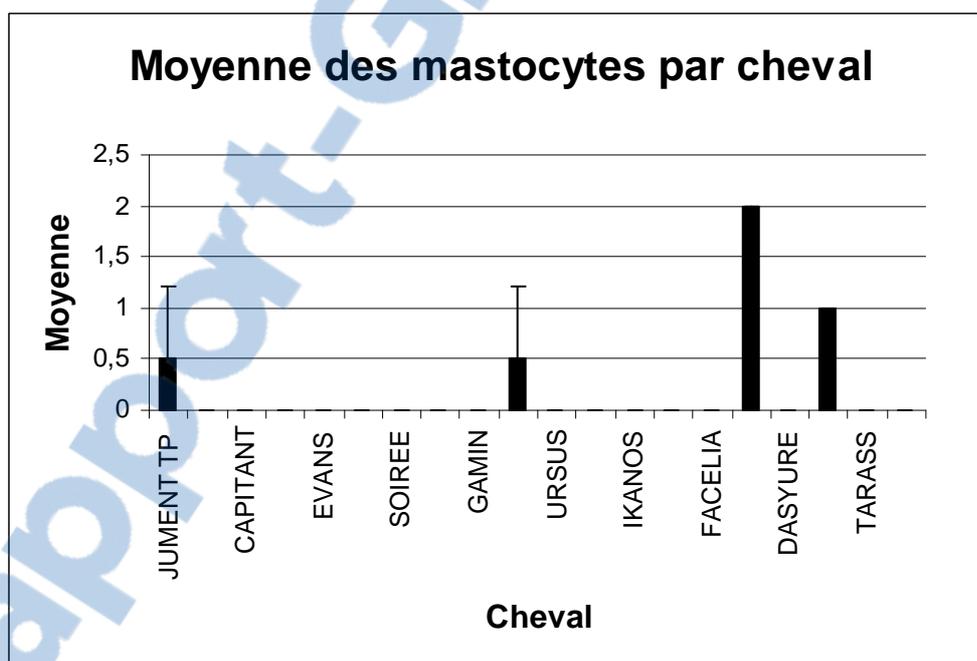


Figure 31 : Nombre moyen de mastocytes

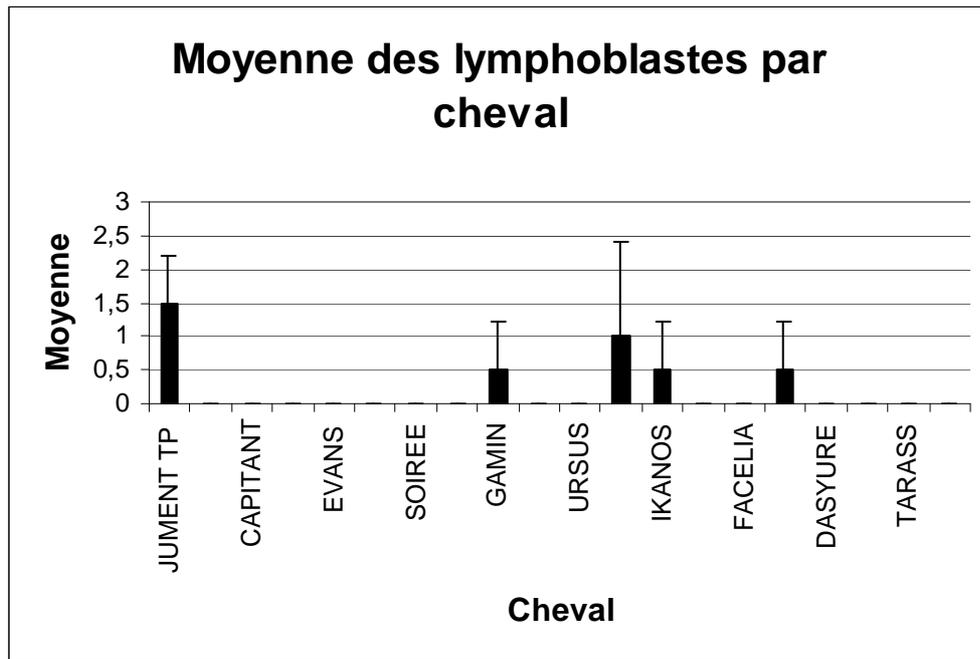


Figure 32 : Nombre moyen de lymphoblastes par cheval

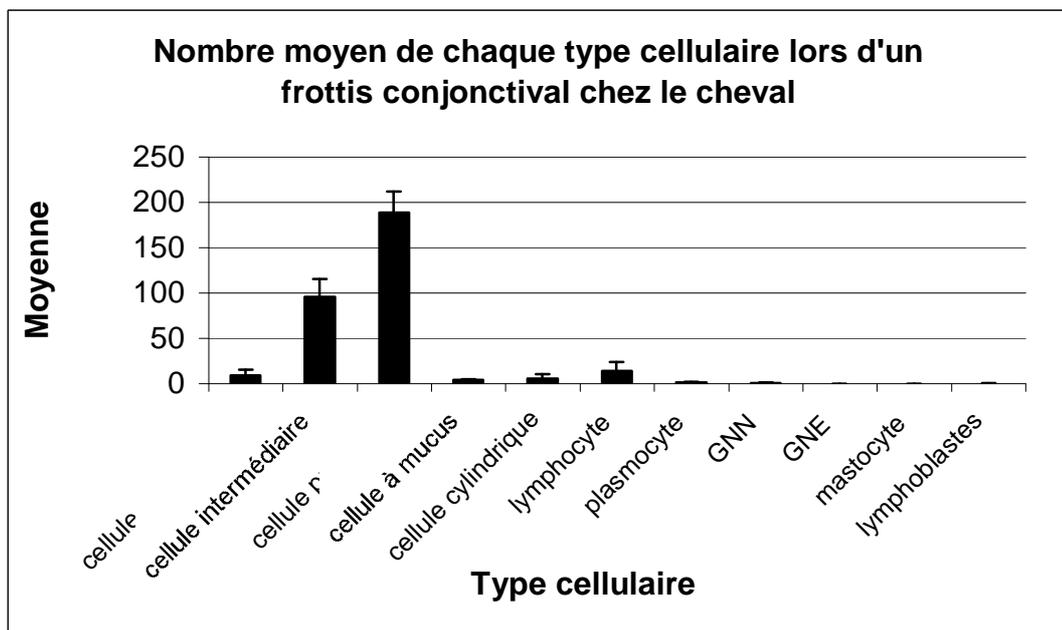


Figure 33 : Bilan du nombre moyen de cellules lors d'un frottis conjonctival chez le cheval

Pour une population totale de 600 cellules analysées par cheval, issues indifféremment de l'œil gauche et de l'œil droit, on a trouvé sur une moyenne de 300 cellules :

- une moyenne globale de 8,8 cellules épithéliales superficielles avec des valeurs moyennes pour chaque cheval comprises entre 1,5 et 19,5 cellules,
- une moyenne globale de 96 cellules épithéliales intermédiaires avec des valeurs moyennes pour chaque cheval comprises entre 18 et 160,5 cellules,
- une moyenne globale de 189 cellules épithéliales profondes avec des valeurs moyennes pour chaque cheval, comprises entre 71,5 et 261,5 cellules,
- une moyenne globale de 3,9 cellules à mucus avec des valeurs moyennes pour chaque cheval, comprises entre 0 et 6,5 cellules, (on a exclu une moyenne aberrante de 52 cellules chez la jument utilisée en Travaux Pratiques à l'ENVT)
- une moyenne globale de 5,6 cellules cylindriques, avec des valeurs moyennes pour chaque cheval, comprises entre 0 et 17,5 cellules,
- une moyenne globale de 14,2 lymphocytes, avec des valeurs moyennes pour chaque cheval, comprises entre 0 et 75,5 lymphocytes,
- une moyenne globale de 1,2 plasmocytes, avec des valeurs moyennes pour chaque cheval, comprises entre 0 et 9 plasmocytes,
- une moyenne globale de 0,9 granulocytes neutrophiles, avec des valeurs moyennes pour chaque cheval, comprises entre 0 et 7,5 neutrophiles,
- on n'a jamais trouvé d'éosinophiles,

- une moyenne globale de 0,2 mastocyte, avec des valeurs moyennes pour chaque cheval, comprises entre 0 et 2 mastocytes,
- une moyenne globale de 0,2 lymphoblaste avec des valeurs moyennes pour chaque cheval, comprises entre 0 et 1 lymphoblaste.

On a testé statistiquement les populations cellulaires pour lesquelles on avait des variations de valeurs assez importantes selon les individus à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis :

- Cellules épithéliales superficielles : $H = 21,979$; $p = 0,285$
- Cellules épithéliales intermédiaires : $H = 33,656$; $p = 0,020$
- Cellules épithéliales profondes : $H = 34,314$; $p = 0,017$
- Cellules à mucus : $H = 27,108$; $p = 0,077$
- Cellules cylindriques : $H = 23,638$; $p = 0,210$
- Lymphocytes : $H = 31,787$; $p = 0,033$
- Plasmocytes : $H = 25,836$; $p = 0,135$
- Granulocytes neutrophiles : $H = 22,52$; $p = 0,258$

Le test statistique montre qu'on n'a pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les chevaux pour les cellules épithéliales superficielles, les cellules à mucus, les cellules cylindriques, les plasmocytes et les neutrophiles.

On a par contre une différence significative ($p < 0,05$) entre les chevaux pour les cellules épithéliales intermédiaires, profondes et les lymphocytes.

On n'a pas testé les dernières populations cellulaires pour lesquelles le nombre de cellules variait uniquement de 0 à 1 et pour lesquelles et les variations ne semblaient pas significatives.

2.2.2. En pourcentage

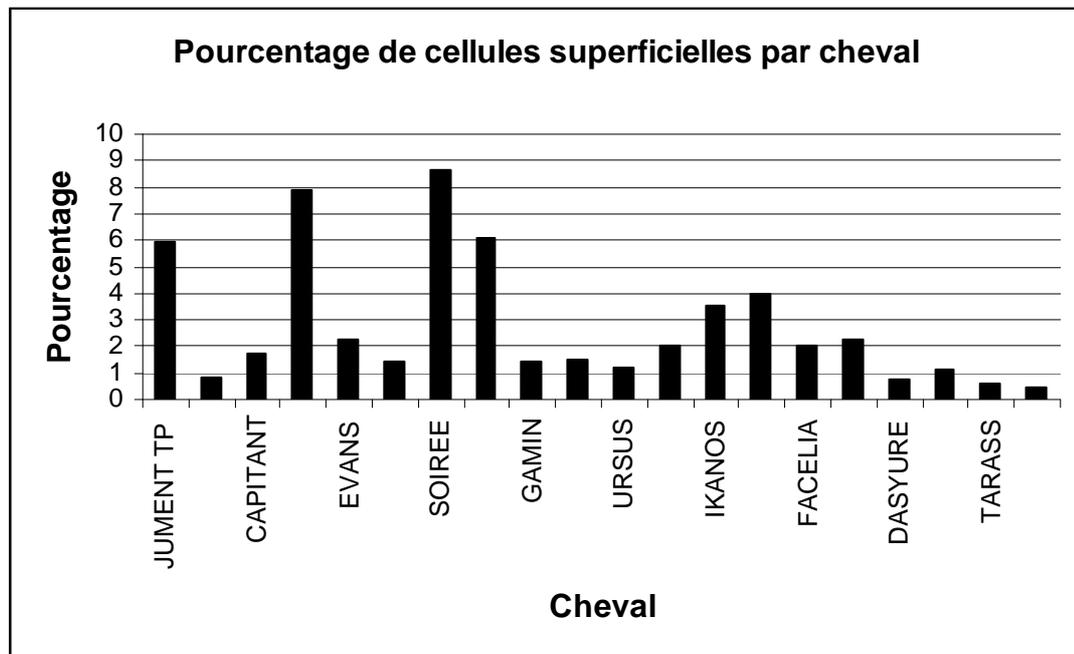


Figure 34 : Pourcentage de cellules superficielles

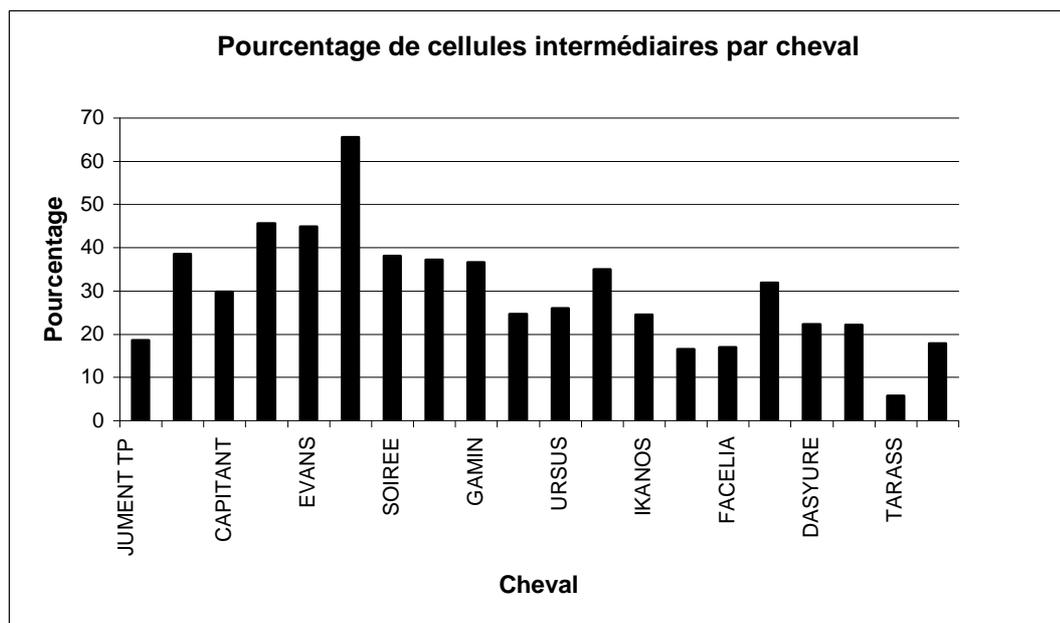


Figure 35 : Pourcentage de cellules intermédiaires

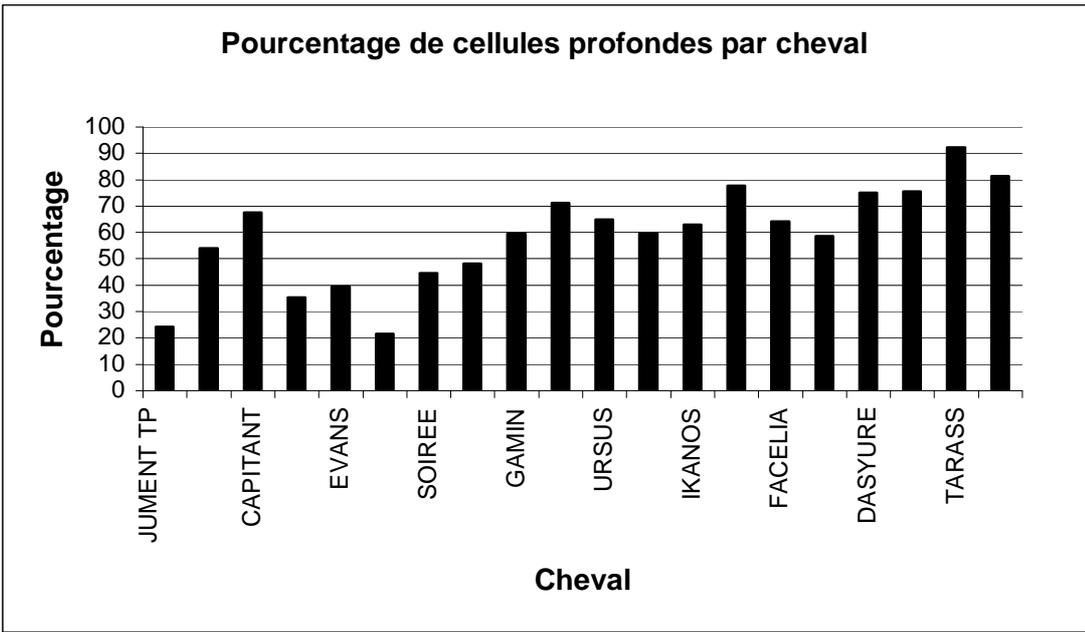


Figure 36 : Pourcentage de cellules profondes

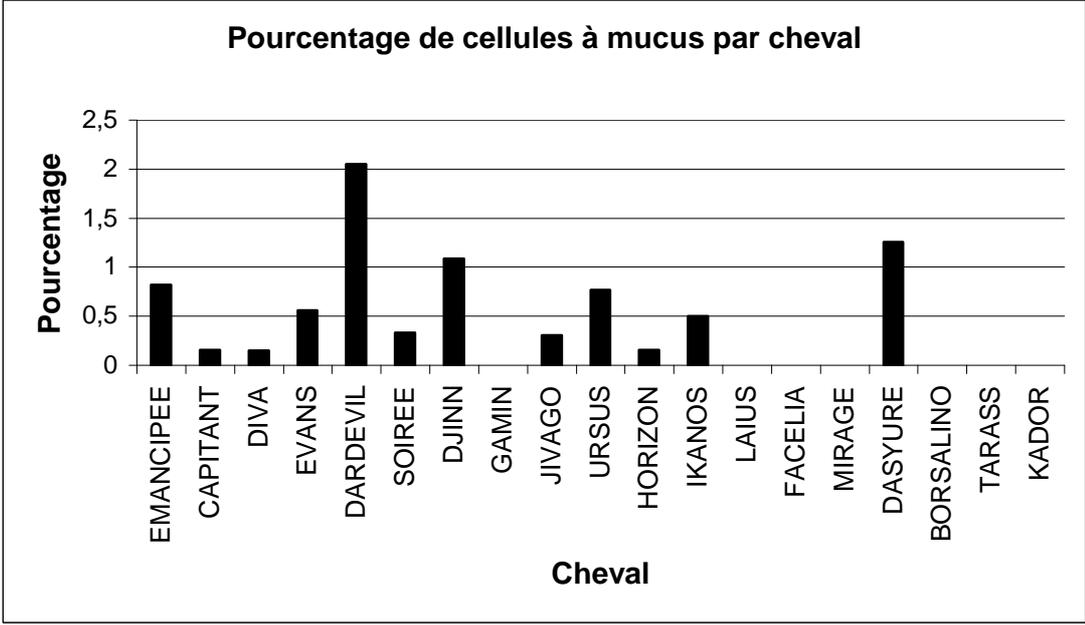


Figure 37 : Pourcentage de cellules à mucus

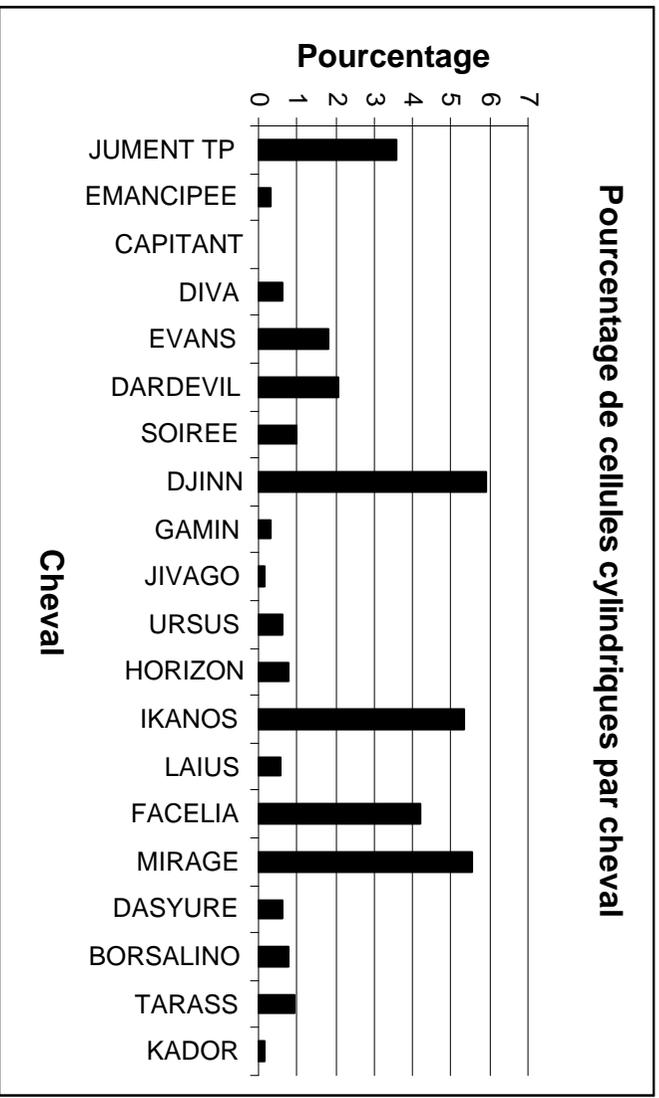


Figure 38 : Pourcentage de cellules cylindriques

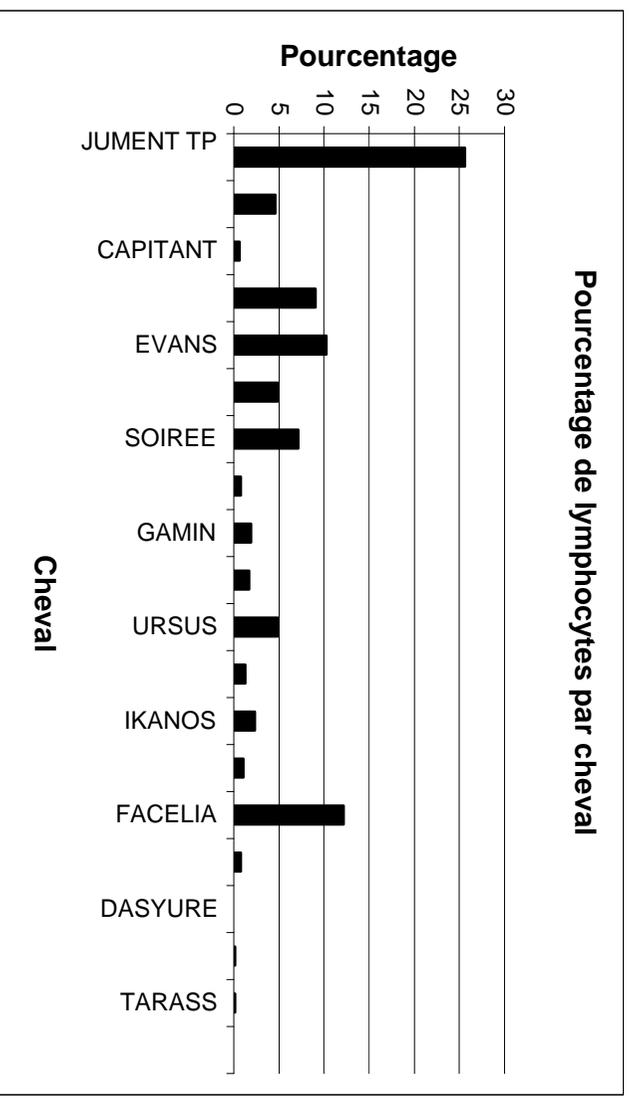


Figure 39 : Pourcentage de lymphocytes

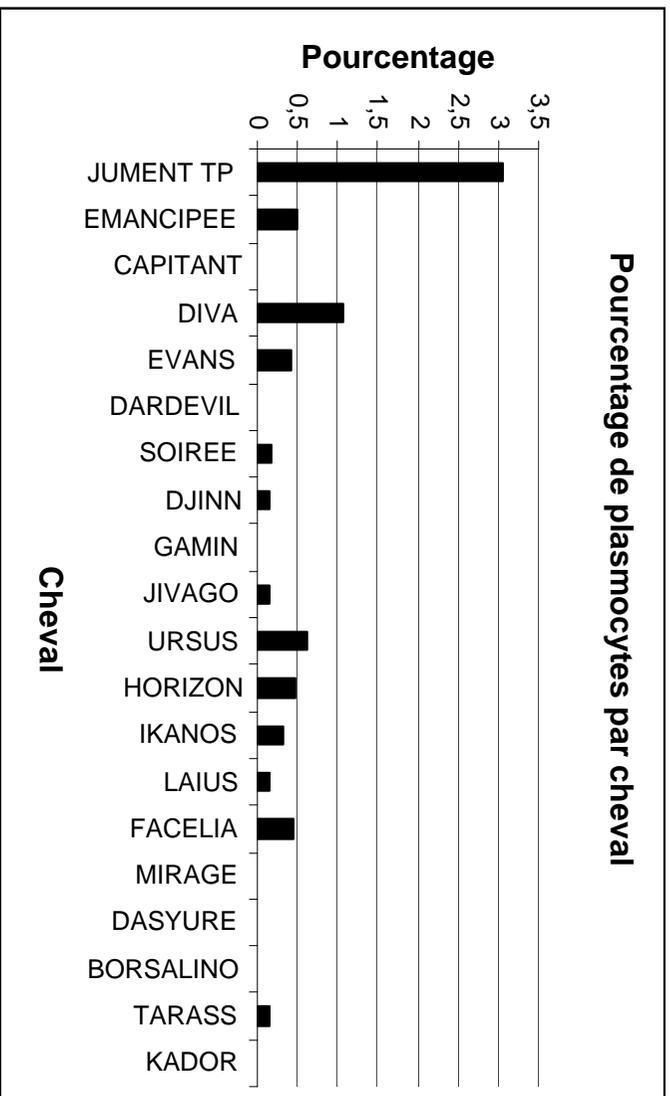


Figure 40 : Pourcentage de plasmocytes

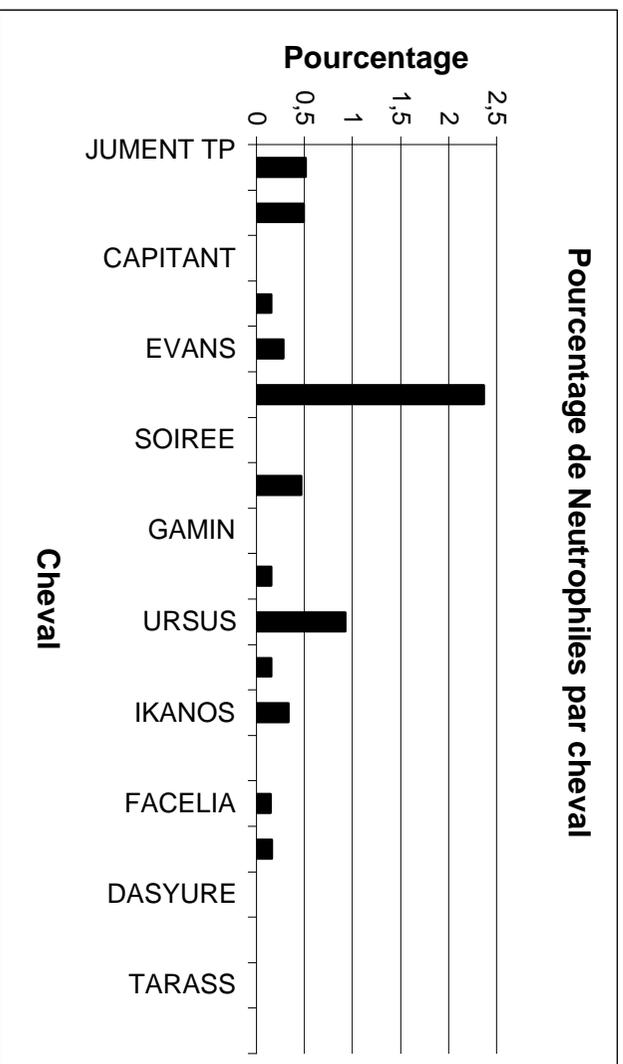


Figure 41 : Pourcentage de granulocytes neutrophiles

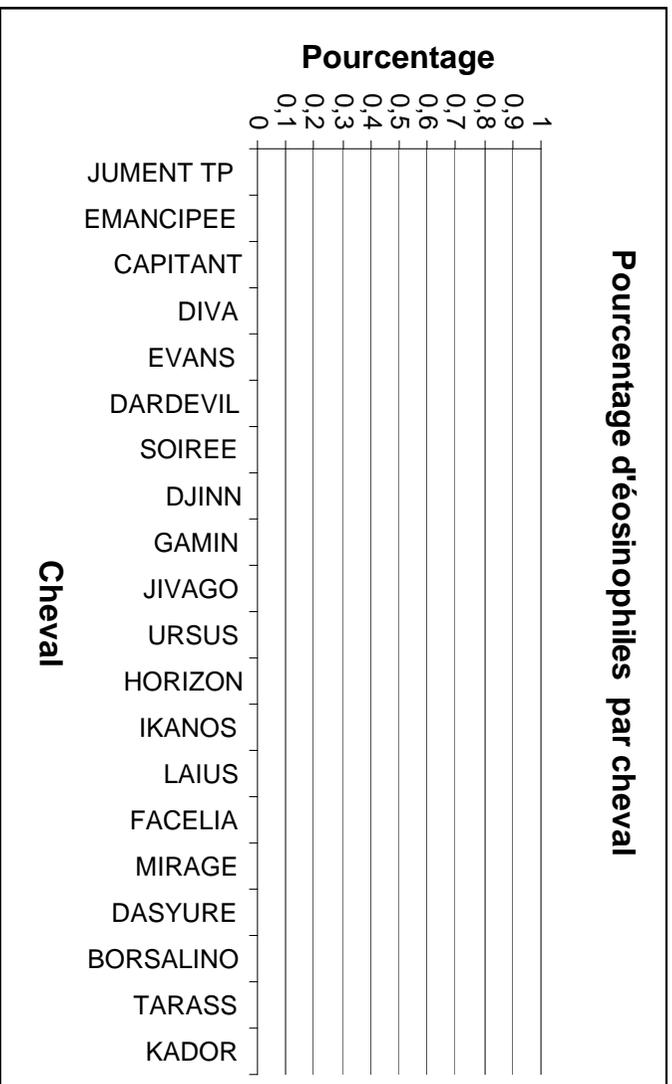


Figure 42 : Pourcentage d'éosinophiles

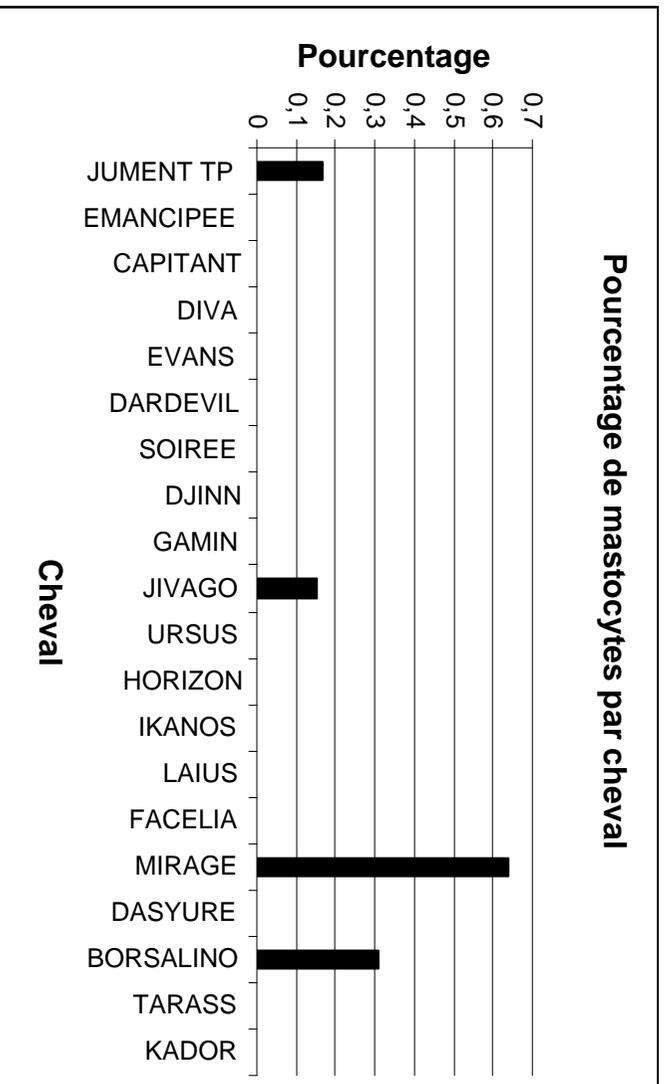


Figure 43 : Pourcentage de mastocytes

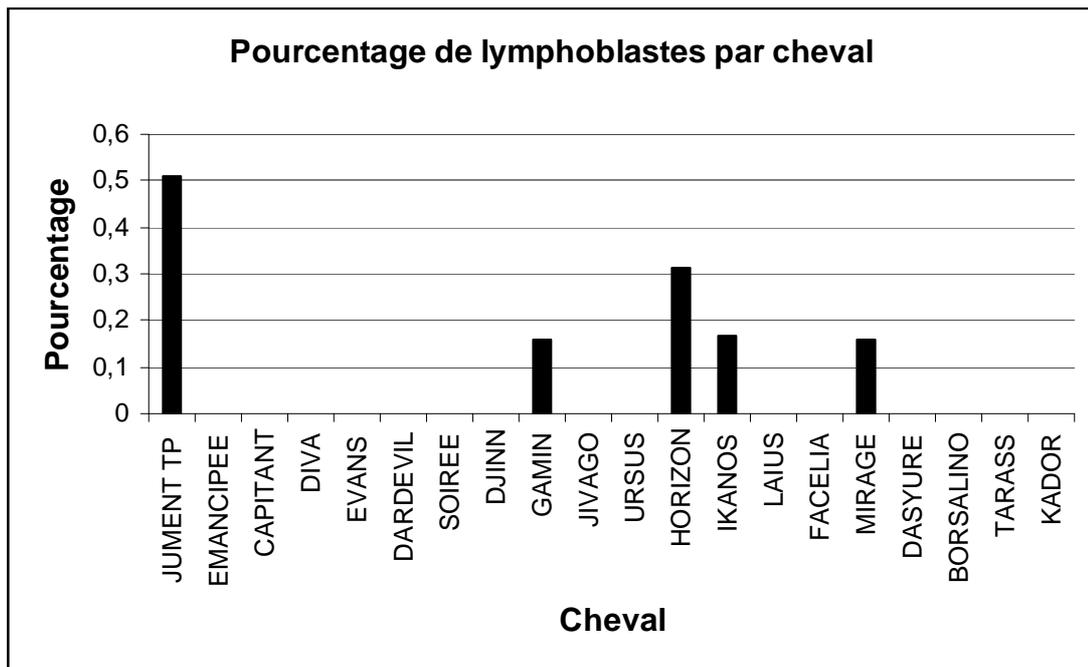


Figure 44 : Pourcentage de lymphoblastes

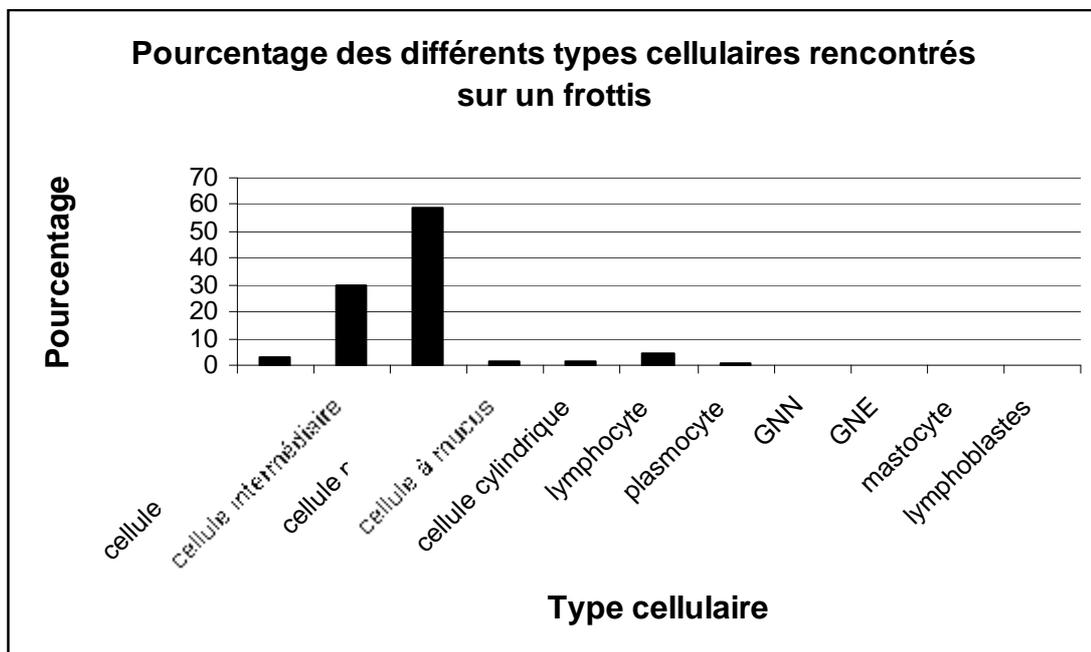


Figure 45 : Pourcentage moyen des différents types cellulaires lors d'un frottis conjonctival chez le cheval

Pour une population totale de 600 cellules analysées par cheval, issues indifféremment de l'œil gauche et de l'œil droit, on a trouvé sur 300 cellules :

- Un pourcentage global de 2,8 % cellules épithéliales superficielles avec des pourcentages moyens pour chaque cheval compris entre 0,5 et 8,6 %,
- Un pourcentage global de 29,9 % cellules épithéliales intermédiaires avec des pourcentages moyens pour chaque cheval compris entre 5,6 et 65,7 %,
- Un pourcentage global de 59 % cellules épithéliales profondes avec des pourcentages moyens pour chaque cheval compris entre 20 et 90 %,
- Un pourcentage global de 1,3 % cellules à mucus avec des pourcentages moyens pour chaque cheval compris entre 0 et 2 %,
- Un pourcentage global de 1,8 % cellules cylindriques avec des pourcentages moyens pour chaque cheval compris entre 0 et 6 %,
- Un pourcentage global de 4,5 % lymphocytes avec des pourcentages moyens pour chaque cheval compris entre 0 et 25 %,
- Un pourcentage global de 0,4 % plasmocytes avec des pourcentages moyens pour chaque cheval compris entre 0 et 3 %,
- Un pourcentage global de 0,3 % granulocytes neutrophiles avec des pourcentages moyens pour chaque cheval compris entre 0 et 2,3 %,
- On n'a pas trouvé de granulocytes éosinophiles,
- Un pourcentage global de 0,06 % mastocytes avec des pourcentages moyens pour chaque cheval compris entre 0 et 0,65 %,

- Un pourcentage global de 0,06 % lymphoblastes avec des pourcentages moyens pour chaque cheval compris entre 0 et 0,5 %.

Globalement, ce sont les cellules épithéliales profondes qui étaient majoritaires (plus de 50 %) chez chaque cheval mais chez quelques individus, il s'agissait des cellules intermédiaires.

2.3. Descriptif cytologique

D'une manière générale, l'analyse morphologique des cellules observées a concordé avec les descriptions données pour le chien et le chat dans les différentes sources bibliographiques et correspondait donc aux descriptions données dans la partie bibliographique de la thèse.

3. Discussion

3.1. Méthode de préparation d'un frottis conjonctival

D'après les différentes études qui ont été précédemment réalisées, en particulier sur les méthodes utilisées pour réaliser des frottis conjonctivaux, il apparaît donc que le moyen le plus fiable et le moins risqué pour prélever des cellules conjonctivales est l'utilisation de la cytobrosse sur un oeil anesthésié localement au préalable avec un collyre.

La cytobrosse est un outil qui est facile d'utilisation, avec lequel on a très peu de risques d'accidents et qui confère aux prélèvements correctement traités une très bonne cellularité, distribution et intégrité cellulaire ; c'est l'outil de choix en matière de cytologie conjonctivale.

3.2. Population cellulaire rencontrée lors d'un frottis conjonctival chez le cheval

La lecture des lames de cytologie conjonctivale préparées à partir de prélèvements faits sur des yeux sains chez 20 chevaux de la région toulousaine a montré que les populations cellulaires les plus représentées étaient les cellules épithéliales profondes (59,9 %) ainsi que les cellules épithéliales intermédiaires (28,9 %).

C'est justement pour ces deux types de cellules que le test statistique de Kruskal-Wallis a montré qu'il y avait une différence significative entre les chevaux. Effectivement, suivant les chevaux, ce sont tantôt les cellules intermédiaires qui se trouvent majoritaires (plus de 50 %) et tantôt les cellules profondes.

Ceci pourrait être expliqué par l'invasivité du prélèvement, c'est à dire la vigueur avec laquelle la cytobrosse a été manipulée car ces deux types cellulaires appartiennent aux couches profondes de l'épithélium conjonctival. Le fait que l'on ait plus de cellules profondes que superficielles va dans le sens des auteurs qui rapportent qu'en médecine humaine la cytobrosse récupère plus de cellules provenant des couches profondes de la conjonctive. (Willis et al 1997)

Les autres cellules que l'on peut rencontrer lors de la lecture d'un frottis conjonctival chez le cheval sont ensuite, par ordre d'incidence, des lymphocytes (4,5 %), des cellules épithéliales superficielles (2,8 %), des cellules cylindriques (1,8 %), des cellules à mucus (1,3 %) et beaucoup plus rarement, des plasmocytes (0,4 %), des granulocytes neutrophiles (0,3 %) et enfin des mastocytes (0,06 %) et des lymphoblastes (0,06 %).

De même, pour les lymphocytes, le test statistique montre qu'il existe une différence significative entre les chevaux. Cependant, si on regarde les données, on s'aperçoit que pour les quatre derniers chevaux, les moyennes chutent à 0 voire 0,5 lymphocyte alors que cette moyenne était toujours supérieure à deux lymphocytes pour les autres. On a refait le test en supprimant les quatre derniers chevaux et on a trouvé alors qu'il n'y avait pas de différence significative entre les chevaux pour la quantité de lymphocytes.

On pourrait attribuer ces quatre dernières valeurs plus basses que les autres à la localisation du prélèvement, peut être plus éloigné des follicules lymphoïdes ou bien à un

prélèvement pas assez invasif pour récolter des lymphocytes à partir des follicules lymphoïdes. On pourrait aussi mettre en cause l'étalement du frottis et éventuellement une mauvaise distribution des cellules qui mettrait les lymphocytes présents sur la lame en dehors des 300 cellules comptabilisées sur la lame.

Chez un cheval en bonne santé, on ne retrouve pas de granulocytes éosinophiles sur un frottis conjonctival.

4. Conclusion

La cytologie conjonctivale est un examen complémentaire très précieux en ophtalmologie vétérinaire quant au diagnostic étiologique des conjonctivites et des tumeurs.

C'est un examen qui n'est pas difficile à réaliser et à mettre en pratique au cours des consultations quotidiennes du vétérinaire praticien. Il lui suffit simplement de disposer de collyre anesthésique, d'une cytobrosse, d'une lame porte-objet et d'un kit de coloration rapide si la lame est destinée à être lue par ses soins.

La population cellulaire présente sur une cytologie conjonctivale d'un œil de cheval sain n'avait jamais été analysée dans le détail et avait été décrite et par analogie avec ce que l'on connaît chez le chien et le chat.

Cette étude contribue à donner des références pour la conjonctive saine du cheval et met en avant des particularités cytologiques propres à l'espèce équine : on trouve majoritairement des cellules épithéliales conjonctivales, profondes ou intermédiaires. On rencontre ensuite des lymphocytes, des cellules conjonctivales superficielles, des cellules à mucus et cylindriques. Le reste des cellules, neutrophiles, plasmocytes, mastocytes et lymphoblastes n'est que très rarement rencontré sur une lame de frottis conjonctival.

Il serait intéressant par la suite de renouveler ce type d'étude sur une population de chevaux malades présentant respectivement des conjonctivites bactériennes, virales et des tumeurs conjonctivales afin de caractériser le frottis conjonctival dans ces différents cas de figure.

ANAGNOSTOPOULOU-FOTINOPOULOU, R., RAMMON-KINIA, I.
Cytologic findings in conjunctival samples obtained with a standard cytobrush
Acta cytologica, 1991, **35**, p 660.

BANKS, W. J.
Applied Veterinary Histology, 3rd Edition
St Louis: Mosby Year Book, 1993, 527 p.

BAUER, G.A.
Exfoliative cytology of the cornea and conjunctiva of domestic animals
Th. Med.vet. : Zürich, Aus der veterinär-Chirurgischen Klinik der Universität Zürich, 1999.

BAUER, G. A., SPIESS, B. M. et al.
Exfoliative cytology of Conjunctiva and cornea in domestic animals: A comparison of four
Collecting techniques
Veterinary & Comparative ophthalmology, 1996, **6**, N°3.

BLEUER-ELSNER, S.
Renseignements fournis par la cytologie oculaire chez les carnivores.
Th. Med.vet. : Lyon: 1992, 141 p.

CLERC, B.
Ophthalmologie vétérinaire. 2nde Edition.
Maisons-Alfort : Editions du Point vétérinaire, 1997, 616 p.

CURIEL, J. M. A. d. S., C. P. MOORE, et al.
The Eyes and Ocular Adnexa
In: PRATT, P.W., COWELL, R. L. and TYLER, R. D.
Cytology and Hematology of the Horse
Goleta, California, American Veterinary Publications, 1992, Ch 3: 47-68 .

FRANCART, S. and CLERC, B
Le frottis conjonctival chez le chien : Etude cytologique.
Le Point Vétérinaire, 1981, **12**: 20-24.

GELATT, K. N.

Essentials of Veterinary Ophthalmology

Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 595 p.

JEGOU, J. P. and S. LIOTET

Intérêt du frottis conjonctival dans le diagnostic biologique des conjonctivites chez le chien et le chat.

Pratique médicale et chirurgicale, 1991, **26** : 567-580.

JONGH, O.

Intérêt des examens cytologiques en ophtalmologie.

Le Point Vétérinaire, 1994, **26**, numéro spécial "biologie clinique" : 539-547.

LAVACH, J., .THRALL, M.A et al.

Cytology of Normal and Inflamed Conjunctivas in Dogs and Cats

Journal of th American Veterinary Medical Association, 1977, **170**: 722-727.

LAVACH, J. D

Large Animal Ophthalmology

St. Louis: C.V. Mosby Company, 1990, 395 p.

LEESON, T. S. and LEESON, C. R.

A brief Atlas of Histology.

Philadelphia: W.B. Saunders Compagny, 1979, 264-265.

PRASSE, K. W. and WINSTON, S. M.

The Eyes and Associated Structures.

In: COWELL, R. L., TYLER, R. D. and MEINKOTH, J. H.

Diagnostic Cytology and Haematology of the Dog and Cat. 2nd edition

St Louis: Mosby, 1999, Chp 5: 68-82.

REGNIER, J.

Le test de schirmer chez le cheval : valeurs usuelles et fluctuations journalières et hebdomadaires.

Th.: Med.vet. : Toulouse: 2002, 50 p.

SLATTER, D.

Fundamentals of Veterinary Ophthalmology.

Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1990, 630 p.

SPEIRS, V. and WRIGLEY, R.

Clinical Examination of horses.

Philadelphia: WB Saunders company, 1997, 358p.

STEVENS, A. and LOWE J. S.

Histology.

Paris: Editions Pradel,1993, 378 p.

T.RAMSEY, D.

Cytologic Examination of the Eye.

Veterinary Technician, 1994, March, 131-139.

TRUMEL, C. et Dossin, O.

Cytologie conjonctivale

Toulouse (ENVT) : CES d'ophtalmologie vétérinaire, 2001-2002.

TSUBOTA, K., Kajiwara, K. et al.

Conjunctival brush cytology.

Acta cytologica, 1990, **34**: 233-235.

WHITLEY, R. D.

Microbiology of the Equine Eye in Health and Disease.

The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 1984, **6**: 451-466.

WHITLEY, R. D., BURGESS, E. C., et al.

Microbial isolates of the normal equine eye.

Equine Veterinary Journal, 1983, **supplement 2**: 138-140.

WILLIS, M., D., Bounous, I. et al.

Conjunctival Brush Cytology: Evaluation of a New Cytological Collection Technique in Dogs and cats With a Comparison to Conjunctival Scraping.

Veterinary & Comparative ophthalmology, 1997, **7**: 74-80.