



ROYAUME DU MAROC
UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
FES



ETUDE DE LA MICROSCOPIE SPÉCULAIRE

MEMOIRE PRESENTE PAR :
Docteur KEITA Séverin

Né le 22 Décembre 1975 à Mandiakuy (MALI)

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE SPECIALITE EN MEDECINE
OPTION : OPHTALMOLOGIE

Sous la direction de :
Professeur : **BENATIYA ANDALOUSSI IDRIS**

Session Mai 2017

Après des années d'investissement et de formation, aujourd'hui est pour moi le moment que je souhaite mettre en avant afin de rendre hommage à toutes les personnes sans lesquelles je n'aurais pu aboutir à cette formation.

Je rends hommage aussi à toutes les personnes ayant contribuées de loin ou de prêt à cette formation, j'espère être à la hauteur de la confiance que vous aviez bien voulu m'accorder.

A mon maître
Monsieur le Professeur
TAHRI HICHAM

*Je vous remercie de m'avoir accepté dans le service pour l'apprentissage
de l'ophtalmologie.*

*Vos qualités humaines et professionnelles m'ont accompagné et épaulé
tout au long de cette formation et ont facilité son déroulement.*

*Je serai donc fière de vous honorer et espère être digne de la confiance
que vous me témoigniez tout en vous souhaitant une bonne réussite
dans votre nouvelle carrière.*

*Veillez, cher Maître, accepter l'expression de ma haute considération,
et de mon profond respect.*

A mon maître

Monsieur le Professeur

BENATIYA ANDALOUSSI IDRIS

J'ai eu le grand plaisir d'apprendre à connaître, sous votre nouvelle direction avec vos compétences professionnelles et vos qualités humaines incontestables.

A vos côtés, j'ai grandi professionnellement en m'imprégnant de votre savoir scientifique et de votre expérience.

Votre dévouement envers les patients, votre disponibilité ainsi que votre gentillesse me sont un grand exemple.

Veillez, cher Maître, trouvé dans ce modeste travail, l'expression de ma haute considération, de ma sincère reconnaissance et qu'Allah le Tout Puissant vous guide et vous protège à la tête de ce service dont nous sommes si fiers.

A mon Maître

Le Professeur

ABDELLAOUI MERIEM

*Votre enseignement rigoureux, vos qualités humaines, votre modestie
ont toujours été un grand apport pour cette formation.*

*Vos précieux conseils et votre soutien permanent pour améliorer mes
compétences pratiques et théoriques.*

*Vos enseignements continueront d'illuminer mon chemin, j'espère être à
la hauteur de la confiance que vous aviez bien voulu placer en moi.*

*Veillez trouver cher maitre ma permanente et sincère reconnaissance
et l'expression de mon profond respect.*

A mon Maître
Le Professeur
CHRAIBI fOUAD

Vous aviez prodigués avec patience et indulgence infinie, précieux conseils.

Vous étiez toujours disponibles et soucieux de nous donner la meilleure formation qui puisse être.

*Votre gentillesse et vos remarques nous ont été d'une aide précieuse.
Qu'il nous soit permis de vous rendre un grand hommage et de vous formuler notre profonde gratitude.*

SOMMAIRE

SOMMAIRE	6
INTRODUCTION	8
RAPPEL ANATOMIQUE ET PHYSIOLOGIQUE	11
I- ANATOMIE	12
II- PHYSIOLOGIE	16
III-INERVATION	17
NOTRE ETUDE	18
MATERIELS ET METHODES.....	19
I- MATERIELS	20
II- METHODES	28
RESULTATS	29
DISCUSSION	36
I- TECHNIQUES ET PRINCIPE D'EXAMEN DE LA MICROSCOPIE SPECULAIRE	37
II- LES MACHINES DE LA MICROSCOPIE SPECULAIRE	39
III- LA PRATIQUE	40
IV- LES INDICATIONS DE LA MICROSCOPIE SPECULAIRE	48
CONCLUSION.....	59
RESUME.....	61
BIBLIOGRAPHIE	64

INTRODUCTION

La microscopie spéculaire s'est imposée depuis deux décennies (1) comme la technique d'exploration non invasive de référence de l'endothélium cornéen.

Elle permet l'analyse qualitative et quantitative à titre diagnostique, préventif ou dans un simple but de surveillance, de cette couche monocellulaire dont on connaît bien le rôle dans le maintien de la transparence cornéenne.

Avec le développement de nouveaux procédés de réfraction, tels que les lentilles intraoculaires, les nouveaux médicaments et solutions topiques et intraoculaires, il est nécessaire de normaliser et de valider la microscopie spéculaire endothéliale cornéenne.

La microscopie spéculaire permet d'accéder à la structure et à la fonction de l'endothélium cornéen. Il existe plusieurs appareils de microscope spéculaire, chacune capturant les images de cellules à différents grossissements et étalonnages.

La microscopie spéculaire est utilisée pour visualiser et enregistrer l'image de la couche de cellules endothéliales cornéennes sans invasion.

Les microscopes spéculaires cliniques sont tous basés sur le microscope de laboratoire conçu par Maurice (2) pour fournir une vue à grossissement élevé de la lumière spéculaire réfléchie de l'endothélium cornéen.

Les premiers rapports projetés en 1920 décrivent l'utilisation de spéculaire réflexe à la lumière de la lampe à fente pour voir l'endothélium cornéen (3).

Le réflexe spéculaire se produit à une interface régulière, à surface lisse, de deux indices de réfraction, la lumière du sujet ayant un angle d'incidence égal à l'angle de réflexion pour l'observateur. Les cellules endothéliales peuvent être imagées parce que l'indice de réfraction des cellules endothéliales est supérieur à la valeur de 1,336 pour l'humeur aqueuse, reflétant ainsi 0,022% de la lumière projetée (4).

Depuis la première observation et la description de l'image endothéliale par Vogt en 1918 à l'aide d'une simple lampe à fente et la mise au point en 1968 du premier microscope spéculaire par David Maurice, de nombreux appareils se sont succédés pour permettre l'examen de l'endothélium in vivo.

Le but de notre travail est d'analyser les résultats de la microscopie spéculaire de nos patients sains et de les comparer aux données de la littérature.

RAPPEL

ANATOMIQUE ET

PHYSIOLOGIQUE

I- ANATOMIE

La cornée est un tissu transparent avasculaire en continuité avec la sclère (opaque) et la conjonctive (semi-transparente). La zone de transition correspond au limbe, sa structure richement vascularisée constitue un réservoir de cellules souches épithéliales.

Elle comporte 6 couches d'avant en arrière en plus du film lacrymal :

1. Le film lacrymal :

Il est tapissé de l'intérieur vers la surface externe de 3 couches :

- La couche profonde mucinique (0.02 à 0.05 μ) elle a une surface hydrophile puis sécrétée par les cellules caliciformes de l'épithélium conjonctival et des glandes de Henlé.
- La couche intermédiaire aqueuse (7 μ) elle est sécrétée par les glandes lacrymales principales et accessoires de Krauss et Wolfring
- Et la couche lipidique qui est sécrétée par les glandes sébacées palpébrales, de meibomius, Zeiss et Moll.

Le film lacrymal joue un rôle de protection contre de la dessiccation et assure la régularité épithéliale et l'oxygénation de la cornée. Il contient des protéines anti microbiennes (IgA/G, lysozyme...) et joue un rôle osmotique vis-à-vis du stroma.

2. Le limbe cornéen :

On trouve à ce niveau les cellules souches limbiques caractérisées par leur renouvellement rapide et continu, il joue un rôle dans les phénomènes de cicatrisation.

La vascularisation limbique est de type terminal favorisant une richesse en médiateurs de l'inflammation, le limbe étant un site privilégié de l'inflammation.

3. L'épithélium cornéen 10% de l'épaisseur cornéenne

C'est un épithélium malpighien, non kératinisé composé :

- D'une assise basale : couche unistratifiée en contact avec la lame basale
- D'une assise intermédiaire : zone de transition
- D'assise superficielle : 2 à 3 couches de cellules plates desquamâtes, les microvillosités superficielles permettent d'augmenter la surface des échanges métaboliques et de renforcer l'adhérence du film lacrymal

Le renouvellement se fait en 7 à 14 jours à partir des cellules basales qui desquament dans le film lacrymal.

Plusieurs types de jonctions caractérisent l'épithélium : tightjunction, gap junction, desmosomes et hémi-desmosomes

Il joue un rôle de protection mécanique, de barrière vis-à-vis des microorganismes et la diffusion de l'eau.

4. La membrane basale

Elle est divisée en 2 parties : la lamina lucida et la lamina densa.

Elle permet l'ancrage de l'épithélium à la membrane de bowman.

Elle joue un rôle dans la cicatrisation par support aux cellules basales.

La membrane de Bowman est acellulaire, 12 μ d'épaisseur, formée par la condensation de fibres collagènes et de protéoglycanes. Elle ne régénère pas après traumatisme

5. Le stroma 90% du tissu cornéen

Il est composé de matrice extracellulaire, de kératocytes et de fibres nerveuses.

Les fibres de collagènes sont disposées en lamelles superposées (250) traversant la cornée du limbe au limbe parallèles entre elles et parallèles à la surface cornéenne ce qui permet une transparence cornéenne.

Les protéoglycanes à kératane sulfate et chondroïtine sulfate, permettent de maintenir constant l'espace inter fibrillaire et l'hydratation stromale.

Les kératocytes jouent un rôle de l'intégrité de la matrice extracellulaire.

6. La couche de Dua

Nouvelle couche de découverte plus récente résistante et supporterait une pression de 1,5 à 2 bars.

7. La membrane de descemet

Lame basale de l'endothélium, résistante, solide, amorphe, élastique, riche en collagène et en laminine

8. L'endothélium (base de notre étude)

La couche la plus postérieure de la cornée directement en contact avec l'humeur aqueuse.

Il assure un triple rôle de déturgescence pour maintenir la transparence :

- Synthèse
- Barrière interne
- Transport actif

Environ 500.000 cellules constituées d'une seule couche de cellules plates, hexagonales et régulière en « nid d'abeille » lors de l'examen in vivo en microscopie spéculaire, reliées par des jonctions étroites et lâches.

Les cellules endothéliales ont une hauteur de 5µm et une largeur de 15-20µm, avec une densité cellulaire moyenne chez le jeune adulte de 3500 cellule/mm² (diminuent avec l'âge)

- Le noyau est ovale, central et volumineux.
- Le cytoplasme contient de fins granules avec des vacuoles et de nombreux organites témoignant de sa grande activité cellulaire, les mitochondries qui ont un rôle respiratoire, le réticulum endoplasmique rugueux et lisse qui ont une activité de synthèse, les glycosaminoglycanes.
- La membrane cytoplasmique comprend :
 - Une face basale (en rapport avec la membrane de Descemet) irrégulière, sinueuse pour augmenter la surface d'échange avec les cellules voisines. Elle est le siège de nombreuses vésicules de pinocytose.
 - Une face apicale(en rapport avec l'humeur aqueuse) régulière et présente des microvillosités au nombre de 20-300 qui augmentent la surface de contact, des prolongements margino-apicaux intriqués les microvillosités pour oblitérer les espaces intercellulaires, des jonctions intercellulaires apicales qui constituent une barrière permettant le passage de petites molécules de l'humeur aqueuse vers les l'espace intercellulaire, et des structures ciliées peu nombreux dont l'extrémité baigne dans l'humeur aqueuse.
 - Une face latérale (en rapport avec les cellules de voisinage) qui assure la jonction intercellulaire par les zonulae ocludens (tightjunctions) et par les maculae ocludens (gap junctions).

Sous le stress l'endothélium cornéen subit :

- ∅ une perte de sa structure hexagonale= pléomorphisme
- ∅ une augmentation de la taille de la cellule= polymégathisme

L'endothélium a un rôle de régulation et d'hydratation cornéenne pour maintenir les 78% d'eau dans le stroma grâce à la pompe Na^+/K^+ ATPase.

II- PHYSIOLOGIE

A- Pouvoir optique

- La cornée procure plus des 2/3 du pouvoir réfractif de l'œil, elle transmet 85% de la lumière incidente, une partie est perdue par phénomène de diffusion et une autre partie est réfléchi permettant l'étude en microscopie spéculaire.
- La puissance de réfraction est égale à la somme de la réfraction des différentes couches qui constituent les interfaces air/larme, larme/tissu cornéen, tissu cornéen/HA soit environ 43D. La cornée est d'autant plus puissante qu'elle est courbe

B- Transparence

- La transparence de la cornée dépend de l'agencement des fibres collagène dans le stroma, constance du diamètre moyen de chaque fibre et de la distance entre chaque fibre qui font que le rayon lumineux n'est pas totalement réfléchi.
- L'hydratation du stroma dépend de la pompe endothéliale, la barrière épithéliale, la pression intraoculaire et de la pression stromale de gonflement.

La pompe endothéliale implique un mécanisme actif qui dépend de la pompe $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ située dans la membrane plasmique latérale de l'endothélium, elle permet les mouvements ioniques du stroma vers l'humeur aqueuse créant ainsi un gradient osmotique qui aboutit à expulser le Na^+ dans l'humeur aqueuse et libérer le K^+ dans la cellule endothéliale.

- Et de l'absence de vaisseaux et d'une faible densité cellulaire.

III- INNERVATION

- La cornée est l'un des tissus les plus innervés et les plus sensibles
- Le stroma post, la membrane de Descemet et l'endothélium sont dénués de toute innervation sensitive.

Notre étude se limitera à la couche endothéliale de la cornée

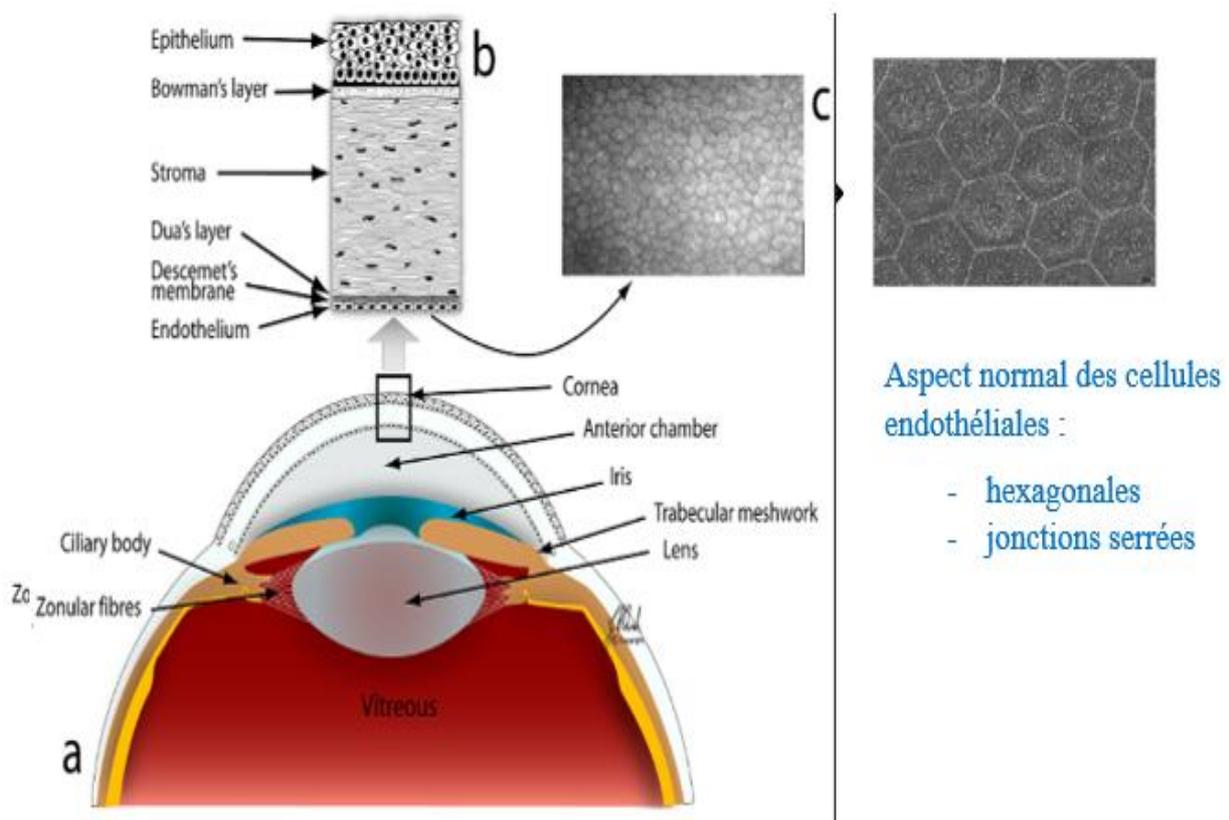


Figure1 : différentes couches de la cornée avec aspect normal de cellules endothéliales

NOTRE ETUDE

MATERIELS

ET METHODES

I-MATERIELS

Nous avons mené une étude prospective sur une période de 5 mois (Octobre 2016 – Février 2017) réalisée au service d'ophtalmologie du CHU Hassan II de Fès et porte sur des patients volontaires ayant une cornée saine (non suivis pour une pathologie cornéenne).

Notre objectif est d'analyser les résultats de la microscopie spéculaire obtenus dans notre échantillon de patients sains et de comparer aux données de la littérature.

Nous avons réalisé une fiche d'exploitation où sont recueillies en détail les données suivantes :

- L'âge
- Le sexe
- La profession
- Les résultats de la microscopie spéculaire

1- Unité de microscopie spéculaire du service



Image1-2 : TOPCONSP-3000P

Le microscope spéculaire SP-3000P de TOPCON répond à tous les besoins de l'analyse des cellules endothéliales et de la pachymétrie avec des fonctions fiables et faciles d'utilisation et un large éventail d'options.

Le système de mesure sans contact rend son fonctionnement sûr et simple avec un besoin minimal d'expérience et de connaissances techniques.



Image 3 : position de réalisation de la microscopie spéculaire

2- Réalisation de la Microscopie Spéculaire

a) Enregistrement des données du malade sur ordinateur

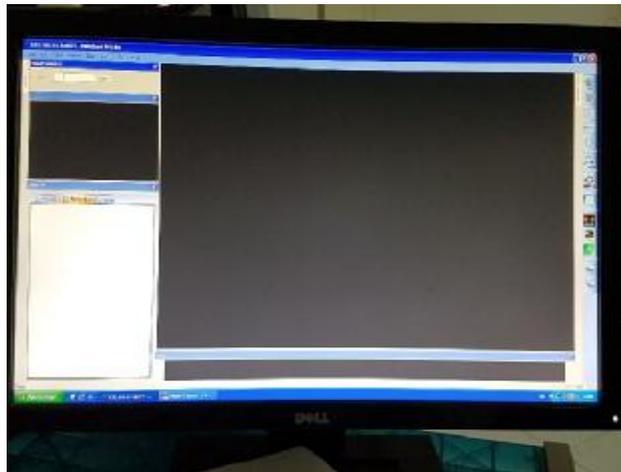


Image 4 : logiciel du microscope spéculaire

b) Alimentation du microscope spéculaire

La mentonnière motorisée car l'examen se fait assis comme à la lampe à fente, améliore le confort des patients, réduit le stress et améliore la posture.

Trois modes de capture d'images : automatique, semi-automatique et manuel.



Image 5 : démarrage du microscope spéculaire

c) Alignement 3D automatique et cibles de fixation

L'écran couleur affiche des images vives de la cornée permettant une évaluation visuelle immédiate de l'état de l'œil du patient.

Les cibles de fixations permettent des analyses centrale, nasale, temporale, supérieure et inférieure ainsi que la mesure de la cornée du patient.

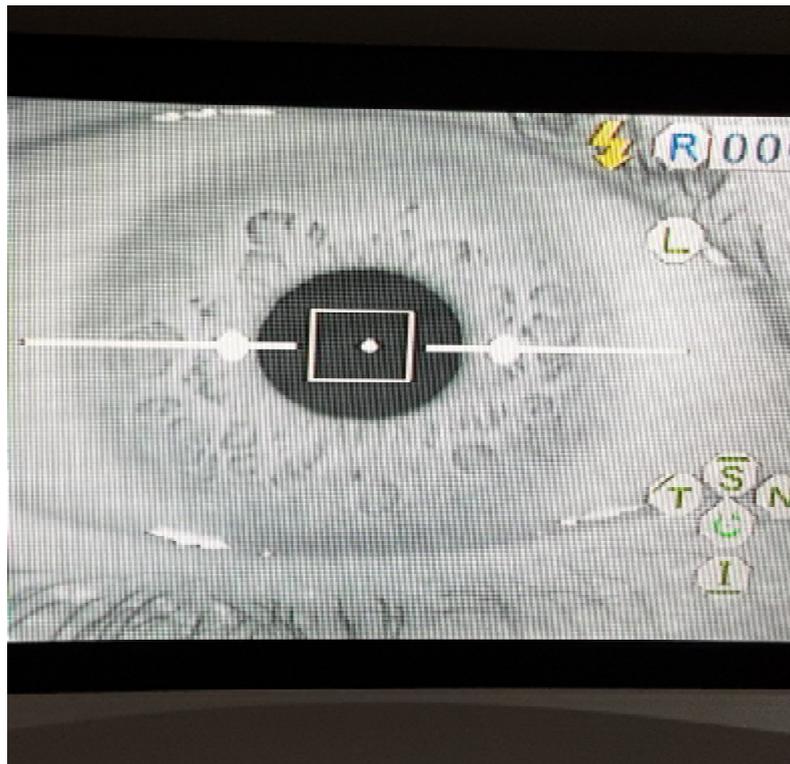


Image 6 : écran couleur avec les sites de fixation

d) Analyse des cellules endothéliales par le logiciel

Le logiciel fournit une analyse très précise de la couche des cellules endothéliales. Il peut être installé sur n'importe quel ordinateur fonctionnant sous Windows 2000 ou XP.

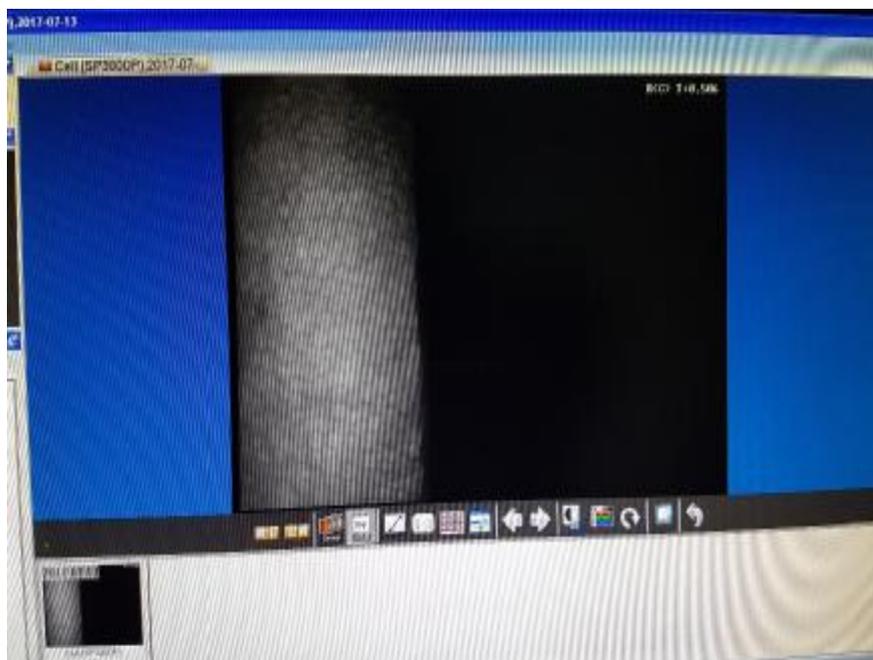


Image 7 : premier affichage de l'endothélium cornéen avec l'épaisseur cornéenne

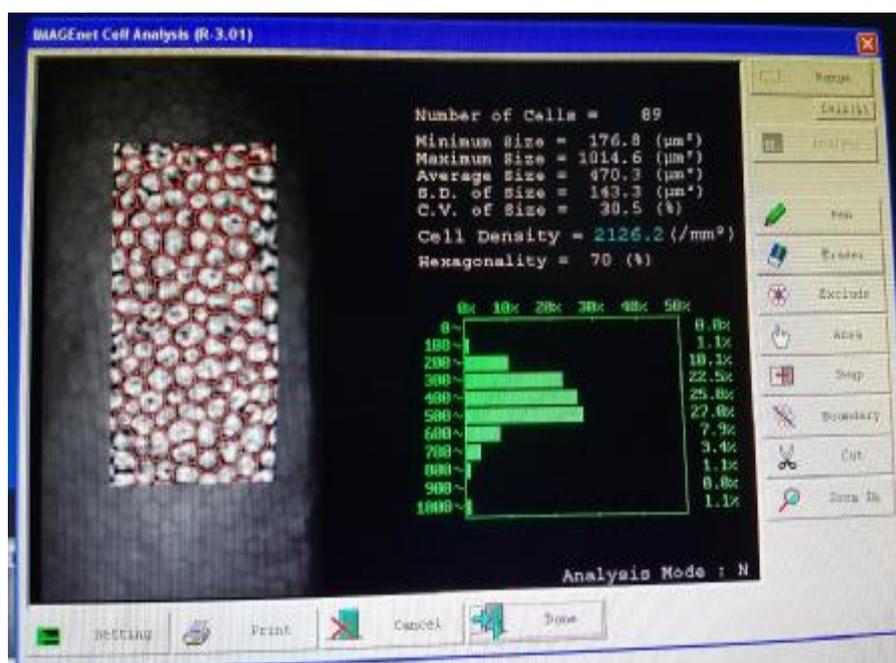


Image 8 : affichage après analyse de l'endothélium cornéen

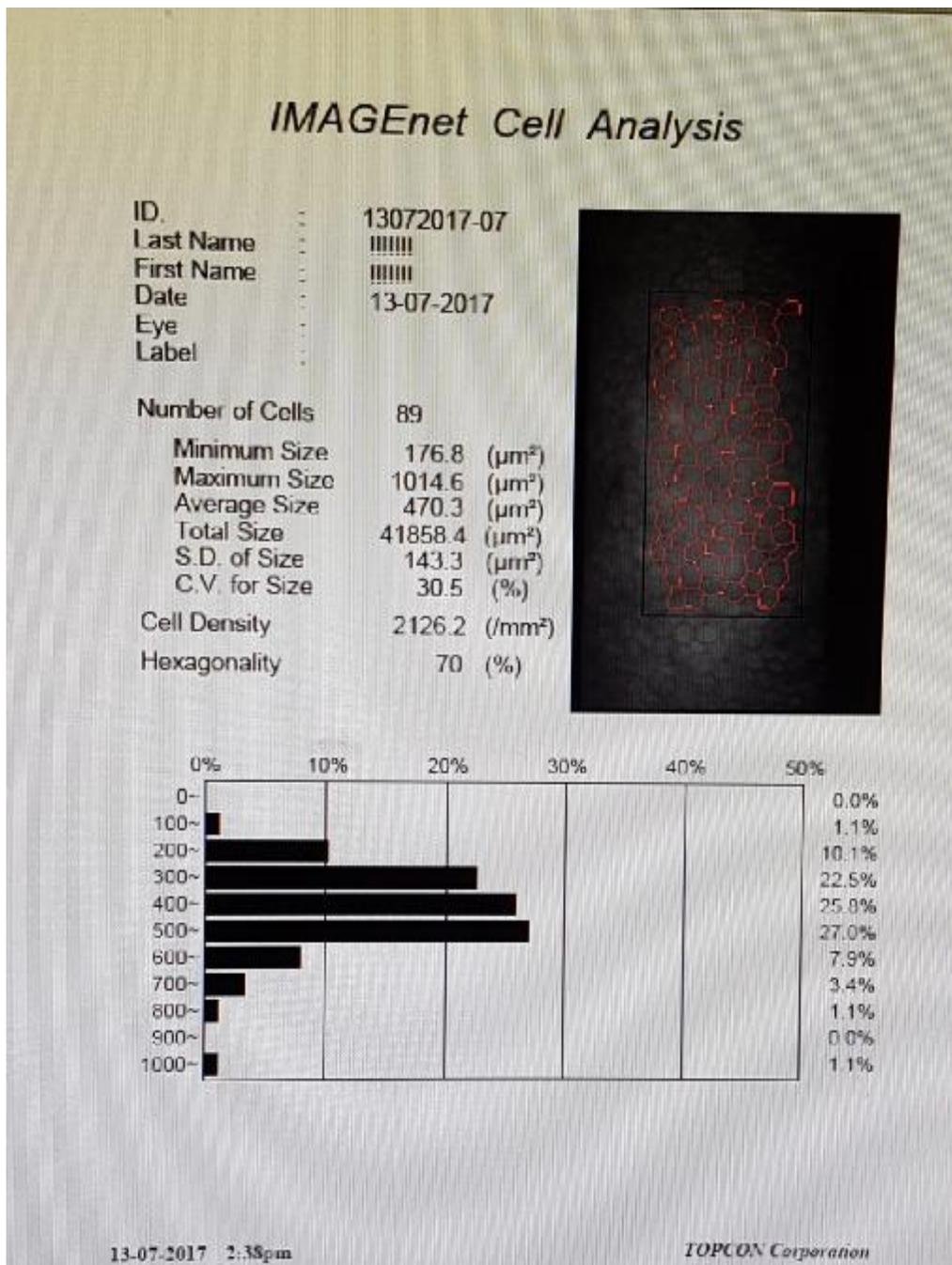


Image 9 : affichage après conversion en fichier pdf

e) Analyse direct des cellules endothéliales sur le microscope spéculaire

Il y'a une possibilité d'analyser directement les cellules endothéliales sur le microscope sans passer par le logiciel installé sur ordinateur



Image 10 : affichage des cellules endothéliales

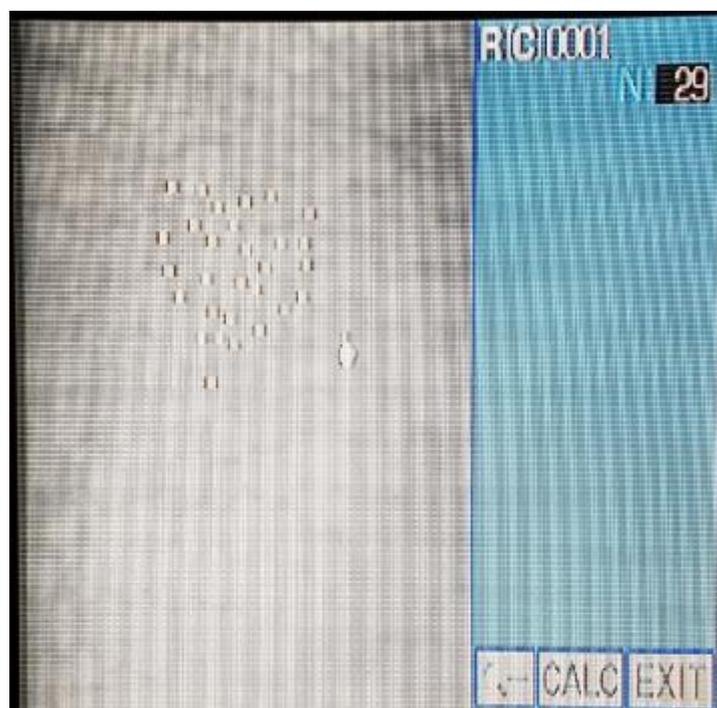


Image 11 : sélection manuelle des cellules à analyser

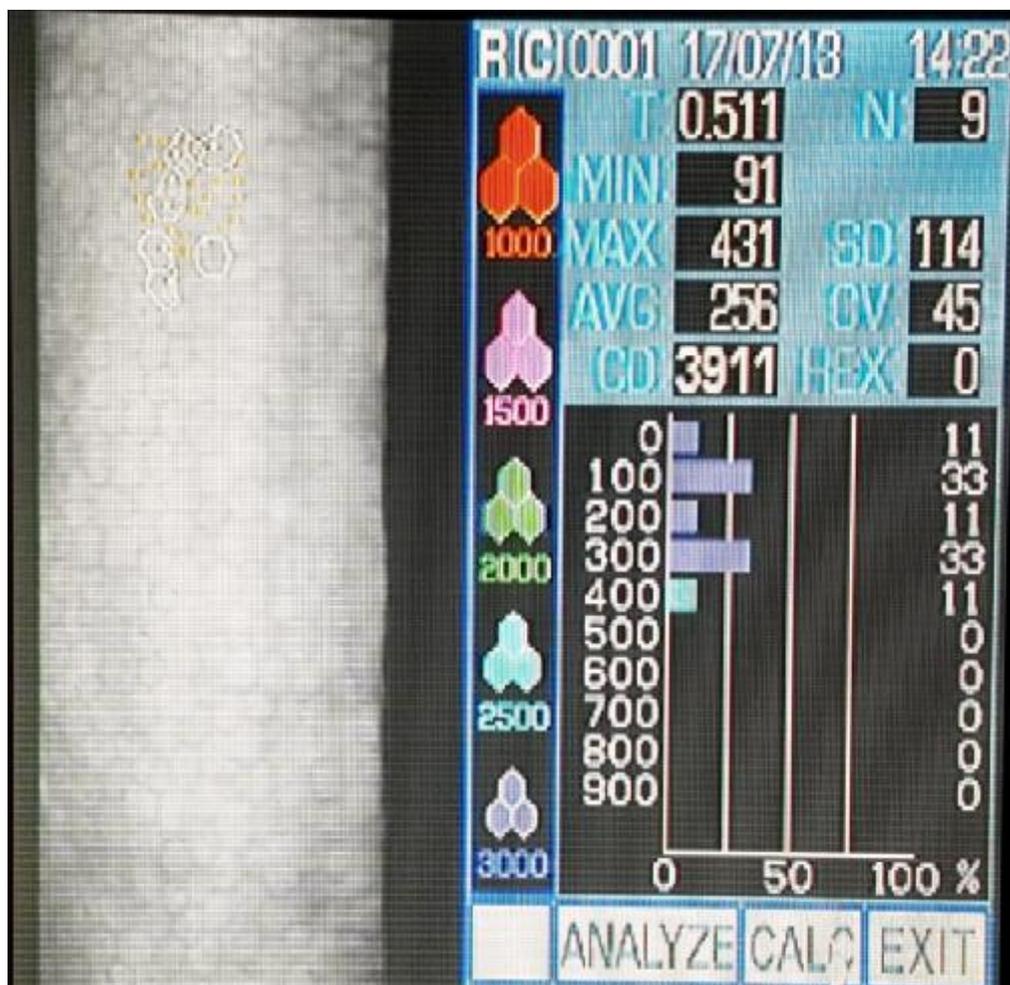


Image12 : analyse finale des cellules endothéliales

II- METHODES

Le recueil des données a été effectué sur Excel, qui comprenait 2 groupes d'items. La fiche Excel a été remplie par le médecin réalisateur de la microscopie spéculaire.

Ces items avaient traits aux caractéristiques démographiques et aux résultats de la microscopie spéculaire.

Les données ont été saisies sur Excel et analysées à l'aide du logiciel SPSS version 17.0. Une analyse descriptive des caractéristiques sociodémographiques et cliniques des patients a été effectuée. Les résultats ont été présentés sous forme de pourcentage, en cellule/mm², en μ et en μm^2 .

RESULTATS

Notre étude est portée sur un échantillon de 120 patients de cornée saine dont 240 yeux au total.

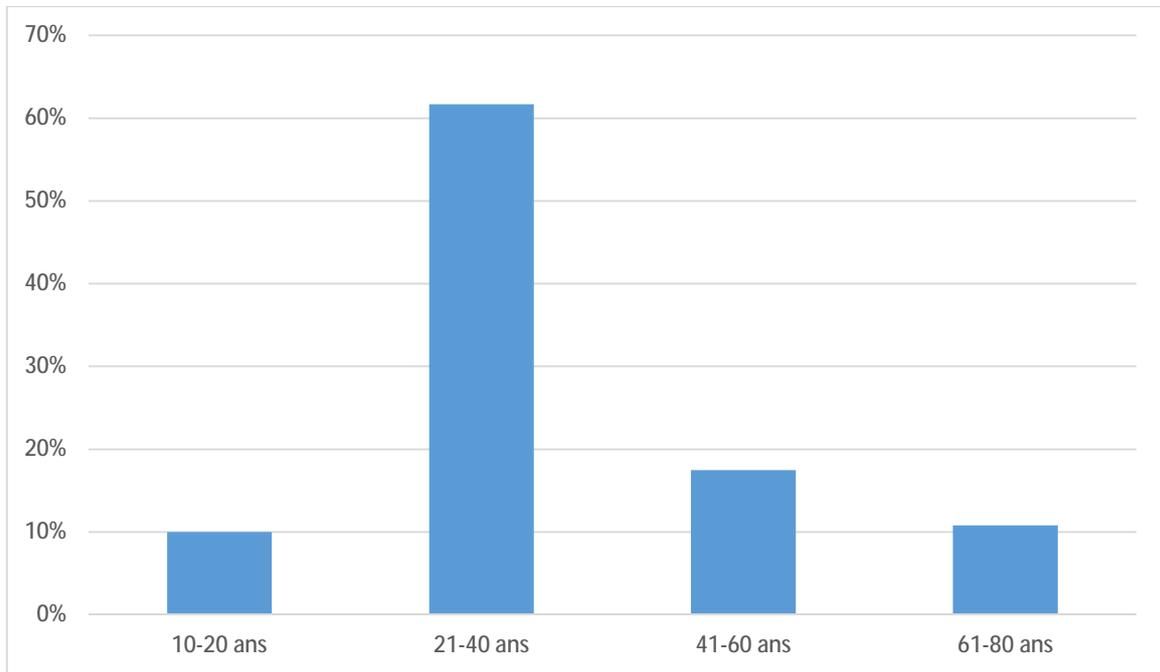


Diagramme 1 : Répartition par tranche d'âge

La tranche d'âge de 21-40 ans est la plus représentative avec 61.7%

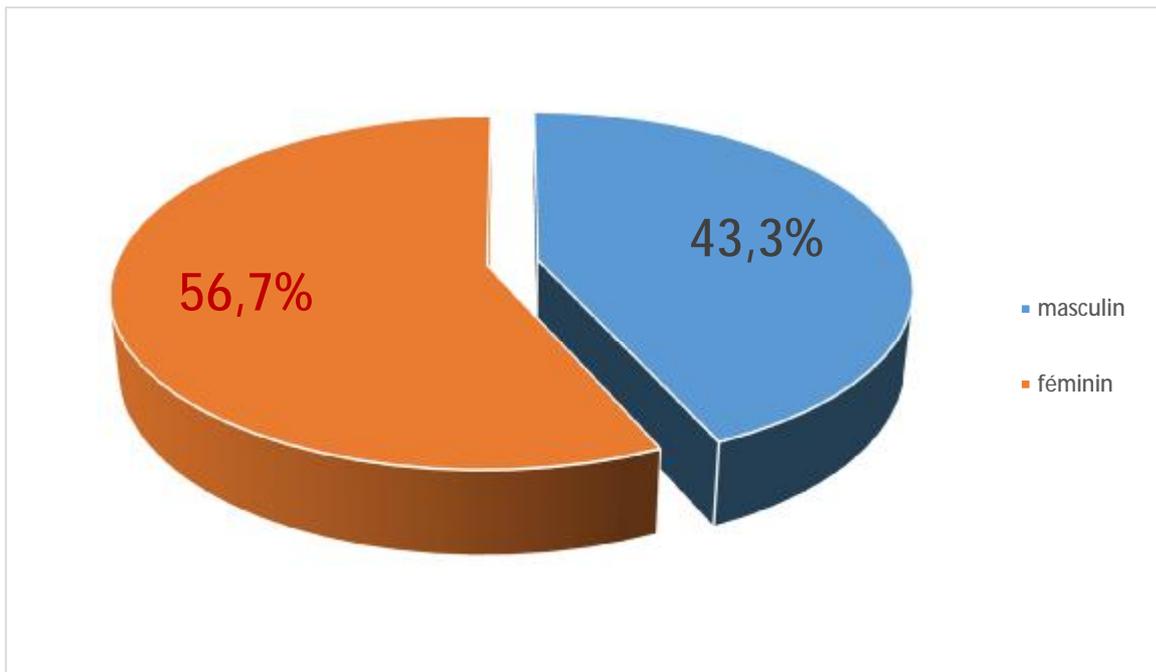
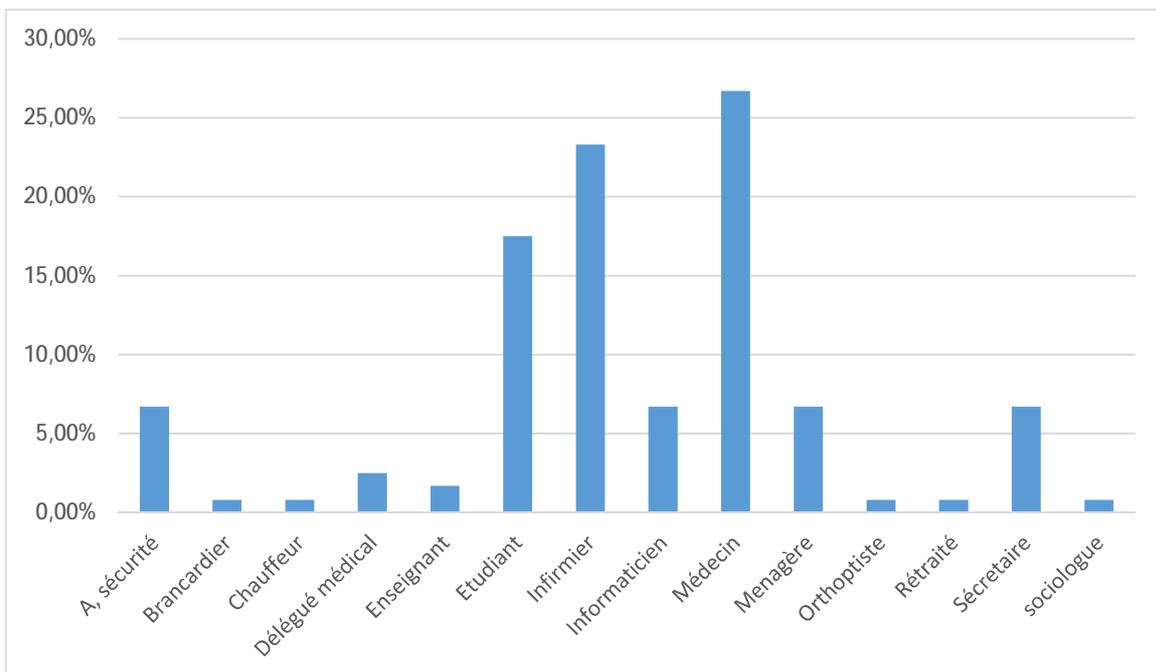


Diagramme 2 : REPARTION SELON LE SEXE

Le sexe féminin est aussi représenté que le sexe masculin

Diagramme 3 : REPARTION SELON LA PROFESSION



Le personnel médical est le plus représenté avec 26.7% de médecins et 23.3% d'infirmiers

Tableau 1 : Répartition selon l'épaisseur cornéenne

Pachymétrie μ	Minimum	Moyenne	Maximum
OD	419	503	600
OG	418	504	598

Moyenne 503 OD et 504 pour OG

Tableau 2 : Répartition selon la Densité cellulaire

Densité cellulaire cellule/mm ²	Nombre total	minimum	maximum	moyenne	écart-type
OD	120	1740	3447	2555	330.1
OG	120	1797	3404	2571	341.4

Moyenne 2555 OD et 2571 OG

$P=0.27$

Pas de différence significative entre les deux yeux

Tableau 3 : Répartition de la densité cellulaire par tranche d'âge

Tranche d'âge en année	densité cellulaire OD			densité cellulaire OG		
	minimum	moyenne	maximum	minimum	moyenne	maximum
10 - 20	2358	2699	3447	1985	2644	3404
21-40	1740	2631	2631	1797	2650	3363
41-60	1860	2359	2942	1861	2416	2873
61-80	1909	2313	2745	1849	2287	2901

$P=0.27$

Tableau 4 : Répartition selon l'hexagonalité

Hexagonalité	Nombre total	minimum%	maximum%	moyenne%	écart-type
OD	120	21	76	54.07	9.263
OG	120	25	88	54.24	9.999

Moyenne 54.07 OD et 54.24 OG

$P=0.87$

Pas de différence significative entre les deux yeux.

Tableau 5 : Répartition du % d'hexagonalité par tranche d'âge

Tranche d'âge en année	% d'hexagonalité OD			% hexagonalité OG		
	minimum	moyenne	maximum	minimum	moyenne	maximum
10 - 20	44	50.8	70	38	52.2	66
21-40	31	55	76	25	55	88
41-60	39	52	76	31	51.9	72
61-80	45	55.2	64	41	55.8	73

$P= 0.87$

Tableau 6 : Répartition selon la taille du Coefficient de Variation (C.V) de la taille des cellules

Taille du C.V. %	Nombre total	minimum	maximum	moyenne	écart-type
OD	120	22.300	49.000	35.562	4.972
OG	120	24.200	52.100	35.768	5.012

Moyenne 35.562 OD et 35.768 OG

$P= 0.66$

Après l'étude des principaux paramètres ci-dessus de la microscopie spéculaire nous avons analysé aussi les autres paramètres moins importants qui sont :

Tableau 7 : répartition selon nombre de cellules analysées

Nombre de cellule μm^2	minimum	moyenne	maximum	écart-type	Total
OD	25	100.24	142	21.700	120
OG	32	102.24	141	18.812	120

Avec une moyenne de 142 pour OD et 141 pour OG

$P= 0.50$

Pas de différence significative entre les deux yeux

Tableau 8 : Répartition selon le nombre minimum de cellules analysées

Nombre minimum μm^2	Nombre total	minimum	maximum	moyenne	écart-type
OD	120	29.50	496.000	122.342	59.027
OG	120	30.90	257.000	123.282	47.894

Moyenne 122.342 OD et 123.282 OG

$P= 088$

Pas de différence significative

Tableau 9 : Répartition selon le nombre maximum de cellules analysées

Nombre maximum μm^2	Nombre total	minimum	maximum	moyenne	écart-type
OD	120	846.200	1247.200	874.348	152.962
OG	120	104.700	1622.300	884.000	218.410

Moyenne 874.200 OD et 884.000 OG

$P= 0.001$

Il existe une différence significative entre les deux yeux

Tableau 10 : Répartition selon la taille moyenne analysée

Taille moyenne μm^2	Nombre total	minimum	maximum	moyenne	écart-type
OD	120	33.600	574.800	395.274	61.797
OG	120	4.900	556.300	393.022	65.564

Moyenne **395.274 OD** et **393.022 OG**

$P= 0.07$

Pas de différence significative entre les deux yeux

Tableau 11 : Répartition selon la taille totale analysée

Taille totale μm^2	Nombre total	minimum	maximum	moyenne	écart-type
OD	120	9287.300	44935.900	38981.702	6763.578
OG	120	12121.800	45637.300	39567.653	4659.632

Moyenne **38981.702 OD** et **39567.653 OG**

$P= 0.04$

Différence significative entre les deux yeux

Tableau 12 : Répartition selon la déviation de la taille standard des cellules (S.D)

Taille de S.D μm^2	Nombre total	minimum	maximum	moyenne	écart-type
OD	120	78.700	210.700	141.832	27.550
OG	120	87.800	235.100	140.778	28.031

Moyenne **141.832 OD** et **140.778 OG**

$P= 0.63$

Pas de différence significative entre les deux yeux

Pas de différence significative entre les deux yeux

DISCUSSION

I- TECHNIQUES ET PRINCIPE D'EXAMEN DE LA MICROSCOPIE

SPECULAIRE

Elles sont au nombre de deux selon qu'il y a ou non, contact avec la cornée (5).

La biomicroscopie à la Lampe à Fente reste la technique sans contact cornéen la plus facile à mettre en œuvre : on observe l'endothélium au fort grossissement (25 ou 40 X) en éclairant fortement l'épithélium au moyen d'une lumière incidente arrivant obliquement sur la cornée selon un angle d'environ 50°. On recherche alors l'image de l'endothélium au voisinage de cette zone d'éblouissement à droite ou à gauche selon la position de la source lumineuse.

Cette technique qui ne demande qu'un peu d'entraînement, nécessite une cornée claire condition commune à toutes les techniques mais aussi une bonne immobilisation de l'œil du patient pour que l'image soit stable. Elle n'autorise pas une analyse précise de la mosaïque endothéliale ni la mesure de la densité cellulaire mais elle peut permettre de reconnaître l'existence d'une dystrophie cornéenne ou d'une importante déperdition cellulaire.

La microscopie spéculaire endothéliale sans contact cornéen peut également se pratiquer à l'aide de microscopes. Ces microscopes ont été les premiers commercialisés puis rapidement délaissés au profit des microscopes en mode contact à grand champ. Ils sont ensuite réapparus sur le marché en raison de leur moindre prix et une amélioration technique leur conférant une plus grande facilité d'utilisation. Leur champ d'investigation reste toutefois limité car ils ne permettent qu'un examen en champ étroit et d'une surface limitée de la cornée (un site central et quelques sites périphériques le plus souvent).

La microscopie spéculaire endothéliale avec contact cornéen peut se faire soit à l'aide d'un verre de contact (type Eisner ou Tomey) ou au moyen d'un microscope spéculaire. Dans les deux cas il est possible d'observer une image en grand champ ce qui confère à ces techniques un intérêt particulier.

Cette image est obtenue soit par balayage optique à l'aide d'un miroir oscillant permettant de juxtaposer des bandes d'endothélium ou bien par réduction des indices de réfraction des matériaux constituant le cône optique afin de limiter les reflets et les réflexions parasites issus des différentes interfaces traversées par la lumière incidente au travers de la cornée.

L'utilisation de ces techniques peut permettre l'observation de surfaces endothéliales approchant le millimètre carré. Elles permettent en outre d'explorer une vaste surface endothéliale et pour certains microscopes d'aller jusqu'à la périphérie cornéenne en dépassant même le « corneal ring » postérieur (zone circulaire de plis secondaires à l'indentation cornéenne par le cône). Elles sont enfin d'utilisation aisée bien que plus « agressives » pour la cornée et ne nécessitent que l'utilisation préalable d'un collyre anesthésiant et d'une bonne homogénéisation du film lacrymal en cours de l'examen (difficulté surtout chez les porteurs de lentilles).

L'image endothéliale observée au moyen d'un oculaire ou sur un écran vidéo peut être soit photographiée soit mise en mémoire pour permettre ultérieurement une analyse qualitative et quantitative.

Certains de ces microscopes possèdent en outre un pachymètre incorporé ce qui permet avec une relative précision de localiser des anomalies cornéennes et d'apprécier leur retentissement.

II- Les machines de la microscopie spéculaire

Il existe plusieurs microscopes spéculaires avec un minimum de 13 sociétés différentes, dont Topcon est parmi les plus reconnues mondialement par les ophtalmologistes.

Les microscopes spéculaires existant sur le marché sont :



III- La pratique

En pratique, on s'efforce de faire la mise au zéro du pachymètre en visualisant les cellules épithéliales (cellules claires et cellules sombres) (figure 2) puis l'on progresse régulièrement vers l'endothélium en traversant le stroma cornéen dont on apprécie au passage la transparence et les altérations éventuelles



Figure 2 : cellules claires et sombres de l'épithélium cornéen

La mosaïque endothéliale devient ensuite nettement visible et l'on peut alors noter le chiffre de la pachymétrie qui, pour un endothélium normal peut parfois varier de 450 à 600 micron. La valeur de cette mesure reste toutefois imprécise car la netteté de la mise au point peut persister sur quelques centièmes de millimètres et qu'il est impossible de contrôler avec précision la fixation du patient.

La surface spécifique du réflexe spéculaire dépend de la courbure de la surface réfléchissante (figure 3).

Ainsi, la lumière réfléchi par une surface plane reproduisant la zone de la source lumineuse, la lumière réfléchi à partir d'un cylindre sera condensée 90 ° par rapport à l'axe du cylindre et de la lumière réfléchi par la surface d'une sphère sera condensée dans tous les axes. Par conséquent, le rayon de courbure de la surface réfléchissante dicte la zone du réflexe spéculaire.

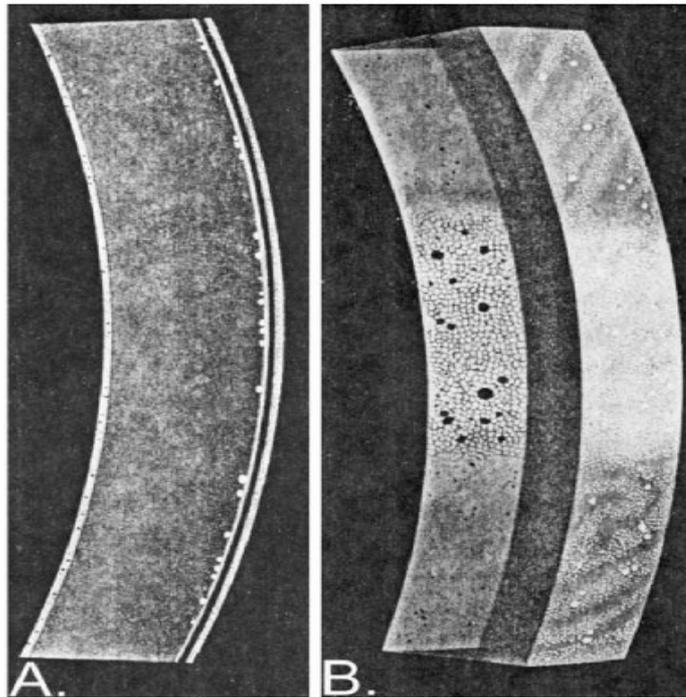


Figure 3 : réflexion lumineuse condensée 90° par rapport à l'axe du cylindre

La taille et la forme de l'image réfléchie de la source lumineuse est modifiée par la surface réfléchissante. Une surface plane reflète l'image non déformée. La surface incurvée réduira l'image au minimum.

Une autre restriction dans la zone de réflexion lumineuse est provoquée par la proximité des deux surfaces concentriques, à savoir l'épithélium et l'endothélium. La surface épithéliale est hautement réfléchissante en raison de la grande différence d'indice de réfraction entre l'air et l'épithélium cornéen. Lorsque le faisceau de lumière passe à travers la cornée, elle est réfléchie par l'interface épithéliale endothéliale. La surface spéculaire visible est un compromis entre la largeur du faisceau et de l'épaisseur de la cornée (Figure 4). En raison de cette restriction de la zone visible de l'endothélium est un rectangle et dont le rayon de courbure de la cornée domine la hauteur du rectangle.

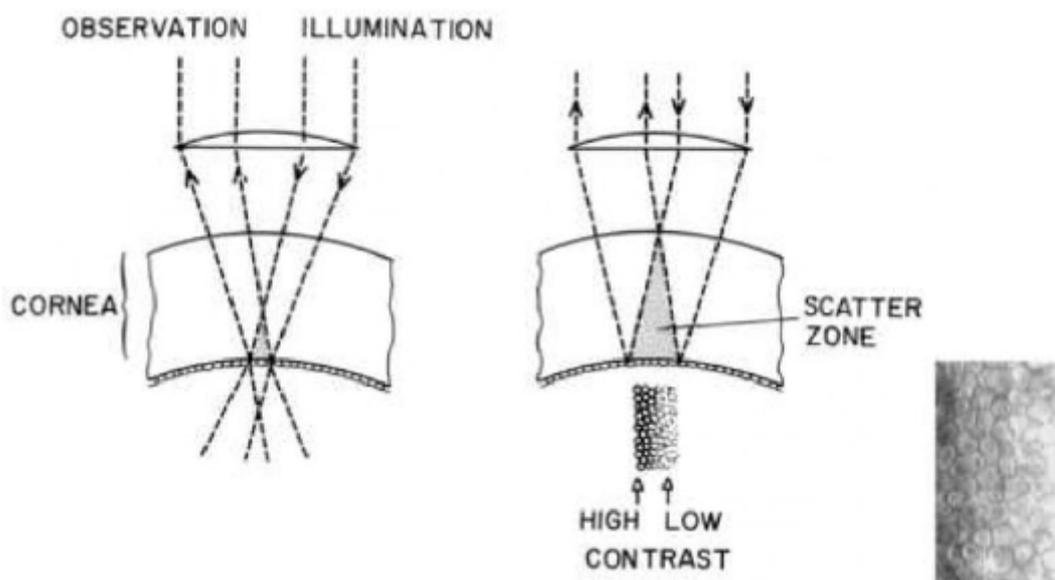


Figure 4 : endothélium issu d'un faisceau lumineux à travers l'épaisseur de la cornée
 La zone de la cellule endothéliale est un compromis entre la largeur du faisceau lumineux et l'épaisseur de la cornée (6)

Comme le faisceau de fente de lumière passe à travers le stroma cornéen la lumière sera diffusée par les lamelles de collagène et kératocytes et permettra de réduire le contraste de l'image des cellules endothéliales. La dispersion de la lumière est encore aggravée par l'augmentation de la largeur du faisceau de lumière. Par conséquent, le côté gauche de l'image endothéliale a un plus grand contraste parce que l'observateur voit la surface à travers un minimum de dispersion de la lumière du stroma.

Le microscope spéculaire de laboratoire spéculaire de Maurice a été modifié par plusieurs sociétés commerciales.

Tous les instruments actuellement disponibles utilisent l'ordinateur d'interface pour la capture d'image endothéliales et l'analyse de la morphologie des cellules. Ces instruments sans contact utilisent la technologie de mise au point automatique de l'image.

Lorsque l'endothélium cornéen est endommagé la cicatrisation est un processus d'agrandissement cellulaire et d'étalement pour créer une couche contiguë de cellules sur la surface intérieure de la cornée. Le degré de perte de cellules endothéliales liée à une pathologie, un traumatisme, une toxicité chimique, etc., peut se traduire sur la microscopie spéculaire comme une augmentation individuelle de la surface cellulaire et une diminution de la densité des cellules endothéliales de la cornée.

La cicatrisation des plaies de la cornée se traduit également par une augmentation de la variation des zones de cellules individuelles, à savoir polymégathisme ou coefficient de variation (CV).

Les cellules à six faces (hexagonales) sont l'indication d'une répartition uniforme de la tension superficielle, de la membrane et des cellules normales. Le polygone qui a la plus grande surface par rapport à son périmètre est l'hexagone. Ainsi, la forme de la cellule la plus efficace pour couvrir une zone donnée est l'hexagone ; c'est-à-dire une cornée parfaite devrait avoir 100% hexagones (7).

La cornée normale doit s'attendre à 60% de cellule endothéliale comme hexagones. Le stress des cellules endothéliales se traduira par une diminution de la distribution normale de 60% de cellules hexagonale (8). L'analyse morphologique des cellules endothéliales comprend : zone cellulaire \pm S.D. (μm^2), la densité cellulaire (cellules / mm^2), polymégathisme (coefficient de variation CV) et un pléomorphisme (% de cellules hexagonales). La densité cellulaire est déterminée à partir de la zone de cellule moyenne (équation 1)

Equation 1 : densité cellulaire

$$\text{cell density} = \frac{10^6}{\text{average cell area}}$$

Cell density = densité cellulaire (cellule par mm²)

Average cell area = zone de cellule moyenne (µm²)

10⁶ est utilisé pour convertir les unités de mesure.

La valeur de polymégathisme est un coefficient décrivant la variation de la surface cellulaire. Comme l'écart type de la surface moyenne des cellules augmente la précision des baisses estimées de la densité cellulaire. Par conséquent, l'augmentation de polymégathisme provoque une diminution de la précision de la surface moyenne de la cellule. Le polymégathisme est définie par le coefficient de variation (CV) (équation 2)

Equation 2 :

$$CV = \frac{SD_{\text{cell area}}}{\text{mean cell area, } \mu\text{m}^2}$$

CV = coefficient de variation et

SD = écart-type moyenne de la zone cellulaire.

Les porteurs de lentilles de contact à long terme et les patients diabétiques développent un polymégathisme des cellules endothéliales, tout en conservant une densité cellulaire normale pour leur âge (9, 10, 11, 13, 14).

Ainsi, le polymégathisme ne peut modifier le volume de la cellule mais l'apparence de la surface de la cellule d'interface avec l'humeur aqueuse dans la chambre antérieure. Il convient de noter que l'hexagonalité des cellules endothéliales est en rapport direct avec la surface cellulaire (12, 15).

L'endothélium cornéen a une surface d'environ 130 mm²(16). La densité cellulaire chez l'enfant de 3 à 6 ans est de 4000 à 3500 cellules par mm², soit il y a 390.000 à 520.000 cellules par cornée (17).

Cette valeur diminue au fur et à mesure que l'âge augmente (18-19) comme dans notre étude la moyenne de la densité cellulaire décroît sur les deux yeux de la tranche d'âge la plus faible au plus élevée.

Plusieurs études publiées de la race caucasienne (17-19) montrent que les adultes d'âge moyen « 30 ans » peuvent avoir une densité cellulaire comprise entre 2700 à 2900 cellules par mm² dans notre étude la tranche d'âge de 21 à 40 ans « moyenne 30 ans » nous avons 1769 à 2997 cellules par mm² avec une différence significativement inférieure par rapport à la littérature caucasienne en ce qui concerne le nombre minimum de cellules/mm² et une valeur supérieure pour le maximum de cette tranche d'âge.

L'adulte à partir de 70 ans peut avoir une densité cellulaire endothéliale entre 2400 à 2600 cellules/mm² dans notre étude nous avons 1871 à 2823 cellules/mm², même constat que pour la tranche d'âge de 21-40 ans par rapport à notre étude.

La race asiatique a une densité cellulaire plus élevée par groupe d'âge par rapport à celle de la race caucasienne (20-21) avec 3835 cellules/mm² pour le maximum, notre étude a trouvé une valeur inférieure de 3447 cellules/mm².

Tableau 13 : comparaison de la densité cellulaire par tranche d'âge avec une étude américaine (34)

Tranche d'âge (année)	Densité cellulaire (cellule/mm ²)	
	A.J.Bonnel et M.Cymbor	Notre étude
10-20	2 900 - 3 500	2 172 - 3 447
21-40	2 500 - 3 300	1 769 - 3 363
40-60	2 200 - 2 950	1 860 - 2 873
60-80	1 900 - 2 700	1 849 - 2 823

Dans notre série la moyenne de la densité cellulaire est de 2 555 cellules/mm² et atteint les 2 300 vers l'âge de 80 ans ce qui rejoint les données de la littérature.

La perte progressive de cellules endothéliales avec l'âge chez les sujets normaux est une grande préoccupation lors de la conception d'un essai clinique pour évaluer les effets d'un médicament ou intervention chirurgicale sur le tissu cornéen (24-25-26-27).

Selon Armitage et al (28), la perte de cellules est bimodale de 0 à 20 ans la perte cellulaire est plus rapide par an que les sujets de plus de 20 ans :

Armitage et al. Ont trouvé une perte de cellules de 0,22% par an entre 17 et 83 ans (n = 78).

Yee et al (23) 0,3% de perte de cellules par an entre 10 et 89 ans (n = 60). Moller-Pedersen (29) aussi 0.3% de perte chez les plus de 14 ans (n = 178). Bourne et al (30) ont fait deux séries de patients après une période de 10 ans. Les auteurs ont regroupé les patients qui étaient <18 ans (5 à 15 ans, n = 10) et les patients > 18 ans (n = 42). La première tranche d'âge des patients plus jeunes avait 1,1% ± 0,8% de perte de la densité des cellules endothéliales par an contre 0,6% ± 0,5% pour la deuxième tranche de patients plus âgés.

Edelhauser et collaborateurs (31, 32, 33) ont observé une relation intéressante entre l'emplacement des cellules endothéliales et la densité cellulaire. La densité cellulaire diminue dans la cornée humaine à partir de la périphérie vers le centre de 9%.

L'analyse informatisée de l'image endothéliale n'en permet l'évaluation précise qu'en fonction de la netteté de l'image examinée. Par contre elle permet de déterminer des paramètres morpho métriques qui rendent mieux compte de la fonction endothéliale que la simple mesure de la densité cellulaire. Il s'agit du périmètre cellulaire, des coefficients de variation de surface cellulaire (polymégathisme) et de forme (pléiomorphisme). La valeur de ces paramètres augmente normalement avec l'âge et de façon symétrique entre les deux yeux si bien qu'une nette disparité doit être considérée comme pathologique.

Il est à peu près unanimement admis (5) que le seuil de décompensation endothéliale se situe autour d'une densité de 500 cellules/mm² et qu'au-dessous de 1 000 cellules/mm² une action chirurgicale sur le segment antérieur peut conduire à un œdème cornéen chronique (surtout si elle est émaillée de complications car, du moins en ce qui concerne la chirurgie de la cataracte, les progrès réalisés ces dernières années ont permis de réduire très notablement la déperdition cellulaire endothéliale secondaire à l'acte chirurgical).

Le pléomorphisme est une perturbation significative du motif hexagonal régulier de l'endothélium qui provoque une diminution de la stabilité de la mosaïque endothéliale. Le pléomorphisme se produit secondairement à un stress physiologique de la maladie oculaire, le port de lentilles de contact ou des changements normaux du vieillissement.

Si un endothélium cornéen présente moins de 50% de cellules hexagonales, il est considéré comme cliniquement significatif à un pléomorphisme. En raison de son

effet sur la fonction de la barrière au fluide de l'endothélium, la présence d'un pléomorphisme augmente le risque de développer une endothéliopathie iatrogènes et un œdème de la cornée post -opératoire des patients.

Dans notre étude le taux moyen est de 54% d'hexagonalité ce qui rejoint ces données.

Un taux élevé ou anormal de polymégathisme est généralement le premier signe de la maladie endothéliale, il indique un stress physiologique à l'endothélium cornéen et un mécanisme de réparation des plaies de cornée hyperactives.

IV- Les indications de la microscopie spéculaire (5)

La microscopie spéculaire permet un examen objectif et quantifiable de l'endothélium cornéen et peut donc être utilisée dans un but diagnostique ou pronostique à l'égard d'affections endothéliales reconnues ou non.

Il peut s'agir d'une évaluation endothéliale :

- 1- post traumatique, qu'il s'agisse d'un traumatisme cornéen perforant ou d'une contusion cornéenne, surtout avec hyphéma ou encore d'un traumatisme endothélial d'origine chirurgicale ;
- 2- dans les suites d'un glaucome par fermeture de l'angle, où l'on sait que l'hypertonie aiguë est très fréquemment responsable d'une déperdition cellulaire ;
- 3- dans les suites d'une inflammation du segment antérieur, d'un iritis ou à fortiori d'une endothélite où l'on peut observer des précipités endothéliaux, du pigment, des cellules, de la fibrine, plus ou moins associés à un agrandissement cellulaire surtout après hypertonie ;

4- en cas d'œdème de cornéen, l'examen endothélial est souvent impossible ou ne peut véritablement se faire qu'en champ étroit car la lumière dispersée dans le stroma vient masquer l'image de l'endothélium. Dans certains cas cependant, lorsqu'il existe par exemple un œdème de cornéen unilatéral et qu'il n'y a pas d'antécédent chirurgical connu, la découverte de cellules endothéliales turgescentes et un peu agrandies peut faire évoquer un syndrome de Chandler (figure 5-6) surtout si l'on peut mettre en évidence une ligne de séparation entre cet endothélium pathologique et un endothélium sain.

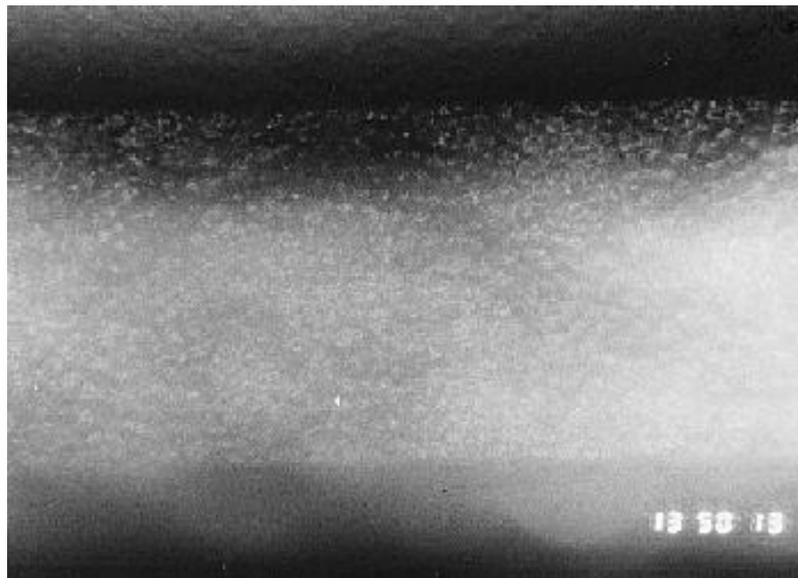


Figure 5 : Syndrome de Chandler. Les cellules endothéliales sont turgescentes, œdémateuses, mais peu agrandies. La densité cellulaire est supérieure à 2 000 cellules/mm².



Figure 6 : Syndrome de Chandler avec une nette ligne de séparation entre un endothélium pathologique avec des cellules très pléomorphes et agrandies et un endothélium sain où l'on devine des cellules de taille normale sur la partie gauche du cliché.

Dans ce cas il convient de rechercher systématiquement l'existence d'une éventuelle correctopie ainsi qu'une hypertonie oculaire ;

La découverte d'anomalies endothéliales au décours de l'examen clinique peut traduire l'existence d'une dystrophie cornéenne sans qu'elle ait obligatoirement de retentissement sur l'acuité visuelle.

Il peut s'agir d'une dystrophie postérieure polymorphe (figure 7) affection héréditaire autosomale dominante, essentiellement dans sa forme vésiculaire ou linéaire.



Figure 7 : Dystrophie postérieure polymorphe dans la forme vésiculaire. Noter l'aspect lacunaire des vésicules et leur contour dense ainsi que leur groupement ici en chapelet. Les cellules endothéliales avoisinantes sont agrandies et la densité cellulaire est voisine de 1 480 cell/mm².

Elle se caractérise par son aspect polymorphe comprenant des images lacunaires ressemblant à des gouttes, plus ou moins confluentes et régulières, regroupées en îlots parfois peu étendus et pouvant passer inaperçus (figure 8) lors d'un examen rapide au biomicroscope ; d'autres fois les anomalies sont regroupées en « bandes » plus ou moins linéaires et assez étendues pouvant traverser la cornée sur la moitié ou les deux tiers de son diamètre avec parfois des bifurcations

directionnelles. Ces anomalies sont uni ou bilatérales et s'accompagnent généralement dans les formes les plus étendues d'un agrandissement cellulaire se traduisant par une diminution de la densité cellulaire endothéliale fréquemment inférieure à 2 000 cellules/mm².

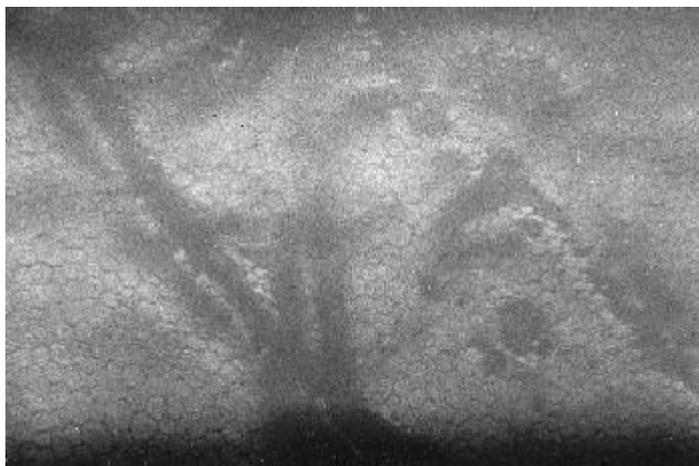


Figure 8 : Dystrophie postérieure polymorphe dans sa forme linéaire (band-like).

Aspect lacunaire plus hétérogène « encadré » par des limites grossièrement parallèles et associé également ici à un agrandissement cellulaire endothélial (1 334 cell/mm²).

La cornea guttata est la dystrophie cornéenne endothéliale qui suscite le plus de demandes d'examen en microscopie spéculaire (figure 9-10-11). Ceci en raison de sa fréquence et de son évolutivité (responsable à long terme d'un retentissement sur l'acuité visuelle) et surtout du risque de décompensation en cas d'intervention chirurgicale sur le segment antérieur.

Elle prédomine généralement au centre de la cornée où les gouttes sont plus nombreuses et ont tendance à devenir confluentes. Il devient alors impossible d'y examiner les cellules endothéliales et l'on peut parfois visualiser l'épaississement caractéristique de la membrane de Descemet.

L'observation des cellules doit alors se faire en périphérie parfois à la limite ou au-delà de l'anneau cornéen « corneal ring » postérieur. Les plages cellulaires sont

souvent d'étendue réduite et l'on doit les rechercher attentivement car l'aspect des cellules est un bon indicateur de l'évolution de la dystrophie. L'augmentation du pléiomorphisme et du polymégathisme est souvent associé à une augmentation de la taille des cellules traduisant la fragilisation de la couche cellulaire endothéliale dans son rôle de maintien de la transparence cornéenne.

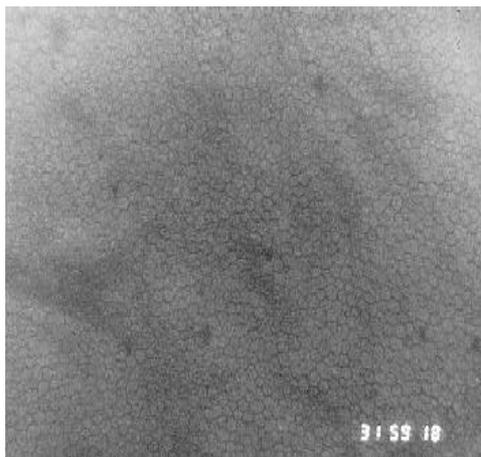


Fig9

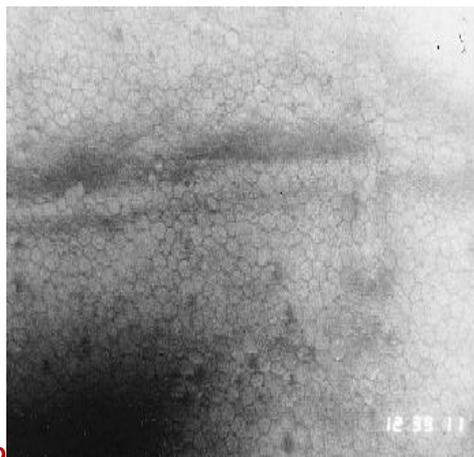


Fig10

Figure 9-10 : Deux images de cornea guttata discrète et cliniquement inapparente.

On note la différence d'aspect de l'endothélium avec des densités cellulaires respectives de 2 600 et 1 300 cell/mm² environ.



Figure 11 : Zone centrale de « confluence » des gouttes. Les cellules endothéliales ont disparu et l'aspect que l'on observe ici est celui de la membrane de Descemet épaissie.

La mesure de la pachymétrie, tant au centre qu'à la périphérie cornéenne, à chaque fois qu'elle est possible car apporte un élément supplémentaire à l'évaluation fonctionnelle de la cornée.

La microscopie spéculaire est encore indiquée dans l'évaluation endothéliale des kératoplasties transfixiantes (figure 12) On y observe le plus souvent un agrandissement cellulaire associé à une accentuation du pléiomorphisme mais le polymégathisme reste souvent plus modéré.

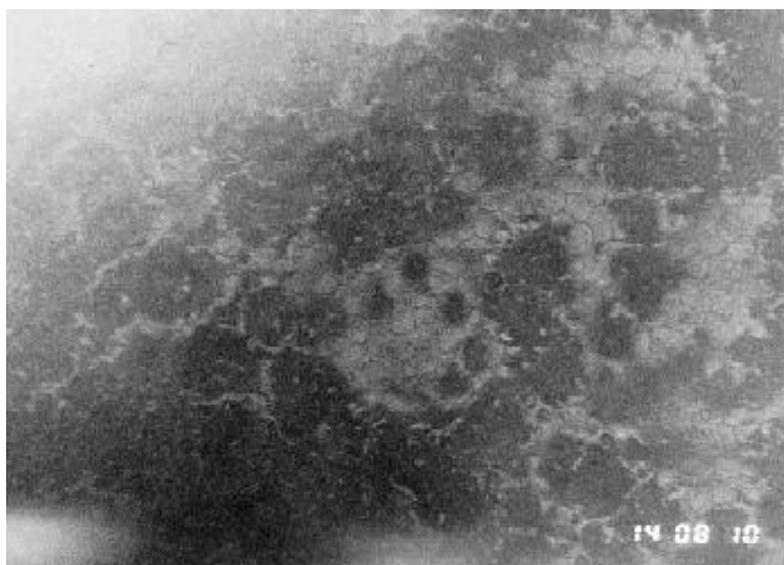


Figure 12 : Plages cellulaires périphériques d'une cornée guttata évoluée. On remarque l'agrandissement cellulaire endothélial ainsi que l'accentuation du pléiomorphisme et du polymégathisme. La densité cellulaire est voisine de 1 200 cell/mm².

En cas d'aphakie, l'indication sera posée selon les données cliniques et à chaque fois qu'il existe un œdème cornéen, parfois périphérique, associé à un iridodonsis et qu'à fortiori la cornée reste claire en regard d'une iridectomie sectorielle ; l'endothélium cornéen peut être alors sensiblement normal au centre avec une bonne conservation de l'acuité visuelle alors qu'il existe une déperdition cellulaire périphérique responsable de l'œdème.

Elle permet également d'apprécier le retentissement endothélial d'un port prolongé de lentilles cornéennes (figure 13) et enfin, si celui-ci n'est plus toléré, de poser l'éventuelle indication d'une implantation secondaire.

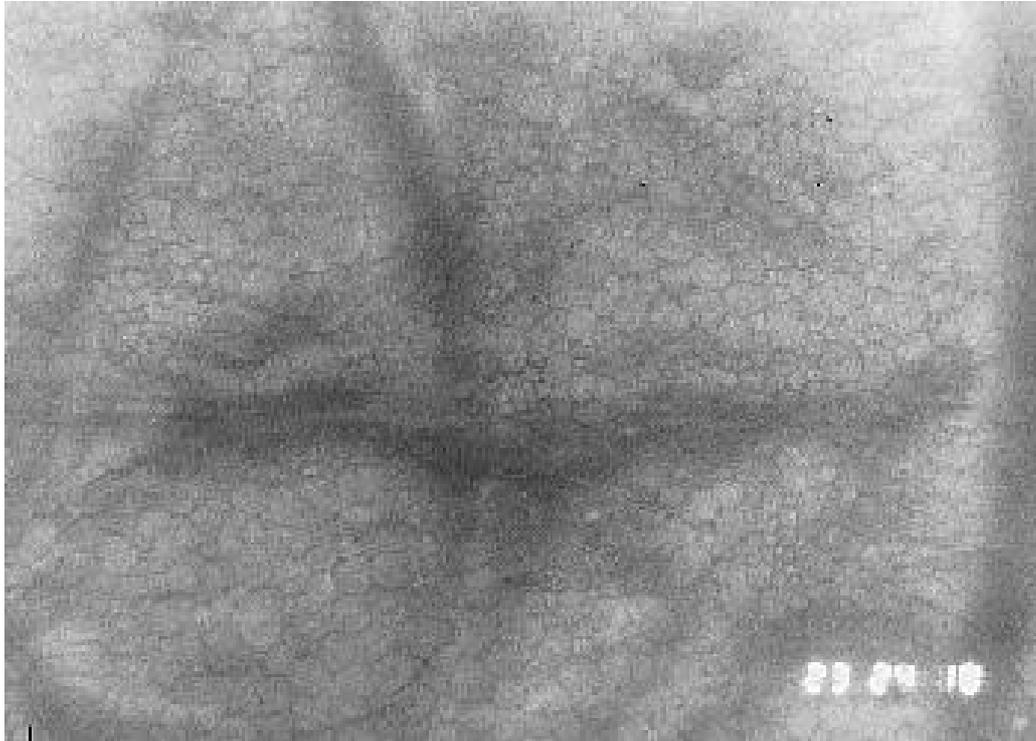


Figure 13 : Très important polymégathisme cellulaire chez un porteur de longue date de lentilles cornéennes. La densité cellulaire est de 1 770 cell/mm².

Cette surveillance endothéliale devra d'ailleurs être *systématique* chez les « porteurs » d'implants de chambre antérieure qu'ils soient pseudophakes ou phakes, ces implants pouvant être responsables d'une perte cellulaire endothéliale au cours des années, que l'on ait pu ou non mettre en évidence avec certitude une mobilité de l'implant ou un contact endothélial (figure 14).

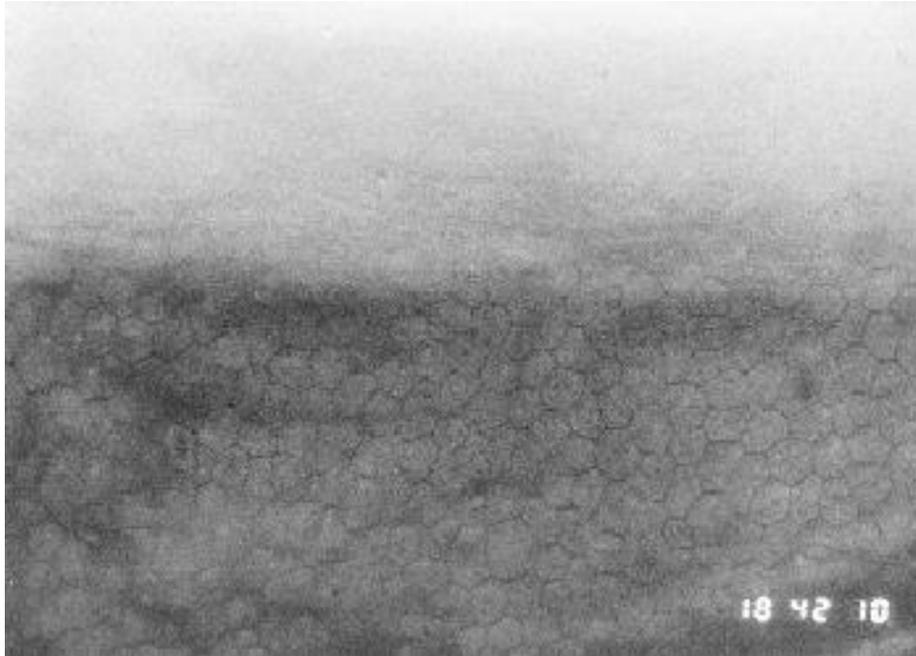


Figure 14 : Pseudophake implanté en chambre antérieure (la partie supérieure correspond au reflet de la lumière sur l'implant qui vient masquer la mosaïque endothéliale. La déperdition cellulaire (872 cell/mm²) est en rapport avec une trop grande mobilité de l'implant.

La microscopie spéculaire reste la seule technique utilisable en routine pour évaluer le retentissement endothélial de nouveaux implants ou celui de lentilles cornéennes (augmentation du pléiomorphisme et du polymégathisme cellulaire endothélial chez les porteurs au long cours de lentilles en PMMA par exemple (figure 15).

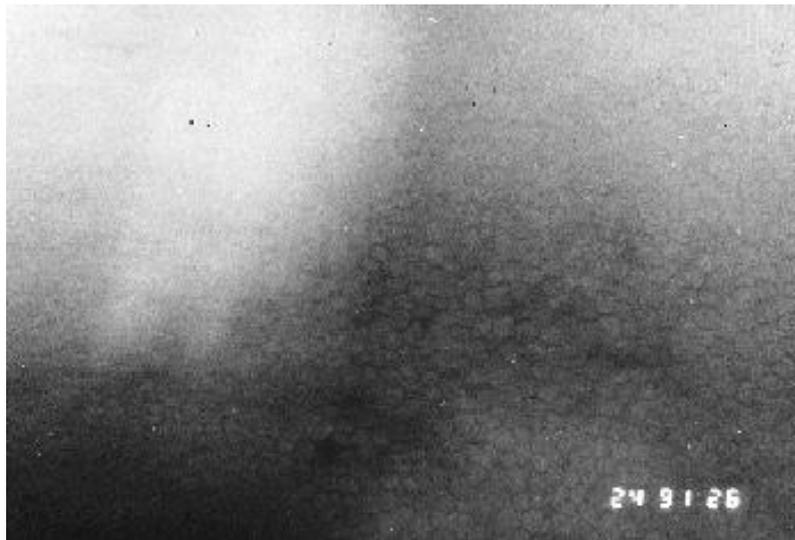


Figure 15 : Implant « Myopic ». Agrandissement cellulaire endothélial en regard du bord de l'optique dont on perçoit le reflet. La densité cellulaire est localement de 1 390 cell/mm².

L'indication de la microscopie spéculaire avant chirurgie du segment antérieur et particulièrement de la cataracte n'est pas systématique. On retiendra comme indications l'existence reconnue d'une dystrophie endothéliale surtout s'il existe des antécédents de décompensation de l'œil adelphe, des antécédents traumatiques, inflammatoires, d'hypertonie (essentiellement aiguë), de chirurgie sur le segment antérieur ou sur le segment postérieur (huile de silicone après décollement de rétine, par exemple) (figure 16-17).

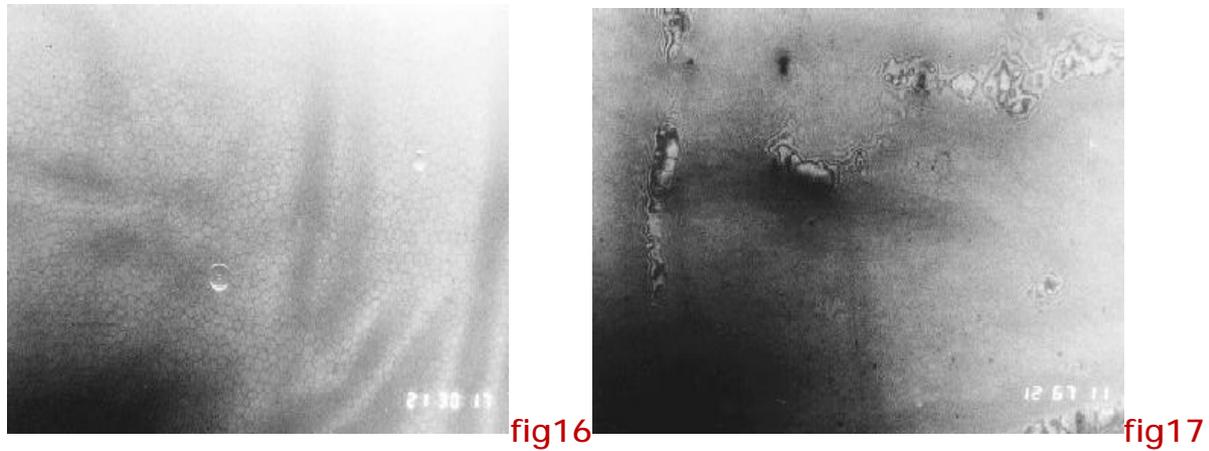


Figure 16-17 : Deux aspects d'huile de silicone au contact de l'endothélium cornéen après chirurgie pour décollement de rétine. Sur le second cliché on devine les cellules endothéliales qui paraissent peu altérées.

Enfin avant la mise en place d'un implant dans la chambre antérieure (révolu), qu'il s'agisse d'une implantation secondaire chez un aphake ou de la mise en place d'un implant pour corriger la myopie.

CONCLUSION

La microscopie spéculaire de l'endothélium cornéen fait partie de l'examen clinique de la cornée tel qu'il peut être pratiqué dans les conditions habituelles. Le recours à l'usage d'un microscope spéculaire permet à la fois d'en faire plus précisément l'analyse qualitative et quantitative et d'obtenir des images parfois utiles dans un but médico-légal.

C'est un examen sans contact, simple, indolore, rapide, peu coûteux et capable de fournir beaucoup d'informations sur l'analyse informatisée de la mosaïque endothéliale, apporter la précision, l'objectivité et la reproductivité qui lui sont indispensables.

RESUME

Introduction

La microscopie spéculaire s'est imposée depuis deux décennies (1) comme la technique d'exploration non invasive de référence de l'endothélium cornéen.

Elle permet l'analyse qualitative et quantitative à titre diagnostique, préventif ou dans un simple but de surveillance, de cette couche monocellulaire dont on connaît bien le rôle dans le maintien de la transparence cornéenne.

Matériels et méthodes

Nous avons mené une étude prospective sur une période de 5 mois (Octobre 2016 – Février 2017) réalisée au service d'ophtalmologie du CHU Hassan II de Fès et porte sur des patients volontaires ayant une cornée saine (non suivis pour une pathologie cornéenne).

Résultats

Notre étude est portée sur un échantillon de 120 patients de cornée saine dont 240 yeux au total.

La tranche d'âge 21-40 ans est la plus représentative avec 61.7% avec une légère prédominance féminine.

La moyenne de l'épaisseur cornéenne en μ est de 503 à l'OD et 504 sur l'OG.

La densité cellulaire cellule/mm² est en moyenne de 2555 sur l'OD et 2571 sur l'OG.

La moyenne de l'hexagonalité en % des cellules endothéliales est de 54.07 pour l'OD et de 54.24 pour l'OG.

Discussion

Les techniques et principe de la microscopie spéculaire sont au nombre de deux selon qu'il y a ou non, contact avec la cornée (5).

L'utilisation de ces techniques peut permettre l'observation de surfaces endothéliales approchant le millimètre carré. Elles permettent en outre d'explorer une vaste surface endothéliale et pour certains microscopes d'aller jusqu'à la périphérie cornéenne en dépassant même le « corneal ring » postérieur (zone circulaire de plis secondaires à l'indentation cornéenne par le cône).

Conclusion

La microscopie spéculaire de l'endothélium cornéen fait partie de l'examen clinique de la cornée tel qu'il peut être pratiqué dans les conditions habituelles.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Dans la microphotographie vivo de l'endothélium cornéen. Archives of Ophthalmology. 1975; 93: 143-5. [PubMed]
- 2- Maurice DM. l'activité de la membrane cellulaire dans l'endothélium cornéen de l'oeil intact. Experientia. 1968; 24: 1094-5.
- 3- Volt R. Je ne sais pas. Archives GraefesKin Ophtalmologie. 1920; 101: 123.
- 4- Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. La microscopie spéculaire clinique. I. Principes optiques. Archives of Ophthalmology. 1979; 97: 1714-9.
- 5- Cotinat J. Microscopie spéculaire de l'endothélium cornéen J Fr Ophtalmol 1999 ; 22 : 255-261
- 6- Berliner ML. Biomicroscopy de l'œil; La microscopie lampe à fente de l'œil vivant. I. New York: Paul B. HoeberInc ; 1943. p. 310.
- 7- Tanimura K. Une analyse quantitative des cellules endothéliales cornéennes. Japanese Journal of Ophthalmology. 1981; 32: 1835-9.
- 8- MacRae SM, Matsuta M, Shellans S, Rich LF. Les effets de lentilles de contact durs et mous sur l'endothélium cornéen. Am J Ophthalmol. 1986; 102: 50-7.
- 9- Hirst LW, Auer C, Dohn J, Tseng CG, Khodadoust AA. Spéculaire Microscopie de Contact dur porteurs lentilles. Ophtalmologie. 1984; 91: 1147 à 1153.
- 10- Herrmann R, Ohrloff C, Schalnus R. fluorophotométrie - une technique sensible pour la mesure quantitative de la fonction endothéliale de la cornée. Fortschritte der Ophthalmologie. 1985; 82: 584-6.
- 11- Schoessler JP. L'usure par contact de la lentille et l'endothélium cornéen. J Am optométrie Assoc. 1987; 58: 804-10.
- 12- Bergmanson JPG. Analyse histopathologique des cornéenne endothéliale Polymegethism. Cornée. 1992; 11: 133-42.

- 13- Makitie J, Koskenvuo M, Vannas A, et al. endothélium cornéen après photocoagulation chez les patients diabétiques. *Acta Ophthalmologica*. 1985; 63: 355-60. [PubMed]
- 14- Schultz RO, Matsuda M, Yee RW, et al. changements endothéliales cornéennes dans le type I et diabète de type II. *American Journal of Ophthalmology*. 1984; 98: 401-10. [PubMed]
- 15- Ringvold A, Davanger M, Olsen EG. Organisation de l'endothélium cornéen. *Acta Ophthalmologica*. 1984; 62: 911-8. [PubMed]
- 16- Maurice DM. *Le Cornea et Sclère*. 3e. 1b. New York: Academic Press; 1969. pp. 1-158.
- 17- McCarey BE. microscopie spéculaire Noncontact: une technique de macrophotographie et quelques résultats de cellules endothéliales. *Ophthalmologie*. 1979; 86: 1848-1860.
- 18- Hoffer KJ. décomposition cornéen après le comptage cellulaire endothélial cornéen. *American Journal of Ophthalmology*. 1979; 87: 252-3. [PubMed]
- 19- Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changements dans la structure de la cornée endothéliale cellulaire normale en fonction de l'âge. *CurrentEyeResearch*. 1985; 4: 671-8.
- 20- Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF. Comparaison de l'endothélium cornéen dans un Américain et une population japonaise. *Archives of Ophthalmology*. 1985; 103: 68-70.
- 21- Doughty MJ, Muller A, Zaman ML. L'évaluation de la fiabilité des estimations endothéliales cornéennes humaines densité cellulaire en utilisant un microscope spéculaire sans contact. *Cornée*. 2000; 19: 148-58.
- 22- McCarey BE, al Reaves T. mesure non invasive de la perméabilité de l'épithélium cornéen. *CurrentEyeResearch*. 1995; 14: 505-10.

- 23- Yee R, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changements dans la structure normale cornéenne endothéliale cellulaire comme Fonction d'âge. *Current Eye Research*. 1985; 4: 671-8.
- 24- Laing RA, Sanstrom MM, Berrospi AR, Leibowitz HM. Les changements dans l'endothélium cornéen en fonction de l'âge. *ExperimentalEyeResearch*. 1976; 22: 587-94.
- 25- Binder PS, Akers P, Zavala EY. la densité cellulaire endothéliale déterminée par microscopie spéculaire et par microscopie électronique à balayage. *Ophtalmologie*. 1979; 86: 1831-47.
- 26- Cheng H, Jacobs PM, McPherson K, Noble MJ. Précision des estimations de densité cellulaire et EndothelialCellLoss avec l'âge. *Archives of Ophthalmology*. 1985; 103: 1478-81.
- 27- Abib FC, J. Barreto Comportement de la densité endothéliale de la cornée pendant toute une vie. *J CataractRefractSurg*. 2001; 27: 1574-8.
- 28- Amrmitage WJ, Dick AD, Bourne WM. Prédire la perte des cellules endothéliales et la survie de la cornée graphique à long terme. *Investir Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44: 3326-31.
- 29- Moller-Pedersen T. Une étude comparative des kératocytes cornéens humains et de la densité des cellules endothéliales duriing vieillissement. *Cornée*. 1997; 16: 333-8.
- 30- Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. cornéennes changement de cellules endothéliales centrales sur une période de dix ans. *InvestigativeOphthalmology& Visual Science*. 1997; 38: 779-82.
- 31- Amann J, Holley GP, Lee SB, Edelhauser HF. Augmentation de la densité des cellules endothéliales dans les régions Para central et périphériques de la cornée humaine. *Am J Ophtalmologie*. 2003; 135: 584-90.

- 32- Edelhauser HF. L'équilibre entre la transparence cornéenne et Œdème. Investir Ophthalmol Vis Sci. 2006; 47: 1755-67.
- 33- Edelhauser HF. La résilience de l'endothélium cornéen à réfraction et la chirurgie intraoculaire. Cornée. 2000; 19: 263-73.
- 34- <https://www.reviewofoptometry.com/article/under-the-specular-microscope>