Bibliographie

1. Byrne M et al. A standardized technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. Veterinary Immunology and Immunopathology (2000) 73:167-182.
2. Williams M.J et al. Canine Lymphoproliferative Disease Characterized by Lymphocytosis: Imunophenotypic Markers of Prognosis J Vet Intern Med 2008 22: 596-601.
3. Workman HC and Vernau W. Chronic lymphocytic leukemia in dogs and cats: the veterinary perspective. Vet Clin Small Anim **2003** 33:1379-1399.
4. Comazzi S, Gelain ME, Martini V, Riondato F, Miniscalco B, Marconato L, Stefanello D, Mortarino M. Immunophenotype predicts survival time in dogs with chronic lymphocytic leukemia. J Vet Intern Med. 2011 Jan-Feb;25(1):100-6.
5. Villiers E et al. Identification of acute myeloid leukemia in dogs using flow cytometry with myeloperoxydase, MAC387, and a canine neutrophils-specific antibody. Veterinary Clinical Pathology **2006** 35(1): 55-71.
6. Tasca et al. Hematologic abnormalities and flow cytometry immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002-2006). Veterinay Clinical Pathology. 38/1 (2009) 2-12.
7. DM Seelig et al. Canine T-Zone Lymphoma : unique immunophenotyping features, outcome and population characteristics. JVIM. 2014 Mar 21 Epub ahead of print
8. Comazzi S, Gelain ME. Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. Vet J. 2011 May;188(2):149-55.
9. Gelain ME, Mazzilli M, Riondato F, Marconato L, Comazzi S. Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. Vet Immunol Immunopathol. 2008 Feb 15;121(3-4):179-88.
10. Marconato L et al. Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine B cell lymphoma: prognostic significance and proposal of a cut-off value. The Veterinary Journal 2013.
11. J Yamazaki et coll. Monitoring of Minimal Residual Disease (MRD) after Multidrug Chemotherapy and its correlation to outcome in dogs with lymphoma : a proof-of-concept pilot study. JVIM 2010; 24:897-903
12. Sato M et coll. The prognostic significance of minimal residual disease in the early phases of chemotherapy in dogs with high grade B cell lymphoma. Sato M The Veterinary Journal 195 (2013) 319-324.
13. Bauer NB, Zervos D, Moritz A. AgNor and Ki67 equally reflect proliferation in fine needle aspirates of normal, hyperplastic, inflamed, and neoplastic canine lymph nodes (n=101). JVIM 2007; 21:928-965
14. Riondat F. Proliferation index (Ki67 and s-phase) in human and canine lymphoma. Poster 03 à Lugano.
15. MC Kim et coll. Evaluation of a side population of canine lymphoma cells using Hoescht 33342 dye. J Vet Sci (2013), 13(4), 481-486.

Evaluation de la santé utérine par la cytologie chez la chienne et la chatte

S Chastant-Maillard

La cytologie vaginale est très largement utilisée chez la chienne pour la détermination du stade du cycle et pour le diagnostic indirect des affections utérines majeures, de type inflammatoire (pyomètre) ou hémorragiques (tumeurs, métrorragie idiopathique). Chez les femelles de grand format, comme la vache et la jument, l'examen du vagin montre sa faible sensibilité et sa spécificité moyenne pour le diagnostic des états inflammatoires utérins. Au-delà des endométrites cliniques, dans lesquelles du pus est présent dans la cavité vaginale, il existe des formes dites subcliniques dans lesquelles la femelle ne présente aucun signe général, aucun écoulement vaginal purulent, mais reste infertile. Seul l'examen cytologique utérin permet d'établir le diagnostic, sur la base d'une proportion anormalement élevée de neutrophiles sur le frottis utérin. Ces formes subcliniques sont fréquentes chez la vache et la jument puisque par exemple 25 à 50% des vaches présentent un frottis inflammé vers 30 jours post-partum et que l'examen cytologique après un échec à l'insémination est un examen de routine chez la jument. Ce concept d'endométrite subclinique, connu depuis quelques dizaines d'années chez la jument, depuis seulement 2004 chez la vache (Kasimanickam et al, 2004), n'a été abordé chez la chienne et la chatte que très récemment (Watts et Wright, 1995).

Comment réaliser un prélèvement de cellules endométriales chez la chienne et la chatte ?

Autant il est relativement simple d'effectuer un prélèvement en vue d'un examen cytologique chez les grandes femelles, autant ce geste est anatomiquement complexe chez la chienne et la chatte. Chez les grandes femelles, une cytobrosse ou une sonde peuvent être introduites dans la lumière utérine par simple cathétérisme du col utérin sous contrôle d'une palpation transrectale : on réalise ensuite le prélèvement par rotation de la cytobrosse contre la paroi utérine ou on procède à un lavage utérin en injectant (puis réaspirant) une solution de NaCl stérile.

Mais chez la chienne, le geste est beaucoup moins facile à réaliser : le cathétérisme du col avec une sonde métallique droite, le col étant manipulé par voie transabdominale, reste un geste difficile. Le cathétérisme doit donc être réalisé sous contrôle visuel d'un endoscope rigide, placé dans le vagin et amené jusqu'à l'orifice postérieur du col, difficile d'accès ; l'accès au col est rendu difficile par la grande longueur du vagin (plus de 10 cm chez une chienne de type Beagle), le col ne s'ouvrant pas dans l'axe mais ventralement ; un cathéter plastique (cathéter d'insémination de 70 cm de long) est ensuite introduit dans le canal cervical, jusque dans la lumière utérine ; les cellules sont ensuite récupérées par lavage utérin. 2 mL/10 kg de NaCl tiédi stérile sont injectés lentement selon la taille de la femelle. La femelle peut être soit tranquillisée et placée en décubitus sterno-abdominal (Gropetti et al 2010), soit maintenue debout, avec ou sans tranquillisation (Fontaine et al 2009). Si la chienne est couchée, on peut incliner la table caudalement avant l'aspiration du liquide. Seulement 25 à 30% du liquide injecté sont récupérés et transférés dans un tube EDTA. Selon Watts et al (1997), la cannulation a été réussie dans 215 sur 259 chiennes.

Le cathétérisme du col est également possible chez la chatte. Zambelli et al (2004) le réussissent dans 80% des cas au cours de la saison de repos et à 50% au cours de la saison de reproduction (95 chattes au total).

Une autre option, plus invasive, consiste à pratiquer une laparotomie, à exposer les cornes utérines, puis à réaliser un lavage de la cavité utérine à l'aide d'une simple seringue montée sur une aiguille.

L'usage de la cytobrosse est déconseillé chez la chienne car le frottement de la cytobrosse semble induire une réaction inflammatoire endométriale violente (Watts et Wright, 1995). L'endomètre semble particulièrement sensible aux traumatismes, surtout s'ils ont lieu en cours de dioestrus (Dhaliwal et al 2002). Néanmoins, la cathétérisation et le prélèvement cytologique utérin par lui-même ne semble pas avoir d'influence sur la santé utérine (Watts et al 1998).

Le liquide obtenu est centrifugé (15 mn, 400g) et le culot est étalé sur une lame. Les cellules sont ensuite colorées de façon conventionnelle par la coloration Hémalun-Eosine ou Diffquick ou 555. Il est également possible de demander simultanément à l'examen cytologique un examen bactériologique (et un antibiogramme).

Examen cytologique ou biopsie endométriale ?

La biopsie utérine est la technique de référence pour l'évaluation de la santé utérine dans de nombreuses espèces. Une fois le cathétérisme utérin réalisé, il est possible de réaliser une biopsie endométriale via le canal outil de l'endoscope. Néanmoins, Günzel-Appel et al (2001) ont décrit que ce type de prélèvement est à l'origine de cicatrices utérines, d'infections, d'hémomucomètres chez la chienne. Cette observation n'est pas partagée par Schlafer (2012) et Christensen et al (2012), qui n'ont observé des pyomètres que dans les cas de biopsies de l'épaisseur totale (chirurgicales) et jamais dans les cas de biopsies transcervicales.

Quoi qu'il en soit, les conclusions des examens cytologiques et histologiques sont très cohérentes (Gropetti et al, 2010).

Examen cytologique ou examen bactériologique ?

Dans les 10 cas d'endométrite cytologique identifiés par Fontaine et al (2009), seulement 70% ont permis une croissance bactérienne importante. Cette différence entre cas cytologiques et cas bactériologiques a également été observée chez la vache (Deguillaume, 2010). Deux hypothèses peuvent expliquer la présence d'une inflammation sans que des bactéries ne soient mises en évidence : il est possible que des bactéries soient présentes mais ne soient simplement pas mises en évidence par les techniques de bactériologie utilisées ; ou les bactéries qui ont initié l'inflammation ont disparu et l'inflammation persistante explique à elle seule l'infertilité (par ailleurs, il est également envisageable que l'inflammation puisse se développer dans l'utérus sans que des bactéries ne soient présentes dans l'organe).

Variations physiologiques au cours du cycle

Le frottis permet d'observer des cellules endométriales, des leucocytes, des érythrocytes, des bactéries et en cas de saillie ou d'insémination, des spermatozoïdes. Des cellules vaginales peuvent être également observées.

Cellules endométriales : Elles semblent très cohésives, desquamant par plaque, et donc observées le plus souvent en groupes. Issues d'un épithélium columnaire, elles présentent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. On ne peut pas distinguer sur le frottis les cellules épithéliales glandulaires et les cellules luminales. La richesse en groupes de cellules endométriales ne donne pas d'information, non plus que la proportion de cellules endométriales isolées (Watts et al 1998).

Erythrocytes : La proportion d'érythrocytes est constante, ce qui est étonnant (la question se pose de savoir si ce ne serait pas dû à un traumatisme lié au passage du cathéter). Les érythrocytes sont présents en quantité équivalente quelle que soit la phase du cycle (environ 1,5 par champ pour un grossissement de 400)

Leucocytes : Les éosinophiles sont présents en très faible proportion sauf en post partum précoce (en moyenne 14% des neutrophiles, entre 0 et 67%). Les neutrophiles sont la population blanche largement dominante (90% des leucocytes) en proœstrus, œstrus, dioestrus, post partum, alors qu'en anœstrus, ce sont les lymphocytes qui sont dominants.

Bactéries : La présence de bactéries soit être considérée comme normale au cours du proœstrus et de l'œstrus (Watts et al, 1996, 1998), voire même en anœstrus tardif (Gropetti et al 2010). Il s'agit de bactéries de la flore génitale normale (Kustritz, 2006), dont sont exclues les bactéries anaérobies et sans que le rôle pathogène ne soit complètement démontré, les mycoplasmes. Le diagnostic d'endométrite ne doit pas être basé sur la détection de bactéries, mais sur la mise en évidence d'une proportion anormalement élevée de neutrophiles.

Les caractéristiques du frottis normal à chaque stade du cycle sont rassemblées dans le tableau 1 (d'après Watts et al 1998 ; Gropetti et al 2010). Le principe général est une dégénérescence en milieu et fin de dioestrus et une régénération en fin d'anœstrus.

Proœstrus - œstrus

Les cellules endométriales sont groupées. Neutrophiles et lymphocytes sont présents. Des bactéries peuvent être visualisées. Des noyaux nus sont observés essentiellement pendant le proœstrus et le début du dioestrus.

Dioestrus

Au début, des amas de cellules endométriales sans dégénérescence sont détectées. Des neutrophiles sont présents, souvent associés à des débris cellulaires. En milieu de dioestrus, les cellules épithéliales dégénérées prédominent, avec des vacuoles cytoplasmiques et des gouttelettes lipidiques. A la fin du dioestrus, la dégénérescence augmente encore, les cytoplasmes des cellules endométriales se remplissant de gouttelettes lipidiques et les noyaux devenant pycnotiques. Les cellules endométriales prennent un aspect typique, de grande taille et spongieuses. Les neutrophiles sont présents mais également des lymphocytes et des macrophages.

Anœstrus

Il se caractérise par une régression de l'endomètre. Les cellules endométriales sont spongieuses, la proportion de macrophages augmente tandis que celle des neutrophiles diminue. L'aspect change complètement en fin d'anœstrus : on n'observe plus de cellules dégénérées, mais des groupes de cellules intactes avec un noyau rond et un cytoplasme intact sont visibles. Lymphocytes, macrophages et plasmocytes sont présents.

Tableau 1 : Evolution de la cytologie utérine au cours du cycle (adapté d'après Watts et al 1998)

	Dégénérescence* (%moyen ± SEM)	Cellules épithéliales	Vacuoles cytoplasmiques	Ratio leucocytes/ cellules endométriales ** (moyenne ± SEM ; [min – max])	Nombre relatif de leucocytes	Types de leucocytes	Bactéries
Proœstrus	0	Groupes sains	-	2 ± 2	+	Neutrophiles	Présentes
Œstrus	1	Groupes sains	-	24 ± 54 [2-175]	+	Neutrophiles	Présentes
Dioestrus	33 ± 32	Groupes sains et groupes dégénérés	+	7 ± 8 [0-23]	+	Neutrophiles	Absentes
Anœstrus précoce	50 ± 66	Dégénérés	-	18 ± 11 [11-26]	++	Lymphocytes 60% Neutrophiles 30% Macrophages 10%	Absentes
Milieu d'anœstrus	20 ± 30	Groupes sains et groupes dégénérés	+	43 ± 71 [0-197]			
Fin d'anœstrus	0	Groupes sains	-	13 ± 12 [2-33]	+ à ++	Lymphocytes 70% Macrophages 20%	Absentes
Post partum	95 ± 11	Dégénérés	+	312 ± 306 [31 – 742]	++ à +++	Neutrophiles 50% Macrophages 20% Lymphocytes 20%	Absentes

* % des groupes de cellules endométriales avec signes de dégénérescence

** nombre de leucocytes (comptés sur 10 champs au grossissement x400) rapporté au nombre de groupes de cellules endométriales, multiplié par 100.

Modifications du frottis en cas d'affection utérine (d'après Gropetti et al 2010)

Hyperplasie glandulokystique : Prédominance de groupes cellulaires dégénérés et de cellules isolées à cytoplasme spongieux. Les cellules intactes et les rares neutrophiles sont entourés d'un matériel amorphe.

Pyomètre : peu de cellules endométriales, le plus souvent dégénératives. Neutrophiles en tapis.

Subinvolution des zones d'insertion placentaire : désquamation massive de cellules endométriales dégénérées, accompagnées de neutrophiles, macrophages et plasmocytes. La présence d'éosinophiles est typique de cette affection. Des cellules géantes, semblables à des cellules trophoblastiques, similaires aux cellules endométriales dégénérées.

Suite à résorption embryonnaire ou avortement : présence d'une forte proportion de leucocytes (Mir et al 2013). Cette inflammation est probablement la conséquence de la résorption.

Interprétation du frottis endométrial

La quantité de neutrophiles est admise comme un bon indicateur de l'inflammation endométriale. Une des difficultés de l'interprétation d'un frottis utérin est la nécessaire définition préalable du caractère pathologique ou non de l'inflammation. En d'autres termes, au-delà de quelle proportion de neutrophiles la fertilité est-elle affectée ? La détermination du seuil de neutrophiles tolérable est rendue complexe par le fait que l'utérus passe par des phases où la présence de neutrophiles est parfaitement physiologique, voire bénéfique, après l'insémination ou en post partum. Après le coït, la présence de neutrophiles dans la cavité utérine aurait pour fonction de faire disparaître (par phagocytose) les nombreux spermatozoïdes en excès et les bactéries et ainsi d'éviter l'immunisation anti-spermatozoïde de la femelle (Katila, 2012) ; après la mise-bas, il s'agit de phagocyter l'endomètre qui désquame et de limiter la croissance et la multiplication des bactéries (Azawi, 2008). Mais une réaction inflammatoire excessive et/ou persistante est ensuite délétère pour la fécondation et le développement embryonnaire (Hill et Gilbert, 2008). La détermination du seuil pathologique de neutrophiles utérins nécessite donc de comparer les taux de gestation obtenus après insémination de femelles présentant des frottis utérins plus ou moins inflammés. C'est avec cette démarche qu'il a été possible de déterminer que le seuil maximal tolérable entre 21 et 35 jours post partum chez la vache était de 5% de neutrophiles sur un frottis utérin, tandis qu'il n'est plus que de 1% si l'on examine la femelle dans la semaine qui précède l'insémination (Deguillaume, 2010). De la même façon, on ne doit pas trouver plus de 2 neutrophiles par champ d'observation microscopique (x400) avant l'insémination chez la jument (Leblanc, 2010).

L'inflammation utérine post-insémination existe aussi chez la chienne (Ribeiro et al 2006 ; England et al 2012ab ; Freeman et al 2013). L'endométrite pourrait être d'origine immunitaire, du fait d'anticorps antispermatozoïdes, dont la présence a été démontrée chez la chienne (Rosenthal et al 1984). Chez la chienne et encore davantage chez la chatte, compte tenu du faible nombre d'animaux étudiés jusqu'ici, aucune définition « scientifique » basée sur un taux de fertilité ultérieur n'est disponible. On considère donc plus empiriquement comme atteinte d'endométrite une chienne dont le nombre de leucocytes par champ dépasse celui annoncé par Watts et al (1998) (tableau 1), ce qui est pour le moins approximatif. England et al (2012ab) expriment l'intensité de l'inflammation endométriale par le nombre de neutrophiles par ml de liquide utérin collecté (après comptage sur une cellule hématimétrique).

Fréquence de l'inflammation endométriale chez la chienne et la chatte

Une seule publication fournit une prévalence sur la base de frottis endométriaux : sur 26 chiennes infertiles pour des raisons indéterminées (alors qu'elles ont été inséminées au moment opportun avec de la semence de bonne qualité), 10 étaient atteintes d'endométrite (Fontaine et al, 2009). L'analyse de biopsies utérines a permis d'observer 4 endométrites sur 14 cas d'infertilité (diagnostic de gestation négatif avec une insémination réalisée au moment adéquat et avec de la semence de fertilité certifiée ; Mir et al 2013). Schlafer (2012) annonce identifier une endométrite sur environ 50% des biopsies prélevées chez les chiennes subfertiles. Sur des biopsies collectées sur des

chiennes tout venant, 10 endométrites ont été observées sur 20 chiennes, dont 7 cas associés à une hyperplasie glandulokystique ; Christensen et al 2012).

Les données chez la chatte sont extrêmement rares. Sur 79 chattes atteintes d'hyperplasie endométriale, 10 souffraient d'endométrite (dont 3 subcliniques) (Potter et al 1991 ; diagnostic sur la base de l'histologie post mortem). Lawler et al (1991) ont identifié 3 cas d'endométrites sur 10 chattes infertiles. En pratique, des commémoratifs d'infertilité (au moins trois accouplements avec un mâle de fertilité connue sans gestation) sont considérés comme un indicateur d'infection utérine (Ortega-Pacheco et al, 2012).

Conséquences de l'inflammation endométriale

Une inflammation post coïtale intense, avec un afflux excessif de neutrophiles est responsable d'un défaut d'attachement des spermatozoïdes à l'épithélium utérin (indispensable à la fécondation ultérieure), de leur agrégation et/ou de la création d'un milieu hostile au développement de l'embryon. Au total, cette inflammation post coïtale excessive est associée à une fertilité inférieure (division de moitié du taux de gestation) et à une taille de portée inférieure (-2 chiots) (England et al 2012ab ; Freeman et al 2013).

CONCLUSION

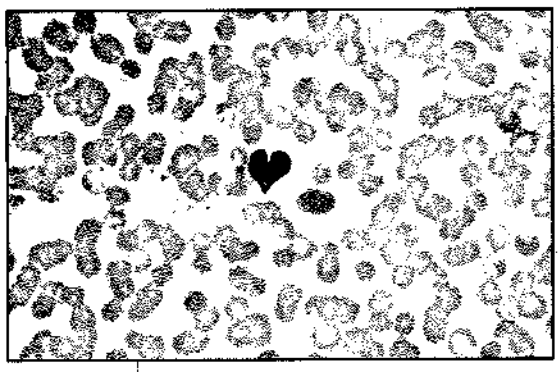
La réalisation d'examens cytologiques endométriaux chez la chienne et la chatte reste encore aujourd'hui exceptionnelle et pratiquées uniquement chez certains praticiens spécialisés ou centres de référence en reproduction assistée. Elle ne présente de réel intérêt que chez les femelles destinées à la reproduction, dans le cadre de l'exploration d'une infertilité. En outre, il serait intéressant d'explorer également chez ces femelles la cytologie cervicale, puisque, au moins chez la vache, l'inflammation du col évolue indépendamment de l'inflammation utérine et que dans cette espèce, elle est responsable par elle-même d'infertilité (Deguillaume et al 2012). Néanmoins, avant d'envisager de pratiquer un tel examen, il est nécessaire d'examiner les arguments qui ont conduit à considérer la chienne comme infertile. Dans 50 à 70% des cas de diagnostic de gestation négatif, la saillie ou l'insémination n'ont pas été réalisée au bon moment par rapport à l'ovulation, ou l'ont été sans contrôle du moment de l'ovulation. Le contrôle du moment de l'ovulation ainsi que la vérification de la qualité de la semence sont des préalables indispensables avant de déclarer la chienne infertile et de s'engager dans des investigations aussi coûteuses qu'aléatoires.

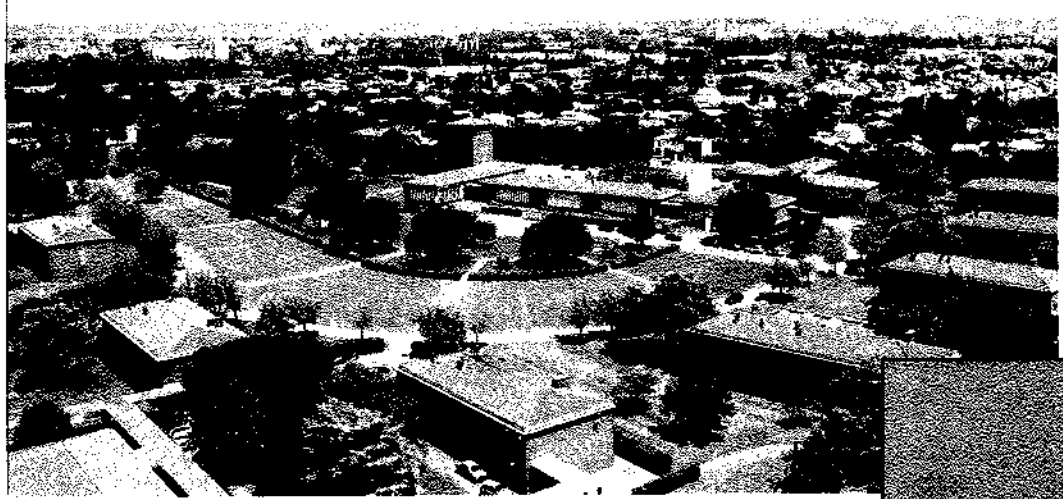
BIBLIOGRAPHIE

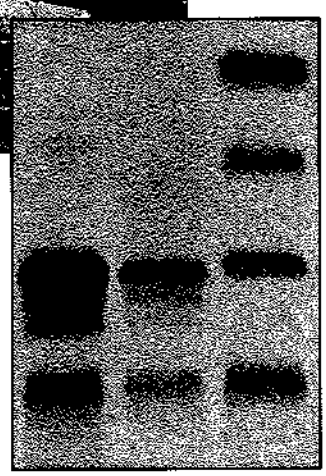
- Azawi OI 2008 Anim Reprod Sci 105, 187–208
- Christensen BW et al 2012 Reprod Dom Anim 47 (Suppl 6) 342-346
- Deguillaume L, 2010. Thèse de doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)14 Décembre 2010
- Deguillaume L et al 2012 J. Dairy Sci. 95 :1776–1783
- Dhaliwal GK et al 2002, 69, 239-249
- England GCW et al. 2012a Theriogenology, 78, 1611-1617.
- England GCW et al 2012b Vet J, 194, 314-318
- Fontaine E et al 2009 Reprod Dom Anim 44(Suppl 2) 196-199
- Freeman SL et al 2013 Vet J 198, 76-80

- Gropetti D et al 2010 Theriogenology, 73, 927-941
- Günzel-Apel AR et al 2001 J Reprod Fert Suppl 57, 61-65
- Hill J et Gilbert R 2008 Aust Vet J 86, 8, 312-316
- Kasimanickman R et al 2004 Theriogenology 62, 9–23
- Katila T 2012 Reprod Dom Anim 47 (Suppl 5) 31-41
- Leblanc MM. 2010 Reprod Dom Anim 45 (Suppl. 2), 21–27
- Lawler DF et al 1991 Am J Vet Res 52, 10, 1747-1753
- Mir F et al 2013, Theriogenology, 79, 312-322
- Ortega-Pacheco A et al 2012, Vet Clin Small Anim 42 547–559
- Potter K et al 1991 J am Vet Med Assoc 198, 8, 1427-1431
- Ribeiro APC et al 2006 Theriogenology 66, 1462-1464
- Kustritz MVR 2006 Theriogenology 66, 567-574
- Rosenthal RC et al 1984, Am J Vet Res, 45, 370-374
- Schlafer DH 2012 Reprod Dom Anim 47 (Suppl 6), 318-322
- Watts JR, Wright PJ 1995 J Small Anim Pract, 36, 201-206
- Watts JR et al 1996 J Small Anim Pract 37, 54-60
- Watts JR et al 1997 J Reprod Fert Suppl, 51, 283-293
- Watts JR et al 1998, J Small Anim Pract 39, 2-9
- Zambelli D et al 2004 Reprod Dom Anim 39, 76-80

actualités en biologie médicale chez le chien et le chat







ECOLE NATIONALE VETERINAIRE

Organisées par
C. Trumel, N. Bourgès-Abella & A. Geffré
24 & 25 Mai 2014