

TP 2 : INTERET DU FROTTIS VAGINAL DANS LA DETERMINATION DU STADE DU CYCLE ŒSTRAL CHEZ LA CHIENNE

1. Introduction

Le frottis vaginal est une méthode rapide qui a été développée dans les années 80, permettant de savoir rapidement si l'organisme est sous imprégnation œstrogénique. Il s'agit d'un examen complémentaire de l'examen clinique génital, qui présente de nombreux atouts : simple, peu coûteux, rapide à réaliser, ne nécessitant que peu de matériel. La technique est basée sur le fait que l'épithélium vaginal se modifie au cours des chaleurs, au fur et à mesure que le taux d'œstrogène augmente. En effet, les œstrogènes induisent une différenciation des cellules de l'épithélium vaginal, qui deviennent plus grandes et anguleuses, et chez lesquelles le cytoplasme se charge en dérivés de la kératine. Ces cellules, suivant leur degré de différenciation, sont qualifiées de cellules intermédiaires, puis superficielles.

Le cycle œstral de la chienne est particulier et la connaissance de ses spécificités permet à son propriétaire de comprendre quand sa chienne peut être correctement fécondée et quelles sont les périodes clés à surveiller pendant une gestation ou lors d'une mise au repos de celle-ci. Le frottis vaginal présente un intérêt particulier chez les chiennes en reproduction, mais aussi chez les chiennes présentant divers signes cliniques potentiellement liés à une imprégnation de l'organisme par des œstrogènes, pour lesquelles des dosages sanguins d'œstradiol seraient plus longs et plus difficiles à interpréter. Il permet d'orienter vers une pathologie génitale.

La réalisation des frottis nécessite un apprentissage tant pour effectuer le geste que pour la lecture et l'interprétation du prélèvement.

2. Préalable (s) :

- Physiologie du cycle œstral chez la chienne.
- Anatomie et histologie de l'appareil génital de la chienne.

3. Objectifs :

A l'issu de ce TP, l'apprenant sera capable de :

- Réaliser un écouvillonnage vaginal chez la chienne.
- Connaître les spécificités du cycle œstral de la chienne.
- Réaliser un frottis vaginal.
- Interpréter un frottis vaginal et déterminer le stade du cycle œstral chez la chienne.

4. Méthodes pour déterminer le stade du cycle œstral

Commémoratifs :

- Age de la femelle.
- Dates des dernières chaleurs.
- Date de la mise-bas.

Comportement.

Examen externe :

- Observation de la vulve.
- Observation du tissu mammaire.

Examens complémentaires :

- Frottis vaginal.
- Vaginoscopie.
- Dosage de la progestérone (sang).
- Dosage de LH (sang).
- Echographie ovarienne.

Tableau 4 : Manifestations physiques visibles et comportement de la chienne aux différentes phases du cycle œstral.

| | Durée | Manifestations physiques visibles | Comportement |
|------------|---------------|--|---------------------------------------|
| Pro œstrus | 10 jours | Pertes sanguinolentes Vulve œdématiée | Attire les mâles Refuse la saillie |
| Œstrus | 10 jours | Pertes rosées Vulve gonflée | Attire le mâle et accepte la saillie |
| Metœstrus | 50 - 60 jours | Gonflement des mamelles possible | Refus du mâle |
| Anœstrus | 4 mois | RAS | RAS |

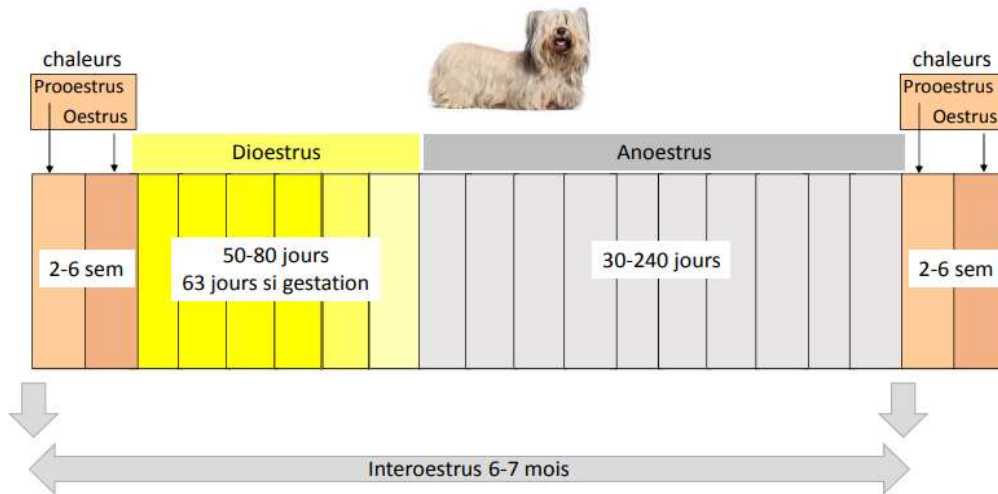


Figure 20 : Cycle œstral de la chienne.



Figure 21 : Comportement de chaleurs.



Figure 22 : Modifications du comportement (**Signe d'Amantéa**).



Figure 23 : Aspect de la vulve hors chaleurs/en chaleurs chez la chienne.

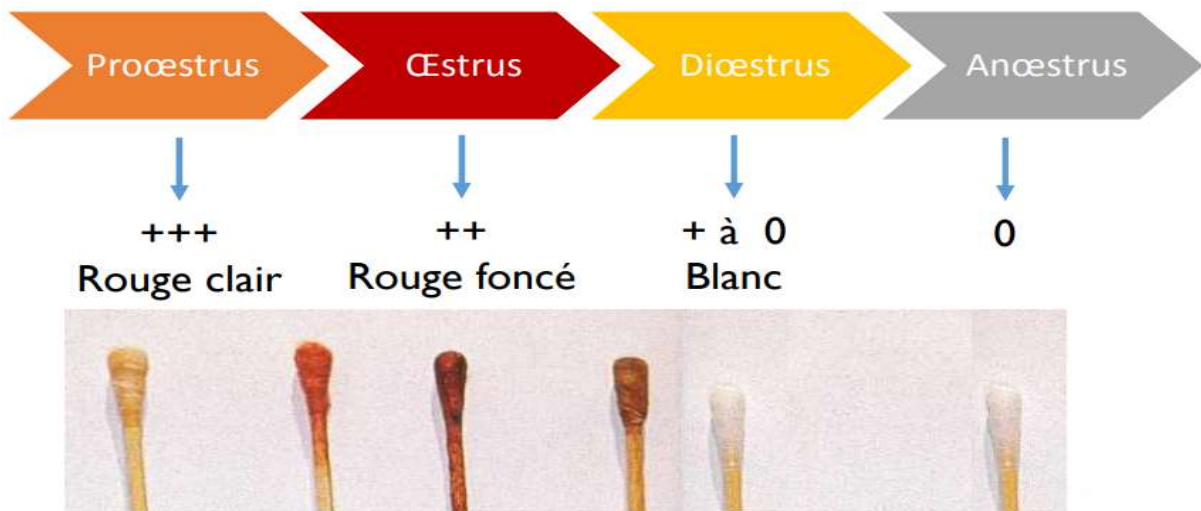


Figure 24 : Ecoulements vulvaires aux différentes phases du cycle œstral de la chienne.

5. Matériel :

- Ecouvillons stériles.
- Sérum physiologique.
- Lames en verre.
- Alcool ou cytofixateur.
- Colorants : Giemsa, May Grunwald.
- Microscope optique.



Figure 25 : Ecouvillons stériles et colorants MGG.

6. La technique d'écouvillonnage :

Plusieurs méthodes pour le prélèvement des cellules vaginales exfoliées sont possibles. Le prélèvement doit être rapide, facile, avec un minimum d'inconfort pour la femelle, praticable à toutes les phases du cycle et permettant d'obtenir un échantillon cellulaire viable.

L'écouvillonnage est la technique la plus couramment employée. On utilise un écouvillon stérile en coton à usage unique.

L'écouvillon stérile doit être humidifié avec deux gouttes de sérum physiologique stérile. Cela peut ne pas être nécessaire si la chienne présente des écoulements vaginaux suffisants (pendant le proestrus ou l'oestrus). Lorsqu'on utilise du matériel non humidifié, le coton collecte les cellules mais également du mucus, ce qui peut gêner l'étalement du prélèvement.

Les lèvres vulvaires peuvent être écartées manuellement avec le pouce et l'index. L'écouvillon est introduit au niveau de la commissure dorsale de la vulve. Puis il est orienté crânio-dorsalement en direction de la colonne vertébrale. Une fois passé au-dessus de l'arcade ischiatique, l'instrument est dirigé crânialement sur une quinzaine de centimètres. Au contact de la muqueuse du vestibule ou de la partie caudale du vagin, l'écouvillon subit une rotation. Le mouvement doit être imprimé avec une force suffisante pour assurer un bon contact avec la muqueuse vaginale. Puis l'écouvillon est extrait délicatement des voies génitales.

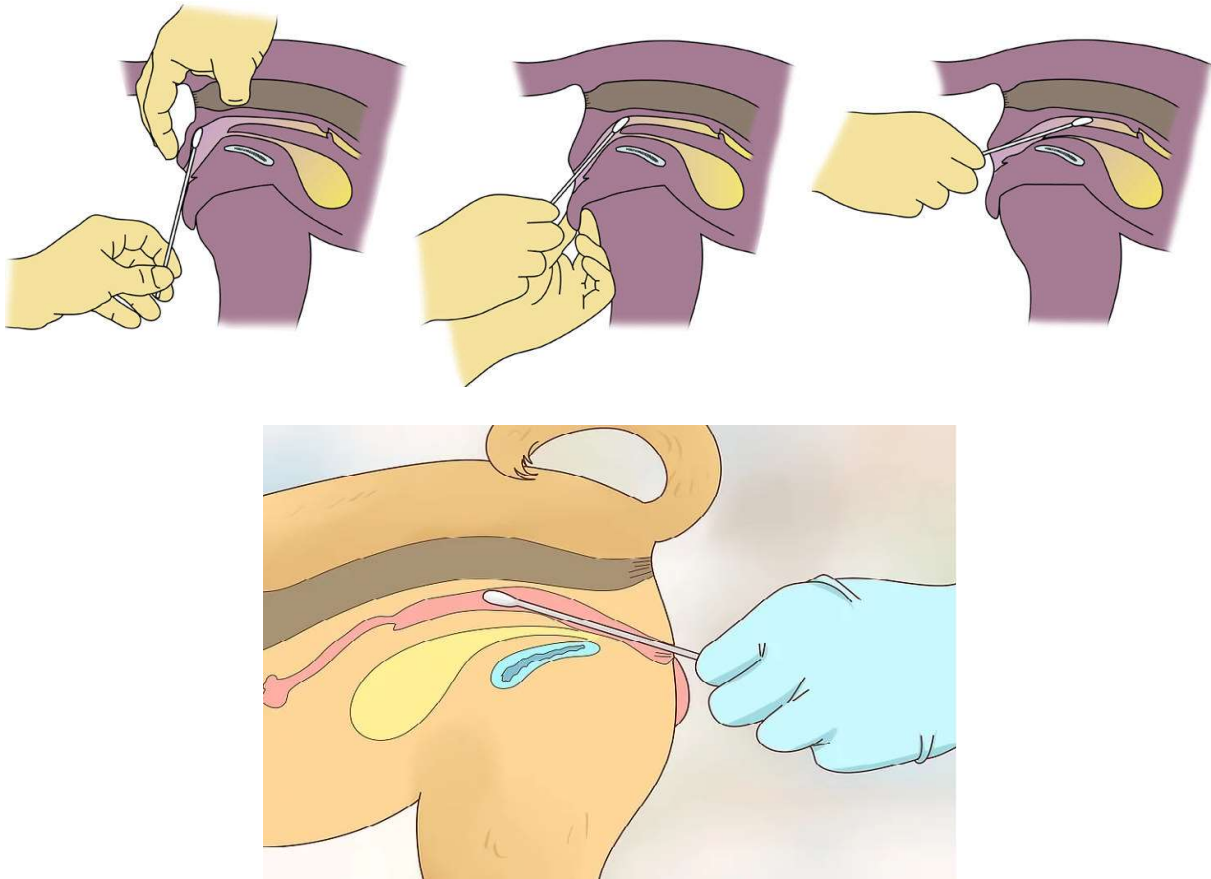


Figure 26 : Technique d'écouvillonnage vaginal chez la chienne.

Certaines précautions sont nécessaires pour éviter des erreurs :

- En dirigeant caudalement l'écouvillon, on évite d'effectuer un prélèvement dans la fosse clitoridienne. En effet, des cellules fusiformes kératinisées sont fréquemment prélevées dans cette zone et peuvent être confondues avec des cellules superficielles kératinisées observées lors de l'œstrus pour un œil non averti.
- L'introduction sur 15 cm (pour une chienne de format moyen) est obligatoire. Les manipulations dans le vagin crânial peuvent être douloureusement ressenties par certaines femelles. Au niveau de la zone caudale du vestibule, l'épithélium pourrait être moins sensible aux variations hormonales ; ceci a été montré chez la femme mais pas encore mis en évidence chez la chienne.
- Le prélèvement sur la partie dorsale du vestibule ou du vagin évite tout traumatisme du méat urétral.
- L'utilisation de spéculums évite tout contact de l'écouvillon avec la muqueuse de la fosse clitoridienne et du vestibule caudal, ce qui assure de prélever dans la zone souhaitée. Il n'y a également aucun risque de léser le méat urinaire.

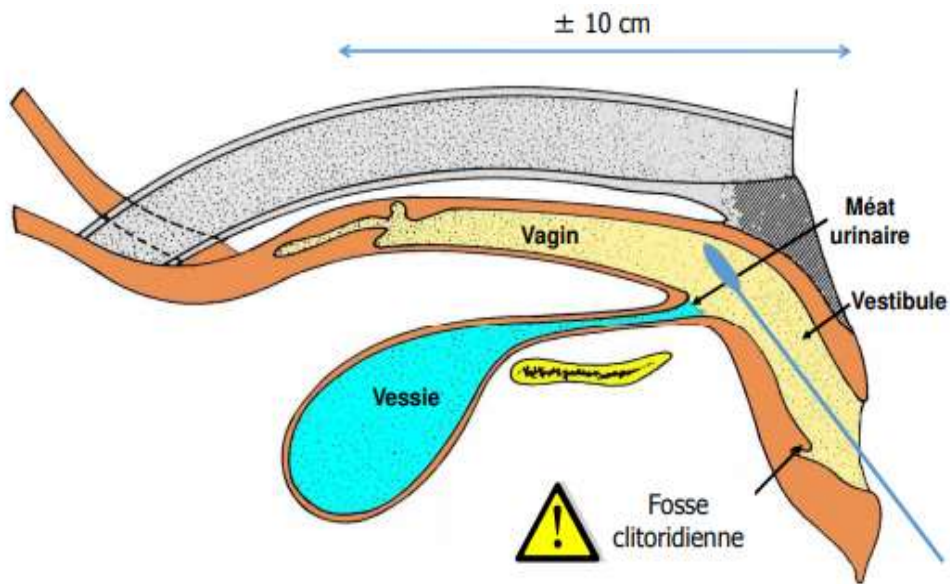


Figure 27 : Orientation correcte de l'écouvillon nécessaire pour éviter de prélever à partir du méat urinaire et de la fosse clitoridienne chez la chienne.

7. Etalement :

Les cellules prélevées sur l'épithélium sont étalées sur une lame en verre. L'étalement doit être effectué rapidement, afin d'éviter le dessèchement du prélèvement. Le but est de transférer un matériel représentatif du prélèvement et non l'ensemble de ce dernier.

L'écouvillon est roulé sur une lame propre sans frottement pour ne pas détériorer les cellules. Généralement deux à trois lignes parallèles, bien séparées, peuvent être étalées sur toute la longueur d'une seule lame. Cependant, la superposition de deux étalements gênerait et fausserait la lecture du frottis.

Il est préférable que l'étalement soit toujours réalisé par le même manipulateur qui applique le même appui de l'écouvillon sur la lame. En effet, les variations des différents types cellulaires sont parfois délicates à observer et nécessitent une méthode standardisée.

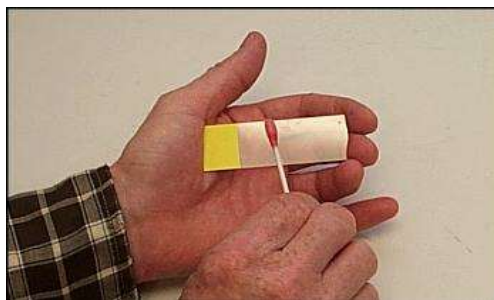


Figure 28 : Etalement du frottis vaginal.

On fixe les cellules sur la lame à l'aide d'un cytofixateur afin d'éviter qu'elles ne se détachent du support au cours de la coloration, puis on les teinte en trempant la lame dans plusieurs bains successifs de colorants. On réalise ensuite l'observation des cellules au microscope.

8. Coloration :

Différentes colorations existent :

8.1. Des colorations unicolores : May Grunwald Giemsa, Giemsa, Diff Quick : RAL 555®, bleu de méthylène.

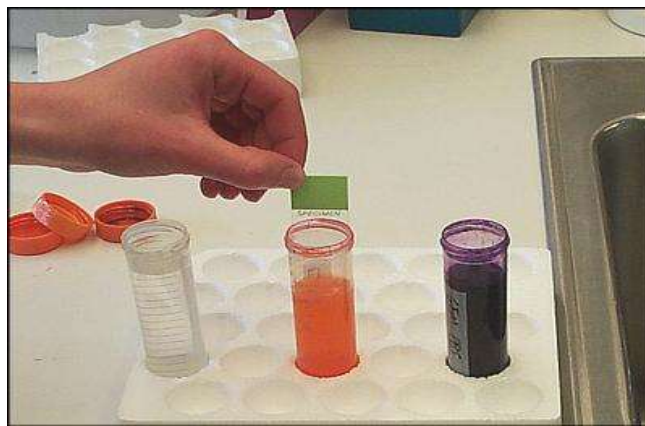


Figure 29 : Coloration Diff Quick.

8.1.1. Coloration au Giemsa :

- Déposer 3 à 5 gouttes de colorant Giemsa sur la lame sèche et fixée et 5 à 6 gouttes d'eau distillée neutre pour neutraliser le colorant acide.
- Laisser le colorant agir 15 à 20 minutes puis rincer à l'eau du robinet.
- Laisser sécher les frottis à l'air libre avant la lecture sous microscope.

8.1.2. Coloration au May Grunwald Giemsa:

- Fixer et sécher la lame.
- Recouvrir la lame totalement en versant 15 gouttes de colorant May Grunwald.
- Laisser agir 2 minutes.
- Rincer avec de l'eau du robinet.
- Recouvrir la lame par le colorant Giemsa dilué (30 gouttes de Giemsa dans 20 ml d'eau).
- Laisser agir 20 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Laisser sécher puis observer les lames sous microscope.

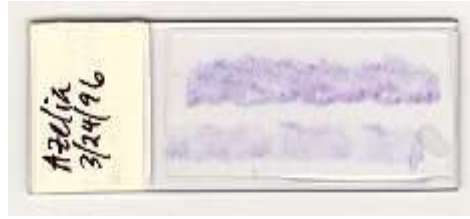


Figure 30 : Frottis vaginal coloré au MGG.

8.2. Des colorations dites différentielles : coloration dite de « Harris-Schorr », qui teinte la kératine des cellules en rouge (cellules dites acidophiles ou éosinophiles) ; les cellules rondes, non kératinisées sont bleues (basophiles). On peut ainsi définir l'index éosinophile, qui se calcule comme le nombre de cellules éosinophiles divisé par le nombre de cellules totales. En phase d'œstrus, l'index éosinophile doit être au moins de 70 à 80 %.

Après avoir fixé les cellules sur la lame de verre, procéder à la coloration comme suit :

1. Fixation.
2. Alcool 70° : tremper 10 fois.
3. Alcool 50° : tremper 10 fois.
4. Eau distillée : tremper 10 fois.
5. Hématoxyline de Harris : 2 minutes.
6. Eau distillée : 1 passage.
7. Eau distillée : 1 passage.
8. Alcool ammoniacal : 1 minute.
9. Eau distillée : tremper 1 fois.
10. Alcool 70° : tremper 1 fois.
11. Alcool 95° : tremper 1 fois.
12. Colorant de Schorr : 2 minutes.
13. Alcool 95° : rincer.
14. Alcool 100° : bien rincer.

Tableau 5 : Bilan de la coloration de Harris-Schorr.

| | Prooestrus | Oestrus | Dioestrus | Anoestrus |
|---------------------|---|---|--|--|
| Coloration | Acidophile (début d'acidophilie) | Acidophile majoritaire | Basophile | Basophile |
| Cellules | Nombreuses ; intermédiaires majoritaires | Nombreuses ; superficielles anucléées ou noyau picnotique ("feuilles mortes") | Nombreuses ; intermédiaires et parabasales isolées | rare ; intermédiaires et parabasales surtout + cellules "en colonne" |
| Hématies | Nombreuses | Rares | Rares | Rares |
| Leucocytes | Peu nombreux | Rares | Assez nombreux au début | Rares |
| Fond frottis | mucus peu abondant, frottis devenant "propre" | mucus peu abondant, frottis "propre" | mucus abondant, frottis "sale" | variable |

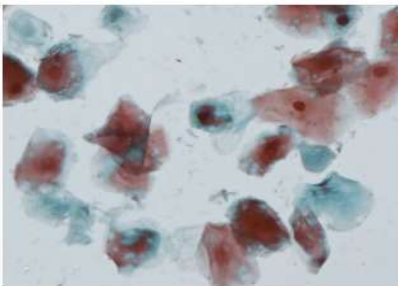
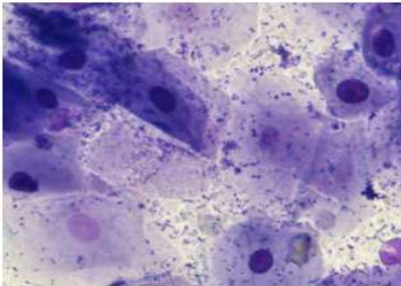
| | | |
|---|--|---|
| |  |  |
| | HARRIS-SHORR | MAY GRUNWALD GIEMSA |
| Progression prooestrus-oestrus Visualisation des cellules sanguines Durée / nombre de bains Polyvalence NeoCare | Facile | Difficile |
| | Difficile | Facile |
| | 20 mn – 14 bains | 15 sec – 3 bains |
| | NON | OUI |

Figure 31 : Comparaison entre la coloration de Harris-Schorr et MGG.

9. Observation au microscope :

L'observation de la lame se fait en deux temps :

- D'abord, un faible grossissement (x40 ou x100) permet d'apprécier globalement la richesse en cellules ainsi que leur répartition (dispersées, en amas ou isolées), la réussite de la coloration. On peut déjà observer l'éventuelle présence de mucus, de polynucléaires neutrophiles, de spermatozoïdes. Cette première visualisation donne également la tendance tinctoriale du frottis (globalement basophile, acidophile, ou « mixte »).
- Puis un fort grossissement (x400) nous donne des informations beaucoup plus précises sur les types cellulaires rencontrés. La morphologie et la couleur de la cellule, la taille et

l'aspect du noyau sont des informations primordiales pour reconnaître le type cellulaire rencontré.

10. Aspect des cellules vaginales :

L'épithélium vaginal est de type stratifié pavimenteux non kératinisé ou épithélium malpighien. Une couche de cellules germinatives repose sur une lame basale. Depuis cette couche vers la lumière utérine, on trouve successivement des cellules parabasales, des cellules intermédiaires (issues de la différenciation des cellules parabasales), puis des cellules superficielles.

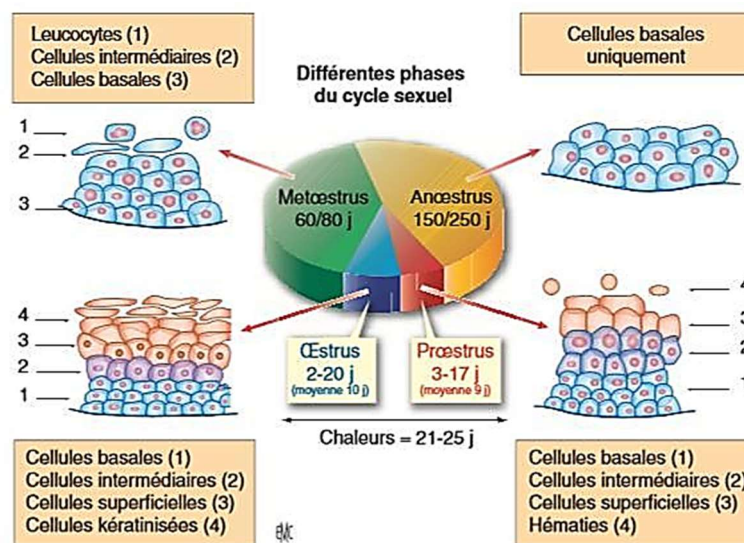


Figure 32 : Différentes couches de l'épithélium vaginal à différents stades du cycle œstral.

Les différentes couches cellulaires présentent les trois stades de maturation physiologique : la prolifération, puis la différenciation et enfin l'exfoliation. Ce phénomène est sous la dépendance hormonale des œstrogènes.



Figure 33 : Les cellules de l'épithélium vaginal observables sur un frottis vaginal.

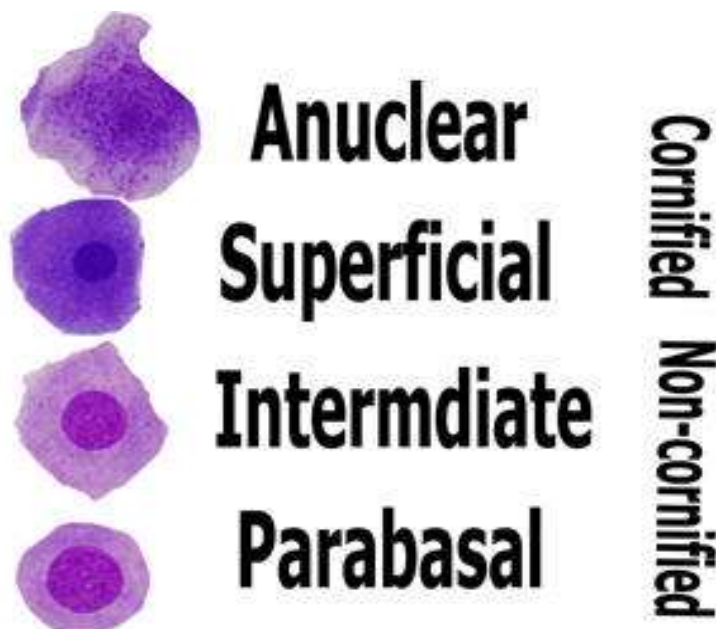
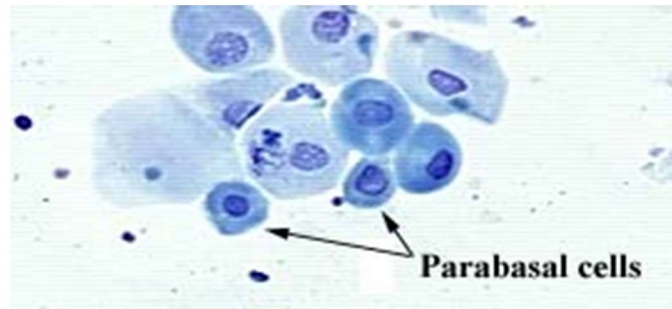
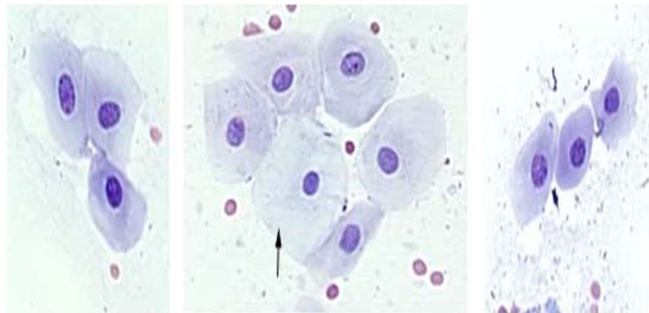


Figure 34 : Cellules vaginales kératinisées et non kératinisées.

Cellules parabasales



Cellules intermédiaires



Cellules superficielles

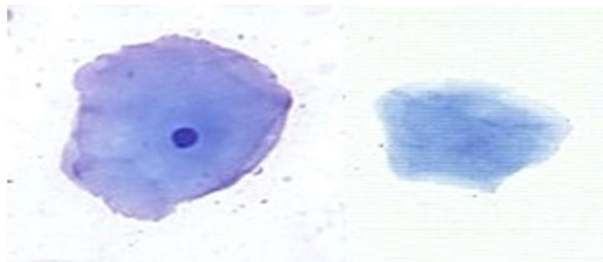
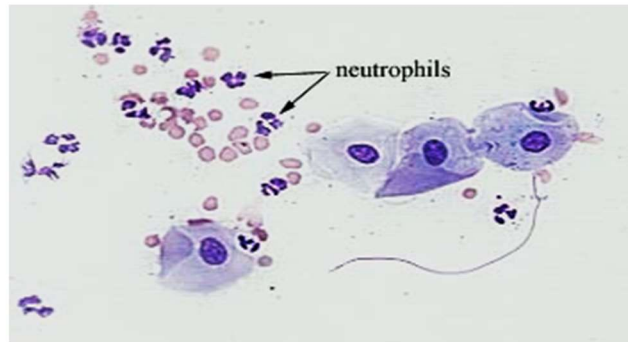


Figure 35 : Différents types cellulaires retrouvés dans un frottis vaginal.

Autres cellules : neutrophiles, hématies



Bactéries

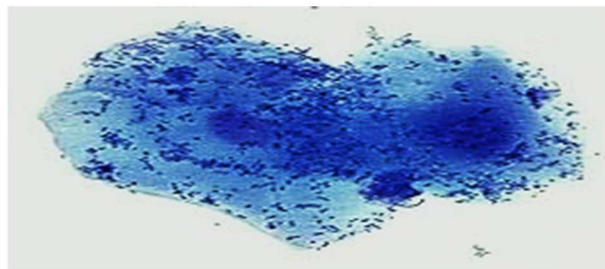


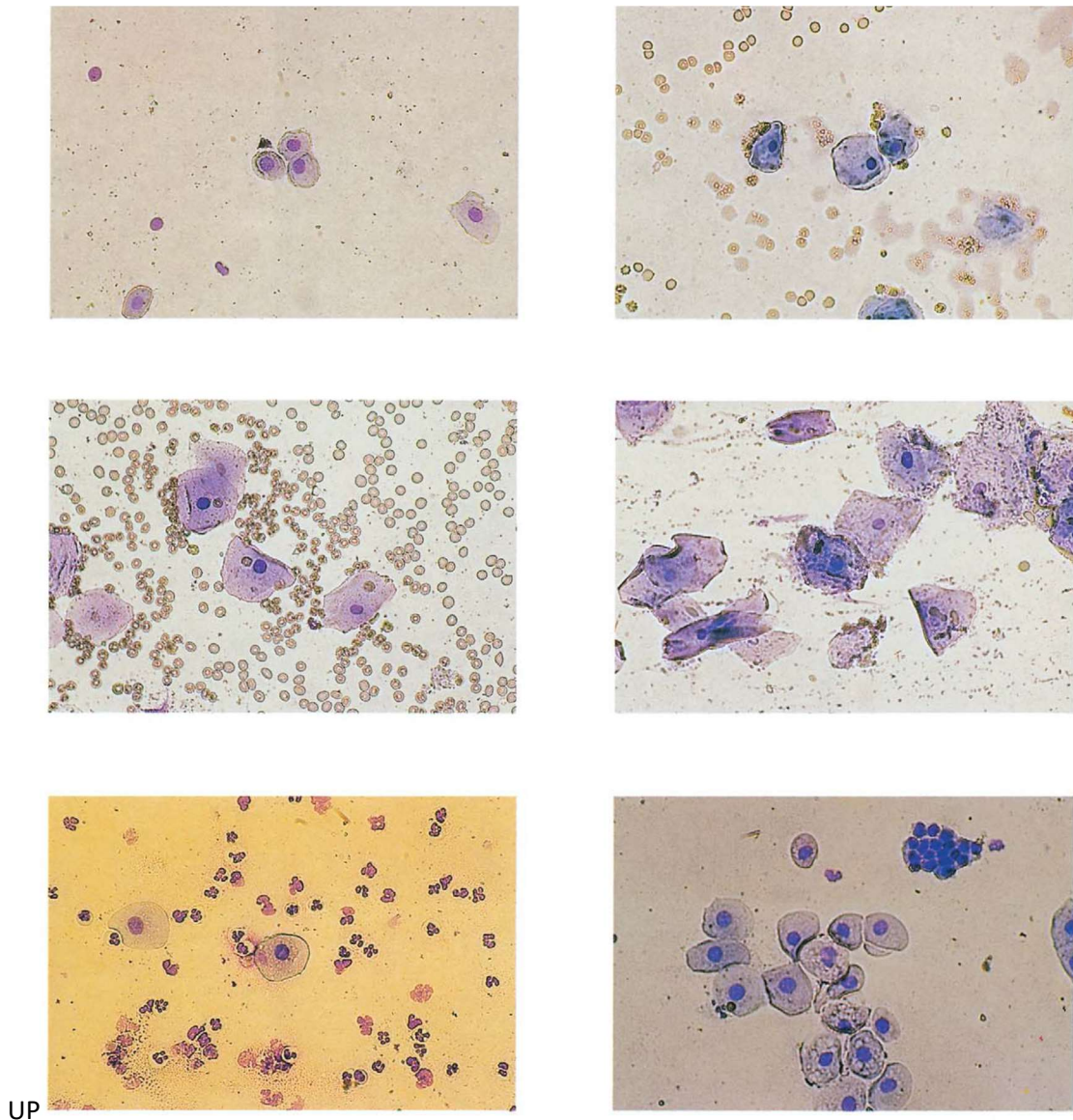
Figure 36 : Autres cellules pouvant être retrouvées dans un frottis vaginal.

En **anœstrus**, l'épithélium vaginal est constitué seulement de quelques couches de petites cellules rondes (**cellules parabasales**) avec un gros noyau bien visible.

En tout début des chaleurs (**début du pro-œstrus**), l'épithélium s'épaissit rapidement. On note de plus un changement de l'aspect des cellules qui le constituent. Elles deviennent plus grandes (**cellules intermédiaires**), plus anguleuses et se chargent progressivement avec une substance cornée, la kératine, qui les rigidifie et les conduit à desquamer : c'est les **cellules superficielles kératinisées** (squames). Leur noyau se condense au centre de la cellule et devient tout petit voir disparaît.

En **œstrus**, le pourcentage de cellules superficielles kératinisées est maximal (> 60 à 80 %). Les cellules ont tendance à se regrouper en amas.

En fin de chaleurs (**fin d'œstrus – début de dioestrus**), en 48 heures, le frottis vaginal redevient constitué majoritairement par des cellules intermédiaires puis parabasales. Des polynucléaires neutrophiles sont également visibles, qui servent à éliminer toutes les cellules mortes. A ce stade, la chienne n'est plus fécondable.



UP

Figure 37 : Photomicrographie des cellules vaginales durant les différents stades du cycle oestral. Les frottis ont été colorés au Wright–Giemsa stain.

- (a) Anoestrus: cellules parabasales et petites intermédiaires.
- (b) Pro-œstrus: petites et grandes cellules intermédiaires et des érythrocytes.
- (c) Début d'œstrus: grandes cellules intermédiaires, cellules épithéliales anucléées et érythrocytes.
- (d) Œstrus: cellules épithéliales anucléées, grandes cellules intermédiaires et des érythrocytes. Le pourcentage des cellules anucléées est élevé.
- (e) Metoestrus: petites cellules intermédiaires et des polynucléaires neutrophiles. Durant le début du metoestrus. De grandes cellules intermediaires peuvent être présentes, plus tard le nombre des cellules parabasales augmente. Souvent, beaucoup de debris sont observés dans le fond.
- (f) Fin de metoestrus : cellules parabasales et intermédiaires sont typiques de ce stade du cycle mais peuvent également être retrouvées pendant l'anoestrus et plus rarement pendant le prooestrus.