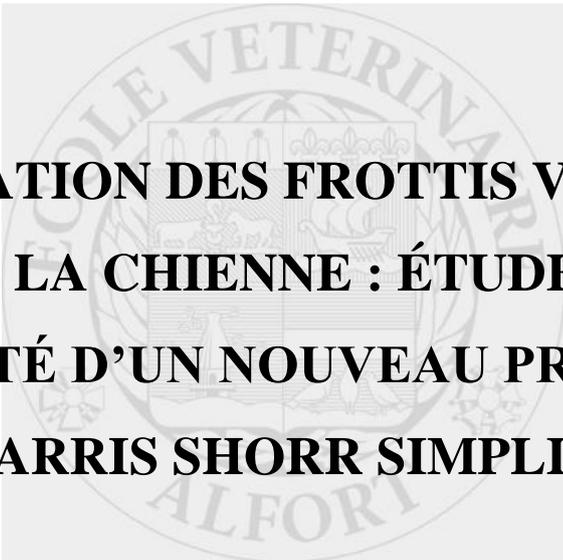


Année 2015



**LA COLORATION DES FROTTIS VAGINAUX
CHEZ LA CHIENNE : ÉTUDE DE
L'EFFICACITÉ D'UN NOUVEAU PROTOCOLE
DE HARRIS SHORR SIMPLIFIÉ**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

Le 21 décembre 2015

Par

Anne-Laure, Marion DUTEY

Née le 18 mars 1989 à Lyon (Rhône)

JURY

Président : P^f Georges GUELLAËN

Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL

Membres

Directeur : D^r Alain FONTBONNE

Maître de conférences en reproduction animale à l'ENVA

Assesseur : D^r Nathalie CORDONNIER

Maître de conférences en Histologie et Anatomie pathologique à l'ENVA

Liste du corps enseignant

Directeur : **M. le Professeur GOGNY Marc**

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs COTARD Jean-Pierre, MIALOT Jean-Paul, MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard.

Professeurs honoraires : Mme et MM. BENET Jean-Jacques, BRUGERE Henri, BRUGERE-PICOUX Jeanne, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CHERMETTE René, CLERC Bernard, CRESPEAU François, M. COURREAU Jean-François, DEPUTTE Bertrand, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, POUCHELON Jean-Louis, ROZIER Jacques.

DÉPARTEMENT D'ÉLEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES ÉQUIDÉS ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. GRANDJEAN Dominique, Professeur-adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

<p>UNITÉ DE CARDIOLOGIE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme CHETBOUL Valérie, Professeur* - Mme GKOUNI Vassiliki, Praticien hospitalier - Mme SECHI-TREHIOU Émilie, Praticien hospitalier <p>UNITÉ DE CLINIQUE ÉQUINE</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. AUDIGIE Fabrice, Professeur - Mme BERTONI Léila, Maître de conférences contractuel - Mme BOURZAC Céline, Maître de conférences contractuel - M. DENOIX Jean-Marie, Professeur - Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier* - Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Praticien hospitalier - Mme TRACHSEL Dagmar, Praticien hospitalier <p>UNITÉ D'IMAGERIE MÉDICALE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme PEY Pascaline, Maître de conférences contractuel - Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier <p>UNITÉ DE MÉDECINE</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. AGUILAR Pablo, Praticien hospitalier - Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences - M. BLOT Stéphane, Professeur* - M. CAMPOS Miguel, Maître de conférences associé - Mme FREICHE-LEGROS Valérie, Praticien hospitalier - Mme MAUREY-GUENEC Christelle, Maître de conférences <p>UNITÉ DE MÉDECINE DE L'ÉLEVAGE ET DU SPORT</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme CLERO Delphine, Maître de conférences contractuel - M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences - M. GRANDJEAN Dominique, Professeur* - Mme MAENHOUDT Cindy, Praticien hospitalier - M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences 	<p>DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. PARAGON Bernard, Professeur <p>DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences <p>UNITÉ DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. BLAGA Radu Gheorghe, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Mme COCHET-FAIVRE Noëlle, Praticien hospitalier - M. GUILLOT Jacques, Professeur* - Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences - M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Mme RISCO CASTILLO Véronica, Maître de conférences (rattachée au DSBP) <p>UNITÉ DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. FAYOLLE Pascal, Professeur - M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences - M. MANASSERO Mathieu, Maître de conférences - M. MOISSONNIER Pierre, Professeur - Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Professeur* - M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences <p>DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme STEBLAJ Barbara, Praticien hospitalier <p>DISCIPLINE : NOUVEAUX ANIMAUX DE COMPAGNIE</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. PIGNON Charly, Praticien hospitalier
--	---

DÉPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Professeur - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur

<p>UNITÉ D'HYGIÈNE QUALITÉ ET SÉCURITÉ DES ALIMENTS</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Professeur - M. BOLNOT François, Maître de conférences* - M. CARLIER Vincent, Professeur <p>UNITÉ DES MALADIES CONTAGIEUSES</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme DUFOUR Barbara, Professeur* - Mme HADDAD/HOANG-XUAN Nadia, Professeur - Mme PRAUD Anne, Maître de conférences - Mme RIVIERE Julie, Maître de conférences contractuel <p>UNITÉ DE PATHOLOGIE DES ANIMAUX DE PRODUCTION</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. ADJOU Karim, Maître de conférences* - M. BELBIS Guillaume, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel - M. MILLEMANN Yves, Professeur - Mme RAVARY-PLUMIOEN Béragère, Maître de conférences - Mme ROUANNE Sophie, Praticien hospitalier 	<p>UNITÉ DE REPRODUCTION ANIMALE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences* - M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Mme MASSE-MOREL Gaëlle, Maître de conférences contractuel - M. MAUFFRE Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel - Mme EL BAY Sarah, Praticien hospitalier <p>UNITÉ DE ZOOTECHNIE, ÉCONOMIE RURALE</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. ARNE Pascal, Maître de conférences - M. BOSSE Philippe, Professeur* - Mme DE PAULA REIS Alline, Maître de conférences contractuel - Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur - Mme LEROY-BARASSIN Isabelle, Maître de conférences - M. PONTER Andrew, Professeur - Mme WOLGUST Valérie, Praticien hospitalier
---	---

DÉPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : M. CHATEAU Henry, Professeur-adjoint : Mme PILOT-STORCK Fanny, Maître de conférences

<p>UNITÉ D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. CHATEAU Henry, Professeur* - Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur - M. DEGUEURCE Christophe, Professeur - Mme ROBERT Céline, Maître de conférences <p>UNITÉ DE BACTÉRIOLOGIE, IMMUNOLOGIE, VIROLOGIE</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur* - Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences - Mme LE ROUX Delphine, Maître de conférences - Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur <p>UNITÉ DE BIOCHIMIE</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences* - Mme LAGRANGE Isabelle, Praticien hospitalier - M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences <p>DISCIPLINE : ÉDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. PHILIPS Pascal, Professeur certifié <p>DISCIPLINE : ÉTHOLOGIE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme GILBERT Caroline, Maître de conférences <p>UNITÉ DE GÉNÉTIQUE MÉDICALE ET MOLÉCULAIRE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme ABIBOL Marie, Maître de conférences - M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur* 	<p>UNITÉ D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences* - M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur - Mme LALOY Ève, Maître de conférences contractuel - M. REYES GOMEZ Édouard, Maître de conférences <p>UNITÉ DE MANAGEMENT, COMMUNICATION, OUTILS SCIENTIFIQUES</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme CONAN Muriel, Professeur certifié (Anglais) - M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences (Biostatistiques, épidémiologie)* - Mme FOURNEL Christelle, Maître de conférences contractuel (Gestion et management) <p>UNITÉ DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur - M. PERROT Sébastien, Maître de conférences - M. TISSIER Renaud, Professeur* <p>UNITÉ DE PHYSIOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur - Mme PILOT-STORCK Fanny, Maître de conférences - M. TIRET Laurent, Professeur*
--	---

* Responsable d'unité

REMERCIEMENTS

**Au Président du jury le Pr Georges Guellaën,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse,
Hommage respectueux.**

**Au Dr Alain Fontbonne, Maître de conférences à l'ENVA
Pour m'avoir confié cette étude,
Pour le temps consacré à la partie expérimentale et à la correction de cette thèse,
Sincères remerciements**

**Au Dr Nathalie Cordonnier, Maître de conférences à l'ENVA
Pour l'attention portée à cette thèse et pour votre relecture très rapide,
Sincères remerciements**

**À Claire Audierne, du laboratoire RAL Diagnostics,
Pour sa confiance et sa disponibilité,
Sincères remerciements**

**À Mr Loïc Desquilbet, Maître de conférences à l'ENVA
Pour son aide précieuse concernant les statistiques.
Sincères remerciements**

**À l'ensemble de l'équipe du CERCA,
Pour leur aide et leur accueil.**

A Marvin pour ton soutien sans faille durant toutes ces années. Que l'avenir nous réserve d'aussi beaux moments que ceux que nous avons déjà eus. Je t'aime.

A mes parents et ma sœur, grâce à vous je réalise enfin mon rêve de petite fille (je serai peut être fleuriste dans une autre vie). Merci pour votre soutien durant ces longues années d'étude.

A ma marraine qui m'a toujours soutenue dans les moments difficiles, mille merci, je n'aurais pu espérer meilleure marraine.

Au reste de ma famille, cousines, oncles, tantes, grandes tantes...

Rien ne vaut une belle famille unie telle que la notre.

A mes amies de toujours Marie, Goy et Manue. Que d'années passées depuis la garderie, pourtant notre amitié est toujours aussi forte malgré la distance. Je vous aime !

A Julie, Pauline et Mathieu, deux supers années au chuva grâce à vous. De nombreux bons souvenirs avec vous et encore bien d'autres à venir je l'espère. Vous êtes toujours les bienvenus à la maison, d'ailleurs les bodyboards n'attendent que vous lorsque les beaux jours reviendront.

A Alexandra pour son aide infiniment précieuse pour la relecture et correction de ma thèse.

Une pensée immense pour **Mounette, Jean-Paul et Marie-Lou** vous qui êtes partis mais que je n'oublie pas.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	1
TABLE DES FIGURES.....	5
TABLE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	11
PREMIÈRE PARTIE, ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE LE CYCLE ŒSTRAL CHEZ LA CHIENNE	15
1 Rappels physiologiques.....	17
1.1 Les phases du cycle sexuel.....	17
1.1.1 Le pro-œstrus.....	17
1.1.2 L'œstrus	18
1.1.3 Le metœstrus	18
1.1.4 L'anœstrus.....	18
1.2 Les modifications hormonales	19
1.2.1 Les hormones hypophysaires	19
1.2.1.1 La FSH	19
1.2.1.2 La LH	21
1.2.1.3 La prolactine.....	23
1.2.2 Les stéroïdes sexuels	23
1.2.2.1 Les œstrogènes	23
1.2.2.2 La progestérone	24
1.2.2.3 Les androgènes	26
1.3 La cytologie vaginale	27
1.3.1.1 Les cellules parabasales.....	29
1.3.1.2 Les cellules intermédiaires	29

1.3.1.3	Les cellules superficielles.....	31
1.3.1.4	Les cellules métœstrales.....	31
1.3.1.5	Les cellules spumeuses ou « <i>foam cells</i> »	32
1.3.1.6	Les cellules superficielles contenant des corps cytoplasmiques	32
1.3.1.7	Les cellules de la fosse clitoridienne.....	33
2	Les frottis vaginaux.....	34
2.1	Technique de réalisation	34
2.2	Les différentes techniques de coloration.....	35
2.2.1	Coloration monochrome dérivée de May-Grünwald-Giemsa.....	35
2.2.2	Les colorations différentielles	37
2.2.2.1	La coloration de Harris Shorr et ses dérivés.....	37
2.2.2.2	La coloration de Papanicolaou	39
2.3	Variation de la cytologie vaginale au cours du cycle.....	41
2.3.1	Le pro-œstrus.....	42
2.3.1.1	Début de pro-œstrus	42
2.3.1.2	Milieu de pro-œstrus	43
2.3.1.3	Fin de pro-œstrus.....	44
2.3.2	L'œstrus	44
2.3.3	Le métœstrus	45
2.3.4	L'anœstrus.....	46
2.4	Les index cytologiques.....	47
2.4.1	L'index éosinophilique (IE).....	47
2.4.2	L'index caryopycnotique (ICP)	48
2.4.3	L'index superficiel (IS).....	49

DEUXIÈME PARTIE, ÉTUDE EXPÉRIMENTALE : ÉTUDE DE L'EFFICACITE D'UN NOUVEAU PROTOCOLE RAPIDE DE COLORATION CHEZ LA CHIENNE.....	51
---	----

1	Objectifs de l'étude.....	53
2	Matériel et méthode	53
3	Analyse statistique	55
3.1	Coefficient de concordance de Lin	55
3.2	Les courbes de Bland et Altman	56
4	Résultats.....	56
4.1	Caractéristiques de la population étudiée.....	56
4.2	Évaluation de la concordance entre les séries de mesures des deux lecteurs	57
4.2.1	Avec la méthode Diagnoestrus®.....	57
4.2.1.1	Coefficient de corrélation de Lin.....	57
4.2.1.2	Graphiques de Bland et Altman	57
4.2.1.2.1	Cellules parabasales	58
4.2.1.2.2	Cellules intermédiaires basophiles	59
4.2.1.2.3	Cellules intermédiaires polychromatophiles	60
4.2.1.2.4	Cellules kératinisées	61
4.2.1.2.5	Cellules acidophiles : IE.....	62
4.2.2	Avec la méthode Diag-Œstro®	62
4.2.2.1	Coefficient de corrélation de Lin.....	62
4.2.2.2	Graphiques de Bland et Altman	63
4.3	Évaluation de concordance entre les séries de mesures des deux méthodes de coloration	64
4.3.1	Lecteur 1.....	64
4.3.1.1	Coefficient de corrélation de Lin.....	64
4.3.1.2	Graphiques de Bland et Altman	65
4.3.2	Lecteur 2.....	66
4.3.2.1	Coefficient de corrélation de Lin.....	66

4.3.2.2	Graphiques de Bland et Altman	66
5	Discussion	68
5.1	Difficultés rencontrés lors de l'expérimentation	68
5.1.1	Étapes de fixation et de coloration	68
5.1.2	Étapes de coloration et de lecture.....	68
5.2	À propos de la concordance entre les séries de mesures des deux opérateurs.....	70
5.2.1	Avec la méthode de coloration D	70
5.2.2	Avec la méthode DO	72
5.3	À propos de la concordance entre les séries de mesures des deux méthodes de coloration	73
	CONCLUSION.....	77
	ANNEXES	79
	BIBLIOGRAPHIE.....	105

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : les phases du cycle œstral (Schaefers-Okkens et Kooistra, 2010)	17
Figure 2 : le cycle œstral chez la chienne (Concannon, 1986)	19
Figure 3 : variations de la concentration de FSH au cours du cycle chez la chienne (Olson <i>et al.</i> , 1982)	20
Figure 4 : pic de FSH comparé au pic de LH chez la chienne (de Gier <i>et al.</i> , 2006)	21
Figure 5 : variations de la concentration en LH dans le sang chez la chienne (Wildt <i>et al.</i> , 1978)	22
Figure 6 : dédoublement du pic de LH dans le sang chez la chienne (de Gier <i>et al.</i> , 2006)	22
Figure 7 : variations de la concentration sanguine en 17β -œstradiol chez la chienne (Wildt <i>et al.</i> , 1979)	24
Figure 8 : variations de la concentration en progestérone chez la chienne (Olson <i>et al.</i> , 1982)	25
Figure 9 : variations de la concentration en testostérone et en androstènedione chez la chienne (Concannon et Castracane, 1985)	26
Figure 10 : schéma des différentes couches de l'épithélium vaginal de la chienne (Dumon, 2009)	27
Figure 11 : les cellules de l'épithélium vaginal observables sur un frottis vaginal (Neveux, 1999)	28
Figure 12 : cellules parabasales colorées avec le protocole Diagnoestrus® au grossissement 1000 (cliché A.-L. Dutey)	29
Figure 13 : grandes cellules intermédiaires basophiles colorées avec le protocole Diagnoestrus® au grossissement 400 (cliché A.-L. Dutey)	30
Figure 14 : cellules intermédiaires polychromatophiles colorées avec le protocole Diagnoestrus® au grossissement 400 (cliché A.-L. Dutey)	30
Figure 15 : cellules superficielles colorées avec le protocole Diagnoestrus® au grossissement 400 (cliché A.-L. Dutey)	31
Figure 16 : cellule metœstrale colorée au May-Grünwald-Giemsa au grossissement 400 (Johnston <i>et al.</i> , 2001)	32
Figure 17 : cellule spumeuse colorée au May-Grünwald-Giemsa au grossissement 1000 (Johnston <i>et al.</i> , 2001)	32
Figure 18 : cellule superficielle présentant des corps cytoplasmiques colorée au May-Grünwald-Giemsa au grossissement 1000 (Johnston <i>et al.</i> , 2001)	33

Figure 19 : cellules clitoridiennes colorée au May-Grünwald-Giemsa au grossissement 400 (Johnston <i>et al.</i> , 2001)	33
Figure 20 : technique de prélèvement par écouvillonnage (Dumon, 2009). 1. Cul de sac utéro-rectal, 2. Fosse clitoridienne. A : intromission verticalement, le long de la paroi postérieure du vagin, de l'écouvillon humidifié avec du sérum physiologique. B : l'écouvillon est ensuite basculé de 90° vers le haut	35
Figure 21 : frottis vaginal coloré avec la méthode Diff-Quick® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)	37
Figure 22 : frottis vaginal coloré avec la méthode Diagnoestrus® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)	39
Figure 23 : évolution de la cytologie vaginale au cours du cycle chez la chienne (Dumon, 2009)	41
Figure 24 : variations de la concentration en leucocytes et en érythrocytes (le jour 1 correspond ici au 1 ^{er} jour du pro-œstrus) (Schutte, 1967b)	42
Figure 25 : frottis de pro-œstrus précoce coloré avec le protocole Diagnoestrus® au grossissement 400 (cliché A.-L. Dutey)	43
Figure 26 : frottis de pro-œstrus moyen coloré avec le protocole Diagnoestrus® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)	43
Figure 27 : frottis de pro-œstrus tardif coloré avec le protocole Diagnoestrus® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)	44
Figure 28 : frottis d'œstrus coloré avec le protocole Diagnoestrus® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)	45
Figure 29 : frottis de metœstrus coloré avec le protocole Diagnoestrus® au grossissement 400 (cliché A.-L. Dutey)	46
Figure 30 : frottis d'anœstrus coloré avec le protocole Diagnoestrus® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)	47
Figure 31 : schéma du phénomène de pycnose (Fontaine, 2011)	49
Figure 32 : courbes de Bland et Altman pour le pourcentage de cellules parabasales avec la méthode D	58
Figure 33 : courbes de Bland et Altman pour le pourcentage de cellules intermédiaires basophiles avec la méthode D	59
Figure 34 : courbes de Bland et Altman pour le pourcentage de cellules intermédiaires polychromatophiles avec la méthode D	60

Figure 35 : courbes de Bland et Altman pour le pourcentage de cellules kératinisées avec la méthode D	61
Figure 36 : courbes de Bland et Altman pour l'index éosinophilique avec la méthode D	62
Figure 37 : frottis coloré avec la méthode Diagnoestrus® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)	69
Figure 38 : frottis coloré avec la méthode DO au grossissement 100 provenant de la même chienne que le frottis de la figure 36 (cliché A.-L. Dutey)	69

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : protocole de coloration Diff-Quick® (notice d'utilisation Diff-Quick®)	36
Tableau 2 : protocole de coloration de Harris Shorr (Neveux 1999)	38
Tableau 3 : protocole de coloration de Papanicolaou (d'après cours d'anatomie pathologique du CHU Necker). (1) éosine (2) mélange de vert lumière et de brun de Bismarck	40
Tableau 4 : comparaison des 2 méthodes de coloration utilisées dans l'étude : Diagnoestrus® et Diag- (Estro®)	54
Tableau 5 : interprétation des valeurs du coefficient de concordance de Lin (Lin <i>et al</i> , 2007)	55
Tableau 6 : concordance entre le pourcentage de cellules comptées par les 2 lecteurs avec la méthode D (voir la liste des abréviations page 9)	57
Tableau 7 : concordance entre le pourcentage de cellules comptées par les 2 lecteurs avec la méthode DO par le CCL	63
Tableau 8 : biais et limites d'agrément pour les différents types de cellules avec la méthode DO	63
Tableau 9 : concordance entre les pourcentages de cellules comptés avec les 2 méthodes par le lecteur 1 par le CCL	64
Tableau 10 : biais et limites d'agrément pour les différents types de cellules du lecteur 1	65
Tableau 11 : concordance entre les pourcentages de cellules comptés avec les 2 méthodes par le lecteur 2 par le CCL	66
Tableau 12 : biais et limites d'agrément pour les différents types de cellules du lecteur 2	66
Tableau 13 : comparaison des IE de chaque lecteur avec la méthode D	71
Tableau 14 : moyennes (moy) des pourcentages en IPC et kérat des deux lecteurs en fonction de la méthode de coloration	73
Tableau 15 : biais et limites d'agrément de l'IE avec un agrément de 90 %	74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CCL : coefficient de corrélation de Lin

D : diagnoestrus®

DO : diag-Œstro®

FSH : follicule stimulating hormone

GnRH : gonadotropin releasing hormone

IB : cellule intermédiaire basophile

IC : intervalle de confiance

ICP : index caryopycnotique

IE : index éosinophilique

IPC : cellule intermédiaire polychromatophile

IS : index superficiel

Kérat : cellule kératinisée

LH : luteinizing hormone

Moy : moyenne

Pb : cellule parabasale

INTRODUCTION

Le frottis vaginal est une méthode rapide, simple et peu coûteuse permettant de savoir rapidement si l'organisme est sous imprégnation œstrogénique. Cet acte présente dès lors un intérêt chez les chiennes en reproduction, mais aussi chez celles 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.

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.

Il existe une coloration monochrome, de type May-Grünwald (RAL 555®, Laboratoires RAL, France) que certains vétérinaires emploient, mais il est plus difficile de détecter une légère imprégnation œstrogénique pour des vétérinaires peu familiarisés à la cytologie. Il existe pourtant dans le commerce une coloration polychrome dérivée de la coloration de Harris Shorr (Diagnoestrus®, Laboratoires RAL, France). Celle-ci permet une lecture simple : la kératine étant colorée en rouge par cette coloration, lorsque l'organisme est sous influence d'œstrogènes, le cytoplasme des cellules épithéliales vaginales est partiellement ou totalement coloré en rouge. Cette forme commerciale est cependant très peu utilisée par les vétérinaires car elle est longue à réaliser (plus de 15 minutes), ce qui rend son application très difficile au cours d'une consultation.

Un nouveau protocole de coloration rapide a été proposé par les laboratoires RAL. Il consiste en une simplification de la technique de coloration Diagnoestrus® afin de la raccourcir à deux minutes au lieu de 15 et ainsi de la rendre applicable en clientèle vétérinaire quotidienne.

Le but de notre étude est de vérifier si ce nouveau protocole est fiable en comparant les résultats obtenus avec cette coloration rapide à ceux donnés par la technique de coloration Diagnoestrus®.

Nous aborderons, dans une première partie bibliographique, la physiologie sexuelle de la chienne et ses implications cytologiques notamment lors de la réalisation d'un frottis vaginal, ainsi que les principaux protocoles de coloration utilisés lors de la réalisation de cet examen. Une seconde partie sera consacrée à notre étude expérimentale.

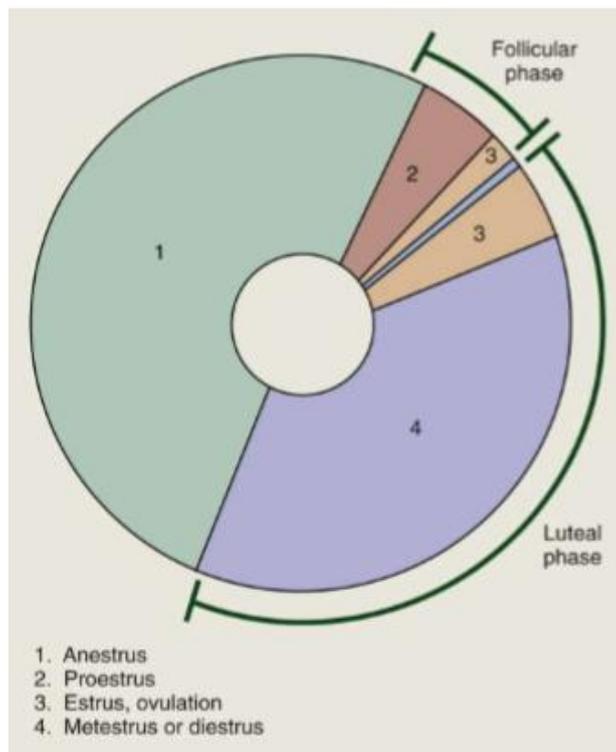
PREMIÈRE PARTIE, ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE
LE CYCLE ŒSTRAL CHEZ LA CHIENNE

1 Rappels physiologiques

1.1 Les phases du cycle sexuel

Le cycle œstral se compose de quatre périodes distinctes définies dès 1900 par Heape : le pro-œstrus, l'œstrus, le metœstrus et l'anœstrus (Figure 1).

Figure 1 : les phases du cycle œstral (Schaefers-Okkens et Kooistra, 2010)



La chienne présente un cycle mono-œstral ce qui signifie qu'elle ne présente qu'un seul œstrus, c'est-à-dire une seule période fertile par cycle.

Deux cycles en moyenne sont observés chaque année.

Chaque période sexuelle est séparée par une période de repos, qualifiée d'interœstrus, d'une durée d'environ 7 mois, mais sa durée est très variable d'une chienne à l'autre, puisqu'elle peut être comprise entre 5 et 11 mois.

1.1.1 Le pro-œstrus

Le pro-œstrus débute avec le premier jour d'apparition d'écoulements vulvaires sanguins et se termine avec l'acceptation du mâle.

Cette période peut durer entre 3 et 21 jours, avec une moyenne de 9 jours (Concannon *et al.*, 1989).

Un œdème de la vulve est observé ainsi que des écoulements sanguins s'expliquant par l'augmentation de la vascularisation et de la perméabilité capillaire de l'utérus. Les hématies passent alors dans la lumière utérine par diapédèse.

La femelle attire le mâle par des phéromones sexuelles excrétées dans les urines, dans les sécrétions vulvaires et dans les sécrétions des sacs anaux. Cependant, durant toute la période de pro-œstrus l'accouplement sera refusé.

1.1.2 L'œstrus

L'œstrus commence le premier jour où la femelle accepte le mâle jusqu'au jour où elle le refuse à nouveau. Cette période peut durer entre 3 et 21 jours avec une moyenne de 9 jours (Concannon *et al.*, 1989).

Pendant cette période, la taille de la vulve et les sécrétions vulvaires diminuent.

L'ensemble pro-œstrus/œstrus correspond à la période communément appelée « chaleurs ».

L'ovulation a lieu pendant l'œstrus. Cependant, il existe une très grande variabilité concernant le moment de l'ovulation par rapport au début du cycle sexuel (England et Concannon, 2002).

Selon Concannon *et al.* (1977), l'ovulation a lieu entre 1 jour avant et 5 jours après le début de l'œstrus.

D'après Lévy et Fontbonne (2007), certaines chiennes vont ovuler précocement au cinquième jour des chaleurs alors que d'autres ovuleront plus tardivement au trentième jour.

Il est donc impossible de prédire la date de l'ovulation sans examens complémentaires.

1.1.3 Le metœstrus

Le metœstrus correspond à la durée de vie du corps jaune dans l'ovaire, qui est identique, que la chienne soit gestante ou non : c'est la phase lutéale du cycle.

Il commence lorsque la femelle refuse le mâle et se termine à la fin de la régénération de l'endomètre. Sa durée est d'environ 70 jours avec un intervalle de 55 à 90 jours (Schaefers-Okkens, 2010).

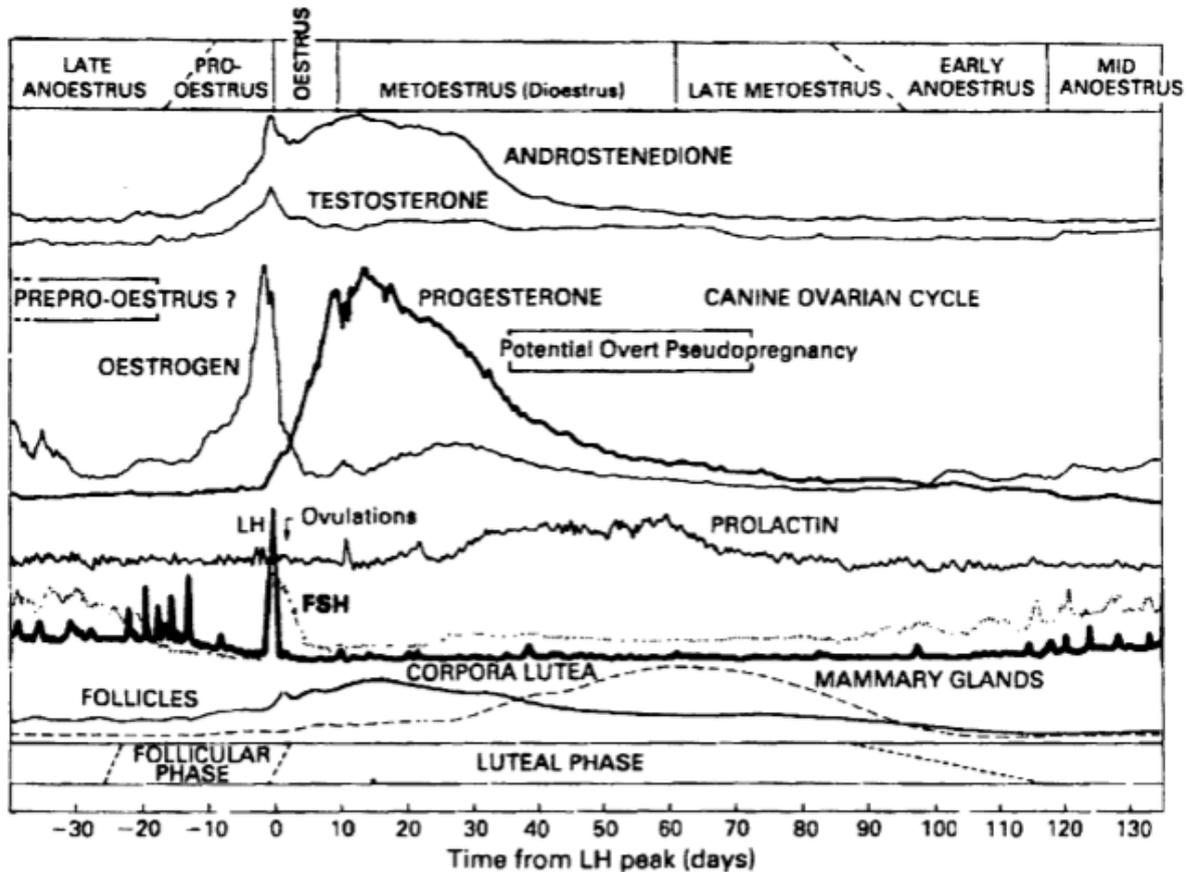
1.1.4 L'anœstrus

L'anœstrus correspond à la période de repos sexuel. Il peut durer entre 4 à 12 mois avec une moyenne de 7 mois (Schaefers-Okkens, 2010). C'est cette phase qui est responsable de la grande variabilité de la durée du cycle sexuel chez la chienne.

1.2 Les modifications hormonales

L'ensemble des modifications hormonales qui seront décrites dans ce paragraphe sont résumées ci-dessous (Figure 2).

Figure 2 : le cycle œstral chez la chienne (Concannon, 1986)



1.2.1 Les hormones hypophysaires

1.2.1.1 La FSH

La FSH (Follicule Stimulating Hormone) est sécrétée par le lobe antérieur de l'hypophyse de manière pulsatile. Elle est sous le contrôle de l'hypothalamus par l'intermédiaire de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone). Elle stimule la folliculogénèse et la production d'œstrogènes par les cellules de la thèque interne des follicules ovariens.

Sa concentration sanguine augmente pendant l'anoestrus pour atteindre des valeurs élevées en fin d'anoestrus allant de 50 à 400 ng/ml et en moyenne de 140 ng/ml, semblables à celles atteintes lors du pic pré-ovulatoire (Concannon, 2011). Il a été supposé que ce mécanisme était nécessaire au recrutement folliculaire pour le cycle suivant (Johnston, 2001)(Okkens et Kooistra, 2006). Une fois les follicules recrutés, ces derniers régulent la sécrétion de gonadotrophines hypophysaires via un *feedback* négatif (Johnston, 2001).

La concentration en FSH diminue ensuite régulièrement jusqu'à atteindre 1 à 4 ng/ml pendant le pro-œstrus (Onclin *et al.*, 2002). Cette baisse progressive est due au *feedback* négatif exercé par les œstrogènes et l'inhibine produits par les follicules ovariens (Figure 3).

Un pic pré-ovulatoire est ensuite observé en réponse à un *feedback* positif consécutif à la baisse de la concentration en œstrogènes et à l'augmentation de la concentration en progestérone (Concannon, 1986).

Ce pic pré-ovulatoire peut être concomitant ou non avec le pic de LH (Luteinizing hormone). Dans l'étude d'Onclin *et al.* (2002), le pic de FSH a été observé 12 heures après celui de LH.

Au pic, la FSH atteint des valeurs sanguines moyennes d'environ 13,8 U/l et la durée du pic est d'environ 110 heures (de Gier *et al.*, 2006).

La FSH possède une demi-vie plus importante que la LH, ce qui explique que la durée du pic est environ trois fois plus longue que celle du pic de LH (Figure 4).

Après un retour à des valeurs basales, la concentration de FSH augmente légèrement à partir de la fin de l'œstrus avec des valeurs situées entre 3 et 6 ng/ml. Ces valeurs restent stables pendant le métœstrus (Onclin *et al.*, 2002).

Figure 3 : variations de la concentration de FSH au cours du cycle chez la chienne (Olson *et al.*, 1982)

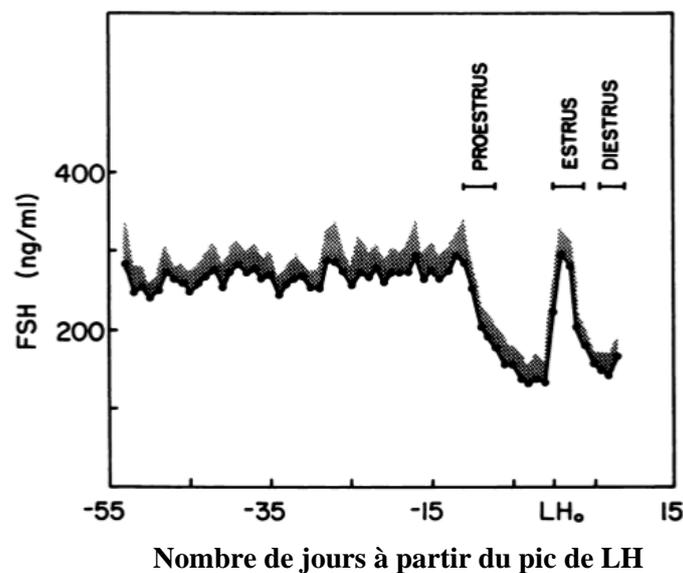
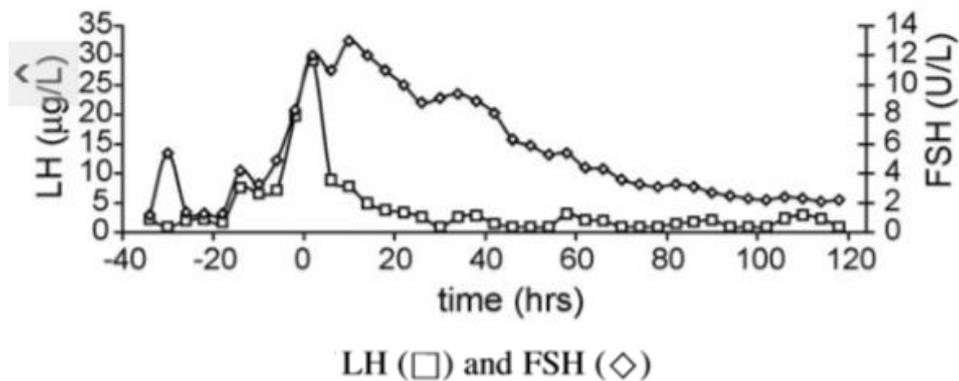


Figure 4 : pic de FSH comparé au pic de LH chez la chienne (de Gier *et al.*, 2006)



1.2.1.2 La LH

La LH est aussi une hormone synthétisée par le lobe antérieur de l'hypophyse et sécrétée de façon pulsatile sous contrôle hypothalamique par l'intermédiaire de la GnRH. Cette hormone provoque l'ovulation, stimule la stéroïdogénèse et est nécessaire au maintien du corps jaune (Feldman et Nelson, 2004).

Pendant l'anœstrus et le pro-œstrus, la concentration sanguine de LH reste à des valeurs basales inférieures

à 1-2 ng/ml. Un pic atteignant des valeurs d'environ 6,1 ng/ml est détecté 3 à 9,5 jours avant le pic de LH par Wildt *et al* (1978), ce dernier peut être associé à la lutéinisation pré-ovulatoire et à la sécrétion précoce de progestérone.

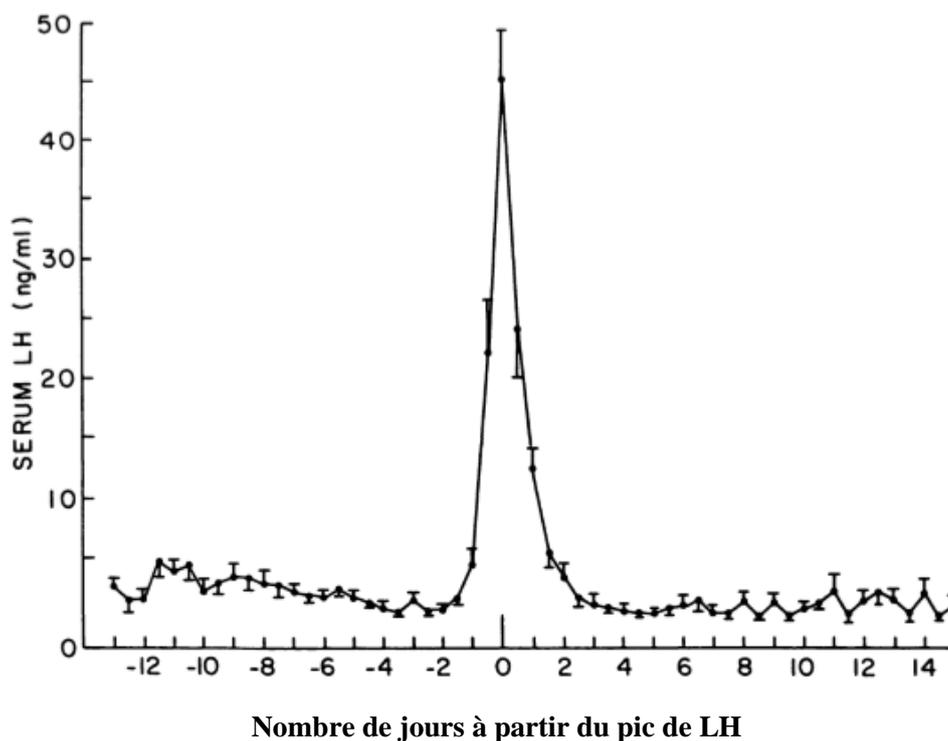
Le pic de LH peut être concomitant au premier jour de l'œstrus comportemental ou apparaître de façon très variable selon les auteurs. Selon Concannon *et al* (1989), l'œstrus peut précéder de 2-3 jours le pic de LH ou le suivre de 4-5 jours.

Comme pour la FSH, un pic pré-ovulatoire de LH est observé en réponse à un *feedback* positif, consécutif à la baisse de la concentration en œstrogènes et à l'augmentation de la concentration en progestérone.

Au pic, la LH atteint des valeurs d'environ 18,7 ng/mL et dure en moyenne 36 heures. Les valeurs entre 72 et 28 heures avant et 100 à 144 heures après le pic de LH sont similaires et atteignent environ 1,9 ng/mL (de Gier *et al.*, 2006) (Figure 5).

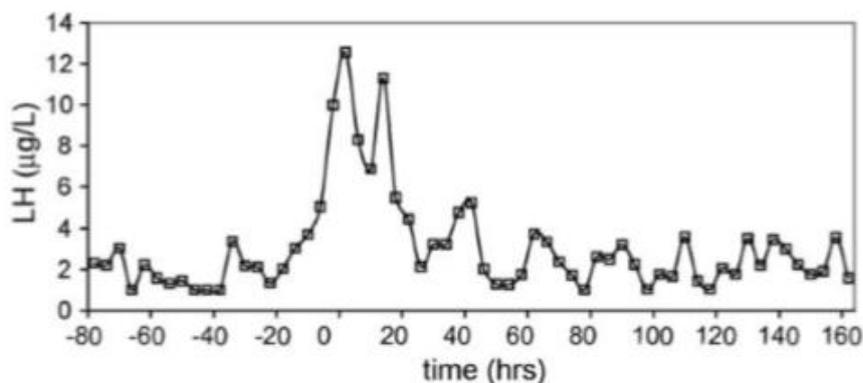
Le pic de LH est considéré comme le jour de référence et donc le temps zéro du cycle œstral chez la chienne.

Figure 5 : variations de la concentration en LH dans le sang chez la chienne (Wildt *et al.*, 1978)



Certains auteurs ont observé l'existence de pics de LH dédoublés avec des valeurs plus faibles entre les 2 pics durant environ 4 heures (de Gier *et al.*, 2006) (Figure 6).

Figure 6 : dédoublement du pic de LH dans le sang chez la chienne (de Gier *et al.*, 2006)



Le pic de LH permet de prédire le moment de l'ovulation. D'après Wildt *et al* (1978), 77,2 % des ovulations ont lieu dans les 24 à 72 heures après le pic de LH; selon Phemister *et al* (1973) l'ovulation a lieu 2 jours après le pic de LH. Il est très souvent admis que l'ovulation ait lieu 2 jours après le pic de LH.

Pendant le métœstrus, la concentration en LH est plutôt stable à environ 5 ng/ml (Smith et Mc Donald, 1974).

1.2.1.3 La prolactine

La prolactine est une glycoprotéine sécrétée de façon pulsatile par le lobe antérieur de l'hypophyse ; elle est antagonisée par la dopamine. Elle a une action sur la lactation et sur le développement de la mamelle, mais possède aussi une action lutéotrope comme la progestérone (Concannon, 1993).

La prolactine présente des valeurs sanguines variables, mais basses, d'environ 3,9 µg/l pendant le pro-œstrus et l'œstrus (de Gier *et al.*, 2006).

Cette hormone pourrait avoir une influence sur l'apparition de la fin du pro-œstrus, et donc de l'initiation de l'œstrus. La suppression de la prolactine lors de l'œstrus précoce via l'utilisation d'un agoniste de la dopamine : la bromocriptine induit l'apparition du pro-œstrus de manière précoce (Beijerink *et al.*, 2003; Van Haften *et al.*, 1989).

Sa concentration augmente lors du metœstrus tardif, entre le 50^e et le 70^e jour du metœstrus, pour atteindre des valeurs 2 à 3 fois plus élevées que lors du metœstrus précoce (Fernandes *et al.*, 1987).

1.2.2 Les stéroïdes sexuels

1.2.2.1 Les œstrogènes

La famille des œstrogènes regroupe plusieurs molécules dont le 17β-œstradiol. Par la suite, nous parlerons essentiellement de cette molécule car elle correspond à la forme active de la famille des œstrogènes.

Le pro-œstrus est marqué par la croissance des follicules ovariens. Ces derniers synthétisent les œstrogènes, d'où l'augmentation des taux circulants lors de cette période.

L'imprégnation œstrogénique est responsable de l'œdème et des écoulements vulvaires, de l'attraction des mâles, des remaniements utérins et de la kératinisation des cellules de l'épithélium vaginal.

La concentration en 17β-œstradiol augmente environ 15 jours avant l'apparition du pic de LH.

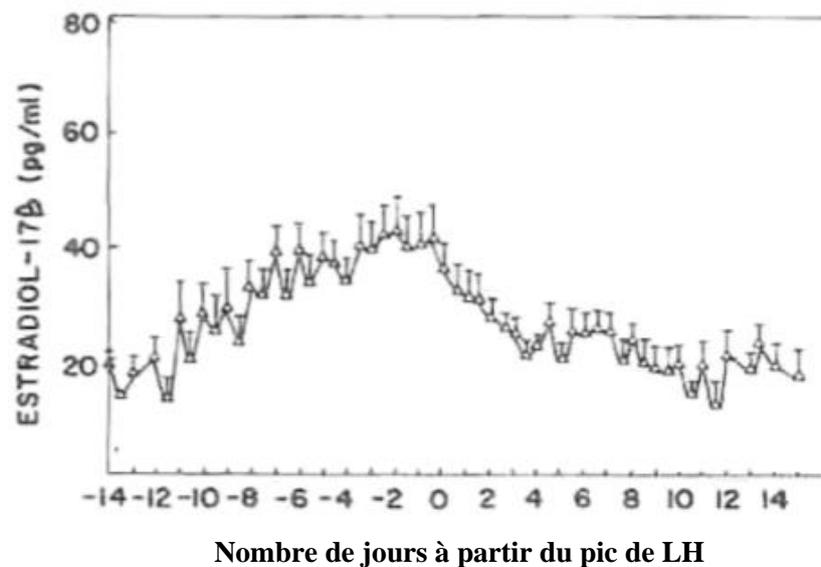
En début de pro-œstrus, les valeurs sont supérieures à 15 pg/ml et atteignent en général 25 pg/ml (Feldman et Nelson, 2004).

La concentration en 17β-œstradiol atteint un pic à 79,1 pg/ml, 24 à 48 heures avant le pic de LH et l'œstrus (Onclin *et al.*, 2002).

Lors du pic de LH, la concentration en œstrogènes a déjà diminué à environ 44,4 pg/ml. Cette baisse stimule la mise en place de l'œstrus. Une différence significative de la concentration en œstrogènes a été mise en évidence par Rota *et al* (2007) entre le jour précédent l'acceptation du mâle avec une concentration moyenne de 33,1 pg/ml et le premier jour de la réceptivité sexuelle avec une concentration d'environ 16,5 pg/ml (Rota *et al.*, 2007).

La concentration en 17β-œstradiol continue ensuite de diminuer jusqu'à des valeurs basales de 6,8 pg/ml (Onclin *et al.*, 2002) (Figure 7).

Figure 7 : variations de la concentration sanguine en 17β -œstradiol chez la chienne (Wildt *et al.*, 1979)



Pendant le métœstrus et l'anœstrus, les œstrogènes présentent des concentrations basales entre 5 et 15 pg/ml (Feldman et Nelson, 2004).

Il a été montré que certaines chiennes présentaient des taux élevés pendant le métœstrus. L'origine en reste inconnue, mais il est supposé que les œstrogènes sont fabriqués par le corps jaune. En effet, chez d'autres espèces, comme le lapin ou le rat, les œstrogènes synthétisés sont sécrétés par les cellules lutéales (Onclin *et al.*, 2002).

Pendant l'anœstrus, il existe des fluctuations de la concentration en œstrogènes dues à l'existence de vagues de développement folliculaire. Ces follicules synthétisent et sécrètent des œstrogènes causant des augmentations mineures de concentration. Ces follicules non matures régressent par la suite provoquant une diminution de la production d'œstrogènes.

1.2.2.2 La progestérogène

Le dosage de la progestérogène est important dans le suivi des chaleurs, il permet de déterminer le moment de l'ovulation.

Elle est synthétisée par les cellules du corps jaune, mais aussi par les follicules pré-ovulatoires, ce qui est une particularité du cycle œstral chez la chienne. La progestérogène commence donc à être synthétisée avant l'ovulation.

Cette hormone permet la préparation de l'utérus en prévision d'une éventuelle gestation.

Pendant l'anœstrus, la progestérogène présente des valeurs inférieures à 1 ng/ml. Sa concentration augmente 24 à 72 heures avant la fin du pro-œstrus, mais, d'après certains auteurs, cette dernière peut augmenter avant ou après le pic de LH.

Le passage de la fin du pro-œstrus au début de l'œstrus est marqué par la baisse de la concentration en œstrogènes, concomitante à l'augmentation de la concentration en progestérone. C'est ce phénomène qui permet l'acceptation de l'accouplement et l'apparition du pic de LH et FSH par un rétrocontrôle positif sur l'hypothalamus et l'hypophyse.

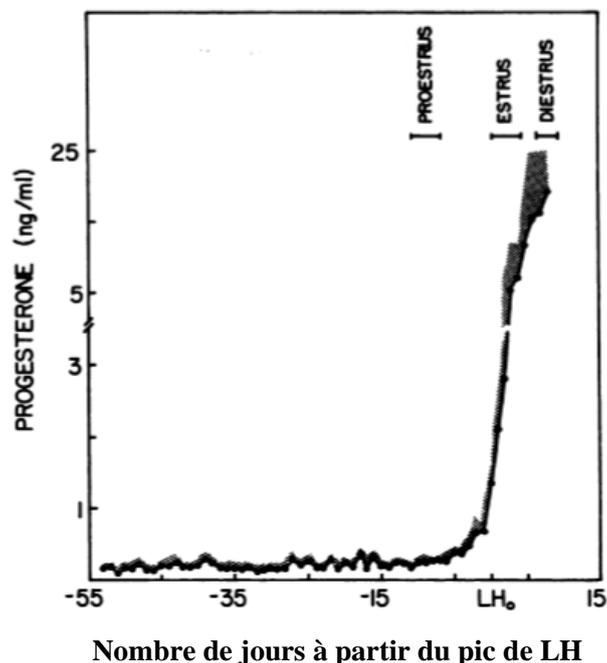
Au pic de LH, la concentration en progestérone augmente car la LH stimule la maturation finale des follicules ovariens entraînant la lutéinisation pré-ovulatoire propre à la chienne. Elle présente des valeurs comprises entre 2 et 4 ng/ml (Olson *et al.*, 1982) (Figure 8).

Deux à trois jours après avoir dépassé les valeurs inférieures à 1 ng/mL, la concentration en progestérone augmente à nouveau avec des valeurs comprises entre 4 et 10 ng/ml le jour de l'ovulation (Feldman et Nelson, 2004). La progestéronémie continue d'augmenter durant 1 à 3 semaines après l'ovulation.

Lors du métœstrus, la progestéronémie atteint un plateau à des valeurs élevées entre 15 et 90 ng/ml, 15 à 30 jours après le pic de LH (Concannon *et al.*, 1989). Ces valeurs élevées de progestérone entraînent un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse, inhibant la synthèse d'hormone gonadotrope.

La progestérone diminue ensuite progressivement pour atteindre des valeurs basales entre 55 et 90 jours après le pic de LH avec une moyenne de 70 jours (Concannon, 2011). Le mécanisme entraînant la régression du corps jaune chez la chienne reste encore inconnu.

Figure 8 : variations de la concentration en progestérone chez la chienne (Olson *et al.*, 1982)



1.2.2.3 Les androgènes

Deux hormones de la famille des androgènes sont à considérer au cours du cycle œstral : l'androstènedione et la testostérone.

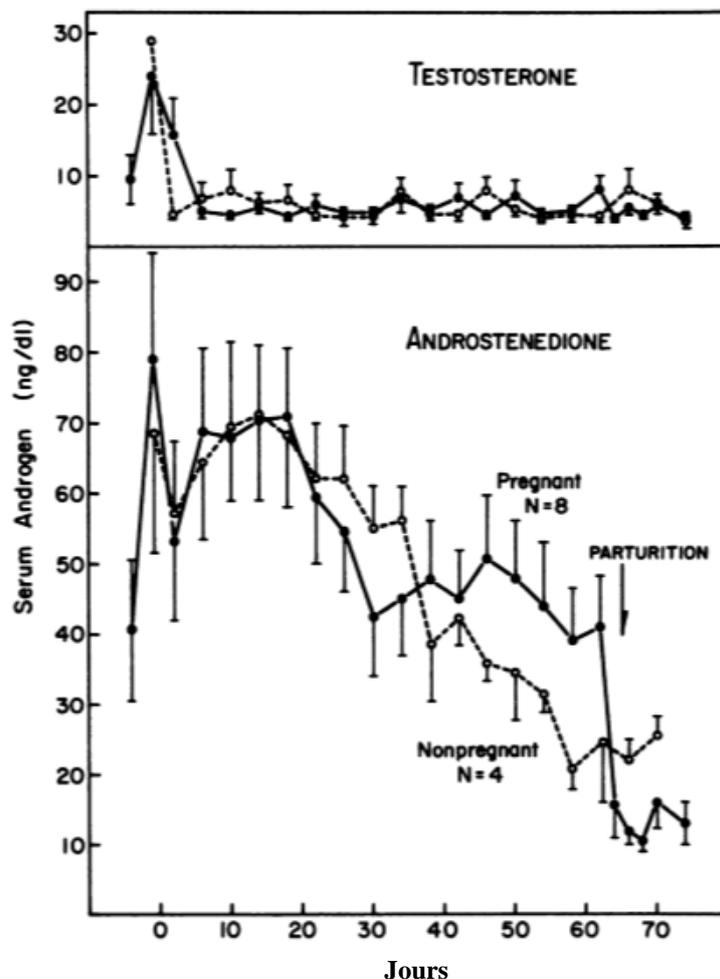
L'androstènedione prédomine sur la testostérone ; elle présente des concentrations sanguines chez la chienne plus élevées que la seconde.

La concentration en androstènedione augmente lors du pro-œstrus et atteint des valeurs maximales d'environ 0,73 ng/ml à l'approche du pic de LH ; puis cette concentration diminue pendant l'œstrus. Elle augmente à nouveau pour atteindre des valeurs élevées de 0,4 à 1,27 ng/ml, 6 à 18 jours après le pic de LH (Concannon et Castracane, 1985). La concentration en androstènedione diminue lentement 20 jours après le pic de LH.

La concentration en testostérone augmente pendant le pro-œstrus tardif et atteint des valeurs maximales de 0,29 ng/ml au pic de LH. Elle diminue ensuite pendant le metœstrus et reste basse, à des valeurs inférieures à 0,1 ng/ml pendant toute cette phase et pendant l'anœstrus (Concannon et Castracane, 1985 ; Olson *et al.*, 1984).

Les variations des taux de ces deux hormones sont présentées dans la figure ci-dessous (Figure 9).

Figure 9 : variations de la concentration en testostérone et en androstènedione chez la chienne (Concannon et Castracane, 1985)



Les modifications hormonales sont responsables de modifications cytologiques au niveau de l'épithélium vaginal.

1.3 La cytologie vaginale

La muqueuse vaginale est recouverte par un épithélium malpighien de type stratifié pavimenteux non kératinisé. Il est formé de plusieurs couches ; de la plus profonde à la plus superficielle, on observe (Figure 10) :

- une couche de cellules basales, attachées à la lame basale, responsables de l'étape de prolifération. On ne les rencontre presque jamais sur les frottis vaginaux (Concannon et Digregorio, 1986) ;
- une couche de cellules parabasales ;
- une couche de cellules intermédiaires ;
- une couche de cellules superficielles.

Les différentes couches reflètent les différentes étapes subies par les cellules épithéliales vaginales qui sont la prolifération, la différenciation et l'exfoliation (Schutte, 1967a).

L'épaisseur de cet épithélium varie sous l'effet de la stimulation hormonale. L'imprégnation en œstrogènes provoque la kératinisation des cellules épithéliales.

Les différents types cellulaires (Figure 11) observés lors de cytologie vaginale nous permettent de situer le stade du cycle sexuel de la chienne.

Figure 10 : schéma des différentes couches de l'épithélium vaginal de la chienne (Dumon, 2009)

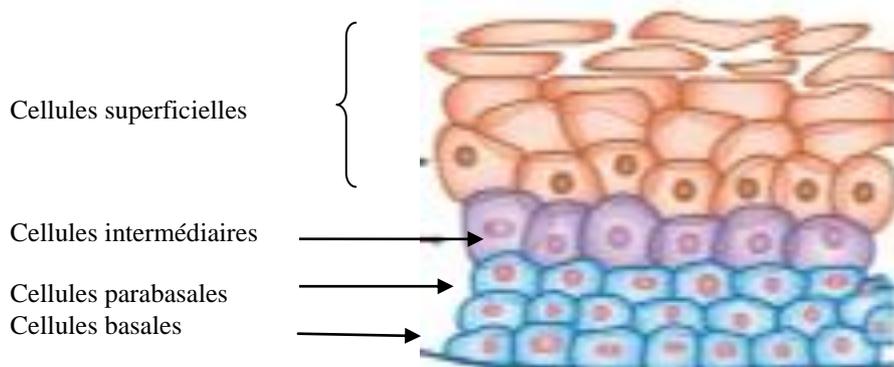


Figure 11 : les cellules de l'épithélium vaginal observables sur un frottis vaginal (Neveux, 1999)



Dans les prochains paragraphes, la description des différentes cellules prendra en compte leur affinité tinctoriale avec la coloration de Harris Shorr.

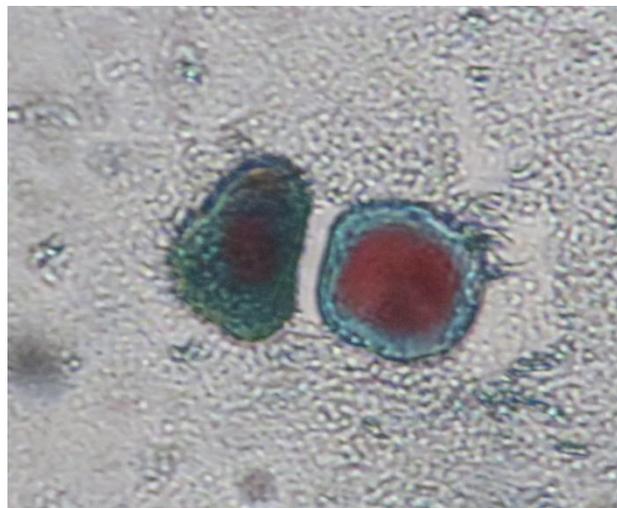
1.3.1.1 Les cellules parabasales

Ce sont les cellules les plus profondes de l'épithélium vaginal habituellement visualisées sur un frottis vaginal. Elles sont de petite taille, environ 10 à 20 μm de diamètre, et de forme ronde (Figure 12). Elles peuvent aussi présenter une forme allongée ; on parle alors de cellules en colonne.

Elles possèdent un noyau bien rond, volumineux et peu de cytoplasme. Le rapport nucléocytoplasmique est alors élevé. Le diamètre nucléaire représente plus de 45 % du diamètre cellulaire et peut atteindre 90 % de ce dernier (Concannon et Digregorio, 1986).

Ce sont des cellules basophiles c'est-à-dire qu'elles présentent une affinité pour les colorants basiques, elles apparaissent bleues après coloration.

Figure 12 : cellules parabasales colorées avec le protocole Diaconostrus® au grossissement 1000 (cliché A.-L. Dutey)



1.3.1.2 Les cellules intermédiaires

On peut les classer en petites cellules intermédiaires et grandes cellules intermédiaires qui correspondent aux différentes étapes de maturation :

- Les petites cellules intermédiaires ont un diamètre allant de 20 à 60 μm . Elles passent d'une forme ronde à une forme ovale. Leur noyau est toujours volumineux, mais le rapport nucléocytoplasmique est moins élevé que celui des cellules parabasales; le diamètre nucléaire représente entre 30 à 35 % du diamètre cellulaire. Ces cellules sont basophiles.
- Les grandes cellules intermédiaires représentent le stade de transition entre les petites cellules intermédiaires et les cellules superficielles.

Elles sont de taille plus importante que les petites cellules intermédiaires, entre 40 et 75 μm de diamètre et présentent des bords anguleux. Le noyau est toujours visible et de forme

ronde ; le rapport nucléo-cytoplasmique est encore en baisse. Le diamètre nucléaire représente entre 15 et 35 % du diamètre cellulaire (Concannon et Digregorio, 1986) (Figure 13).

Les cellules peuvent apparaître basophiles, polychromatophiles (à la fois basophile et acidophile) ou acidophiles en fonction de l'état d'avancement de la kératinisation (Figure 14). Les cellules acidophiles présentent une affinité pour les colorants acides, elles prennent une coloration rouge-orangée lors de coloration.

Figure 13 : grandes cellules intermédiaires basophiles colorées avec le protocole Diaconostrus® au grossissement 400 (cliché A.-L. Dutey)

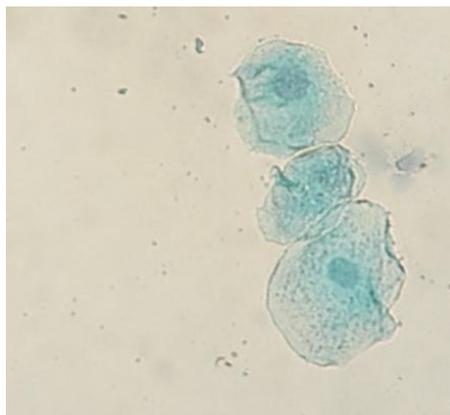
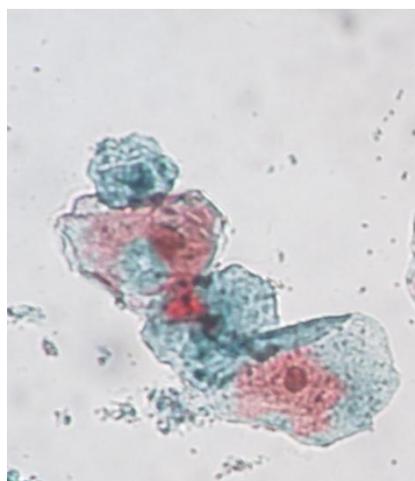


Figure 14 : cellules intermédiaires polychromatophiles colorées avec le protocole Diaconostrus® au grossissement 400 (cliché A.-L. Dutey)



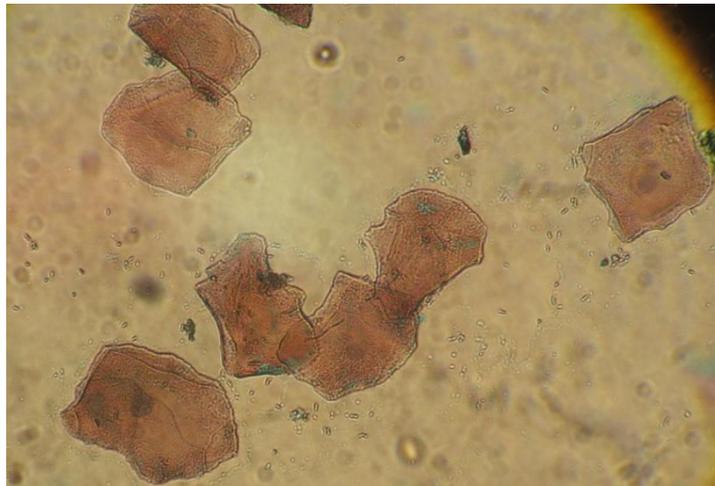
1.3.1.3 Les cellules superficielles

Elles sont aussi appelées cellules kératinisées.

Ce sont les plus grandes cellules de l'épithélium vaginal, avec un diamètre compris entre 40 et 75 μm . Les bords de ces cellules sont très anguleux et plissés. On parle de cellules en « corn flakes » (Figure 15).

Le noyau peut être encore présent, pycnotique ou absent et représente moins de 15 % du diamètre cellulaire. Les cellules anucléées sont aussi appelées squames. Les cellules superficielles présentant un noyau sont aussi qualifiées de cellules intermédiaires superficielles. Elles représentent une forme où les œstrogènes n'ont pas eu leur effet maximal sur la muqueuse vaginale. Cependant, aucune étude n'a montré de relation entre le fait de présenter de telles cellules et des problèmes de fertilité (Feldman et Nelson, 2004).

Figure 15 : cellules superficielles colorées avec le protocole Diaagnoestrus® au grossissement 400 (cliché A.-L. Dutey)



1.3.1.4 Les cellules metœstrales

Ce sont de grandes cellules intermédiaires présentant un ou plusieurs granulocytes neutrophiles dans leur cytoplasme (Figure 16). Ces cellules sont observées lors du metœstrus précoce.

Dans de rares cas, elles sont observées lors du pro-œstrus précoce (Feldman et Nelson, 2004).

Ces cellules reflètent les propriétés de phagocytose de l'épithélium vaginal.

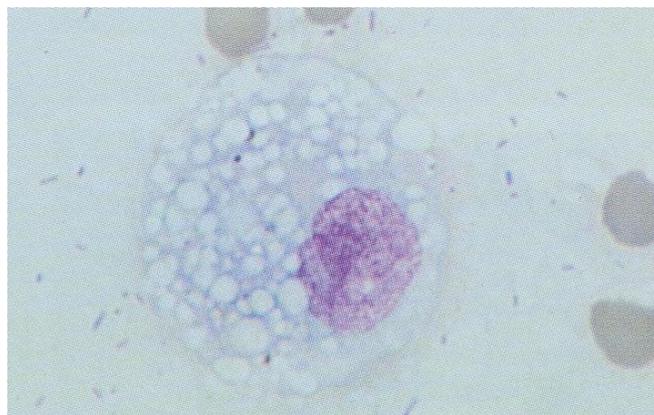
Figure 16 : cellule métœstrale colorée au May-Grünwald-Giemsa au grossissement 400 (Johnston *et al.*, 2001)



1.3.1.5 Les cellules spumeuses ou « foam cells »

Ce sont des cellules parabasales ou intermédiaires présentant des vacuoles cytoplasmiques (Figure 17). Les cellules spumeuses peuvent être observées lors du métœstrus ou de l'anœstrus (Johnston *et al.*, 2001). Leur signification est inconnue.

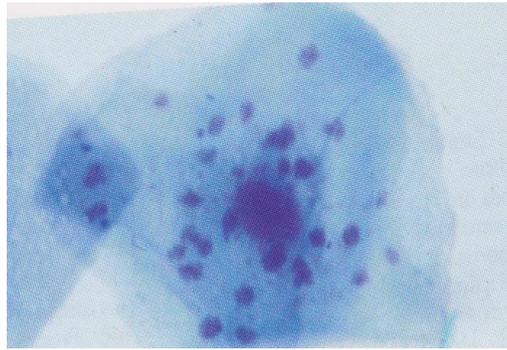
Figure 17 : cellule spumeuse colorée au May-Grünwald-Giemsa au grossissement 1000 (Johnston *et al.*, 2001)



1.3.1.6 Les cellules superficielles contenant des corps cytoplasmiques

Ces cellules contiennent des inclusions cytoplasmiques sombres (Figure 18). Elles sont souvent observées sur des frottis vaginaux d'œstrus. Leur source et leur signification sont inconnues. Les bactéries sont distinguables des inclusions cytoplasmiques par leur taille et leur position ; les bactéries sont de plus petite taille et elles sont localisées en position extracellulaire (Johnston *et al.*, 2001).

Figure 18 : cellule superficielle présentant des corps cytoplasmiques colorée au May-Grünwald-Giemsa au grossissement 1000 (Johnston *et al.*, 2001)

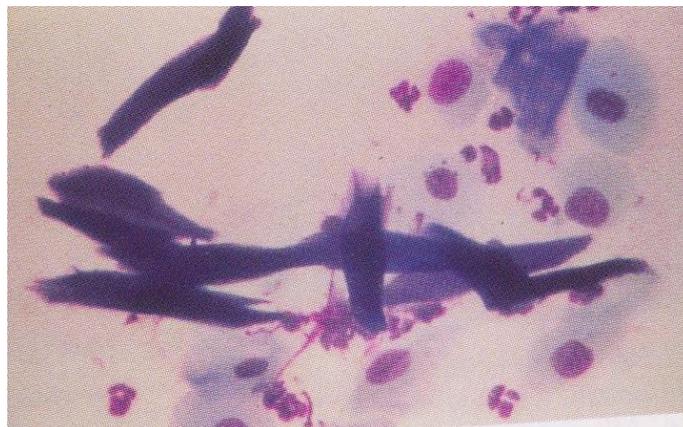


1.3.1.7 Les cellules de la fosse clitoridienne

Ce sont des cellules kératinisées. Elles sont observées lorsque le prélèvement a été effectué à tort dans la fosse clitoridienne.

Elles peuvent être confondues avec des cellules superficielles. En effet, ces deux types cellulaires possèdent la même affinité tinctoriale. Lors de coloration avec la méthode May Grunwald Giemsa, elles apparaissent bleu violet foncé (Johnston *et al.*, 2001) ; elles sont rouge orangé avec la coloration de Harris Shorr. Cependant, leur form allongée permet de les reconnaître (Figure 19).

Figure 19 : cellules clitoridiennes colorée au May-Grünwald-Giemsa au grossissement 400 (Johnston *et al.*, 2001)



2 Les frottis vaginaux

2.1 Technique de réalisation

Plusieurs méthodes de prélèvements existent pour la réalisation des frottis vaginaux. Nous ne développerons ici que la méthode par écouvillonnage, qui est la plus couramment utilisée.

Un écouvillon stérile en coton d'une quinzaine de centimètres avec un manche en bois ou en plastique est tout d'abord humidifié avec du sérum physiologique. L'humidification n'est pas nécessaire si la chienne présente des écoulements vaginaux lors du pro-œstrus ou de l'œstrus.

Les lèvres vulvaires sont écartées manuellement, mais il est également possible d'utiliser un spéculum. Ce dernier permet d'éviter tout contact entre l'écouvillon et la fosse clitoridienne cependant il est peut nécessaire en pratique courante.

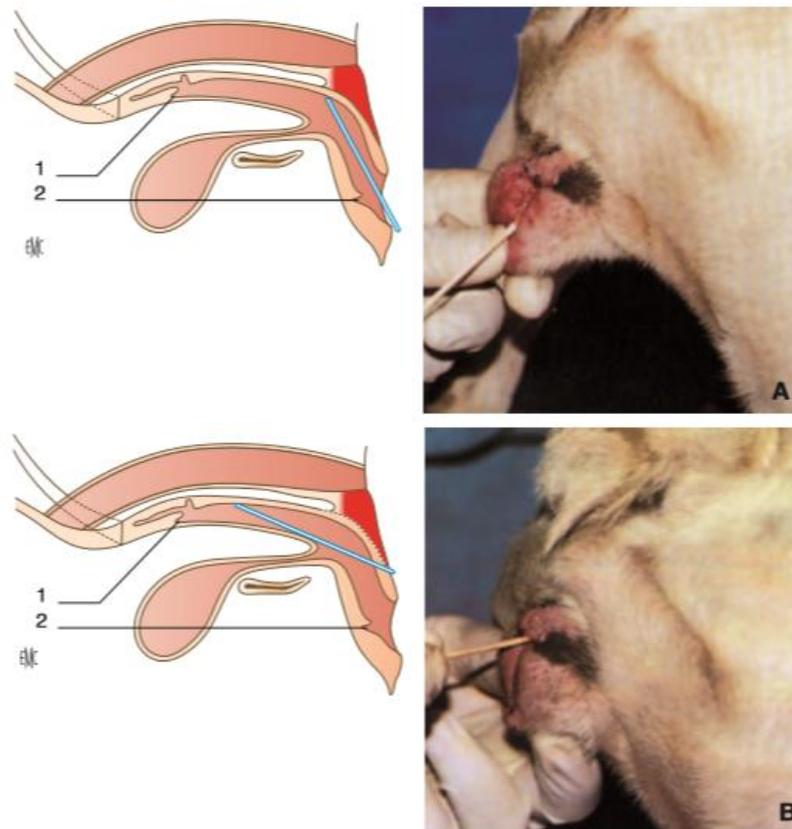
L'écouvillon est introduit au niveau de la commissure dorsale de la vulve en position verticale puis il est réorienté vers l'avant en position horizontale. Il doit être introduit dans la quasi-totalité de sa longueur (Figure 20).

Cette technique permet d'éviter de prélever les cellules de la fosse clitoridienne qui pourraient être confondues avec des cellules superficielles d'une chienne en œstrus par manque de pratique.

Le prélèvement sur la partie dorsale du vagin évite tout traumatisme du méat urétral.

L'écouvillon est ensuite soumis à des mouvements de rotation au contact de la muqueuse vaginale puis il est retiré délicatement.

Figure 20 : technique de prélèvement par écouvillonnage (Dumon, 2009). 1. Cul de sac utéro-rectal, 2. Fosse clitoridienne. A : intromission verticalement, le long de la paroi postérieure du vagin, de l'écouvillon humidifié avec du sérum physiologique. B : l'écouvillon est ensuite basculé de 90° vers le haut



L'écouvillon est ensuite rapidement étalé sur une lame de verre en appliquant une pression suffisante et en le faisant tourner sur lui-même sans le frotter ce qui pourrait léser les cellules. Plusieurs lignes d'étalement peuvent être réalisées sur la même lame en prenant garde de ne pas les superposer.

Le frottis doit ensuite être immédiatement fixé par un mélange alcool-éther ou par un spray cytofixateur. Il doit ensuite être coloré afin de pouvoir être analysé.

Différentes méthodes de coloration sont disponibles en pratique vétérinaire. Les caractéristiques de ces colorations seront détaillées dans le paragraphe suivant.

2.2 Les différentes techniques de coloration

2.2.1 Coloration monochrome dérivée de May-Grünwald-Giemsa

C'est une coloration couramment utilisée par les praticiens. Elle est rapide à réaliser, et de nombreux vétérinaires possèdent les colorants qui sont les mêmes que ceux utilisés pour la coloration des frottis sanguins (RAL 555®, Diff-Quick®) (Tableau 1).

La lame est séchée à l'air libre puis elle est plongée successivement dans 3 bains différents. Si la lame a été préalablement fixée par un cytofixateur, il n'est pas nécessaire de la plonger dans le méthanol.

Tableau 1 : protocole de coloration Diff-Quick® (notice d'utilisation Diff-Quick®)

Ordre de passage	Solution	Durée
1	Méthanol	5 passages
2	Solution 1 Éosine Y	5 passages
3	Solution 2 Colorant de thiazine	5 passages

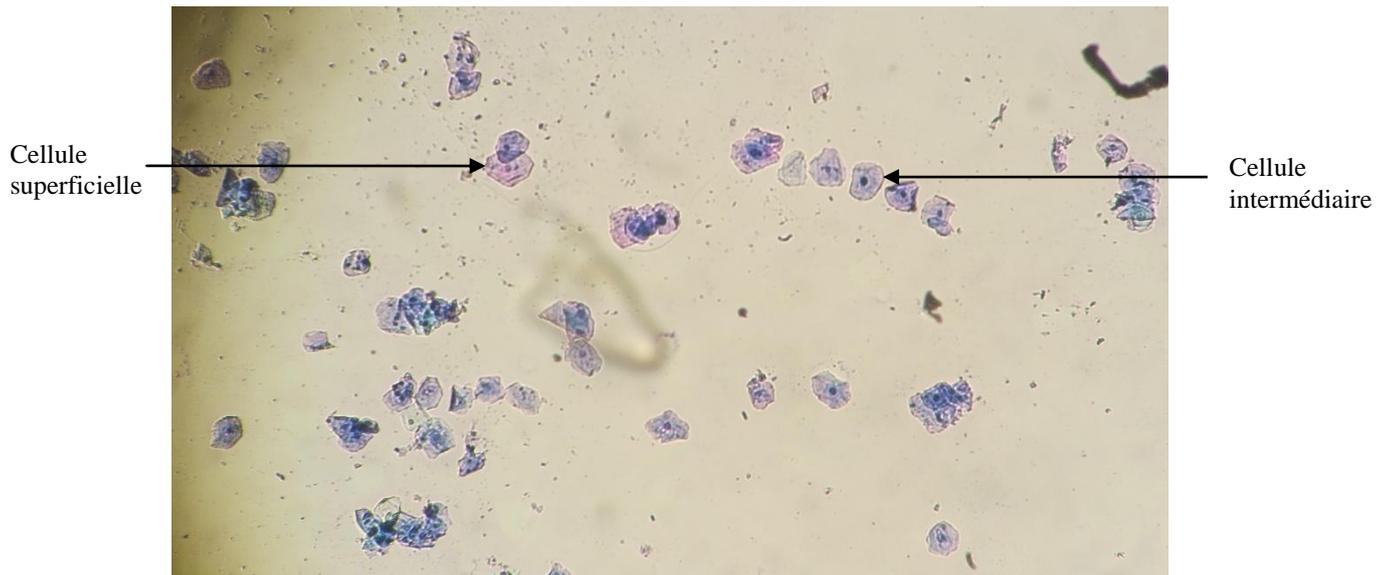
Les hématies et les polynucléaires neutrophiles sont très bien visualisés avec cette coloration.

Le principal inconvénient de cette technique, pour des lecteurs inexpérimentés en cytologie, est la coloration uniforme de toutes les cellules vaginales en bleu violet, qu'elles soient kératinisées ou non (Figure 21). La distinction des différentes cellules ne se fait alors que sur des critères morphologiques comprenant la taille, la forme et la présence ou non d'un noyau, ce qui nécessite un peu de pratique.

Une étude menée par Moxon *et al* en 2010 (Moxon *et al.*, 2010), consistait à comparer la concordance de lecture des frottis vaginaux colorés de façon unichrome avec un protocole équivalent au Diff-Quick® (Rapi-Diff II®) entre un technicien expérimenté et trois novices et d'évaluer la variabilité de lecture intra-technicien. Il a été montré que les résultats étaient très variables. La précision était meilleure quand les frottis étaient analysés par l'opérateur expérimenté, et une grande variabilité dans la classification des cellules (notamment des cellules parabasales et des cellules intermédiaires) était notée pour les techniciens non expérimentés.

Il est donc nécessaire d'avoir une certaine expérience pour interpréter correctement les frottis colorés de cette façon.

Figure 21 : frottis vaginal coloré avec la méthode Diff-Quick® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)



2.2.2 Les colorations différentielles

2.2.2.1 La coloration de Harris Shorr et ses dérivés

Cette coloration a été mise au point par Ephraim Shorr en 1940. Elle a pour avantage de colorer les précurseurs cytoplasmiques de la kératine en orange. Ainsi, les cellules sont distinguées selon leur affinité tinctoriale et non plus seulement sur des critères morphologiques.

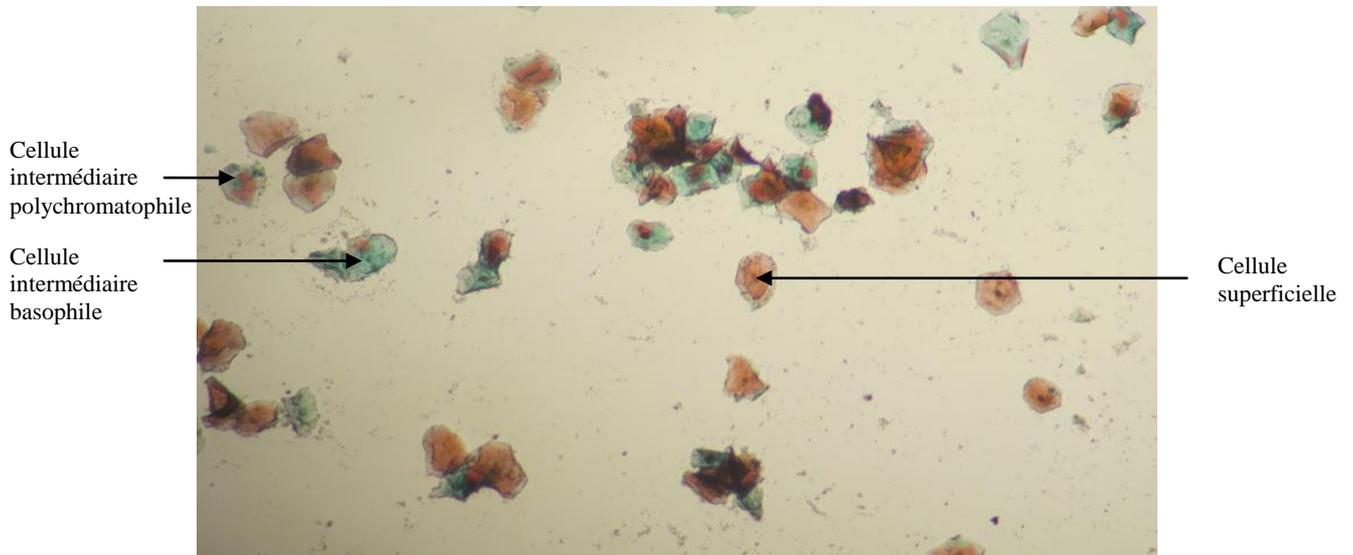
Les cellules parabasales et intermédiaires sont colorées en bleu (cellules basophiles) et les cellules superficielles en rouge orangé (cellules acidophiles) au fur et à mesure que la kératinisation progresse.

Cette coloration est cependant très peu utilisée par les vétérinaires car elle est longue à réaliser (plus de 15 minutes) (Tableau 2), ce qui rend son application très difficile au cours d'une consultation malgré de nouvelles variantes avec des kits simplifiés de coloration, tel que le kit Diagnouestrus® qui diminue le nombre de manipulations et fournit les réactifs en petite quantité (Figure 22).

Tableau 2 : protocole de coloration de Harris Shorr (Neveux 1999)

Ordre de passage	Solution	Durée
1	Fixation alcool-éther	5 minutes
2	Alcool à 70°	Plonger 10 fois
3	Alcool à 50°	Plonger 10 fois
4	Eau distillée	Plonger 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	1 passage
10	Alcool à 70°	1 passage
11	Alcool à 95°	1 passage
12	Colorant de Shorr	2 minutes
13	Alcool à 95°	1 passage
14	Alcool à 100°	1 passage

Figure 22 : frottis vaginal coloré avec la méthode Diagnoestrus® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)



2.2.2.2 La coloration de Papanicolaou

Cette coloration a été décrite par Georges Papanicolaou en 1942. Elle permet la coloration des cellules superficielles en rose orangé ; les cellules intermédiaires apparaissent bleu vert, les cellules plus profondes, vert plus franc, et les noyaux bleu violet (Tableau 3).

C'est la coloration standard des frottis vaginaux chez la femme, mais cette technique fastidieuse est peu utilisée en pratique vétérinaire.

Tableau 3 : protocole de coloration de Papanicolaou (d'après cours d'anatomie pathologique du CHU Necker). (1) éosine (2) mélange de vert lumière et de brun de Bismarck

Ordre de passage	Solution	Durée
1	Alcool à 70°	Plonger 10 fois
2	Alcool à 50°	Plonger 10 fois
3	Eau distillée	Plonger 10 fois
4	Hématoxyline de Harris	5 minutes
5	Eau distillée	Plonger 10 fois
6	Alcool à 95°	passage
7	Alcool à 80°	passage
8	Alcool à 70°	passage
9	Alcool à 70°	passage
10	Orange G 6 (1)	5 minutes
11	Alcool à 95°	30 secondes
12	Alcool à 95°	30 secondes
13	EA 50 (2)	5 minutes
14	Alcool à 95°	30 secondes
15	Alcool à 95°	30 secondes
16	Alcool à 100°	30 secondes
17	Xylène	2 passages

2.3 Variation de la cytologie vaginale au cours du cycle

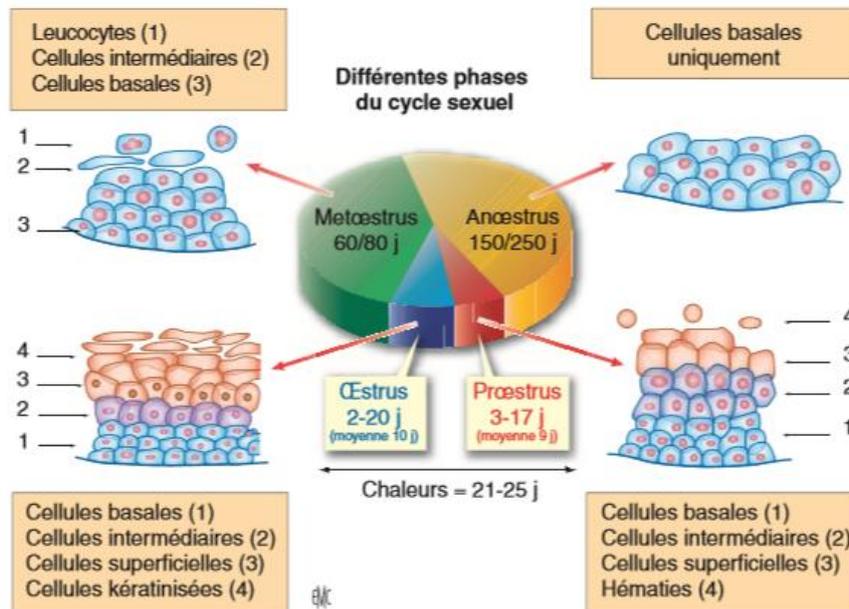
L'épaisseur de l'épithélium vaginal varie pendant le cycle œstral (Figure 23).

Pendant l'anœstrus, l'épithélium vaginal est recouvert de 2 ou 3 couches de cellules parabasales. Lors du pro-œstrus, les cellules épithéliales prolifèrent et commencent leur différenciation. C'est alors que l'on voit apparaître des cellules intermédiaires et superficielles.

Pendant l'œstrus, l'épithélium vaginal est recouvert de 12 à 20 couches de cellules superficielles qui desquament (Taradach, 1980).

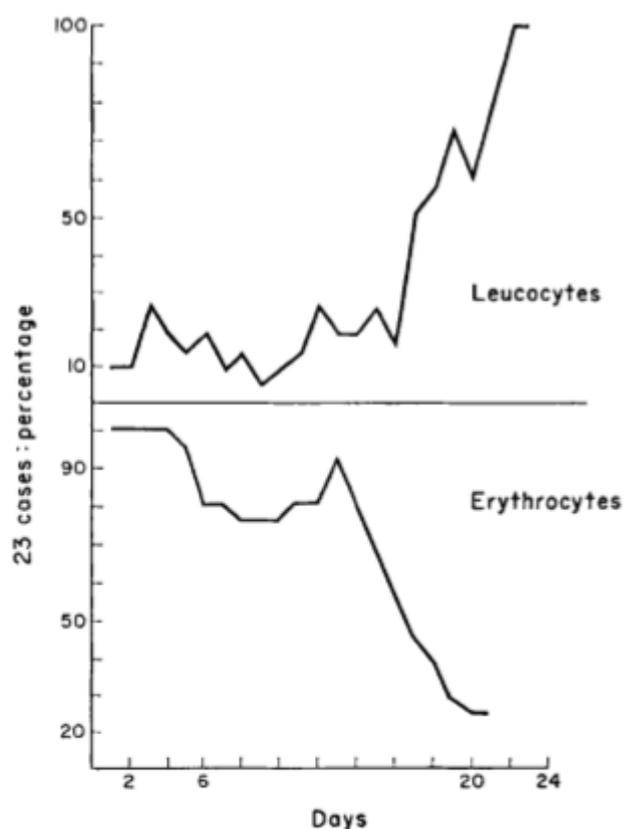
Pendant le metœstrus, l'épithélium est constitué de quelques couches de cellules parabasales et de cellules intermédiaires.

Figure 23 : évolution de la cytologie vaginale au cours du cycle chez la chienne (Dumon, 2009)



Lors du premier jour du pro-œstrus, les hématies sont présentes en grand nombre puis leur quantité diminue. Les leucocytes suivent une évolution opposée, avec un faible nombre en début de pro-œstrus puis une forte représentation notamment lors du metœstrus (Figure 24).

Figure 24 : variations de la concentration en leucocytes et en érythrocytes (le jour 1 correspond ici au 1^{er} jour du pro-œstrus) (Schutte, 1967b)



2.3.1 Le pro-œstrus

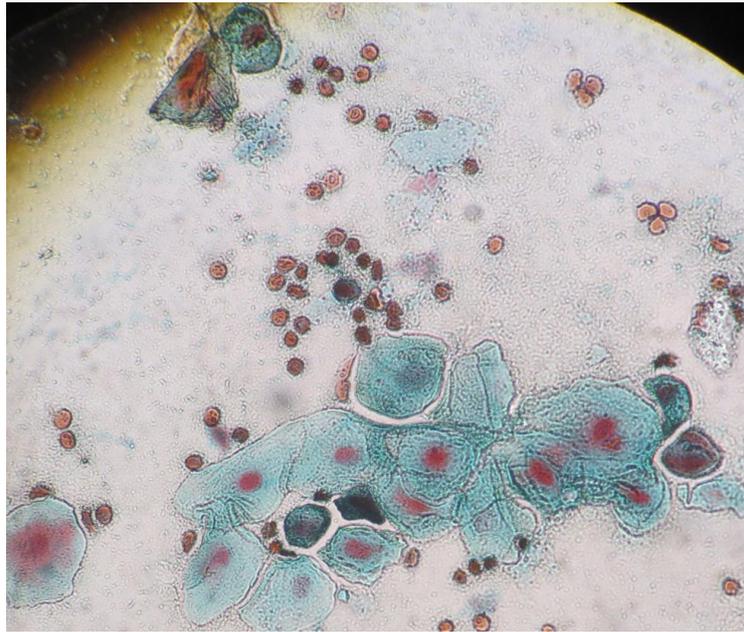
2.3.1.1 Début de pro-œstrus

Le frottis est pauvre en cellules et sale du fait des sécrétions muqueuses cervicales et vaginales. On observe des cellules parabasales, des petites et des grandes cellules intermédiaires nucléées (Post, 1985) (Figure 25).

On peut noter la présence d'hématies en grand nombre ; des polynucléaires et des bactéries sont présents en quantité variable.

Dans l'étude de Groppetti *et al* (2012), des bactéries ont été retrouvées chez 79,1 % des chiennes le 5^e jour de pro-œstrus (Groppetti *et al.*, 2012).

Figure 25 : frottis de pro-œstrus précoce coloré avec le protocole Diagnœstrus® au grossissement 400 (cliché A.-L. Dutey)

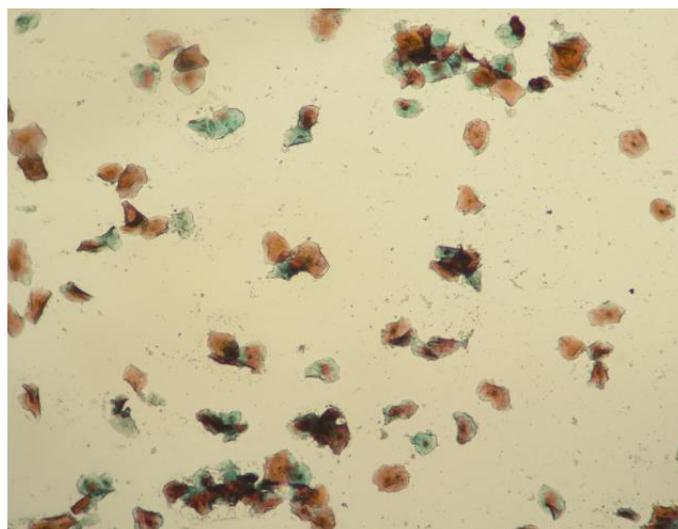


2.3.1.2 Milieu de pro-œstrus

Le frottis est sale du fait des sécrétions muqueuses cervicales et vaginales et riche en cellules.

La kératinisation cellulaire débute sous l'effet de l'augmentation sérique en œstrogènes. Les cellules parabasales et petites intermédiaires se raréfient au profit des grandes cellules intermédiaires et des cellules superficielles nucléées et anucléées (Figure 26).

Figure 26 : frottis de pro-œstrus moyen coloré avec le protocole Diagnœstrus® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)



Les hématies sont toujours présentes, mais leur quantité commence à décroître.
Les polynucléaires neutrophiles disparaissent. En effet, leur diapédèse n'est plus possible du fait de l'épaississement de l'épithélium vaginal.

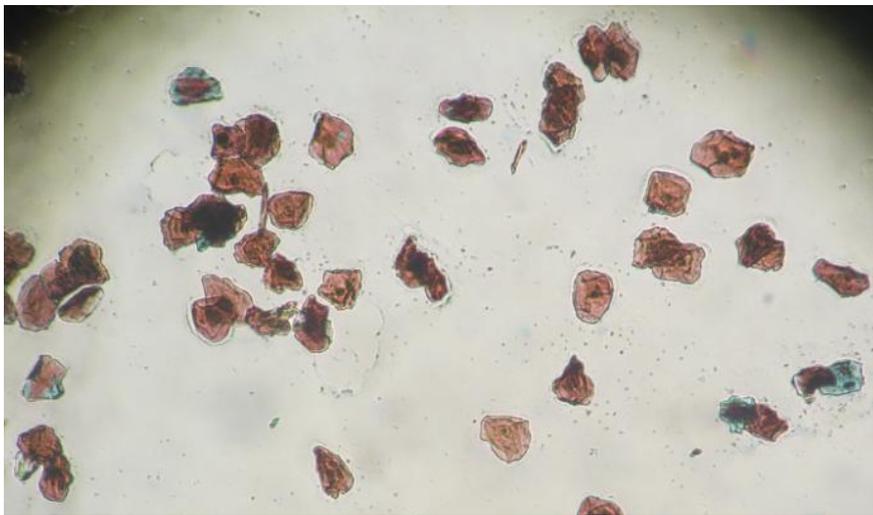
2.3.1.3 Fin de pro-œstrus

Le frottis est propre et riche en cellules.

Les cellules sont majoritairement acidophiles : grandes cellules intermédiaires et cellules superficielles (Figure 27).

La présence d'hématies est variable, et les polynucléaires neutrophiles sont absents.

Figure 27 : frottis de pro-œstrus tardif coloré avec le protocole Diaagnoestrus® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)

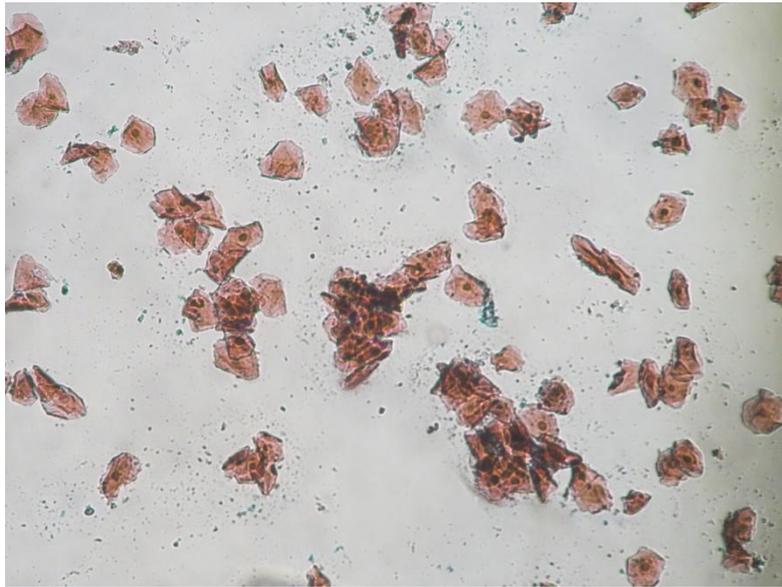


2.3.2 L'œstrus

Le frottis est propre et riche en cellules.

L'œstrus est caractérisé par une majorité de cellules superficielles. Les cellules sont regroupées en amas (Figure 28). Un pic de cellules superficielles anucléées est observé entre 2 jours avant et 3 jours après l'ovulation, avec un pic d'en moyenne 73,7 % mais allant de 60 à 85 % (Moxon *et al.*, 2012)

Figure 28 : frottis d'œstrus coloré avec le protocole Diagnœstrus® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)



Les hématies sont présentes en très faible nombre voire absentes.

Les polynucléaires neutrophiles sont absents. Il est cependant possible d'en observer en fin d'œstrus du fait de la baisse de l'activité des œstrogènes sur la muqueuse vaginale.

Des bactéries en quantité importante peuvent être observées pendant cette phase. Leur présence doit être considérée comme normale en l'absence de polynucléaires neutrophiles (Johnston, 2001).

2.3.3 Le metœstrus

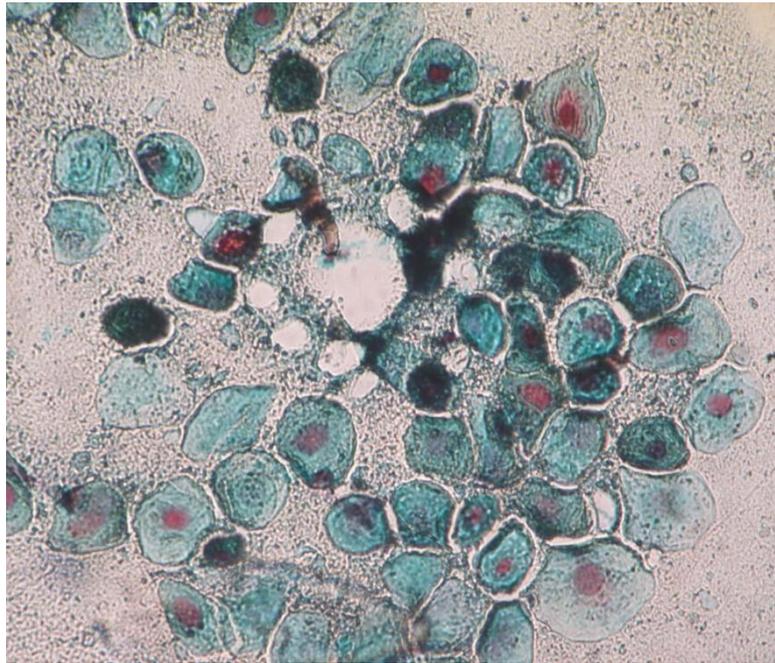
Le metœstrus cytologique correspond au jour où le pourcentage de cellules kératinisées diminue d'au moins 20 %. En 3 jours, la proportion de cellules parabasales et de petites cellules intermédiaires peut représenter jusqu'à 95 % des cellules épithéliales. La coloration est alors à prédominance basophile.

Le frottis est sale et riche en cellules (Figure 29).

Les polynucléaires neutrophiles réapparaissent en quantité importante au cours du metœstrus ; des bactéries sont présentes, mais en quantité moins importante que lors de l'œstrus.

Des hématies peuvent être visualisées en début de metœstrus durant les 18 premiers jours (Johnston, 2001).

Figure 29 : frottis de metœstrus coloré avec le protocole Diagnoestrus® au grossissement 400 (cliché A.-L. Dutey)



2.3.4 L'anœstrus

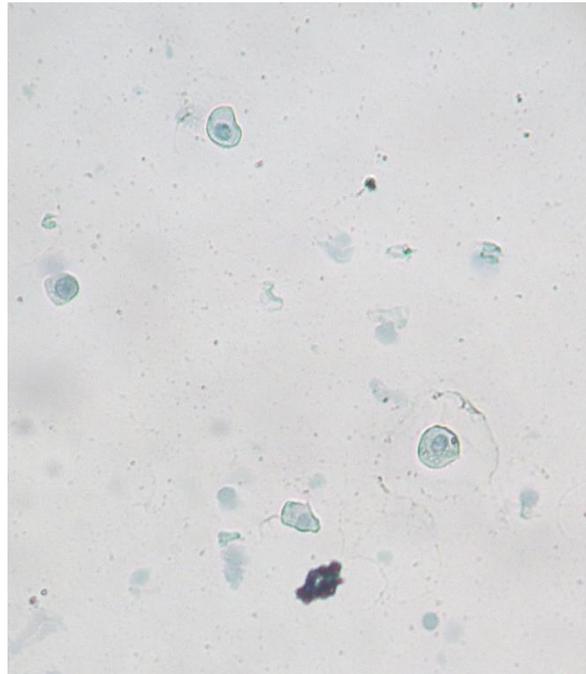
L'anœstrus est caractérisé par un frottis sale, pauvre en cellules qui sont regroupées en amas.

Le frottis est marqué par une présence quasi exclusive de cellules basophiles ; les cellules parabasales prédominent sur les petites cellules intermédiaires (Post, 1985) (Figure 30).

Quelques cellules superficielles du cycle précédent peuvent être observées en très faible nombre (Concannon et Digregorio, 1986).

On observe rarement des hématies ou des polynucléaires en très faible nombre sans signification particulière. Des bactéries sont présentes, mais en quantité bien inférieure aux autres phases du cycle.

Figure 30 : frottis d'œstrus coloré avec le protocole Diañoestrus® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)



2.4 Les index cytologiques

2.4.1 L'index éosinophilique (IE)

La coloration de Shorr permet de calculer l'index éosinophilique qui correspond au rapport entre le nombre de cellules éosinophiles et le nombre de cellules capables de se kératiniser. Les cellules parabasales et les petites cellules intermédiaires ne sont pas prises en compte dans le dénombrement des cellules non kératinisées (Schutte, 1967c).

$$IE = \frac{\text{Nombre de cellules acidophiles} \times 100}{\text{Nombre de cellules capables de se kératiniser (sans les cellules parabasales et petites intermédiaires)}}$$

En 1970, Evans et Savage mettent en place une formule simplifiée pour calculer cet index (Evans et Savage, 1970) :

$$IE = \frac{\text{Nombre de cellules acidophiles}}{\text{Nombre de cellules total}}$$

En 1989, Ramette montre que les courbes obtenues avec les deux indices lors de suivis de chaleurs sont similaires (Ramette, 1989).

L'index éosinophilique varie au cours du cycle sexuel. Il est quasiment nul en début de pro-œstrus. Il augmente ensuite progressivement à la suite de l'augmentation de la concentration en œstrogènes qui provoque la kératinisation des cellules jusqu'à atteindre un pic.

Certaines chiennes ne présentent qu'un seul pic alors que d'autres en présentent deux, voire plusieurs (England, 1992 ; Groppetti *et al.*, 2010). Le pic de kératinisation chez les chiennes n'en présentant qu'un seul survient 1,9 jour après le pic de LH. Pour celles en présentant 2, le second pic apparaît quant à lui 4,4 jours après le pic de LH (England, 1992).

Chez les chiennes présentant 2 pics de l'IE, le début de l'acceptation du mâle n'a lieu qu'au moment de l'un des deux pics (Taradach, 1980).

Il faut noter que le pic de kératinisation ne correspond pas forcément au moment de l'ovulation. Il intervient environ 3 à 6 jours après le pic d'œstradiol (Linde et Karlsson, 1984).

D'après Bouchard, l'ovulation interviendrait 6,9 jours après que l'IE a atteint 80 % (Bouchard *et al.*, 1991).

Selon Schutte, lorsque l'accouplement est effectué pendant le pic de l'IE, une mise-bas est observée chez plus de 90 % des chiennes (Schutte, 1967).

Selon les auteurs, l'index éosinophilique peut atteindre des valeurs maximales variables en fonction des individus. Selon l'étude de Linde et Karlsson, environ 33 % des chiennes de l'étude présentent un IE maximal compris entre 80 et 90 %, et 67 % des chiennes présentent un IE supérieur à 90 % (Linde et Karlsson, 1984). D'après l'étude de Groppetti, l'index éosinophilique maximal est compris entre 60 et 80 % (Groppetti *et al.*, 2010).

De plus, l'index éosinophilique peut atteindre des valeurs maximales pendant une large période selon les études : de 8 jours avant à 2-3 jours après le pic de LH (Concannon *et al.*, 1989), de 6 jours avant à 4 jours après le pic de LH (Olson, 1989).

Il paraît alors difficile de se fier à cet indice pour dater précisément le jour de l'ovulation.

Le metœstrus cytologique correspond au jour où le pourcentage de cellules kératinisées diminue d'au moins 20 % bien que l'IE chute en général de plus de 50 % (Holst et Phemister, 1974). Pendant la fin du metœstrus, l'IE est inférieur à 20 % puis, pendant l'anœstrus l'IE, il est inférieur à 10 %.

2.4.2 L'index caryopycnotique (ICP)

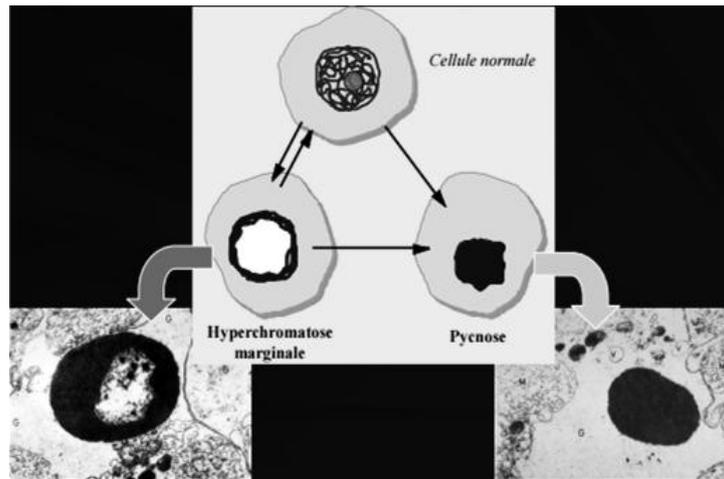
L'index caryopycnotique est le rapport entre le nombre de cellules superficielles présentant un noyau pycnotique et celui des cellules superficielles présentant un noyau vésiculaire, c'est-à-dire encore intact avec une membrane, un nucléoplasme et de la chromatine.

$$\text{ICP} = \frac{\text{Nombre de cellules superficielles avec un noyau pycnotique} \times 100}{\text{Nombre de cellules superficielles avec un noyau vésiculaire}}$$

La pycnose désigne la condensation du noyau, ce dernier devient petit et hyperbasophile. Elle peut être précédée par l'hyperchromatose marginale qui est la condensation de la chromatine sous la membrane nucléaire (Figure 31) (Fontaine, 2011).

Cette transformation nucléaire est sous dépendance œstrogénique et peut donner une idée plutôt fiable de l'imprégnation œstrogénique sur la muqueuse vaginale (Schutte, 1967).

Figure 31 : schéma du phénomène de pycnose (Fontaine, 2011)



L'ICP augmente lentement et atteint 80 % pendant l'œstrus puis environ 100 % lors de l'ovulation. Il chute ensuite brutalement lors du métœstrus puis reste à un niveau basal pendant le métœstrus et l'anœstrus (Post, 1985). Cependant, la valeur du pic ainsi que le jour de sa survenue sont très variables (Wright et Parry, 1989). Il présente aussi des pics inconstants, et très variables également, pendant le pro-œstrus (Schutte, 1967). Cet index n'est donc pas un bon indicateur pour connaître le moment idéal pour l'accouplement.

De plus, la distinction entre un noyau pycnotique et un noyau vésiculaire n'est pas évidente et très chronophage.

2.4.3 L'index superficiel (IS)

L'index superficiel est le pourcentage de cellules des couches superficielles (cellules superficielles et grandes cellules intermédiaires) par rapport aux cellules des couches plus profondes (petites cellules intermédiaires et parabasales).

$$IS = \frac{\text{Nombre de cellules des couches superficielles} \times 100}{\text{Nombre de cellules des couches plus profondes}}$$

L'IS atteint des valeurs qui peuvent dépasser 70 % pendant le pro-œstrus. Il conserve une valeur élevée pendant l'œstrus sans présenter de véritable pic. Une chute caractéristique de l'IS a lieu 24 à 48 heures après le pic d'IE.

Il a été observé que la valeur de l'IS chute jusqu'à de faibles valeurs (<10 %), 4 à 5 jours après l'accouplement si la fécondation a eu lieu. Si la chienne n'a pas été fécondée, cette diminution jusqu'à des valeurs basales prend au moins 3 semaines (Schutte, 1967c).

Cet index est calculé facilement et rapidement, mais comme l'IS ne présente pas de pic, il n'est pas utilisé en pratique pour déterminer la période idéale pour l'accouplement.

La compréhension du cycle œstral de la chienne est primordiale pour assurer une bonne maîtrise de la reproduction. Le frottis vaginal est un examen complémentaire pratique, peu coûteux et rapide à réaliser. Il permet de savoir si l'organisme est sous imprégnation œstrogénique. Cela permet notamment de suivre les chaleurs lors de mise à la reproduction mais aussi de mettre en évidence une sécrétion pathologique d'œstrogènes lors de kyste ovarien ou de tumeur ovarienne ou testiculaire par exemple.

Les protocoles de coloration des frottis vaginaux actuellement sur le marché présentent l'inconvénient d'être longs à réaliser ou nécessitent d'avoir un minimum d'expérience en cytologie vaginale. C'est pourquoi, dans la deuxième partie, nous analyserons l'efficacité d'un nouveau protocole de coloration des frottis vaginaux présentant l'avantage d'être rapide de réalisation et ne nécessitant pas une formation préalable pour la lecture.

DEUXIÈME PARTIE, ÉTUDE EXPÉRIMENTALE :
ÉTUDE DE L'EFFICACITE D'UN NOUVEAU
PROTOCOLE RAPIDE DE COLORATION CHEZ LA
CHIENNE

1 Objectifs de l'étude

Cette étude vise à valider un protocole de coloration rapide des frottis vaginaux chez la chienne appelé Diag-Œstro® (Laboratoire RAL Diagnostics). Ce nouveau procédé est en fait une version raccourcie de la méthode de coloration Diajnoestrus® (Laboratoire RAL Diagnostics).

En effet la coloration du kit Diajnoestrus® a un temps de réalisation de 16 minutes alors que le nouveau kit Diag-Œstro® à tester ne prendrait au praticien que 2 minutes (Notices en Annexe IAnnexe II).

Pour vérifier la fiabilité de ce nouveau protocole, il sera comparé à la méthode de coloration du kit Diajnoestrus®.

Si l'efficacité de cette nouvelle méthode est prouvée, un nouveau kit de coloration des frottis vaginaux pourra être mis sur le marché et permettra aux vétérinaires praticiens de réaliser une coloration plurichrome des frottis vaginaux presque aussi rapidement qu'avec une méthode unichrome 555®.

2 Matériel et méthode

Au CERCA (centre d'étude en reproduction des carnivores), de nombreux suivis de chaleurs sont réalisés tous les jours. Ils consistent en un frottis vaginal et un dosage de progestérone.

Pour l'étude, les frottis vaginaux étaient effectués tous les jours lors des consultations réalisées au CERCA sur des chiennes à différents stades de leur cycle sexuel. Les prélèvements étaient effectués avec des écouvillons stériles en coton hydrophile avec un manche en plastique. Ces derniers étaient ensuite conservés et, à chaque fin de journée, ils étaient collectés puis étalés sur des lames préalablement identifiées par le numéro de dossier (ou le nom de la chienne), la date et la méthode de coloration.

Une seule ligne d'étalement a été réalisée sur chaque lame afin de conserver assez de cellules pour la réalisation des deux lames.

Afin de réaliser une comparaison entre les deux méthodes de coloration chaque prélèvement était étalé sur 2 lames : l'une colorée avec le kit Diajnoestrus® (D) et l'autre avec la méthode Diag-Œstro® (DO).

Afin de limiter les biais lors de cette étude, la première ligne d'étalement réalisée avec l'écouvillon était une fois sur deux attribuée à la méthode D ou à la méthode DO. En effet, la première ligne d'étalement est plus riche en cellules que la seconde. Nous avons donc pris soin de ne pas toujours colorer la première ligne d'étalement avec la même méthode et donc d'éviter un biais à cette étape de l'expérimentation.

Après étalement des frottis, les lames ont été fixées avec un cytofixateur Cytoral® (Laboratoire RAL Diagnostics) puis elles ont été séchées à l'air libre sans agitation durant une minute.

Chaque frottis était ensuite coloré avec l'une ou l'autre des deux méthodes (Tableau 4).

Tableau 4 : comparaison des 2 méthodes de coloration utilisées dans l'étude : Diagnoestrus® et Diag-Æstro®

Diagnoestrus®	Solution	Diag-Æstro®
10 minutes	Solution de rinçage n° 1	5 passages
10 passages	Eau distillée	5 passages
1 minute	Hématoxyline	5 passages
10 passages	Eau distillée	5 passages
1 minute	Différenciateur	5 passages
10 passages	Solution de rinçage n° 2	5 passages
2 minutes	Colorant de Shorr	10 passages
10 passages	Solution de rinçage n° 3	5 passages

Pour cette étude, un total de 102 frottis a été collecté sur 51 chiennes.

Les lames ont ensuite été codées afin de réaliser une lecture à l'aveugle. Des numéros de 1 à 102 ont été attribués de façon aléatoire à chaque lame puis une étiquette avec le numéro correspondant était collée sur l'identification de chaque lame (date, coloration effectuée et identification de la chienne) afin de préserver une lecture objective.

Les lames étaient conservées sans lamelle dans une boîte en bois prévue à cet effet.

Elles étaient ensuite observées à l'aide d'un microscope binoculaire BX40 de Olympus. Chaque lame était étudiée au faible grossissement 40 afin d'évaluer la coloration majoritaire ainsi que la concentration cellulaire de la lame.

Le grossissement 100 était ensuite utilisé pour le comptage des différentes cellules sur un champ représentatif de la lame plutôt situé en queue de frottis où les cellules forment moins d'amas et où la lame a bien plongé dans les différents bains.

Un minimum de 30 cellules a été choisi pour le comptage cellulaire. En général, deux à trois champs à un grossissement de 100 nous permettaient de visualiser le nombre minimum de cellule fixé. Si ce nombre était atteint mais que le dernier champ contenait plus de cellules, ces dernières étaient toutes comptabilisées.

Les cellules observées ont été classées selon leur affinité tinctoriale et leur morphologie. Nous avons distingué les cellules parabasales (Pb), les cellules intermédiaires basophiles (IB), les cellules intermédiaires polychromatophiles (IPC) et les cellules kératinisées (kérat).

Chaque lame a été évaluée par deux opérateurs, le lecteur 1 expérimenté et le lecteur 2 moins averti.

Un tableur Excel a ensuite été complété (Annexe III et Annexe IV) et le pourcentage de chaque type de cellule a été calculé.

L'IE a également été calculé d'après la formule suivante :

$$IE = \frac{\text{Nombre de cellules acidophiles (IPC+kérat)}}{\text{Nombre de cellules total}}$$

Lors d'un suivi de chaleurs, le plus important au moment de la lecture d'une lame, est de voir l'imprégnation œstrogénique de la muqueuse vaginale et donc de calculer le pourcentage de cellules acidophiles ou IE.

Ce sont les pourcentages des différents types cellulaires qui seront par la suite comparés et soumis à l'analyse statistique, bien qu'une attention plus particulière sera portée sur les résultats concernant l'IE de par son intérêt clinique.

3 Analyse statistique

Nous allons comparer la concordance des résultats entre les deux lecteurs avec la méthode D puis avec la méthode DO.

Par la suite, nous comparerons la concordance des résultats entre la méthode de coloration D et la méthode DO pour le lecteur 1 puis pour le lecteur 2.

3.1 Coefficient de concordance de Lin

Dans cette étude, on souhaite évaluer la concordance des résultats entre deux séries de mesures quantitatives, afin de comparer l'efficacité d'un nouveau protocole de coloration à un protocole déjà établi et considéré comme celui de référence.

Le coefficient de concordance de Lin (CCL) sera utilisé de façon à évaluer la corrélation entre les deux méthodes de coloration, mais aussi pour apprécier la concordance des résultats entre les deux opérateurs.

Le CCL est un coefficient allant de -1 à +1, où les valeurs de -1, 0 et +1 signifient, respectivement, une discordance parfaite, une concordance nulle et une concordance parfaite (Lin *et al*, 2007).

L'interprétation des valeurs du CCL se trouve dans le tableau ci-dessous (Tableau 5).

Tableau 5 : interprétation des valeurs du coefficient de concordance de Lin (Lin *et al*, 2007)

Valeur du coefficient de concordance de Lin	Interprétation pour la concordance
< 0,50	Inacceptable
0,51-0,60	Mauvais
0,61-0,70	Passable
0,71-0,80	Moyennement satisfaisant
0,81-0,90	Plutôt bon
0,91-0,95	Très bonne
> 0,95	Excellente

3.2 Les courbes de Bland et Altman

Ce graphique comporte trois éléments :

- Les mesures effectuées par les deux méthodes dont on souhaite savoir si elles sont concordantes ou non.
- Trois droites horizontales : le biais moyen (ou écart systématique moyen entre les deux séries de mesures), et les limites d'agrément qui représentent une zone dans laquelle on retrouve en moyenne 95 % des écarts entre les deux méthodes à comparer.
- Les intervalles de confiance à 95 % de ces 3 droites (sous forme de droites aussi).

(Bland et Altman, 1999).

Avant d'utiliser la méthode graphique de Bland et Altman, il convient d'avoir une idée des valeurs X et Y dans la phrase suivante : « Je considère que mes deux méthodes donnent des valeurs concordantes si (1) l'une ne surestime ou ne sous-estime pas l'autre méthode de plus de X, et si (2) la très grande majorité des écarts entre l'une et l'autre méthode est inférieure à Y (en valeur absolue). » Par la suite, la valeur X correspond à la valeur seuil du 1^{er} critère, et Y celle du 2nd critère (Desquilbet, 2015).

Les lecteurs ne compteront pas les cellules au même endroit de la lame. Des différences dans les résultats seront forcément inévitables, mais on choisit des valeurs seuils X et Y permettant de définir un écart considéré comme acceptable.

Les valeurs de X et Y ont été choisies subjectivement, liées à un sens clinique.

X a été fixé à 15 %, c'est-à-dire que l'on accepte un écart de 15 % entre les résultats du lecteur 1 et ceux du lecteur 2, mais aussi entre les résultats obtenus avec la méthode D et ceux obtenus avec la méthode DO.

Y a été fixé à 35 %, c'est-à-dire que la grande majorité des écarts ne doit pas être supérieure en valeur absolue à 35 %.

Il faut aussi choisir la valeur de l'agrément. On choisira ici 95 % comme valeur de l'agrément, c'est-à-dire que « la grande majorité des écarts » signifiera 95 % des écarts.

Ainsi, le deuxième critère de concordance est le suivant : 95 % des écarts entre l'une ou l'autre méthode doivent être inférieurs à 35 % en valeur absolue.

L'utilisation des courbes de Bland et Altman seront utilisées en plus du CCL. En effet, avec ces courbes, le fait de considérer que des séries de mesures sont concordantes ou non s'appuie sur des considérations cliniques, par le choix des valeurs de X et Y, puis statistiques.

Le calcul du CCL n'inclut aucune réflexion clinique, seule prévaut la considération statistique.

C'est pourquoi, il est intéressant de tracer le graphique de Bland et Altman lorsque le CCL n'est pas très élevé. Ce tracé permettra potentiellement de conclure à une concordance acceptable si les critères cliniques de concordance 1 et 2 sont respectés.

4 Résultats

4.1 Caractéristiques de la population étudiée

L'échantillon était constitué de 102 frottis vaginaux, soit 51 frottis colorés avec la méthode D et 51 avec la méthode DO appariés par paire.

Seuls 98 frottis ont été retenus pour l'étude car deux d'entre eux étaient illisibles ; les deux lames appariées ont donc elles aussi été retirées de l'étude.

Les lames étaient ininterprétables, soit par un manque de coloration global, soit par un nombre insuffisant de cellules.

4.2 Évaluation de la concordance entre les séries de mesures des deux lecteurs

Dans cette partie nous allons comparer les résultats obtenus par les deux lecteurs afin de voir s'ils obtiennent des valeurs similaires pour chaque type de cellule.

Nous analyserons cette concordance pour les frottis colorés avec la méthode D, d'une part, puis avec la méthode DO, d'autre part.

Les valeurs prises en compte pour l'analyse statistique sont présentées en Annexe V et Annexe VI.

4.2.1 Avec la méthode Diagnoestrus®

4.2.1.1 Coefficient de corrélation de Lin

Le Tableau 6 présente les coefficients de concordance de Lin avec leurs intervalles de confiance (IC) ainsi que l'interprétation de ces valeurs pour chaque type cellulaire.

Tableau 6 : concordance entre le pourcentage de cellules comptées par les 2 lecteurs avec la méthode D (voir la liste des abréviations page 9)

	CCL [IC]	Interprétation de la valeur du CCL
Pb	0,32 [0,07 ; 0,57]	Inacceptable
IB	0,77 [0,66 ; 0,88]	Moyennement satisfaisant
IPC	0,77 [0,66 ; 0,88]	Moyennement satisfaisant
Kérat	0,82 [0,73 ; 0,91]	Plutôt bon
IE	0,84 [0,76 ; 0,92]	Plutôt bon

Le pourcentage de Pb a un CCL très faible de 0,32 considéré comme inacceptable. La concordance entre les deux lecteurs est médiocre concernant ce type de cellules colorées avec la méthode de référence D.

Les pourcentages d'IB et d'IPC ont un CCL de 0,77. La concordance des deux lecteurs est donc moyennement satisfaisante pour ces deux populations cellulaires.

Les pourcentages de kérat et l'IE ont un CCL plutôt bon de 0,82 et 0,84 respectivement. Les deux lecteurs obtiennent donc une meilleure concordance pour les kérat et le calcul de l'IE.

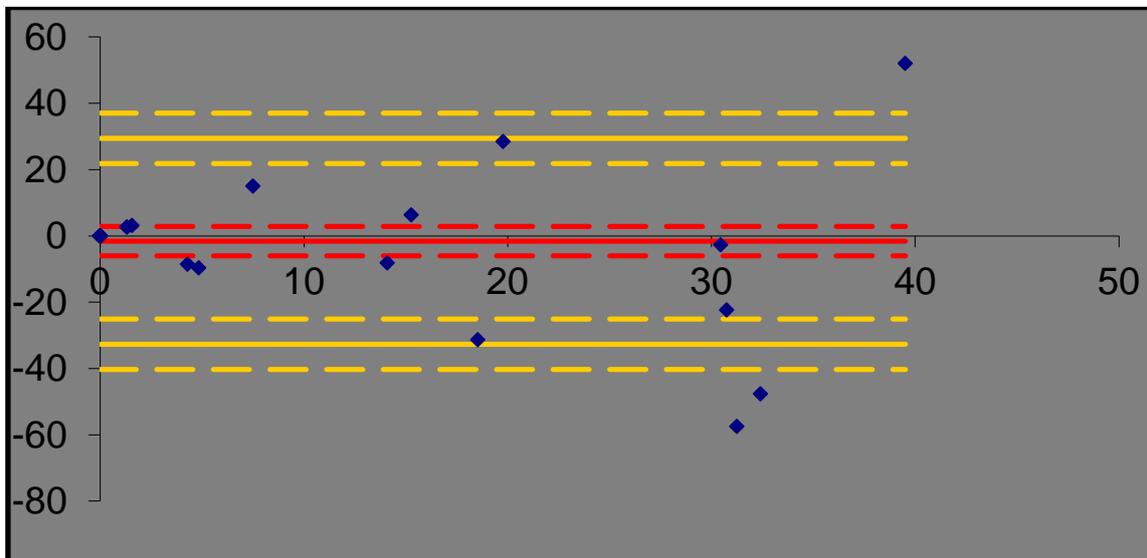
4.2.1.2 Graphiques de Bland et Altman

Nous avons considéré que les lecteurs donnaient des valeurs concordantes pour les différents types de cellules si « (1) la série de mesures du lecteur 2 ne surestimait ou ne sous-estimait pas celle du lecteur 1 de plus de 15 % ; et si (2) la très grande majorité des écarts entre l'une et l'autre des séries de mesures était inférieure à 20 %, en valeur absolue ».

4.2.1.2.1 Cellules parabasales

La Figure 32 présente les courbes de Bland et Altman pour le pourcentage de cellules parabasales avec la méthode D.

Figure 32 : courbes de Bland et Altman pour le pourcentage de cellules parabasales avec la méthode D



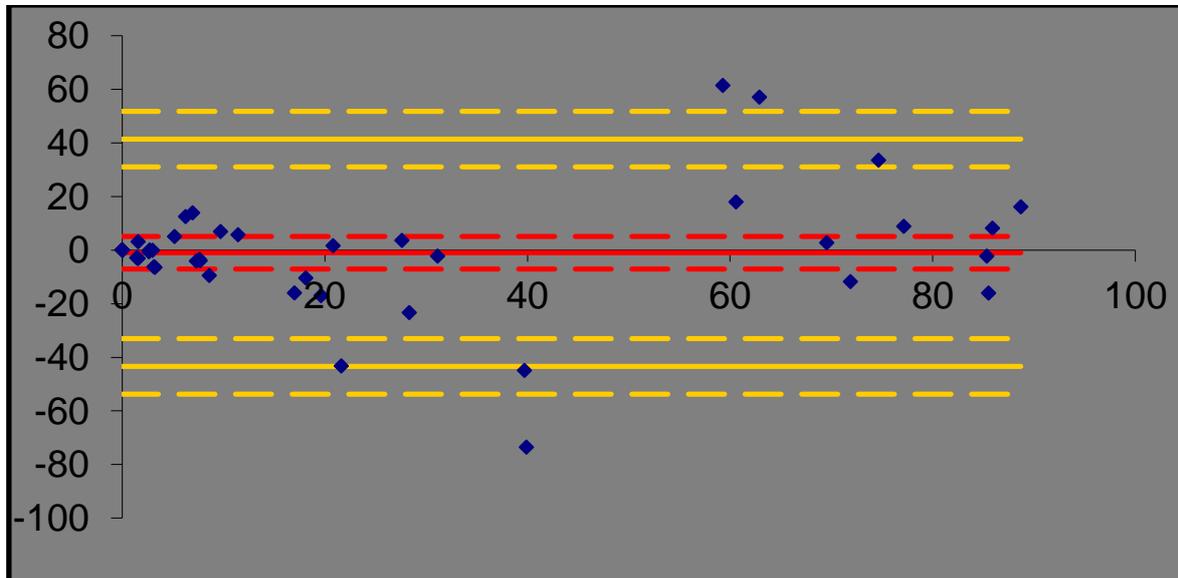
Biais	-1,62 [-6,06 ; 2,81]
Limite 95 % inf. d'agrément	-32,69 [-40,28 ; -25,1]
Limite 95 % sup. d'agrément	29,44 [21,85 ; 37,03]

Le biais moyen est de -1,62 %, et son intervalle de confiance à 95 % est [-6,06 ; 2,81]. Par conséquent, le premier critère de concordance « la série de mesures du lecteur 2 ne surestimait ou ne sous-estimait pas celle du lecteur 1 de plus de 15 % » est respecté puisqu'un écart systématique (« biais moyen ») de -1,62 % est observé, et les bornes de l'intervalle de confiance du biais moyen sont inférieures à 15 % en valeur absolue.

Les limites, supérieure et inférieure, d'agrément, qui sont de -32,69 % et 29,44 % sont inférieures à la limite que l'on s'était fixée pour le second critère de concordance (35 % en valeur absolue). Cependant, les intervalles de confiance à 95 % de ces limites d'agrément sont de [-40,28 ; -25,1] et de [21,85 ; 37,03], indiquant qu'il y a 95 % de chances pour que la vraie limite inférieure de l'agrément soit comprise entre -40,28 % et -25,1 %, et que la vraie limite supérieure de l'agrément soit comprise entre 21,85 % et 37,03 %. Comme la valeur que nous avons fixée à 35 % est incluse dans l'intervalle de confiance, cela veut donc dire qu'il y a des risques pour que le critère « [...] la très grande majorité des écarts entre la nouvelle méthode et la méthode de référence est inférieure à 35 % (en valeur absolue) » ne soit finalement pas respecté.

4.2.1.2.2 Cellules intermédiaires basophiles

Figure 33 : courbes de Bland et Altman pour le pourcentage de cellules intermédiaires basophiles avec la méthode D



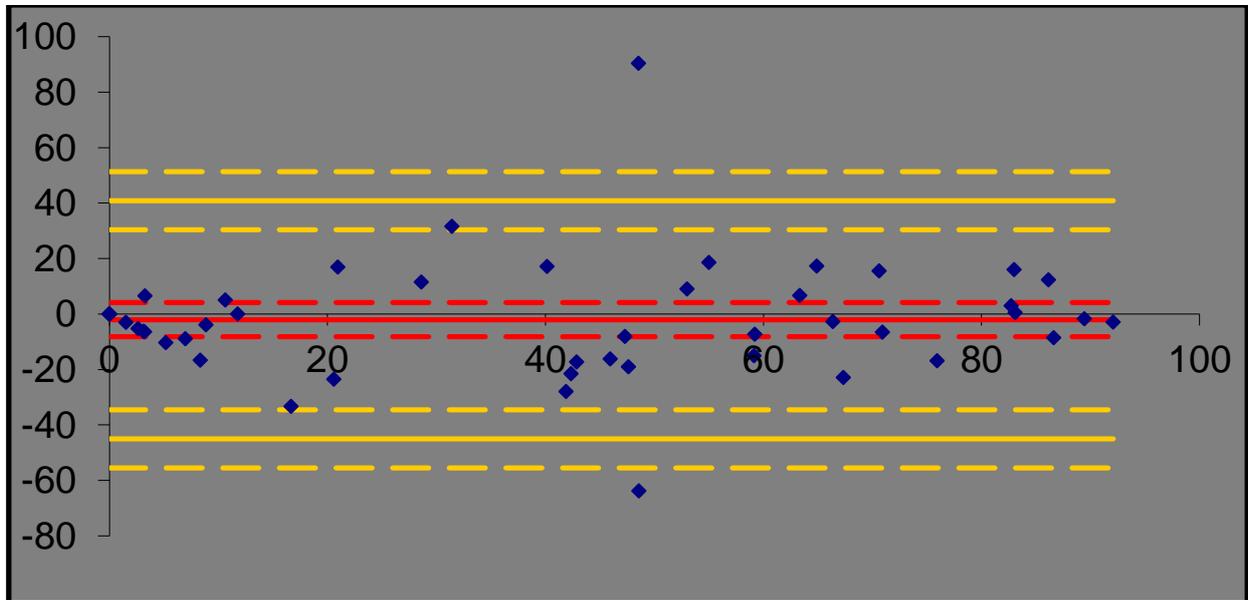
Biais	-0,96 [-7,02 ; 5,1]
Limite 95 % inf. d'agrément	-43,38 [-53,74 ; -33,01]
Limite 95 % sup. d'agrément	41,46 [31,1 ; 51,82]

Le biais moyen est de -0,96 %, et son intervalle de confiance à 95 % est [-7,02 ; 5,1]. Par conséquent, le premier critère de concordance « la série de mesures du lecteur 2 ne surestimait ou ne sous-estimait pas celle du lecteur 1 de plus de 15 % » est respecté.

Les limites inférieures et supérieures d'agrément sont, en valeur absolue, supérieures à 35 %, valeur seuil fixée pour le second critère. Le second critère de concordance n'est donc pas vérifié pour ces cellules.

4.2.1.2.3 Cellules intermédiaires polychromatophiles

Figure 34 : courbes de Bland et Altman pour le pourcentage de cellules intermédiaires polychromatophiles avec la méthode D



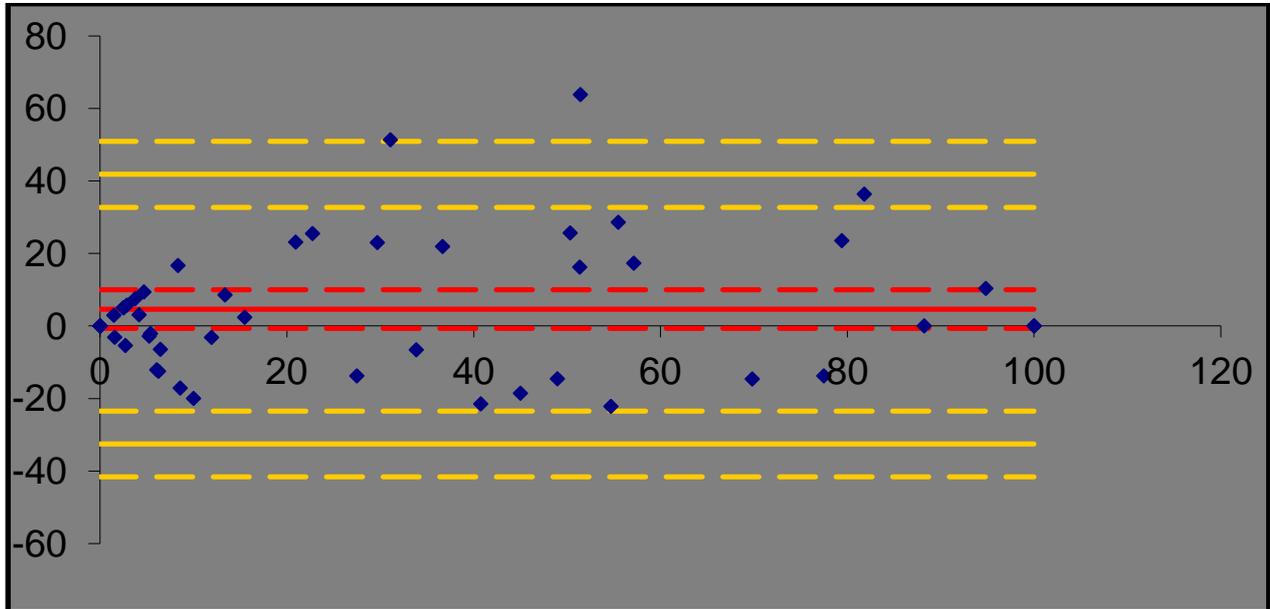
Biais	-2,05 [-8,19 ; 4,08]
Limite 95 % inf. d'agrément	-44,99 [-55,48 ; -34,5]
Limite 95 % sup. d'agrément	40,89 [30,4 ; 51,38]

Le biais moyen est de -2,05 %, et son intervalle de confiance à 95 % est [-8,19; 4,08]. Par conséquent, le premier critère de concordance « la série de mesures du lecteur 2 ne surestimait ou ne sous-estimait pas celle du lecteur 1 de plus de 15 % » est respecté.

Les limites inférieures et supérieures d'agrément sont, en valeur absolue, supérieures à 35 %, valeur seuil fixée pour le second critère. Le second critère de concordance n'est donc pas vérifié pour ces cellules.

4.2.1.2.4 Cellules kératinisées

Figure 35 : courbes de Bland et Altman pour le pourcentage de cellules kératinisées avec la méthode D



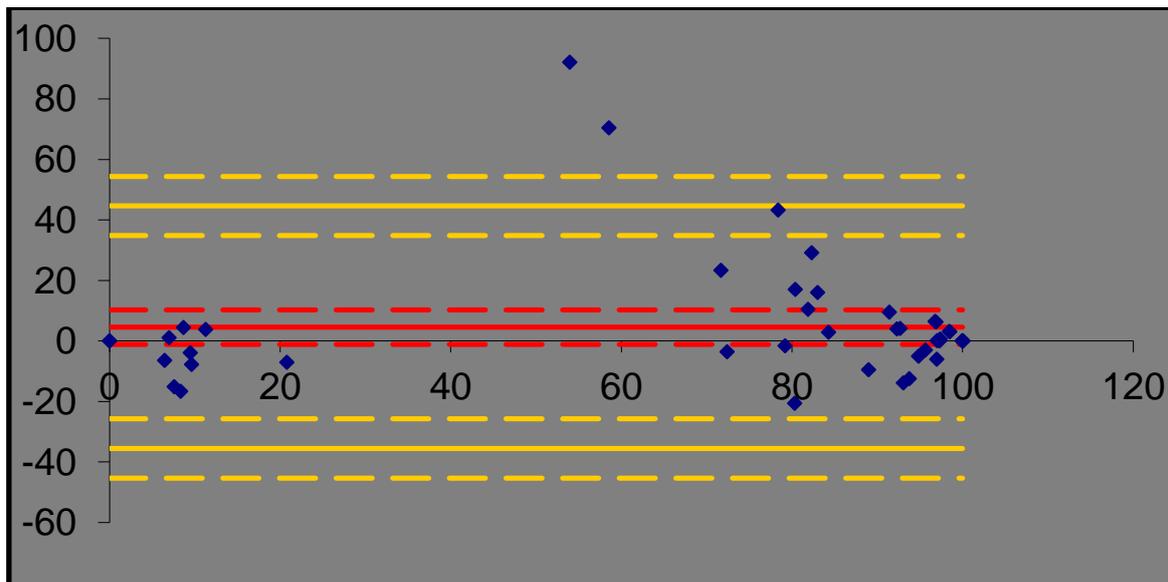
Biais	4,63 [-0,68 ; 9,95]
Limite 95 % inf. d'accord	-32,57 [-41,66 ; -23,48]
Limite 95 % sup. d'accord	41,84 [32,75 ; 50,93]

Le biais moyen est de 4,63 %, et son intervalle de confiance à 95 % est [-0,68; 9,95]. Par conséquent, le premier critère de concordance « la série de mesures du lecteur 2 ne surestimait ou ne sous-estimait pas celle du lecteur 1 de plus de 15 % » est respecté.

La limite inférieure d'accord est, en valeur absolue, inférieure à 35 %, mais la valeur seuil de 35 % est incluse dans son intervalle de confiance. De plus, la limite supérieure d'accord est supérieure à 35 %. Le second critère de concordance n'est donc pas vérifié pour ces cellules.

4.2.1.2.5 Cellules acidophiles : IE

Figure 36 : courbes de Bland et Altman pour l'index éosinophilique avec la méthode D



Biais	4,54 [-1,18 ; 10,26]
Limite 95 % inf. d'agrément	-35,53 [-45,32 ; -25,74]
Limite 95 % sup. d'agrément	44,61 [34,82 ; 54,4]

Le biais moyen est de 4,54 %, et son intervalle de confiance à 95 % est [-1,18; 10,26]. Par conséquent, le premier critère de concordance « la série de mesures du lecteur 2 ne surestimait ou ne sous-estimait pas celle du lecteur 1 de plus de 15 % » est respecté.

Les limites inférieures et supérieures d'agrément sont, en valeur absolue, supérieures à 35 %, valeur seuil fixée pour le second critère. Le second critère de concordance n'est donc pas vérifié pour ces cellules.

4.2.2 Avec la méthode Diag-Œstro®

4.2.2.1 Coefficient de corrélation de Lin

Le Tableau 7 présente les coefficients de concordance de Lin avec leurs intervalles de confiance ainsi que l'interprétation de ces valeurs.

Tableau 7 : concordance entre le pourcentage de cellules comptées par les 2 lecteurs avec la méthode DO par le CCL

	CCL [IC]	Interprétation de la valeur du CCL
Pb	0,58 [0,43 ; 0,73]	Mauvais
IB	0,73 [0,61 ; 0,85]	Moyennement satisfaisant
IPC	0,68 [0,53 ; 0,83]	Passable
Kérat	0,57 [0,38 ; 0,76]	Mauvais
IE	0,78 [0,67 ; 0,89]	Moyennement satisfaisant

Les pourcentages de Pb et de kérat possèdent un CCL très faible de respectivement 0,58 et 0,57, d'où une mauvaise corrélation.

Le CCL pour les IPC est un peu meilleur avec une valeur de 0,68 considérée comme passable.

Les pourcentages d'IB et l'IE ont un CCL de respectivement 0,73 et 0,78, soit une concordance de lecture moyennement satisfaisante.

4.2.2.2 Graphiques de Bland et Altman

Par la suite, nous ne présenterons pas tous les graphiques de Bland et Altman pour plus de clarté. Seules les valeurs des biais moyens et des limites d'agrément accompagnées de leurs intervalles de confiance sont indiquées dans le tableau 8.

Tous les graphiques seront présentés en Annexe VII.

Tableau 8 : biais et limites d'agrément pour les différents types de cellules avec la méthode DO

	Biais [IC]	Limite 95 % inf d'agrément [IC]	Limite 95 % sup. d'agrément [IC]
Pb	-3,53 [-7,2 ; 0,13]	-29,2 [-35,47 ; -22,93]	22,13 [15,86 ; 28,4]
IB	7,36 [0,95 ; 13,77]	-37,5 [-48,46 ; -26,55]	52,22 [41,26 ; 63,18]
IPC	-2,55 [-7,82 ; 2,73]	-39,49 [-48,51 ; -30,46]	34,39 [25,37 ; 43,42]
Kérat	7,36 [0,95 ; 13,77]	-37,5 [-48,46 ; -26,55]	52,22 [41,26 ; 63,18]
IE	-1,74 [-9,04 ; 5,55]	-52,81 [-65,28 ; -40,33]	49,32 [36,85 ; 61,8]

On remarque que le premier critère de concordance « la nouvelle méthode ne surestime pas ou ne sous-estime pas la méthode de référence de plus de 15 % » est respecté pour chaque type de cellule. En effet, nous avons un écart systématique (« biais moyen ») au maximum de 7,36 %, et les bornes des intervalles de confiance des biais moyens sont inférieures à 15 % en valeur absolue.

Les limites inférieures et supérieures d'agrément pour les IB, les IPC, les kérat et l'IE sont en valeur absolue, supérieures à 35 %, valeur seuil fixée pour le second critère. Le second critère de concordance n'est donc pas vérifié pour ces cellules.

Pour les Pb, les limites d'agrément sont en valeur absolue inférieures à 35 %. L'intervalle de confiance de la limite inférieure d'agrément comprend 35 % puisqu'elle est de [35,47 ; 22,93]. Cependant, au vu de la valeur très proche de 35 %, on décide de dire qu'il y a quand même

de grandes chances pour que la majorité des écarts ne soit pas supérieure en valeur absolue à 35 % et donc que le second critère de concordance est respecté pour les Pb.

4.3 Évaluation de concordance entre les séries de mesures des deux méthodes de coloration

Les valeurs prises en compte pour l'analyse statistique sont présentées en Annexe VIII et Annexe IX.

4.3.1 Lecteur 1

4.3.1.1 Coefficient de corrélation de Lin

Le Tableau 9 présente les coefficients de concordance de Lin avec leurs intervalles de confiance ainsi que l'interprétation de ces valeurs.

Tableau 9 : concordance entre les pourcentages de cellules comptés avec les 2 méthodes par le lecteur 1 par le CCL

	CCL [IC]	Interprétation de la valeur du CCL
Pb	0,46 [0,25 ; 0,67]	Inacceptable
IB	0,73 [0,6 ; 0,86]	Moyennement satisfaisant
IPC	0,41 [0,2 ; 0,62]	Inacceptable
Kérat	0,3 [0,07 ; 0,53]	Inacceptable
IE	0,92 [0,89 ; 0,95]	Très bon

Les CCL concernant les Pb, les IPC et les kérat ont des valeurs très faibles considérées comme inacceptables soit, respectivement, 0,46 ; 0,41 et 0,3.

Les pourcentages d'IB ont un CCL moyennement satisfaisant, d'une valeur de 0,73.

Le CCL le plus élevé est obtenu pour l'IE. Il possède une valeur de 0,92 considérée comme très bonne.

La concordance entre les deux méthodes pour les Pb, les IPC et les kérat n'est donc pas acceptable et elle est moyennement satisfaisante pour les IB pour le lecteur 1.

Cependant, la concordance entre les deux méthodes est très bonne pour l'IE.

4.3.1.2 Graphiques de Bland et Altman

Le Tableau 10 présente les biais et limites d'agrément des graphiques de Bland et Altman pour les différents types de cellules du lecteur 1.

Tableau 10 : biais et limites d'agrément pour les différents types de cellules du lecteur 1

	Biais [IC]	Limite 95 % inf. d'agrément [IC]	Limite 95 % sup. d'agrément [IC]
Pb	2,16 [-2,53 ; 6,84]	-30,96 [-38,97 ; -22,95]	35,28 [27,27 ; 43,28]
IB	-5,07 [-10,82 ; 0,69]	-45,75 [-55,58 ; -35,91]	35,61 [25,77 ; 45,45]
IPC	-9,52 [-18,11 ; -0,94]	-70,23 [-84,91 ; -55,55]	51,18 [36,5 ; 65,86]
Kérat	12,43 [2,5 ; 22,37]	-57,83 [-74,83 ; -40,84]	82,7 [65,71 ; 99,7]
IE	2,91 [-0,61 ; 6,43]	-21,97 [-27,98 ; -15,95]	27,79 [21,77 ; 33,8]

On remarque que le 1^{er} critère de concordance « la nouvelle méthode ne surestime pas ou ne sous-estime pas la méthode de référence de plus de 15 % » est respecté pour chaque type de cellule, puisque nous avons un écart systématique (« biais moyen ») au maximum de 12,43 %.

Cependant, la valeur seuil fixée du 1^{er} critère 15 % est incluse dans l'intervalle de confiance du biais moyen pour les IPC et les kérat ; donc on ne peut pas être en totale confiance dans le fait de penser que, réellement, le premier critère de concordance a de grandes chances d'être vérifié pour ces 2 types de cellules.

Les limites, supérieure et inférieure, d'agrément pour l'IE sont de -21,97 % et de 27,9 % et elles respectent le deuxième critère de concordance « la très grande majorité des écarts entre l'une et l'autre des mesures était inférieure à 35%, en valeur absolue ».

Les limites inférieures et supérieures d'agrément pour les IB, les IPC et les kérat sont, en valeur absolue, supérieures à 35 %, valeur seuil fixée pour le 2nd critère. Le deuxième critère de concordance n'est donc pas vérifié pour ces cellules.

La limite inférieure d'agrément pour les Pb est de -30,96 ; donc inférieure à la limite que l'on s'était fixée pour le deuxième critère de concordance (35 % en valeur absolue). L'intervalle de confiance à 95 % de cette limite inférieure d'agrément est de [-38,97 ; -22,95], indiquant qu'il y a 95 % de chances pour que la vraie limite inférieure de l'agrément soit comprise entre 33,8 % et 22,95 %. Comme la valeur que nous avons fixée de 35 % est incluse dans l'intervalle de confiance, cela veut donc dire qu'il y a malheureusement des risques pour que le critère « [...] la très grande majorité des écarts entre la nouvelle méthode et la méthode de référence est inférieure à 35 % (en valeur absolue) » ne soit finalement pas respecté.

De plus, la limite supérieure d'agrément est de 35,28 %, donc supérieure à la limite que l'on s'était fixée pour le deuxième critère de concordance (35 % en valeur absolue).

Le deuxième critère n'est donc pas respecté pour les Pb.

Les deux critères de concordance sont respectés pour l'IE.

Le premier critère de concordance est respecté pour les Pb et les IB mais pas le second.

Les deux critères de concordance ne sont pas respectés pour les IPC et les kérat.

4.3.2 Lecteur 2

4.3.2.1 Coefficient de corrélation de Lin

Le Tableau 11 présente les coefficients de concordance de Lin avec leurs intervalles de confiance ainsi que l'interprétation de ces valeurs.

Tableau 11 : concordance entre les pourcentages de cellules comptés avec les 2 méthodes par le lecteur 2 par le CCL

	CCL [IC]	Interprétation de la valeur du CCL
Pb	0,76 [0,65 ; 0,87]	Moyennement satisfaisant
IB	0,78 [0,67 ; 0,89]	Moyennement satisfaisant
IPC	0,18 [-0,06 ; 0,42]	Inacceptable
Kérat	0,36 [0,12 ; 0,6]	Inacceptable
IE	0,81 [0,72 ; 0,9]	Plutôt bon

Les CCL concernant les IPC et les kérat possèdent des valeurs considérées comme inacceptables, soit, respectivement, 0,18 et 0,36.

Les Pb et les IB ont une valeur de CCL moyennement satisfaisante de 0,76 et 0,78.

Enfin, l'IE possède la valeur de CCL la plus élevée de 0,81, considérée comme plutôt bonne.

La concordance entre les deux méthodes pour les IPC et les kérat n'est pas acceptable pour le lecteur 2. Elle est moyennement satisfaisante pour les Pb et les IB et plutôt bonne pour l'IE.

4.3.2.2 Graphiques de Bland et Altman

Le Tableau 12 présente les biais et limites d'agrément des graphiques de Bland et Altman pour les différents types de cellules du lecteur 2.

Tableau 12 : biais et limites d'agrément pour les différents types de cellules du lecteur 2

	Biais [IC]	Limite 95 % inf. d'agrément [IC]	Limite 95 % sup. d'agrément [IC]
Pb	0,29 [-1,83 ; 2,41]	-14,71 [-18,34 ; -11,09]	15,29 [11,66 ; 18,91]
IB	3,06 [-3,24 ; 9,37]	-41,49 [-52,27 ; -30,72]	47,62 [36,85 ; 58,4]
IPC	-10,56 [-21,01 ; -0,12]	-84,41 [-102,26 ; -66,55]	63,28 [45,42 ; 81,13]
Kérat	7,21 [-3,13 ; 17,56]	-65,95 [-83,64 ; -48,25]	80,38 [62,68 ; 98,07]
IE	-3,35 [-10,13 ; 3,43]	-51,26 [-62,84 ; -39,67]	44,56 [32,97 ; 56,14]

On remarque que le premier critère de concordance « la nouvelle méthode ne surestime pas ou ne sous-estime pas la méthode de référence de plus de 15 % » est respecté pour chaque type de cellule, puisque nous avons un écart systématique (« biais moyen ») au maximum de 10,56 %.

Cependant, la valeur seuil fixée du 1^{er} critère 15 % est incluse dans l'intervalle de confiance du biais moyen pour les IPC et les kérat, donc on ne peut pas être en totale confiance dans le fait de penser qu'en vrai, le premier critère de concordance a de grandes chances d'être vérifié pour ces 2 types de cellules.

Les limites, supérieure et inférieure, d'agrément pour les Pb sont de -14,71 % et 15,29 %, respectent le deuxième critère de concordance « la très grande majorité des écarts entre l'une et l'autre des mesures était inférieure à 35 %, en valeur absolue ».

Les limites inférieures et supérieures d'agrément pour les IB, les IPC, les kérat et l'IE, sont en valeur absolue, supérieures à 35 %, valeur seuil fixée pour le deuxième critère. Le deuxième critère de concordance n'est donc pas vérifié pour ces cellules.

Les deux critères de concordance sont respectés pour les Pb.

Pour les IB et l'IE, le premier critère de concordance est respecté mais pas le second.

Pour les IPC et les kérat, les deux critères de concordance ne sont pas respectés.

D'après le CCL, la concordance des lecteurs concernant la méthode D est plutôt bonne pour les kérat et l'IE. Cependant seul le premier critère de concordance est vérifié.

Avec la méthode DO, les CCL les plus élevés concernent l'IE et les IB mais la concordance est moins forte puisqu'elle n'est que moyennement satisfaisante. Seul les Pb respectent les deux critères de concordance bien que le CCL soit de 0,58 considéré comme mauvais.

En ce qui concerne la concordance entre les deux méthodes de coloration, le lecteur 1 a un CCL très bon de 0,92 pour l'IE, de plus les deux critères de concordance sont vérifiés.

Le CCL pour l'IE du lecteur 2 est de 0,81 soit plutôt bon mais seul le premier critère est respecté.

Le lecteur 2 vérifie les deux critères de concordance pour les Pb avec un CCL moyennement satisfaisant de 0,76.

Seul le premier critère de concordance est vérifié pour les IB et aucun des deux critères n'est vérifié concernant les IPC et les kérat et cela pour les deux lecteurs.

5 Discussion

5.1 Difficultés rencontrés lors de l'expérimentation

Plusieurs limites inhérentes aux protocoles de coloration ont pu être mises en évidence lors de la mise en place de l'expérimentation.

5.1.1 Étapes de fixation et de coloration

Une première série de lames a été récoltée. Chaque jour, les écouvillons étaient étalés sur des lames et fixés à l'aide d'un cytofixateur.

Il avait été décidé de colorer les lames lorsqu'elles atteindraient un total de 200 (donc pour 100 chiennes). En attendant ces dernières étaient conservées sans lamelle dans une boîte en bois.

Après environ 1 mois de collecte, au moment de la coloration des lames, nous avons remarqué que les frottis ne prenaient qu'une coloration éosinophile. Toutes les cellules apparaissaient rouges, y compris les cellules parabasales, ou les petites intermédiaires normalement colorées en bleu.

Une étude menée par Oettlé et Weldhagen en 1982 a mis en évidence le même phénomène lorsque le frottis avait commencé à sécher avant la fixation, ou si la coloration était différée, et qu'il n'était pas réhydraté dans de l'eau distillée avant l'étape de coloration (Oettlé et Weldhagen, 1982).

Nous avons donc essayé de passer les lames dans l'eau quelques minutes avant la coloration sans succès.

Cela nous a permis de savoir qu'il était nécessaire de colorer les lames rapidement après fixation. Dans la pratique courante d'un vétérinaire, cela ne pose pas vraiment de problème étant donné que la coloration a lieu directement après la fixation dans le cadre d'une consultation.

5.1.2 Étapes de coloration et de lecture

Une deuxième série de lames a de nouveau été collectée.

La coloration se faisait le jour même de la fixation pour tous les frottis.

La lecture des lames était prévue lorsqu'elles atteindraient un total de 100 (donc pour 50 chiennes).

L'observation des lames s'est déroulée environ deux mois après le début de la collecte. Cependant, il a été observé que beaucoup de lames présentaient des couleurs très pâles et étaient quasi illisibles. En regardant la correspondance entre le codage des lames et la méthode de coloration utilisée, nous avons remarqué que toutes les lames pâles correspondaient à celles colorées avec la méthode DO (Figure 37 et 38).

Figure 37 : frottis coloré avec la méthode Diagnoestrus® au grossissement 100 (cliché A.-L. Dutey)

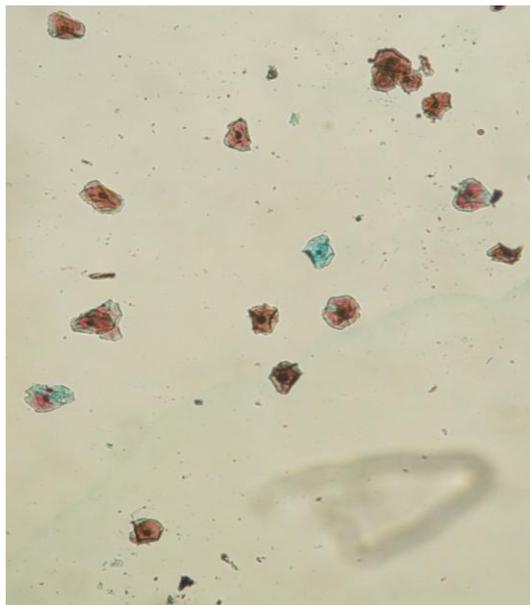
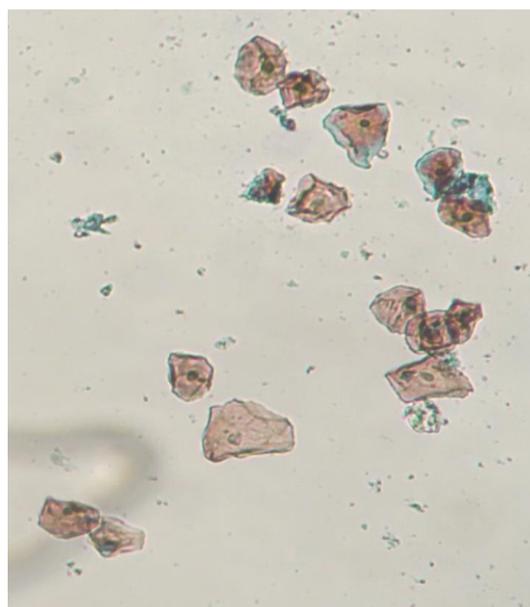


Figure 38 : frottis coloré avec la méthode DO au grossissement 100 provenant de la même chienne que le frottis de la figure 36 (cliché A.-L. Dutey)



Cela nous a permis de constater que la nouvelle méthode de coloration nécessite une lecture immédiate ou rapide après coloration.

5.2 À propos de la concordance entre les séries de mesures des deux opérateurs

5.2.1 Avec la méthode de coloration D

En ne s'intéressant qu'aux CCL, seules les lectures des cellules kératinisées et celles de l'ensemble des cellules acidophiles sont plutôt concordantes, avec une concordance qualifiée de « plutôt bonne ».

Concernant les cellules parabasales, la valeur du CCL est inacceptable.

Cependant, lorsqu'on regarde les tracés de Bland et Altman, on s'aperçoit que le premier critère est respecté, et qu'il y a des chances pour que le deuxième critère le soit aussi.

Seul le premier critère de concordance est respecté pour les IB, les IPC, les kérat et l'IE, c'est-à-dire que l'un des lecteurs ne surestime ou ne sous-estime pas l'autre de plus de 15 %. L'écart systématique des valeurs obtenues pour chaque type cellulaire entre les 2 lecteurs est donc inférieur à 15 % en valeur absolue.

La concordance des 2 lecteurs n'est donc pas vérifiée pour les IB, les IPC, les kérat et l'IE.

Nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement à la concordance des lectures de l'IE qui est l'élément ayant un intérêt clinique majeur.

Le deuxième critère de concordance n'est pas respecté pour les cellules acidophiles, c'est-à-dire que la très grande majorité des écarts entre le lecteur 1 et le lecteur 2 n'est pas inférieure à 35 %. Par « très grande majorité des écarts » on entend 95 % des écarts. Quand on regarde le tableau 13, comparant le pourcentage de cellules acidophiles des frottis colorés avec la méthode D entre le lecteur 1 et le lecteur 2, on s'aperçoit toutefois que seuls 3 couples de valeurs (surlignés dans le tableau) sur 48 ont un écart de plus de 35 %.

Tableau 13 : comparaison des IE de chaque lecteur avec la méthode D

IE D lecteur 1	IE D lecteur 2
72 %	89 %
23 %	94 %
97 %	100 %
94 %	84 %
100 %	100 %
100 %	100 %
57 %	100 %
100 %	100 %
100 %	100 %
24 %	17 %
75 %	91 %
97 %	97 %
100 %	100 %
15 %	0 %
97 %	100 %
6 %	11 %
94 %	100 %
17 %	0 %
91 %	95 %
97 %	98 %
100 %	100 %
100 %	100 %
90 %	94 %
83 %	86 %
100 %	100 %
100 %	86 %
77 %	87 %
6 %	8 %
0 %	0 %
97 %	97 %
97 %	92 %
80 %	78 %
10 %	3 %
60 %	83 %
74 %	71 %
94 %	100 %
100 %	100 %
11 %	8 %
87 %	96 %
100 %	94 %
100 %	88 %
68 %	97 %
91 %	70 %
97 %	94 %
8 %	100 %
14 %	6 %
9 %	13 %
0 %	0 %

Il y a donc seulement environ 6 % (3/48) des écarts supérieurs à 30 % au lieu des 5 % admis dans la phrase « la très grande majorité des écarts entre les deux lecteurs doit être inférieure à 35 % », ce qui n'est pas très différent.

De plus, les valeurs seuil fixées de -35 % et +35 % sont incluses dans les intervalles de confiance des limites inférieure et supérieure d'agrément : [-45,32 ; -25,74] et [34,82 ; 54,4] ; donc il y a des chances pour que le 2nd critère soit quand même vérifié.

5.2.2 Avec la méthode DO

Les CCL obtenus avec la méthode DO sont globalement moins bons qu'avec la méthode D, excepté pour les cellules parabasales. En effet, les cellules kératinisées et l'index éosinophilique possèdent un CCL les classant dans la catégorie « plutôt bons » avec la méthode D alors qu'avec DO les CCL sont respectivement « mauvais » et « moyennement satisfaisant » pour ces deux paramètres.

Avec les graphiques de Bland et Altman, les deux critères de concordance sont respectés pour les cellules parabasales. On voit ici l'importance de réaliser les tracés de Bland et Altman en complément du calcul des CCL. Effectivement, le CCL pour ces cellules est de 0,58 impliquant donc une concordance considérée comme mauvaise. Cependant, les considérations cliniques impliquées dans l'interprétation des courbes de Bland et Altman permettent de conclure à une lecture concordante des deux lecteurs.

Seul le premier critère de concordance est respecté pour toutes les autres cellules, comme c'était le cas avec la méthode DO.

Nous allons là encore nous intéresser plus particulièrement à la concordance des lectures de l'IE.

Le 2nd critère de concordance n'est pas respecté, c'est-à-dire que la très grande majorité des écarts entre le lecteur 1 et le lecteur 2 n'est pas inférieure à 30 %. Quand on regarde le Tableau 13 comparant le pourcentage de cellules acidophiles des frottis colorés avec la méthode DO entre le lecteur 1 et le lecteur 2, on s'aperçoit que 4 couples de valeurs sur 48, soit environ 8 %, ont un écart de plus de 35 %.

De plus, les valeurs seuil fixées de -35 % et +35 % ne sont pas incluses dans les intervalles de confiance des limites inférieure et supérieure d'agrément.

La concordance n'est donc pas acceptable entre les deux lecteurs en ce qui concerne l'IE avec la méthode DO.

L'équivalence des résultats entre les deux lecteurs semble donc meilleure avec la méthode D qu'avec la méthode DO.

La différence de résultats entre les deux opérateurs peut être liée au fait que ces derniers n'aient pas lu les lames au même moment. En effet, le lecteur 2 a lu les lames plus tôt que le lecteur 1. Le délai de lecture entre les deux opérateurs était de quelques semaines à un mois.

Comme décrit précédemment, avec le temps, les couleurs ont tendance à perdre en intensité, d'où une lecture plus difficile. Les résultats seront probablement différents pour une même lame si la lecture est faite immédiatement après la coloration ou quelques temps après.

Il serait intéressant de faire lire une même lame à un même opérateur à plusieurs intervalles de temps après coloration afin de voir l'impact de la perte de coloration sur la précision de la lecture et ainsi de déterminer une durée maximale de la lecture des frottis.

5.3 À propos de la concordance entre les séries de mesures des deux méthodes de coloration

Les deux lecteurs obtiennent une concordance inacceptable entre les deux méthodes de coloration pour les IPC et les kérat. En effet, les CCL sont très faibles et les deux critères de concordance pour les tracés de Bland et Altman ne sont pas respectés.

La concordance est très mauvaise pour les IPC et les kérat, mais elle est plutôt bonne à très bonne pour l'IE. En effet, quand on compare les moyennes des pourcentages d'IPC et de kérat obtenues avec la méthode D et la méthode DO, on s'aperçoit que la moyenne d'IPC est plus élevée avec la méthode D qu'avec la DO, et que la moyenne de kérat est plus élevée avec la méthode DO qu'avec la D, et cela pour les deux lecteurs (Tableau 14). D'où une mauvaise concordance pour ces deux types cellulaires.

Tableau 14 : moyennes (moy) des pourcentages en IPC et kérat des deux lecteurs en fonction de la méthode de coloration

	Moy IPC D	Moy IPC D0	Moy kérat D	Moy kérat D0
Lecteur 1	41 %	32 %	28 %	41 %
Lecteur 2	39 %	29 %	33 %	40 %

Le nouveau protocole rapide ne fait donc pas correctement la distinction entre IPC et kérat, il surestime les kérat et sous-estime les IPC par rapport à la méthode D. Ce fait est vérifié pour les deux opérateurs, ce n'est donc à priori pas un défaut de lecture, mais bien une composante inhérente à la méthode de coloration.

L'IE possède tout de même une concordance correcte car il n'est pas affecté par le fait qu'une cellule soit class e IPC ou kérat. En effet, l'IE correspond au nombre de cellules éosinophiles (IPC et kérat) sur le nombre de cellules total.

Pour les IB, les deux lecteurs sont cohérents et obtiennent un CCL moyennement satisfaisant et un seul critère de concordance respecté pour le tracé de Bland et Altman.

Une disparité apparaît entre les lecteurs pour la concordance des Pb et de l'IE entre les deux méthodes de coloration.

Le lecteur 2 obtient une lecture concordante pour les Pb. En effet, bien que le CCL soit moyennement satisfaisant, les deux critères que nous nous sommes fixés sont respectés. Le lecteur 1, quant à lui, obtient une valeur de CCL inacceptable pour ces cellules et un seul critère de concordance respecté.

Cette différence peut être expliquée par le fait que lorsque le frottis est majoritairement basophile et riche en cellules, un champ peut être beaucoup plus riche en Pb ou en IB en fonction de la zone sélectionnée.

De plus, il n'a pas été fait de différence entre petite cellule intermédiaire basophile et grande cellule intermédiaire basophile dans notre classification. La différence peut être subtile entre une Pb et une

petite IB. Il est donc possible que les critères d'inclusion dans une catégorie plutôt qu'une autre soit différente selon l'opérateur.

Le lecteur 1 trouve une très bonne concordance pour le calcul de l'IE entre les deux méthodes. En effet, le CCL est élevé et les deux critères de concordances de Bland et Altman sont respectés.

Le lecteur 2, quant à lui, conclut à une concordance un peu plus faible que le lecteur 1 pour l'IE. Le CCL est de 0,81 soit plutôt bon, mais seul le premier critère de concordance est respecté.

Si l'on retrace les courbes de Bland et Altman pour le lecteur 2, en essayant d'être moins strict et en s'accordant sur le fait de dire que « la très grande majorité des écarts » signifie 90 % des écarts au lieu des 95 % définis lors de cette étude, on obtient les résultats présentés dans le tableau suivant (Tableau 15).

Tableau 15 : biais et limites d'agrément de l'IE avec un agrément de 90 %

Biais	-3,37 [-10,15 ; 3,41]
Limite 95 % inf. d'agrément	-43,37 [-53,95 ; -32,78]
Limite 95 % sup. d'agrément	36,63 [26,05 ; 47,21]

Le premier critère est toujours respecté.

Les limites inférieures et supérieures d'agrément sont en valeur absolue, supérieures à 35 %. Cependant, la valeur seuil fixée à 35 % en valeur absolue est incluse dans les intervalles de confiance des limites d'agrément : [-53,95 ; -32,78] et [26,05 ; 47,21] donc il y a des chances pour que le 2nd critère soit quand même vérifié.

On ne peut donc pas conclure avec force que la méthode est bonne, mais on ne peut pas non plus dire qu'elle ne l'est pas pour le lecteur 2.

Lorsqu'on s'intéresse de plus près aux 4 couples de frottis présentant un écart de plus de 35 % entre l'IE calculé avec la méthode D et celui calculé avec la méthode DO, pour le lecteur 2, on s'aperçoit que pour 3 de ces couples la majorité des cellules sont catégorisées en IB pour la méthode DO alors qu'elles sont dans la catégorie IPC avec la méthode D.

Ces cellules présentaient peut être une kératinisation très débutante avec une petite partie présentant une coloration rouge à peine visible. Il est possible que les frottis colorés avec la méthode DO commençaient déjà à pâlir au moment de la lecture, d'où la difficulté de distinguer une légère coloration rouge sur les cellules pour un lecteur moins expérimenté.

L'expérience du lecteur 1 a, de plus, sûrement son importance dans les différences de résultats. En effet, le lecteur 1 a l'habitude de lire des lames de frottis colorés par une méthode unichrome avec laquelle la morphologie des cellules est le seul moyen de les interpréter.

Lors de faible coloration au cours de notre expérimentation, la morphologie des cellules était un critère important à prendre en compte pour classer une cellule dans une catégorie plutôt qu'une autre. L'expérience du lecteur 1 dans ce domaine est donc sans nul doute un paramètre à prendre en compte.

Pour des raisons de disponibilité, le lecteur 1 a lu les lames en fonction de leur coloration. La lecture était immédiate si ces dernières semblaient pâlir ; elle était remise à plus tard si la coloration était encore vive et les couleurs bien identifiables.

Cela implique que les couples de lames n'étaient pas forcément lus au même moment ; ce qui peut donc avoir un impact sur la concordance finale des différentes cellules. Cependant, malgré cette limitation, le lecteur 1 obtient quand même une très bonne concordance entre les deux méthodes de coloration pour le calcul de l'index éosinophilique.

Les couleurs bleues ou rouges obtenues avec la méthode DO semblent bien franches immédiatement après coloration, mais deviennent de plus en plus pâles avec le temps si elles ne sont pas recouvertes par une lamelle.

Cette caractéristique implique une lecture plus ou moins facile après un certain temps. En effet, les couleurs devenant trop pâles, il devient très difficile de distinguer le rouge du bleu.

Compte tenu de ce constat, il serait intéressant de mettre en place une nouvelle étude où les lames seraient colorées et lues le jour même. Ce travail de coloration et de lecture étant très chronophage, il serait judicieux de ne réaliser qu'un à deux frottis par jour sur une plus longue période afin d'obtenir un nombre plus important de chiennes et ainsi d'augmenter la puissance statistique. Un total de 100 chiennes, soit 200 frottis, serait un nombre satisfaisant.

Pour conserver des couleurs franches dans le temps, il serait possible d'essayer de protéger les lames avec des lamelles en verre.

La fiabilité du nouveau protocole de coloration est donc satisfaisante pour le lecteur 1 mais pas pour le lecteur 2. Pour ce dernier, une concordance entre les deux méthodes existe bien, mais elle n'est pas assez forte pour conclure que les deux méthodes sont équivalentes. Or le lecteur 2 possède des caractéristiques proches des vétérinaires qui lisent les lames en clientèle.

Cependant, ce nouveau protocole présente l'intérêt majeur d'être applicable en clientèle vétérinaire quotidienne et d'être beaucoup plus facile à lire qu'une coloration unichrome.

Il est donc intéressant, pour un vétérinaire non expérimenté, d'interpréter les frottis vaginaux colorés par ce protocole presque aussi rapide qu'une coloration normochrome. Ainsi, il pourra interpréter le frottis grâce à deux critères : morphologie cellulaire et coloration.

Devant les bons résultats obtenus par le lecteur 1 et l'utilité non négligeable de ce nouveau protocole, il paraît intéressant de l'utiliser en pratique vétérinaire quotidienne afin de montrer la présence d'une imprégnation œstrogénique.

CONCLUSION

Le but de notre étude expérimentale était de valider un protocole de coloration rapide des frottis vaginaux.

Il a été observé que les lectures des deux opérateurs n'étaient pas tout à fait concordantes pour les différentes populations cellulaires, que ce soit avec la méthode Diagnouestrus® ou avec la méthode Diag-Æstro®, bien que la concordance soit globalement meilleure avec la coloration Diagnouestrus®.

L'index éosinophilique est l'élément qui a été pris en compte pour valider ou non l'équivalence des deux méthodes. En effet, lors de lecture de frottis vaginaux, c'est la présence ou non d'imprégnation œstrogénique qui intéresse le clinicien donc la présence de cellules acidophiles.

Les résultats statistiques concernant les lectures de l'opérateur 1 sont très bons et concluent à une équivalence des deux méthodes de coloration et donc à la validation du nouveau protocole. Cependant, les résultats du lecteur 2 ne sont pas aussi nets. Une corrélation existe bel et bien pour cet opérateur, mais elle n'est pas assez forte pour permettre de dire que la nouvelle méthode de coloration donne des résultats comparables à la méthode Diagnouestrus®.

Compte tenu des limites mises en évidence, et notamment de la lecture tardive des frottis, il serait intéressant de prolonger l'étude en réalisant des frottis colorés et analysés le jour même par les deux lecteurs. Cela serait éventuellement possible en ne réalisant qu'un à deux frottis par jour sur une plus longue durée d'étude.

En effet, à première vue, il semblerait qu'une lecture immédiate donne des résultats identiques entre les deux colorations. De plus, une lecture instantanée serait plus représentative de la pratique vétérinaire quotidienne dans le cadre d'une consultation.

ANNEXES

Référence : Kit Diagnœstro 363260-0000

Kit Diag-œstro

DETERMINATION DE L'IMPRÉGNATION OESTRŒGÉNIQUE DANS LE CYCLE SEXUEL CHEZ LA CHIENNE OU DANS LE DIAGNOSTIC DU SYNDROME DE FÉMINISATION CHEZ LE CHIEN PAR LA COLORATION DE SHORR-HEMATOXYLINE STABILISÉE

Principe :

La coloration par le kit Diagnœstro est une coloration de Shorr simplifiée. Le principe de cette technique repose sur la différenciation des cellules selon leur affinité tinctoriale.

Les précurseurs cytoplasmiques de la kératine se colorent en rouge orangé. Les cellules basophiles apparaissent bleues, et les cellules acido-philes rouges orangées.

Cette technique permet la coloration des frottis vaginaux chez la chienne notamment pour la détermination de la période d'ovulation. Cette coloration permet l'évaluation de l'imprégnation oestrogénique des cellules préputiales (colorée par écouvillonnage de la cavité pénienne) dans le cas de suspicion de Sertolionome.

Description du kit : (6 x 100 ml)

Kit Diagnœstro C coffret de coloration :
Flacon 1 : Solution de rinçage N°1 100 ml
Flacon 2 : Hématoxyline stabilisée 100 ml
Flacon 3 : Différenciateur 100 ml
Flacon 4 : Solution de rinçage N°2 100 ml
Flacon 5 : Colorant de Shorr 100 ml
Flacon 6 : Solution de rinçage N°3 100 ml

Nombre de tests réalisables : 100 lames

Matériel spécifique nécessaire non fourni :

CytoRAL (code 361400-0075), eau distillée, papier absorbant

Utilisation :

Produit destiné à un usage exclusivement professionnel.
Usage de diagnostic in vitro.
L'enlèvement et le traitement des déchets chimiques et biologiques doivent être effectués par une entreprise spécialisée et agréée.
Conserver à température ambiante (15-25°C) et à l'abri de la lumière.
Durée de vie après ouverture : se conformer à la date de péremption de l'étiquette.

Préparation des échantillons :

Les échantillons doivent être préparés conformément aux méthodes en vigueur dans le laboratoire, en l'application de l'Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale, J.O. n°287 du 11 décembre 1999.

Recommandations et/ou notes d'utilisation :

Renouveler régulièrement les solutions de rinçage.
Veillez à bien refermer les flacons entre les étapes.
La couleur et la clarté du fond de colorations varient en fonction du pH de l'échantillon



RAL DIAGNOSTICS - Site Montesson - 35650 Martillac - France - Tél. : +33 (0)5 57 96 04 04 - Fax : +33 (0)5 57 96 04 05 - www.ral-diagnos.com

Kit Diag-œstro

DETERMINATION DE L'IMPRÉGNATION OESTRŒGÉNIQUE DANS LE CYCLE SEXUEL CHEZ LA CHIENNE OU DANS LE DIAGNOSTIC DU SYNDROME DE FÉMINISATION CHEZ LE CHIEN PAR LA COLORATION DE SHORR-HEMATOXYLINE STABILISÉE

Mode opératoire :

Veillez lire attentivement l'intégralité des informations qui suivent avant d'utiliser le produit. Préparer l'échantillon : - Fixer le frottis 1 à 5 secondes à l'aide du CytoRAL. Laisser sécher 1 minute

Temps de réalisation : 3 minutes

ETAPE 1 : - Plonger le frottis 5 fois dans le flacon 1 : solution de rinçage N°1
- Tamponner sur papier absorbant
- Rincer en plongeant 5 fois dans un flacon d'eau distillée

ETAPE 2 : - Plonger le frottis 5 fois dans le flacon 2 : Hématoxyline stabilisée
- Tamponner sur papier absorbant
- Rincer en plongeant 5 fois dans un flacon d'eau distillée

ETAPE 3 : - Différencier en plongeant le frottis 5 fois dans le flacon 3 : Différenciateur
- Tamponner sur papier absorbant

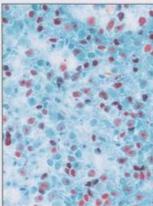
ETAPE 4 : - Rincer en plongeant 5 fois dans le flacon 4 : solution de rinçage N°2
- Tamponner sur papier absorbant

ETAPE 5 : - Plonger le frottis 10 fois dans le flacon 5 : colorant de Shorr
- Tamponner sur papier absorbant

ETAPE 6 : - Rincer en plongeant 5 fois dans le flacon 6 : solution de rinçage N°3
- Sécher à l'air

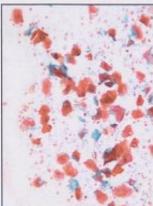
Résultats : interprétation des frottis vaginaux chez la chienne et préputiaux chez le chien

1. Début de proœstro (objx10)



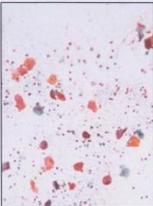
Hématies peu nombreuses, cellules superficiales rarement kératinisées et bleues.

2. Proœstro (objx10)



Hématies nombreuses, cellules superficiales prenant la coloration acido-phile.

3. Fin du proœstro (objx10)



Kératinisation, frottis "propre" présence d'hématies et de cellules épithéliales superficielles dispersées.

4. œstro (objx10)



Le frottis est plus riche en cellules superficielles, les kératinisées et regroupées en amas. Pas d'hématies, frottis "propre", très acido-phile rouge.

5. Anœstro (objx10)



Cellules parabasales, basophiles, les cellules superficielles sont allongées "en colonne". Autres cellules épithéliales en faible nombre.



cellules préputiales normales



cellules préputiales kératinisées



NOTICE D'UTILISATION



Annexe III : comptage des quatre populations cellulaires pour les 98 frottis analysés par le lecteur 1

N° frotti	Nombre de Pb	Nombre d'IB	Nombre d'IPC	Nombre kératinisées	Total cellules
1	0	0	0	30	30
2	0	1	26	6	33
3	0	0	17	16	33
5	0	1	20	14	35
6	0	2	28	6	36
7	0	1	20	16	37
8	0	1	12	25	38
9	0	0	16	19	35
10	0	0	22	8	30
11	0	0	4	30	34
12	0	3	23	6	32
13	0	3	21	11	35
15	0	0	17	13	30
16	0	3	28	0	31
17	0	2	5	28	35
18	13	16	0	2	31
19	0	0	8	27	35
20	3	3	20	9	35
21	0	4	24	2	30
22	8	23	0	4	35
23	0	1	16	27	44
24	0	16	19	2	37
25	0	9	5	18	32
26	3	22	5	2	32
27	21	10	4	0	35
28	0	0	8	23	31
29	0	0	22	13	35
30	14	30	0	0	44
31	15	10	9	0	34
32	2	29	1	1	33
33	0	1	6	26	33
34	0	8	24	0	32
35	0	3	13	16	32
36	13	13	6	6	38
37	0	4	26	7	37
38	0	2	19	9	30
39	1	1	13	21	36
40	0	0	8	24	32
41	0	1	19	14	34
42	0	3	17	12	32
43	0	3	20	17	40
44	0	0	12	22	34
45	0	12	18	0	30
46	0	0	6	24	30
47	0	10	21	0	31
48	0	1	29	5	35
49	0	4	23	13	40
50	0	32	3	2	37
51	0	2	4	30	36
52	0	5	15	11	31

53	1	12	14	13	40
54	0	3	18	11	32
55	10	20	0	0	30
56	0	0	3	26	29
57	0	0	11	23	34
58	4	23	1	3	31
59	0	1	15	16	32
60	0	0	16	17	33
61	0	7	22	6	35
62	0	0	33	8	41
63	0	7	20	3	30
64	19	11	0	1	31
65	13	22	2	1	38
66	18	11	2	1	32
67	0	2	27	3	32
68	0	0	10	20	30
69	0	3	14	16	33
70	0	27	2	1	30
71	0	1	11	24	36
72	4	24	1	4	33
73	0	4	18	11	33
74	0	29	2	0	31
75	2	31	0	1	34
76	3	25	0	3	31
77	0	1	11	21	33
78	0	4	19	9	32
79	0	0	8	27	35
80	0	8	23	0	31
81	0	0	0	30	30
82	0	4	16	12	32
83	2	1	17	12	32
84	0	1	1	32	34
85	12	17	0	1	30
86	0	2	29	0	31
87	5	23	4	5	37
88	0	23	1	6	30
89	0	0	30	3	33
90	0	1	13	18	32
91	0	0	0	30	30
92	21	2	1	6	30
93	0	3	17	12	32
94	17	20	0	0	37
95	2	28	6	0	36
96	0	2	26	4	32
97	0	0	0	30	30
98	0	2	27	8	37
99	6	27	0	0	33
100	0	1	4	27	32

Annexe IV : comptage des quatre populations cellulaires pour les 98 frottis analysés par le lecteur 2

N° frotti	Nombre de Pb	Nombre d'IB	Nombre d'IPC	Nombre kératinisées	Total cellules
1	0	0	0	30	30
2	0	1	19	14	34
3	0	0	13	25	38
4	0	2	23	8	33
5	0	1	19	16	36
7	0	1	14	22	37
8	0	3	19	17	39
9	0	0	27	15	42
10	0	0	6	29	35
11	0	0	4	30	34
12	0	0	30	1	31
13	0	1	19	19	39
14	0	0	15	15	30
15	0	1	14	17	32
16	0	2	31	2	35
17	0	1	14	23	38
18	9	32	3	2	46
19	0	0	14	19	33
20	0	6	16	20	42
21	0	1	24	1	26
22	7	40	1	1	49
23	0	1	8	25	34
24	0	0	16	21	37
25	0	4	17	15	36
26	9	25	1	0	35
27	1	36	1	2	40
28	0	1	9	21	31
29	0	5	20	11	36
30	16	39	0	0	55
31	1	20	13	2	36
32	1	32	0	0	33
33	0	0	4	30	34
34	30	4	40	0	74
35	0	0	12	22	34
36	2	31	0	0	33
38	0	1	9	23	33
39	0	0	6	29	35
40	0	1	8	21	30
41	0	1	12	30	43
42	0	2	14	21	37
43	0	0	17	21	38
44	0	3	12	20	35
45	0	5	20	5	30
46	0	3	5	32	40
47	0	12	26	2	40
48	0	0	30	6	36
49	0	7	24	3	34
50	1	32	5	0	38
51	0	1	14	19	34
52	0	2	6	26	34

53	0	10	16	4	30
54	0	2	25	7	34
55	2	30	0	0	32
56	0	0	0	30	30
57	0	0	3	31	34
58	7	24	0	0	31
59	0	3	15	17	35
60	0	5	23	12	40
61	0	8	29	0	37
62	0	0	6	30	36
63	0	4	16	11	31
64	3	41	0	1	45
65	1	32	0	2	35
66	3	32	0	0	35
67	0	0	27	13	40
68	0	0	13	21	34
69	0	3	23	13	39
70	2	29	1	1	33
71	0	0	17	30	47
72	7	31	0	0	38
73	0	4	19	13	36
74	6	31	0	3	40
75	4	26	0	0	30
76	0	30	0	1	31
77	0	0	0	30	30
78	0	0	26	7	33
79	0	1	11	20	32
80	0	10	23	1	34
81	2	29	2	0	33
82	0	0	19	12	31
83	0	4	8	19	31
84	0	1	8	20	29
85	14	19	1	0	34
86	0	0	29	3	32
87	19	5	2	3	29
88	1	1	30	0	32
89	0	0	28	6	34
90	0	0	2	24	26
91	0	33	4	0	37
92	11	5	3	12	31
93	0	2	12	24	38
94	15	24	0	0	39
95	17	33	0	0	50
96	1	5	32	0	38
97	0	0	0	30	30
98	0	4	9	22	35
99	3	27	0	0	30
100	0	0	10	24	34

Annexe V : comparaison des pourcentages des 4 populations cellulaires et de l'IE entre les 2 lecteurs pour la méthode D

% Pb lect 1	% PB lect 2	% IB lect 1	% IB lect 2	% IPC lect 1	% IPC lect 2	kérat lect 1	kérat lect 2	IE lect 1	IE lect 2
0%	0%	28%	11%	16%	47%	56%	42%	72%	89%
0%	3%	77%	3%	3%	94%	20%	0%	23%	94%
0%	0%	3%	0%	33%	0%	64%	100%	97%	100%
0%	3%	6%	13%	81%	84%	13%	0%	94%	84%
0%	0%	0%	0%	10%	0%	90%	100%	100%	100%
0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	100%
0%	0%	43%	0%	51%	43%	5%	57%	57%	100%
0%	0%	0%	0%	12%	12%	88%	88%	100%	100%
0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	100%
14%	66%	62%	17%	11%	7%	14%	10%	24%	17%
0%	0%	25%	9%	75%	91%	0%	0%	75%	91%
0%	0%	3%	3%	79%	56%	18%	41%	97%	97%
0%	0%	0%	0%	32%	9%	68%	91%	100%	100%
12%	18%	73%	82%	3%	0%	12%	0%	15%	0%
0%	0%	3%	0%	13%	29%	84%	71%	97%	100%
42%	20%	52%	70%	0%	7%	6%	4%	6%	11%
0%	0%	6%	0%	84%	68%	9%	33%	94%	100%
6%	34%	78%	66%	17%	0%	0%	0%	17%	0%
0%	0%	9%	5%	53%	32%	38%	63%	91%	95%
0%	0%	3%	2%	56%	28%	41%	70%	97%	98%
0%	0%	0%	0%	80%	17%	20%	83%	100%	100%
0%	0%	0%	0%	46%	64%	54%	36%	100%	100%
0%	0%	10%	6%	90%	89%	0%	6%	90%	94%
9%	0%	9%	14%	57%	38%	26%	48%	83%	86%
0%	0%	0%	0%	52%	34%	48%	66%	100%	100%
0%	0%	0%	14%	63%	56%	37%	31%	100%	86%
0%	0%	23%	13%	67%	52%	10%	35%	77%	87%
0%	15%	94%	78%	6%	0%	0%	8%	6%	8%
32%	29%	68%	71%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0%	0%	3%	3%	54%	38%	43%	59%	97%	97%
0%	0%	3%	8%	32%	49%	66%	44%	97%	92%
0%	0%	20%	22%	63%	78%	17%	0%	80%	78%
10%	0%	81%	97%	0%	0%	10%	3%	10%	3%

0%	0%	40%	17%	60%	67%	0%	17%	60%	83%
0%	0%	26%	29%	74%	68%	0%	3%	74%	71%
0%	0%	6%	0%	94%	91%	0%	9%	94%	100%
0%	0%	0%	0%	91%	82%	9%	18%	100%	100%
60%	3%	29%	90%	11%	3%	0%	5%	11%	8%
0%	0%	13%	4%	80%	92%	7%	4%	87%	96%
0%	0%	0%	13%	48%	58%	52%	30%	100%	94%
0%	0%	0%	3%	23%	34%	77%	63%	100%	88%
0%	0%	32%	30%	68%	65%	0%	5%	68%	97%
0%	0%	9%	6%	56%	74%	34%	21%	91%	70%
0%	0%	3%	0%	83%	83%	14%	17%	97%	94%
34%	3%	58%	91%	5%	0%	3%	6%	8%	100%
0%	3%	86%	84%	8%	13%	5%	0%	14%	6%
56%	9%	34%	91%	6%	0%	3%	0%	9%	13%
18%	10%	82%	90%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

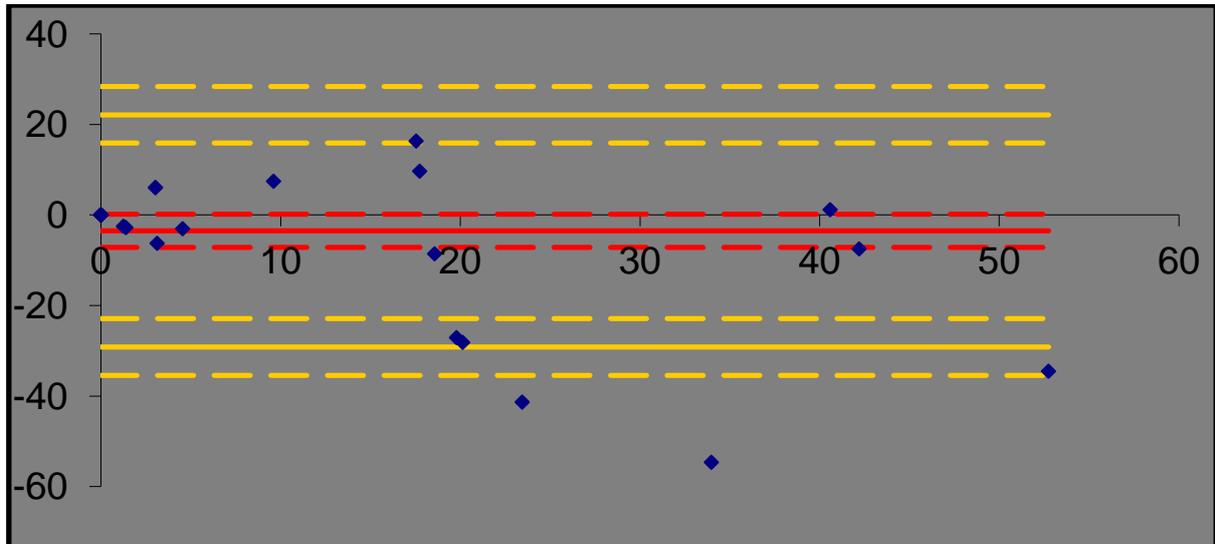
Annexe VI : comparaison des pourcentages des 4 populations cellulaires et de l'IE entre les 2 lecteurs pour la méthode DO

% Pb lect 1	% PB lect 2	% IB lect 1	% IB lect 2	% IPC lect 1	% IPC lect 2	kérat lect 1	kérat lect 2	IE lect 1	IE lect 2
0%	0%	0%	9%	35%	34%	65%	57%	100%	91%
13%	23%	74%	77%	3%	0%	10%	0%	13%	0%
0%	0%	9%	0%	72%	97%	19%	3%	91%	100%
0%	6%	0%	88%	0%	6%	100%	0%	100%	6%
0%	0%	9%	0%	41%	35%	50%	65%	91%	100%
0%	0%	3%	0%	31%	36%	67%	64%	97%	100%
0%	0%	0%	89%	0%	11%	100%	0%	100%	11%
0%	0%	9%	5%	53%	38%	38%	57%	91%	95%
0%	0%	13%	0%	50%	61%	38%	39%	88%	100%
70%	35%	7%	16%	3%	10%	20%	39%	23%	48%
6%	0%	3%	13%	53%	26%	38%	61%	91%	87%
0%	0%	13%	0%	59%	79%	28%	21%	88%	100%
0%	0%	8%	0%	50%	45%	43%	55%	93%	100%
9%	26%	69%	71%	16%	3%	6%	0%	22%	3%
0%	0%	9%	3%	60%	49%	31%	49%	91%	97%
40%	41%	57%	56%	0%	3%	3%	0%	3%	3%
0%	0%	10%	21%	58%	71%	33%	9%	90%	79%
6%	13%	91%	87%	0%	0%	3%	0%	3%	0%
0%	0%	3%	3%	57%	53%	40%	44%	97%	97%
0%	0%	2%	3%	36%	24%	61%	74%	98%	97%
0%	0%	3%	0%	18%	12%	79%	88%	97%	100%
0%	0%	0%	0%	33%	38%	67%	62%	100%	100%
0%	0%	3%	0%	41%	8%	56%	92%	97%	100%
3%	0%	30%	33%	35%	53%	33%	13%	68%	67%
0%	0%	3%	3%	3%	28%	94%	69%	97%	97%
0%	0%	7%	3%	63%	27%	30%	70%	93%	97%
0%	0%	5%	11%	73%	26%	22%	63%	95%	89%
61%	7%	35%	91%	0%	0%	3%	2%	3%	2%
46%	38%	54%	62%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
3%	0%	3%	0%	36%	17%	58%	83%	94%	100%
0%	0%	0%	3%	25%	27%	75%	70%	100%	97%
0%	0%	16%	6%	48%	18%	35%	76%	84%	94%
0%	6%	90%	88%	7%	3%	3%	3%	10%	6%
0%	0%	0%	3%	57%	44%	43%	53%	100%	97%
0%	0%	9%	8%	42%	59%	48%	33%	91%	92%
0%	0%	3%	9%	47%	43%	50%	49%	97%	91%
0%	0%	0%	0%	73%	17%	27%	83%	100%	100%

34%	6%	34%	94%	16%	0%	16%	0%	32%	0%
0%	0%	6%	3%	11%	41%	83%	56%	94%	97%
0%	0%	0%	8%	20%	13%	80%	80%	100%	100%
0%	0%	0%	3%	26%	29%	74%	68%	100%	93%
0%	0%	12%	11%	55%	53%	33%	36%	88%	97%
0%	0%	6%	3%	14%	37%	80%	61%	94%	89%
0%	0%	0%	0%	23%	42%	77%	58%	100%	97%
23%	14%	66%	82%	0%	2%	11%	2%	11%	100%
44%	3%	29%	56%	26%	36%	0%	6%	26%	4%
6%	3%	88%	97%	3%	0%	3%	0%	6%	42%
33%	6%	67%	94%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

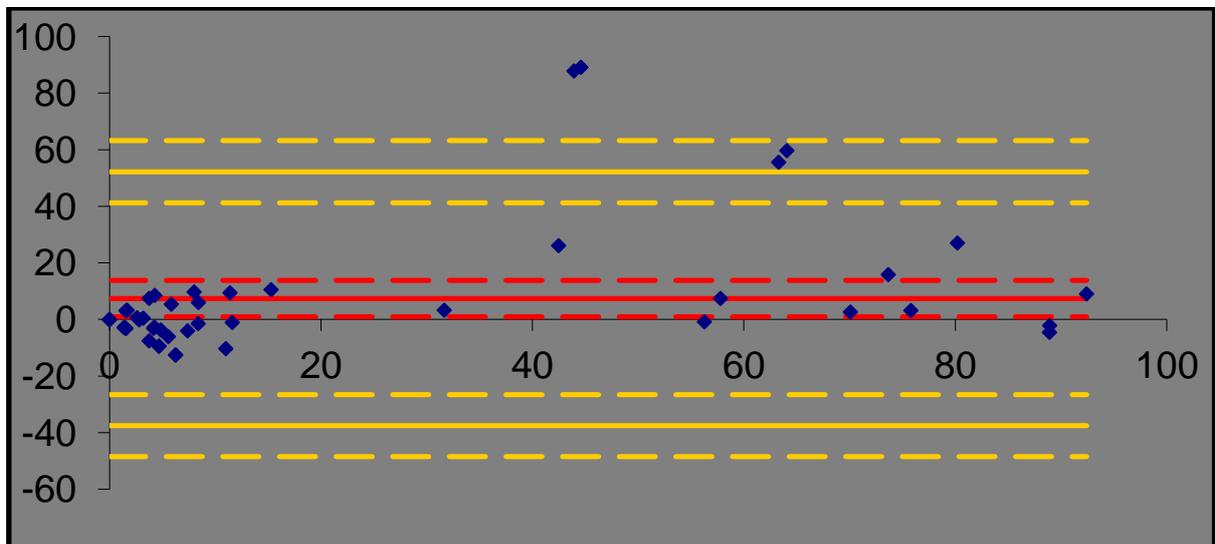
Annexe VII : graphiques de Bland et Altman

Courbes de Bland et Altman pour le pourcentage de cellules parabasales avec la méthode DO



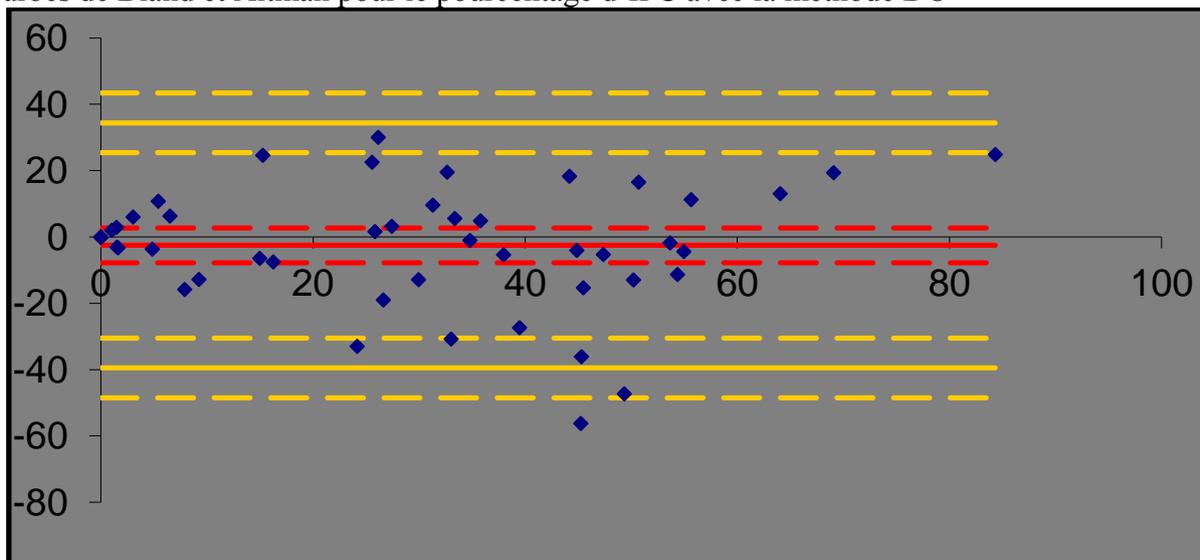
Biais	-3,53 [-7,2 ; 0,13]
Limite 95% inf d'agrément	-29,2 [-35,47 ; -22,93]
Limite 95% sup d'agrément	22,13 [15,86 ; 28,4]

Courbes de Bland et Altman pour le pourcentage d'IB avec la méthode DO



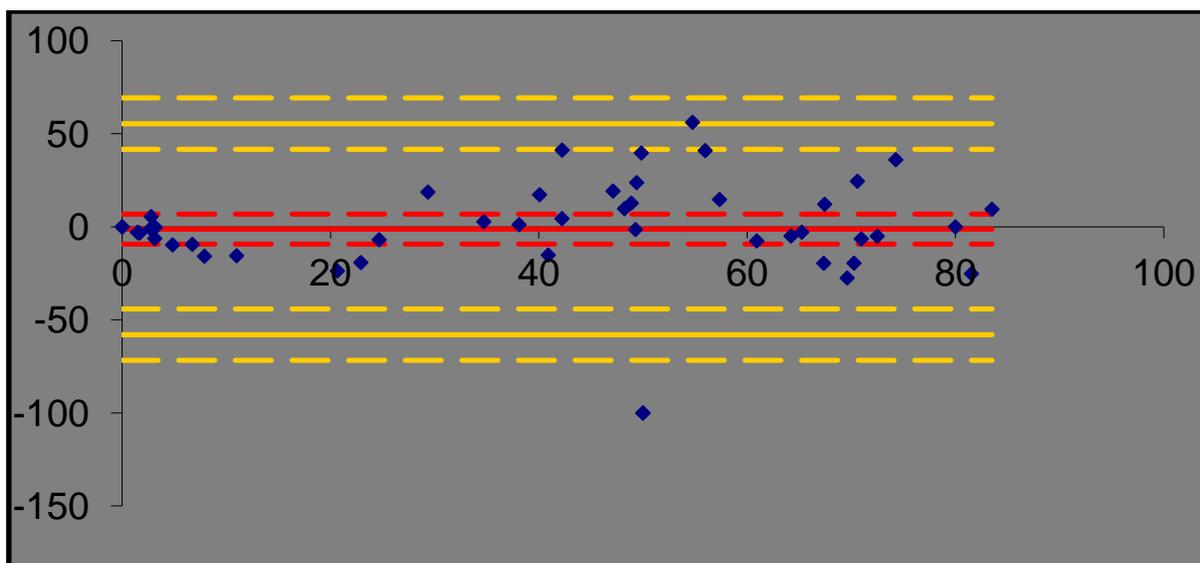
Biais	7,36 [0,95 ; 13,77]
Limite 95% inf d'agrément	-37,5 [-48,46 ; -26,55]
Limite 95% sup d'agrément	52,22 [41,26 ; 63,18]

Courbes de Bland et Altman pour le pourcentage d'IPC avec la méthode DO



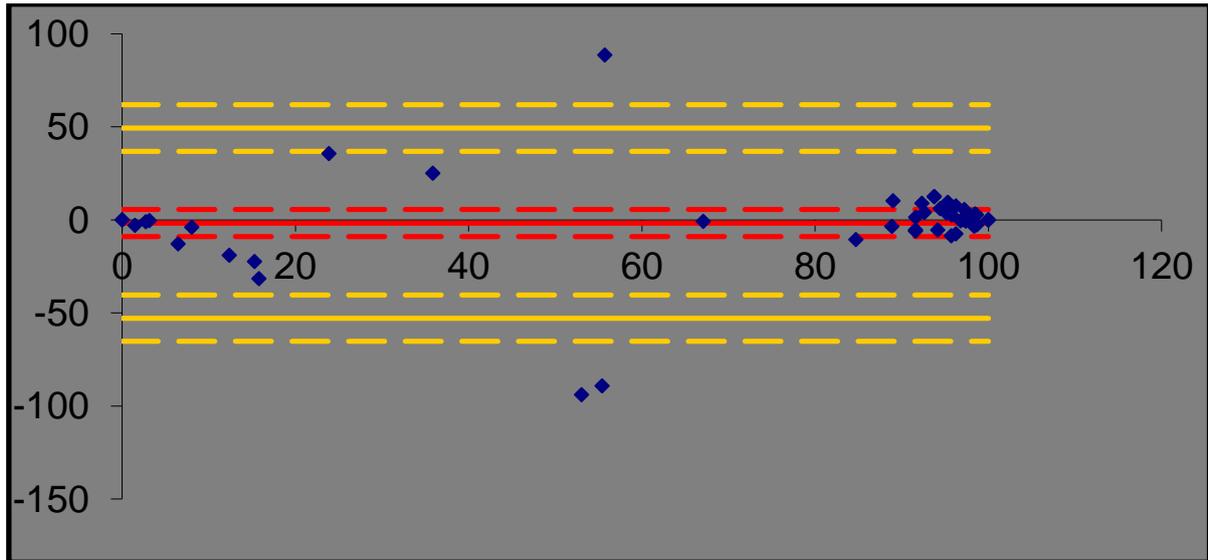
Biais	-2,55 [-7,82 ; 2,73]
Limite 95% inf d'agrément	-39,49 [-48,51 ; -30,46]
Limite 95% sup d'agrément	34,39 [25,37 ; 43,42]

Courbes de Bland et Altman pour le pourcentage de kérat avec la méthode DO



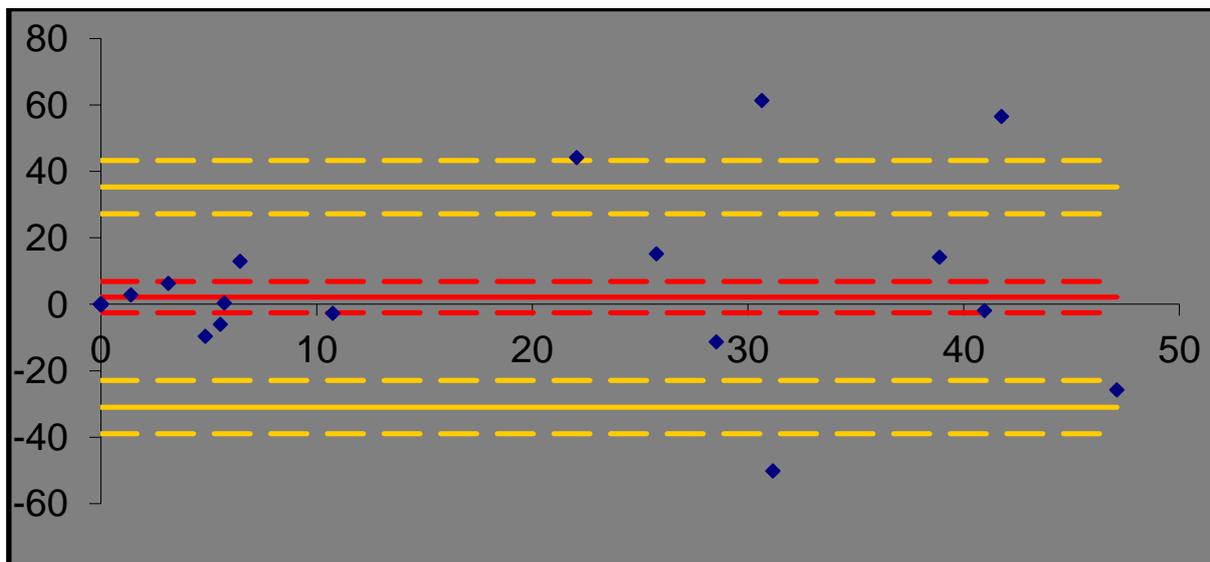
Biais	-1,28 [-9,38 ; 6,82]
Limite 95% inf d'agrément	-57,96 [-71,8 ; -44,11]
Limite 95% sup d'agrément	55,4 [41,55 ; 69,25]

Courbes de Bland et Altman pour l'IE avec la méthode DO



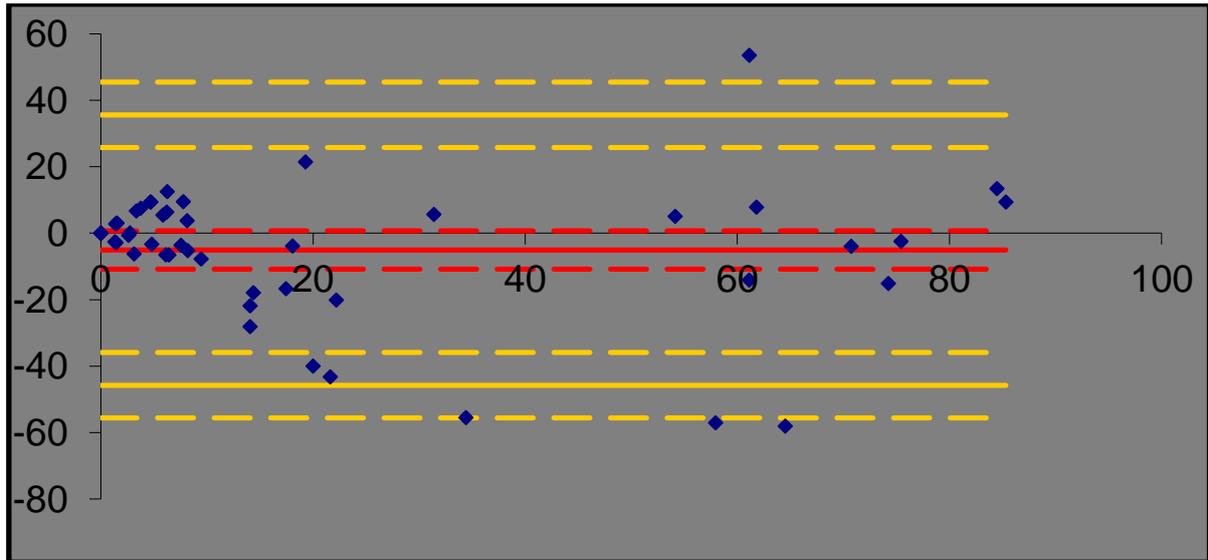
Biais	-1,74 [-9,04 ; 5,55]
Limite 95% inf d'agrément	-52,81 [-65,28 ; -40,33]
Limite 95% sup d'agrément	49,32 [36,85 ; 61,8]

Courbes de Bland et Altman pour le pourcentage de cellules parabasales pour le lecteur 1



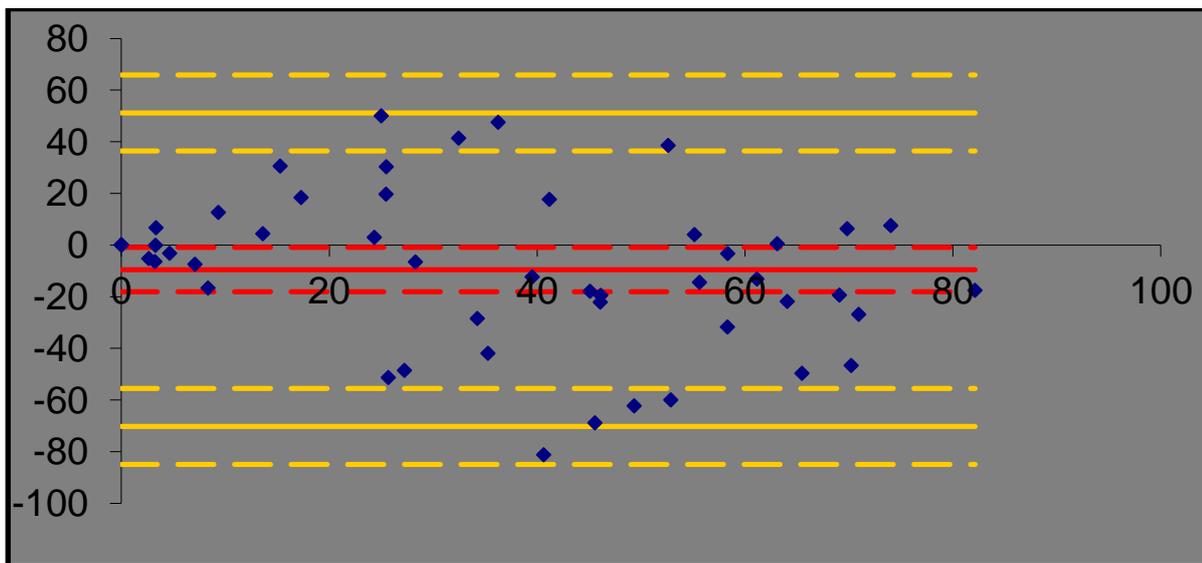
Biais	2,16 [-2,53 ; 6,84]
Limite 95% inf d'agrément	-30,96 [-38,97 ; -22,95]
Limite 95% sup d'agrément	35,28 [27,27 ; 43,28]

Courbes de Bland et Altman pour les IB pour le lecteur 1



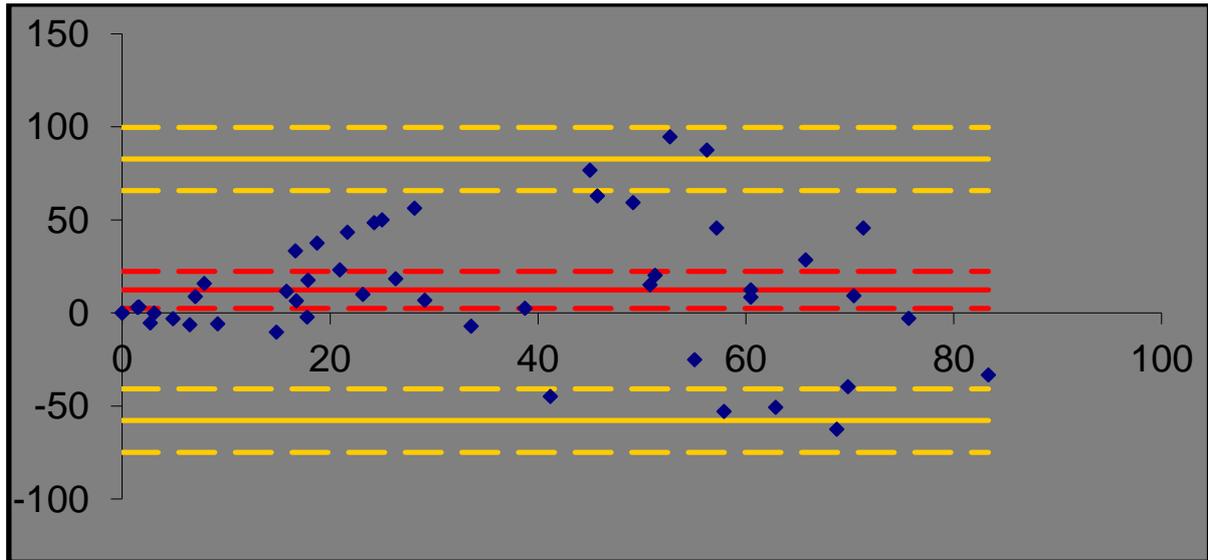
Biais	-5,07 [-10,82 ; 0,69]
Limite 95% inf d'agrément	-45,75 [-55,58 ; -35,91]
Limite 95% sup d'agrément	35,61 [25,77 ; 45,45]

Courbes de Bland et Altman pour les IPC pour le lecteur 1



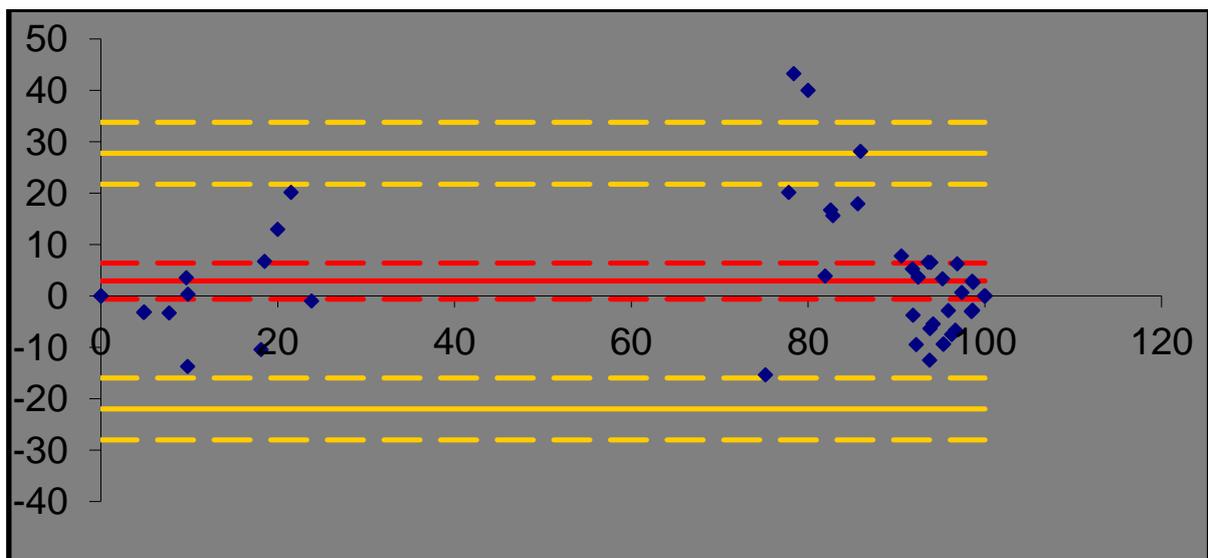
Biais	-9,52 [-18,11 ; -0,94]
Limite 95% inf d'agrément	-70,23 [-84,91 ; -55,55]
Limite 95% sup d'agrément	51,18 [36,5 ; 65,86]

Courbes de Bland et Altman pour les kérat pour le lecteur 1



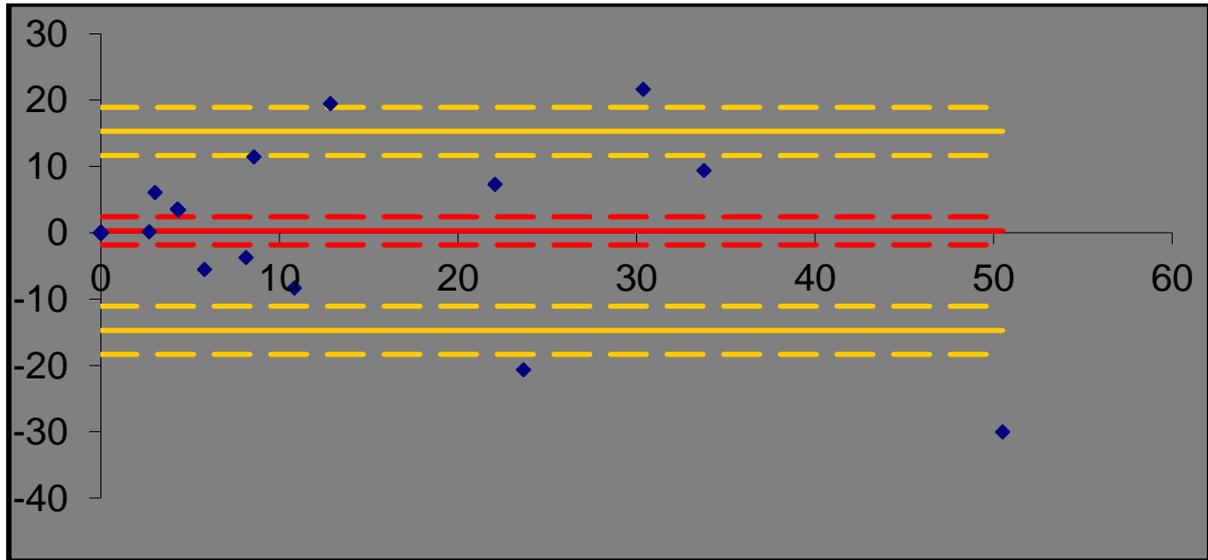
Biais	12,43 [2,5 ; 22,37]
Limite 95% inf d'agrément	-57,83 [-74,83 ; -40,84]
Limite 95% sup d'agrément	82,7 [65,71 ; 99,7]

Courbes de Bland et Altman pour l'IE pour le lecteur 1



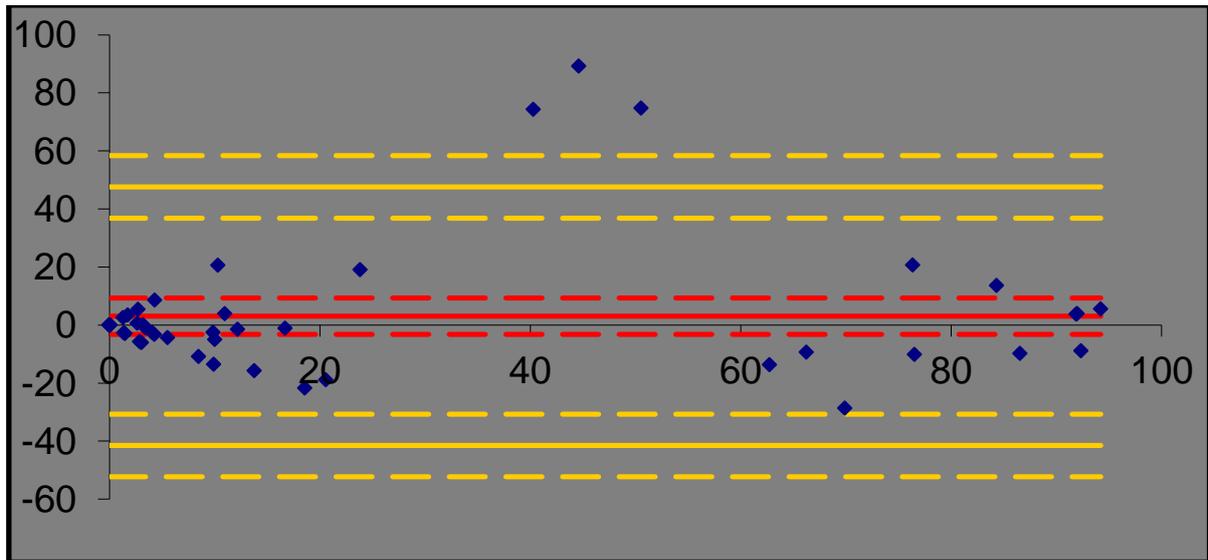
Biais	2,91 [-0,61 ; 6,43]
Limite 95% inf d'agrément	-21,97 [-27,98 ; -15,95]
Limite 95% sup d'agrément	27,79 [21,77 ; 33,8]

Courbes de Bland et Altman pour les Pb pour le lecteur 2



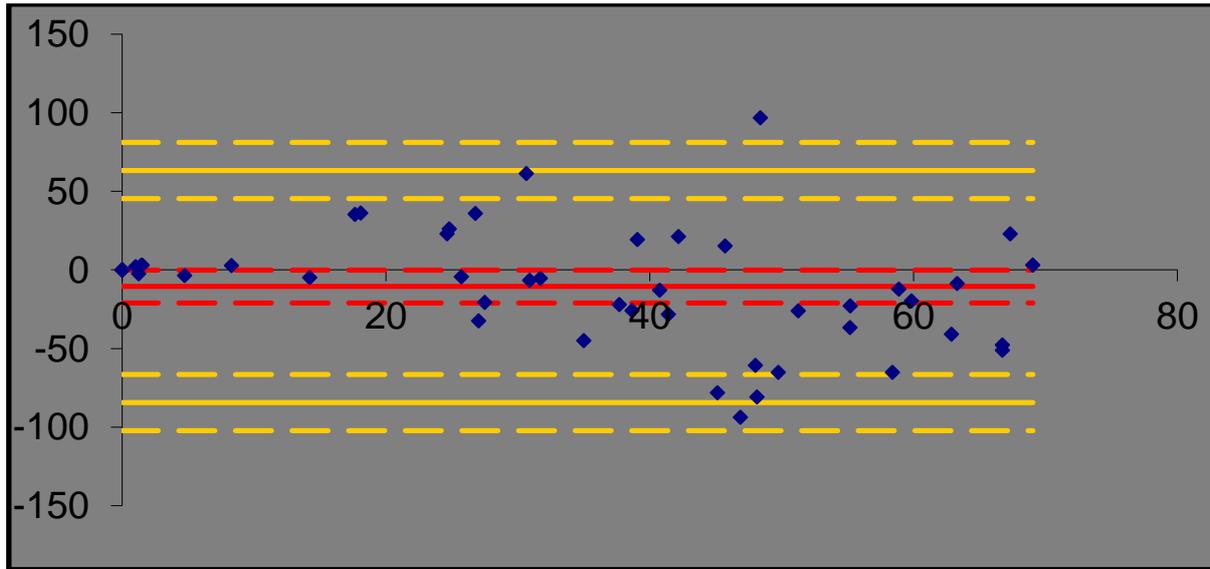
Biais	0,29 [-1,83 ; 2,41]
Limite 95% inf d'agrément	-14,71 [-18,34 ; -11,09]
Limite 95% sup d'agrément	15,29 [11,66 ; 18,91]

Courbes de Bland et Altman pour les IB pour le lecteur 2



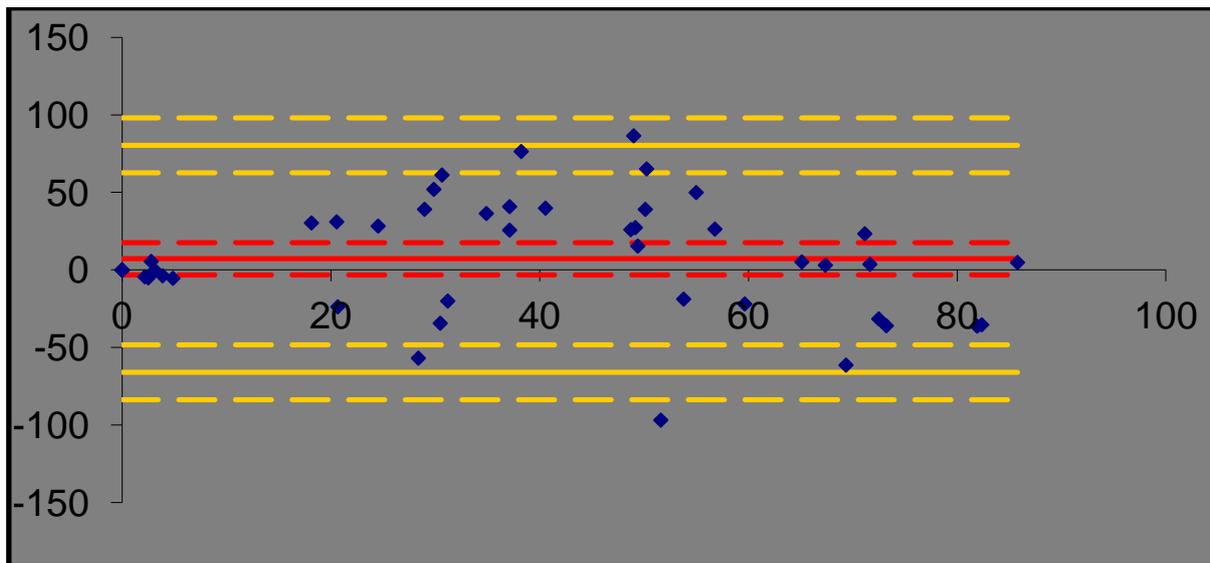
Biais	3,06 [-3,24 ; 9,37]
Limite 95% inf d'agrément	-41,49 [-52,27 ; -30,72]
Limite 95% sup d'agrément	47,62 [36,85 ; 58,4]

Courbes de Bland et Altman pour les IPC pour le lecteur 2



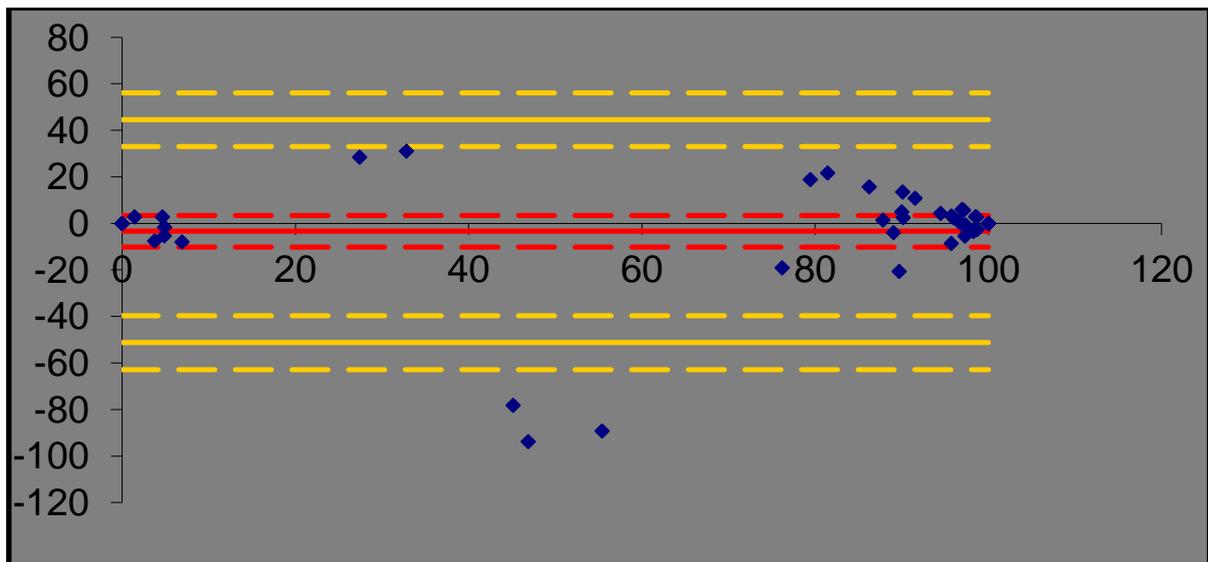
Biais	-10,56 [-21,01 ; -0,12]
Limite 95% inf d'agrément	-84,41 [-102,26 ; -66,55]
Limite 95% sup d'agrément	63,28 [45,42 ; 81,13]

Courbes de Bland et Altman pour les kérat pour le lecteur 2



Biais	7,21 [-3,13 ; 17,56]
Limite 95% inf d'agrément	-65,95 [-83,64 ; -48,25]
Limite 95% sup d'agrément	80,38 [62,68 ; 98,07]

Courbes de Bland et Altman pour l'IE pour le lecteur 2



Biais	-3,35 [-10,13 ; 3,43]
Limite 95% inf d'agrément	-51,26 [-62,84 ; -39,67]
Limite 95% sup d'agrément	44,56 [32,97 ; 56,14]

Annexe VIII : comparaison des pourcentages des 4 populations cellulaires et de l'IE entre les 2 méthodes pour le lecteur 1

D N° lame	D0 N° lame	% Pb D	% Pb D0	% IB D	% IB D0	% IPC D	% IPC D0	% kérat D	% kérat D0	IE D	IE D0
25	44	0%	0%	28%	0%	16%	35%	56%	65%	72%	100%
88	58	0%	13%	77%	74%	3%	3%	20%	10%	23%	13%
77	12	0%	0%	3%	9%	33%	72%	64%	19%	97%	91%
96	81	0%	0%	6%	0%	81%	0%	13%	100%	94%	100%
56	35	0%	0%	0%	9%	10%	41%	90%	50%	100%	91%
1	71	0%	0%	0%	3%	0%	31%	100%	67%	100%	97%
24	91	0%	0%	43%	0%	51%	0%	5%	100%	57%	100%
11	42	0%	0%	0%	9%	12%	53%	88%	38%	100%	91%
97	82	0%	0%	0%	13%	0%	50%	100%	38%	100%	88%
87	92	14%	70%	62%	7%	11%	3%	14%	20%	24%	23%
34	83	0%	6%	25%	3%	75%	53%	0%	38%	75%	91%
2	78	0%	0%	3%	13%	79%	59%	18%	28%	97%	88%
57	43	0%	0%	0%	8%	32%	50%	68%	43%	100%	93%
72	26	12%	9%	73%	69%	3%	16%	12%	6%	15%	22%
100	13	0%	0%	3%	9%	13%	60%	84%	31%	97%	91%
18	85	42%	40%	52%	57%	0%	0%	6%	3%	6%	3%
67	49	0%	0%	6%	10%	84%	58%	9%	33%	94%	90%
95	75	6%	6%	78%	91%	17%	0%	0%	3%	17%	3%
93	5	0%	0%	9%	3%	53%	57%	38%	40%	91%	97%
41	23	0%	0%	3%	2%	56%	36%	41%	61%	97%	98%
62	33	0%	0%	0%	3%	80%	18%	20%	79%	100%	97%
9	68	0%	0%	0%	0%	46%	33%	54%	67%	100%	100%
16	90	0%	0%	10%	3%	90%	41%	0%	56%	90%	97%
20	53	9%	3%	9%	30%	57%	35%	26%	33%	83%	68%
3	84	0%	0%	0%	3%	52%	3%	48%	94%	100%	97%
29	38	0%	0%	0%	7%	63%	63%	37%	30%	100%	93%
63	98	0%	0%	23%	5%	67%	73%	10%	22%	77%	95%
74	64	0%	61%	94%	35%	6%	0%	0%	3%	6%	3%
30	94	32%	46%	68%	54%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
7	39	0%	3%	3%	3%	54%	36%	43%	58%	97%	94%
8	40	0%	0%	3%	0%	32%	25%	66%	75%	97%	100%
61	52	0%	0%	20%	16%	63%	48%	17%	35%	80%	84%
76	70	10%	0%	81%	90%	0%	7%	10%	3%	10%	10%

45	15	0%	0%	40%	0%	60%	57%	0%	43%	60%	100%
80	69	0%	0%	26%	9%	74%	42%	0%	48%	74%	91%
86	59	0%	0%	6%	3%	94%	47%	0%	50%	94%	97%
89	10	0%	0%	0%	0%	91%	73%	9%	27%	100%	100%
27	36	60%	34%	29%	34%	11%	16%	0%	16%	11%	32%
21	51	0%	0%	13%	6%	80%	11%	7%	83%	87%	94%
60	46	0%	0%	0%	0%	48%	20%	52%	80%	100%	100%
79	28	0%	0%	0%	0%	23%	26%	77%	74%	100%	100%
47	73	0%	0%	32%	12%	68%	55%	0%	33%	68%	88%
54	17	0%	0%	9%	6%	56%	14%	34%	80%	91%	94%
48	19	0%	0%	3%	0%	83%	23%	14%	77%	97%	100%
65	22	34%	23%	58%	66%	5%	0%	3%	11%	8%	11%
50	31	0%	44%	86%	29%	8%	26%	5%	0%	14%	26%
66	32	56%	6%	34%	88%	6%	3%	3%	3%	9%	6%
99	55	18%	33%	82%	67%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
37	6	0%	0%	11%	6%	70%	78%	19%	17%	89%	94%

Annexe IX : comparaison des pourcentages des 4 populations cellulaires et de l'IE entre les 2 méthodes pour le lecteur 2

D N° lame	D0 N° lame	% Pb D	% Pb D0	% IB D	% IB D0	% IPC D	% IPC D0	% kérat D	% kérat D0	IE D	IE D0
25	44	0%	0%	11%	9%	47%	34%	42%	57%	89%	91%
88	58	3%	23%	3%	77%	94%	0%	0%	0%	94%	0%
77	12	0%	0%	0%	0%	0%	97%	100%	3%	100%	100%
96	81	3%	6%	13%	88%	84%	6%	0%	0%	84%	6%
56	35	0%	0%	0%	0%	0%	35%	100%	65%	100%	100%
1	71	0%	0%	0%	0%	0%	36%	100%	64%	100%	100%
24	91	0%	0%	0%	89%	43%	11%	57%	0%	100%	11%
11	42	0%	0%	0%	5%	12%	38%	88%	57%	100%	95%
97	82	0%	0%	0%	0%	0%	61%	100%	39%	100%	100%
87	92	66%	35%	17%	16%	7%	10%	10%	39%	17%	48%
34	83	0%	0%	9%	13%	91%	26%	0%	61%	54%	87%
2	78	0%	0%	3%	0%	56%	79%	41%	21%	97%	100%
57	43	0%	0%	0%	0%	9%	45%	91%	55%	100%	100%
72	26	18%	26%	82%	71%	0%	3%	0%	0%	0%	3%
100	13	0%	0%	0%	3%	29%	49%	71%	49%	100%	97%
18	85	20%	41%	70%	56%	7%	3%	4%	0%	11%	3%
67	49	0%	0%	0%	21%	68%	71%	33%	9%	100%	79%
95	75	34%	13%	66%	87%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
93	5	0%	0%	5%	3%	32%	53%	63%	44%	95%	97%
41	23	0%	0%	2%	3%	28%	24%	70%	74%	98%	97%
62	33	0%	0%	0%	0%	17%	12%	83%	88%	100%	100%
9	68	0%	0%	0%	0%	64%	38%	36%	62%	100%	100%
16	90	0%	0%	6%	0%	89%	8%	6%	92%	94%	100%
20	53	0%	0%	14%	33%	38%	53%	48%	13%	86%	67%
3	84	0%	0%	0%	3%	34%	28%	66%	69%	100%	97%
29	38	0%	0%	14%	3%	56%	27%	31%	70%	86%	97%
63	98	0%	0%	13%	11%	52%	26%	35%	63%	87%	89%
74	64	15%	7%	78%	91%	0%	0%	8%	2%	8%	2%
30	94	29%	38%	71%	62%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
7	39	0%	0%	3%	0%	38%	17%	59%	83%	97%	100%
8	40	0%	0%	8%	3%	49%	27%	44%	70%	92%	97%
61	52	0%	0%	22%	6%	78%	18%	0%	76%	78%	94%
76	70	0%	6%	97%	88%	0%	3%	3%	3%	3%	6%

45	15	0%	0%	17%	3%	67%	44%	17%	53%	83%	97%
80	69	0%	0%	29%	8%	68%	59%	3%	33%	71%	92%
86	59	0%	0%	0%	9%	91%	43%	9%	49%	100%	91%
89	10	0%	0%	0%	0%	82%	17%	18%	83%	100%	100%
27	36	3%	6%	90%	94%	3%	0%	5%	0%	8%	0%
21	51	0%	0%	4%	3%	92%	41%	4%	56%	96%	97%
60	46	0%	0%	13%	8%	58%	13%	30%	80%	94%	100%
79	28	0%	0%	3%	3%	34%	29%	63%	68%	88%	93%
47	73	0%	0%	30%	11%	65%	53%	5%	36%	97%	97%
54	17	0%	0%	6%	3%	74%	37%	21%	61%	70%	89%
48	19	0%	0%	0%	0%	83%	42%	17%	58%	94%	97%
65	22	3%	14%	91%	82%	0%	2%	6%	2%	100%	100%
50	31	3%	3%	84%	56%	13%	36%	0%	6%	6%	4%
66	32	9%	3%	91%	97%	0%	0%	0%	0%	13%	42%
99	55	10%	6%	90%	94%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
4	14	0%	0%	6%	0%	70%	50%	24%	50%	0%	0%

BIBLIOGRAPHIE

- BEIJERINK NJ, DIELEMAN SJ, KOOISTRA HS, OKKENS AC. Low doses of bromocriptine shorten the interestrus interval in the bitch without lowering plasma prolactin concentration, *Theriogenology*, 2003, **60**, p. 1379-1386.
- BLAND JM, ALTMAN DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat. Methods Med. Res.*, 1999, **8**, 135- 160.
- BOUCHARD GF, SOLORZANO N, CONCANNON PW, YOUNGQUIST RS, BIERSCHWAL CJ. Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone, *Theriogenology*, 1991, **35**, p. 603-611.
- CONCANNON P, HANSEL W, MCENTEE K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch, *Biol. Reprod.*, 1977, **17**, p. 604-613.
- CONCANNON PW. Clinical and endocrine correlates of canine ovarian cycles and pregnancy, *in: Kirk's Current veterinary therapy IX Small animal practice*, 1986, Saunders, p. 1214-1224.
- CONCANNON PW. Canine physiology of reproduction, *in: Small animal reproduction and infertility*, 1986, Burke, T.J., p. 23-77.
- CONCANNON PW. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs, *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1993, **47**, p. 3-27.
- CONCANNON PW. Reproductive cycles of the domestic bitch, *Anim. Reprod. Sci.*, 2011, **124**, p. 200-210.
- CONCANNON PW, CASTRACANE VD. Serum androstenedione and testosterone concentrations during pregnancy and nonpregnant cycles in dogs, *Biol. Reprod.*, 1985, **33**, p. 1078-1083.
- CONCANNON PW, DIGREGORIO GB. Canine vaginal cytology, *in: Small animal reproduction and infertility*, 1986, Burke, T.J., p. 96-111.
- CONCANNON PW, MCCANN JP, TEMPLE M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog, *J. Reprod. Fertil*, 1989, p. 3-25.

- DE GIER J, KOOISTRA HS, DJAJADININGRAT-LAANEN SC, DIELEMAN SJ, OKKENS AC. Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17 β , progesterone, prolactin, and α -melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch, *Theriogenology*, 2006b, **65**, p. 1346-1359.
- DESQUILBET L. Concordance entre deux séries mesures - Version v7. *Polycopié Ecole Natl. Vét. D'Alfort Unité Pédagogique Biostat. D'Epidémiologie*. 2015, 21.
- DUMON C. Cytologie de l'appareil reproducteur du chien et de la chienne, *EMC Elsevier Masson SAS Paris Vét. Pathol. Reprod.*, 2009.
- ENGLAND G, CONCANNON PW. Determination of the Optimal Breeding Time in the Bitch: Basic Considerations, *Recent Adv. Small Anim. Reprod. Int. Vet. Inf. Serv. Ithaca NY.*, 2002.
- ENGLAND GCW. Vaginal cytology and cervicovaginal mucus arborisation in the breeding management of bitches, *J. Small Anim. Pract.*, 1992, **33**, p. 577-582.
- EVANS JM, SAVAGE TJ. The collection of vaginal smears from bitches, *Vet. Rec.*, 1970, **87**, p. 598-599.
- FELDMAN E., NELSON R. Ovarian cycle and vaginal cytology, in: *Canine and feline endocrinology and reproduction*, 2004, Saunders, p. 752-774.
- FERNANDES PA, BOWEN RA, KOSTAS AC, SAWYER HR, NETT TM, OLSON PN. Luteal function in the bitch: changes during diestrus in pituitary concentration of and the number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin, *Biol. Reprod.*, 1987, **37**, p. 804-811.
- FONTAINE J. Pathologie cellulaire non tumorale. *Polycopié Ecole Natl. Vét. D'Alfort Unité Embryol. Histol. Anat. Pathol.*. 2011, 50.
- GROPETTI D, PECILE A, ARRIGHI S, DI GIANCAMILLO A, CREMONESI F. Endometrial cytology and computerized morphometric analysis of epithelial nuclei: A useful tool for reproductive diagnosis in the bitch, *Theriogenology*, 2010, **73**, p. 927-941.
- GROPETTI D, PECILE A, BARBERO C, MARTINO PA. Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: Role on fertility, *Theriogenology*, 2012, **77**, p. 1549-1556.
- HEAPE W. The sexual season of mammals and the relationship of "pro-estrus" to menstruation. Part I. In: *Q. J. Microbiol. Sci.*, 1900, **44**, 1-70.

- HOLST PA, PHEMISTER RD. Onset of diestrus in the Beagle bitch: definition and significance, *Am. J. Vet. Res.*, 1974, **35**, p. 401-406.
- JOHNSTON SD. Canine et feline theriogenology [En ligne], 2001, [<http://bibliotheque.vet-alfort.fr/Record.htm?idlist=4&record=19113796124919319789>] (consulté le 27/5/15).
- JOHNSTON SD, ROOT KUSTRITZ M., OLSON PN. Vaginal cytology, *in: Canine and feline theriogenology*, 2001, Saunders, p. 32-40.
- LÉVY X, FONTBONNE A. Determining the optimal time of mating in bitches: particularities, *Rev Bras Reprod Anim.*, 2007, **31**, p. 128-134.
- Lin L, Hedayat AS, Wu W. A unified approach for assessing agreement for continuous and categorical data. *J Biopharm Stat* 2007,**17**:629-652
- LINDE C, KARLSSON I. The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch, *J. Small Anim. Pract.*, 1984, **25**, p. 77-82.
- MOXON R, BATTY H, IRONS G, ENGLAND GCW. Perioovulatory changes in the endoscopic appearance of the reproductive tract and teasing behavior in the bitch, *Theriogenology*, 2012, **78**, p. 1907-1916.
- MOXON R, COPLEY D, ENGLAND GCW. Quality assurance of canine vaginal cytology: A preliminary study. *Theriogenology*. 2010, **74**, 479- 485.
- NEVEUX M. Les frottis vaginaux chez la chienne, *Point Vét.*, 1999, **30**, p. 557-564.
- OKKENS A, KOOISTRA H. Anoestrus in the Dog: a Fascinating Story. 2006, **41**, 291- 296.
- OLSON PN. Exfoliative cytology of the canine reproductive tract PN Olson - Proceedings of the Society for Theriogenology, 1989, *Proc. Annu. Meet. Soc. Theriogenology*, 1989, p. 29-30.
- OLSON PN, BOWEN RA, BEHRENDT MD, OLSON JD, NETT TM. Concentrations of Reproductive Hormones in Canine Serum Throughout Late Anestrus, Proestrus and Estrus, *Biol. Reprod.*, 1982, p. 1196-1206.
- OLSON PN, BOWEN RA, BEHRENDT MD, OLSON JD, NETT TM. Concentrations of testosterone in canine serum during late anestrus, proestrus, estrus, and early diestrus, *Am. J. Vet. Res.*, 1984, **45**, p. 145-148.

- ONCLIN K, MURPHY B, VERSTEGEN J. Comparisons of oestradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches, *Theriogenology*, 2002, **57**, p. 1957-1972.
- PAPANICOLAOU GN. (1942) A new procedure for staining vaginal smears. *Science*, **95**, 438-439
- POST K. Canine vaginal cytology during the estrous cycle, *Can. Vet. J.*, 1985, **26**, p. 101.
- RAMETTE O. Contribution à l'étude des frottis vaginaux chez la chienne en vue de déterminer le moment de l'ovulation, *Thèse Médecine Vét. Alfort N° 69*, 1989, p. 127.
- ROTA A, VERONESI MC, VOLPE S, RICCARDI A, BATTOCCHIO M. Estradiol-17 β , Progesterone and Testosterone Plasma Concentrations during Estrus in the Bitch, *Vet. Res. Commun*, 2007, **31**, p. 197-199.
- SCHAEFERS-OKKENS AC. Estrous cycle and breeding management of the healthy bitch, in: *Textbook of Veterinary Internal Medicine : disease of the dog and the cat by S.J Ettinger and E.C. Feldman*, 2010, Saunders, p. 1873-1889.
- SCHAEFERS-OKKENS AC, KOOISTRA HS. Ovaries, in: *Clinical endocrinology of dogs and cats. An illustrated text.*, 2010, Schlütersche, p. 203-234.
- SCHUTTE AP. Canine Vaginal Cytology-I Technique and Cytological Morphology. *J. Small Anim. Pract.*. 1967a, **8**, p. 301-306.
- SCHUTTE AP. Canine Vaginal Cytology-II Cyclic Changes. *J. Small Anim. Pract.*, 1967b, **8**, p. 307-311.
- SCHUTTE AP. Canine Vaginal Cytology-III Compilation and Evaluation of Cellular Indices. *J. Small Anim. Pract.*, 1967c, **8**, p. 313-317.
- SHORR E. A new technic for staining vaginal smears. *Science*, 1940, **91**, 321-322.
- SMITH MS, MC DONALD LE. Serum Levels of Luteinizing Hormone and Progesterone During the Estrous Cycle, Pseudopregnancy and Pregnancy in the Dog^{1 2 3}. *Endocrinology*, 1974, **94**, p. 404-412.
- TARADACH C. Frottis vaginaux chez la chienne Beagle. Détermination de la période d'ovulation à l'aide de l'indice éosinophilique, *Rev. Médecine Vét.*, 1980, **131**, p. 775-782.

- VAN HAAFTEN B, DIELEMAN SJ, OKKENS AC, BEVERS M., WILLEMSE A. Induction of oestrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and/or bromocriptine, *J Reprod. Fertil.*, 1989, p. 330-331.
- WILDT DE, CHAKKRABORTY WB, SEAGER SW. Relationship of Reproductive Behavior, Serum Luteinizing Hormone and Time of Ovulation in the Bitch, *Biol. Reprod.*, 1978, **18**, p. 561-570.
- WILDT DE, PANKO WB, CHAKKRABORTY PK, SEAGER SW. Relationship of serum estrone, estradiol-17beta and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biol. Reprod.* 1979, **20**, 648- 658.
- WRIGHT PJ, PARRY BW. Cytology of the Canine Reproductive System, *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 1989, **19**, p. 851-874.

LA COLORATION DES FROTTIS VAGINAUX CHEZ LA CHIENNE : ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ D'UN NOUVEAU PROTOCOLE DE HARRIS SHORR SIMPLIFIÉ

NOM et Prénom : DUTEY Anne-Laure, Marion

Résumé :

L'objectif de notre étude était de valider un protocole de coloration rapide des frottis vaginaux chez la chienne. Ce nouveau procédé est en fait une version raccourcie de la méthode de coloration Diajnoestrus®.

Un frottis vaginal a été effectué sur 49 chiennes, au Cerca, au cours de l'année 2015. Chaque frottis était coloré avec la méthode Diajnoestrus® et avec le nouveau protocole. C'est donc 98 lames qui ont été étudiées. Les pourcentages de quatre populations cellulaires (cellules parabasales, cellules intermédiaires basophiles, cellules intermédiaires polychromatophiles et cellules kératinisées) ainsi que l'index éosinophilique ont été calculés pour chacune des lames par deux lecteurs. Les concordances entre les deux méthodes de coloration ainsi qu'entre les deux opérateurs ont été évaluées grâce au calcul du coefficient de corrélation de Lin et aux tracés de Bland et Altman. C'est l'index éosinophilique, marqueur de l'imprégnation œstrogénique, qui a été pris en compte pour valider ou non l'équivalence des deux méthodes.

D'après le lecteur 1, la valeur de l'index éosinophilique est équivalente entre les deux méthodes de coloration et le nouveau protocole est donc valide. Cependant, pour le lecteur 2 la concordance n'est pas si franche entre les deux méthodes.

Mots clés : ETUDE CLINIQUE / CERCA / COLORATION / FROTTIS VAGINAL / INDEX ÉOSINOPHILIQUE / CARNIVORE DOMESTIQUE / CHIENNE

Jury :

Président : P^f Georges GUELLAËN
Directeur : D^r Alain FONTBONNE
Assesseur : D^f Nathalie CORDONNIER

THE STAINING OF VAGINAL SMEARS OF THE BITCH: STUDY OF THE EFFICACITY OF A NEW HARIS SHORR SIMPLIFIED PROTOCOL

SURNAME and Given name: DUTEY Anne-Laure, Marion

Summary

The aim of this study was to validate a rapid staining protocol of vaginal smears in bitches. This new procedure is actually a shortened version of the Diagnoestrus® staining method.

Two vaginal smear were made on 49 bitches during the year 2015. Each smear was stained with the Diagnoestrus® method and the new protocol. As a result 98 slides were studied this way. The percentages of four cellular populations (parabasal cells, basophilic intermediate cells, polychromatophilic intermediate cells and keratinised cells) and the eosinophilic index were worked out for each slide by two readers. Agreement between the two staining methods and between the two operators was estimated by calculating Lin's correlation coefficient and by using Bland-Altman plots.

The eosinophilic index, oestrogen level's marker, was taken into account to validate or not the equivalence of the two protocols.

For the first reader, the eosinophilic index was equivalent between the two staining methods so the new protocol is valid. However, for the second reader, the agreement isn't so obvious between the two methods.

Keywords: CLINICAL STUDY / CERCA / STAINING / VAGINAL SMEARS / EOSINOPHILIC INDEX / DOMESTIC CARNIVORES / BITCH

Jury:

President: Prof. Georges GUELLAËN

Director: D. Alain FONTBONNE

Assessor : D. Nathalie CORDONNIER