



HAL
open science

Comparaison des données cytologiques et histologiques pour le diagnostic de l'endométrie chez la vache

Elodie Larroque

► **To cite this version:**

Elodie Larroque. Comparaison des données cytologiques et histologiques pour le diagnostic de l'endométrie chez la vache. Médecine vétérinaire et santé animale. 2014. dumas-04548561

HAL Id: dumas-04548561

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04548561v1>

Submitted on 16 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 12128

To cite this version :

Larroque, Elodie. *Comparaison des données cytologiques et histologiques pour le diagnostic de l'endométrie chez la vache.*
Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 114 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

COMPARAISON DES DONNÉES CYTOLOGIQUES ET HISTOLOGIQUES POUR LE DIAGNOSTIC DE L'ENDOMÉTRITE CHEZ LA VACHE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

LARROQUE Elodie
Née, le 13 janvier 1988 à Saint Lizier (09)

Directeur de thèse : Mme Sylvie CHASTANT-MAILLARD

JURY

PRESIDENT :
M. Olivier PARANT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Sylvie CHASTANT-MAILLARD
Mme Caroline LACROUX

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
Mme Marie-Noëlle LUCAS

Ingénieur de Recherche à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VÉTÉRAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. Alain MILON

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
- Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
- M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
- M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*
- M. SAUTET Jean, *Anatomie*
- M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1^{er} CLASSE

- M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
- M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. DUCOS Alain, *Zootéchnie*
- M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*
- M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme BENARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
- M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*
- M. DUCOS DE LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
- M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
- M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
- M. PICAUVET Dominique, *Pathologie infectieuse*
- M. SANS Pierre, *Productions animales*
- Mme TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme MICHAUD Françoise, *Professeur d'Anglais*
- M. SEVERAC Benoît, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
Mme BENNIS-BRET Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
M. CUEVAS RAMOS Gabriel, *Chirurgie Equine*
Mme DANIELS Hélène, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mlle DEVIERS Alexandra, *Anatomie-Imagerie*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle FERRAN Aude, *Physiologie*
M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
Mlle LAVOUE Rachel, *Médecine Interne*
M. LIENARD Emmanuel, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. MAILLARD Renaud, *Pathologie des Ruminants*
Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, *Pathologie Chirurgicale*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. NOUVEL Laurent, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mlle PAUL Mathilde, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme PRADIER Sophie, *Médecine interne des équidés*
M. RABOISSON Didier, *Productions animales (ruminants)*
Mme TROEGELER-MEYNADIER Annabelle, *Alimentation*
M. VOLMER Romain, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*
Mme WARET-SZKUTA Agnès, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. BOURRET Vincent, *Microbiologie et infectiologie*
M. DAHAN Julien, *Médecine Interne*
Mme FERNANDEZ Laura, *Pathologie de la reproduction*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. DOUET Jean-Yves, *Ophthalmologie*

REMERCIEMENTS

A Mr le Professeur Olivier Parant,

Professeur des Universités,

Praticien hospitalier *Gynécologie-Obstétrique*,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux

A Mme Sylvie Chastant-Maillard,

Maitre de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Réaliser ma thèse dans le domaine de la Reproduction était certes régi par l'intérêt que j'apporte à cette matière, mais aussi pour le succès que vous pouvez avoir auprès des étudiants. Et je pense, à l'issue de cette thèse, que je fais partie moi aussi de ces étudiants qui vous recommandent à la fois pour votre sympathie, dynamisme, joie de vivre, qualités d'enseignante mais aussi pour cette ténacité au travail que vous déployez. Cette thèse m'aura certes apporté énormément d'un point de vue scientifique mais humainement aussi de par votre rencontre.

A Mme Caroline Lacroux,

Maitre de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Qui a accepté de faire partie de notre jury de thèse

Qu'elle en soit sincèrement remerciée.

A Mme Marie-Noëlle Lucas,

Ingénieur de recherche à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Qui a été d'une aide précieuse dans la lecture et l'interprétation des biopsies utérines,

Qui a donc joué un rôle majeur dans l'élaboration de cette thèse,

Et avec qui, il était fort agréable de travailler dans la simplicité et la bonne humeur,

Qu'elle reçoive dès à présent toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements.

A Hanna Mila,

Docteur vétérinaire de l'Ecole vétérinaire de Toulouse,

Pour avoir réalisé mes statistiques dans un travail de buiatrie, alors que tu étais plongée depuis des mois dans « tes petits chiots ».

Merci pour le temps que tu m'as consacré.

A Fabien Corbière,

Maitre de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pour avoir participé à la partie statistique de cette thèse et au temps qu'il m'a consacré.

Aux techniciennes de laboratoire du service d'histologie et d'anatomie pathologie de l'école vétérinaire de Toulouse,

Qui ont participé activement à l'élaboration des lames d'histologie dans un temps imparti en plein mois de juillet.

Aux techniciennes du laboratoire d'analyse de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse,

Qui ont réalisé la coloration des frottis à plusieurs reprises et dans les délais les plus courts.

A Anne Geffré,

Chargée de Consultations au laboratoire des cliniques de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pour sa formation dans la lecture des frottis.

A mes maitres de stage,

Le **Dr Garros** pour le goût qu'il m'a donné pour la médecine vétérinaire et le monde rural auquel je me destine.

Les **Drs Lamazou, Trapes, Cachard, Miqueu, Albin** pour leur accueil chaleureux (à de nombreuses reprises) et pour tout ce qu'ils ont pu m'apprendre.

Les **Drs Manière, Bellon, Jourdain, Butseraen, Fratzac, Clerget** les vétérinaires charolais qui ont réussi à faire leur césarienne malgré l'accent « sudiste » qui les tordait de rire.

Les **Drs Arveux, Philis, Vignes, Mestdagh, Carles** pour cette formation de qualité et votre joie de vivre.

Les **Drs Balandreau, Dujardin, Pierre et Chenin** pour leur gentillesse, leurs bons conseils et les moqueries sur mon accent.

Le **Dr Lafon** qui a été LE maître de stage par excellence auquel je dois beaucoup dans l'approche clinique et scientifique que j'ai actuellement dans mon métier.

A mes parents,

Qui n'ont cessé d'être là tout au long de mes études, à assurer mon confort et ma réussite scolaire, bien que je n'ai pas toujours été facile...

Vous êtes les premiers responsables de ce qui m'arrive aujourd'hui, je vous aime fort ...

A ma mère,

Pour sa contribution dans la réalisation des prélèvements aux abattoirs, qui n'était pas une épreuve tout à fait anodine pour elle.

A mon père,

Pour son dévouement pour les autres, sa générosité et sa rigueur qu'il m'a transmise pour le travail.

A Nicolas,

Pour sa présence, son soutien moral pendant ces dix années d'étude qu'il a passées à mes côtés.

Pour sa gentillesse et sa générosité qu'ils le définissent.

Pour cette histoire qu'on a vécue ensemble et qui a donné ce que je suis aujourd'hui. Merci.

A mon frère,

Toi avec qui je n'ai pas partagé ma jeunesse, avec qui je n'ai cessé de me chamailler, mais avec qui aujourd'hui je suis heureuse de partager des moments simples de la vie.

A ma famille,

Qui a suivi toutes les étapes de mes études, dans les meilleurs moments comme dans les pires. Qui m'a soutenu par les bons gâteaux de Maraine, les coups de fils de la jeune Sylvie, les longs après-midis de discussion avec tatie Chris, les anecdotes sur le monde Paysan avec Papi Jeannot.

A mes parents d'adoption du Béarn,

Aritxu et Jean-Jacques

Qui m'ont accueilli sous leur toit pour réaliser mes stages vétérinaires.

Pour leur gratitude, leur bonté et joie de vivre.

Pour cette vie béarnaise qu'ils m'ont fait connaître et apprécier.

A tous mes amis,

A mes copines du « cuatro »,

Avec qui, l'amitié est comme une évidence

Hélène, une amitié qui dure depuis la maternelle, toi qui a fait un joli parcours clôturé par une belle petite **Clémence**, tu nous montres le chemin à suivre ... je vais attendre un peu avant de m'y mettre ; **Emilie**, là aussi une rencontre depuis notre plus jeune âge, une belle amitié qui ne cesse de s'enrichir malgré les distances ; et **la Sisi**, alors là le « ponpon », depuis notre rencontre sur les bancs du collège en sixième, on a tout partagé, on est inséparable, une amitié comme on en rêve à part son petit copain qui a compris que vivre avec Sylvaine c'était aussi vivre avec ses copines...

A mes amis du «Castéras»,

Aurélie, Marine, Marie, Laure, Charlène, Rémi, la tchoure, la ribote, schumi, Eric...

Avec qui j'ai passé ma jeunesse au Castéras, entre les larmes et les fous-rires, les cris du bosquito et ses félicitations très brèves, les places du podium et les éliminations par erreur de parcours, les pelles, les fourches et brouettes à grains,

Qui sont responsables de ma jeunesse festive.

A mes copines vétos,

Chloé Moulis, notre doyenne et notre sagesse (sauf peut-être dans le luchonnais...), une amitié qui a connu ses prémices en pleine préparation du concours avec entraide, soutien moral..., une équipe de travail de choc qui a duré toutes les années d'études vétérinaires, merci pour ce que tu es et cette amitié qui nous relie

Lucie Roger, Ginger Roger (et tous ces surnoms !!), une mère pour moi, merci pour ta générosité, ta bonne humeur et ta philosophie de la vie, des rencontres humaines de la sorte sont les belles choses de la vie

Candice Montagne, une mère pour le groupe, toujours à anticiper les petits besoins de chacun, à se préoccuper du bien-être de chacun parfois à son détriment, une personne de parole, notre amitié est aussi une belle chose qui me définit.

Aure-Hélène Barrot, encore une personne avec des qualités humaines immenses, son altruisme est un de ses plus beaux traits de caractère, merci pour tous tes petits plats et gâteaux, de tes visites surprises à la colloc et de ce que tu nous a apporté ces dernières années.

Stéphanie Gayraud, « Gay » pour les intimes, née aussi le 13.01.1988, une rencontre qui a connu son apogée en dernière année vétérinaire notamment au travers du semestre de bovine et de notre voyage en Guadeloupe, merci de tous ce qu'on a partagé ensemble, de tes talents en informatique et de ton accueil dans notre pied à terre à Jean-Jo...

Merci à toutes pour cette amitié fusionnelle et naturelle, pour ces moments fantastiques passés ensemble, pour notre amitié tout simplement.

Au groupe de bovine : à **Véro et Sophie**, nos « p'tit » de la bovine ; à **Charlotte**, pour ta joie de vivre et ta générosité ; à la **triplette de bovine** ; à **Darty, Sam, Bras**, nos quelques mecs de bovine ; à **Filou** pour ton humour, ta sympathie et ton aide au boulot ; à **Vincent**, l'alforien parce qu' « on s'en branle » ; à **Anaïs**, pour sa bonne humeur perpétuelle, merci à tous les 3 pour cette année de « Bobo » de folie...

A tous les A3 et A4 avec qui on a eu le plaisir de travailler cette année aux hôpitaux de bovine, en ambu et aux autops : **Mézard, Roco, Biotonic, Geoffray, Emilie, Hélène, Anaïs, Sophie, Sabine, Fordin, Marie-Lou, Clémence, Jade, Judith, Maxime, Fabien, Morgane, Delphine, Océane, Lucie, Marine...**

A nos poulots, **Pauline, Céline, Flavie, Cailleau, Blondel, Combes, Condemine, « Fabraguette », Girbal, Gadenne, Lorette, Lapere, Lauriane, Perrin, Pierre-Yves, Christophe, Adeline, JJG, Bastien, Mathilde**, vous avez été au top...

A tous mes copromos, même ceux de canine, avec qui ces années d'étude ont été des concentrées de moments formidables : **Caroline, Thibault, Papi, Salim, Bibo, Maelle, Mathilde, Amandine, Cédric, Marion, Tony, Sandra, Puech, Manu, Aurélie, Charlotte, Delphine...**

A la colloc avec **Dadou et RV** et à mon roux préféré « **thuthur** » !!!

A mes parents du « cheval »,

Jo et JMB

Qui m'ont vu grandir

Qui m'ont appris à persévérer pour réussir

Pour notre amitié de longue date

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	16
INTRODUCTION	18
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	20
I. La réalisation de la biopsie utérine	21
A. Les premières biopsies utérines en médecine vétérinaire	21
B. Les principes de la biopsie utérine	21
C. La technique	22
1. Le prélèvement de matériel endométrial.....	22
a) Le site de prélèvement.....	22
b) Le matériel	25
2. Mise en pratique	27
a) Chez la jument.....	27
(1) Biopsie trans-cervicale.....	27
b) Chez la vache	28
c) Chez la chienne	29
(1) Biopsie par laparotomie	29
(2) Biopsie trans-cervicale.....	29
3. La préparation du tissu pour l'examen histologique	30
II. L'analyse histologique de la biopsie utérine dans la recherche d'endomérite	31
A. L'intérêt de l'histologie chez toutes les espèces.....	31
B. L'histologie physiologique de l'endomètre	32
1. Modifications au cours du cycle œstral.....	32
2. Modifications au cours de l'involution utérine chez la vache.	34
C. Les lésions d'endomérite : descriptions et significations.....	35
1. Les pré-requis à l'analyse histologique et les définitions	35
2. Chez la jument	36
3. Chez la vache	40
4. Chez la chienne.....	43
5. Chez la femme	44
D. Corrélation entre les lésions histologiques et les paramètres de reproduction	45
1. Chez la jument	45
a) Les lésions histologiques caractéristiques d'infertilité.....	45
b) Préviation des taux de gestation selon la classe de la biopsie.....	45
2. Chez la vache	46
a) Les lésions histologiques caractéristiques d'infertilité.....	46
b) Préviation des animaux infertiles en fonction de leur lésion histologique	47
3. Chez la chienne.....	47
III. L'examen histologique dans le diagnostic d'endomérite chez la vache	48
CONCLUSION	51

PARTIE EXPERIMENTALE	52
I. Matériels et méthodes	53
A. Constitution de l'échantillon d'étude	53
B. Protocole expérimental	53
C. Préparation des échantillons	54
D. Coloration des lames	55
1. Cytologie	55
2. Histologie	55
E. Lecture des lames	55
1. Cytologie	55
2. Histologie	56
F. Collecte, saisie et synthèse des données	58
1. Cytologie	58
2. Histologie	58
G. Analyse statistique	62
1. Validation des supports d'étude (épithélium, couches profondes, lames entières)	62
2. Homogénéité de l'inflammation	62
3. Corrélation entre les données cytologiques et histologiques	62
a) Le coefficient de corrélation (r)	62
b) Comparaison des médianes	63
c) La proportion de vaches malades ou saines en fonction du couple (note histologique ; note cytologique)	63
4. Approche diagnostique d'un seuil histologique	63
II. Résultats	63
A. Descriptions cytologiques (figure 16)	63
1. Evaluation quantitative	63
a) Cytologie endométriale	63
b) Cytologie cervicale	64
2. Evaluation qualitative	64
3. Evaluation semi-quantitative	64
B. Descriptions histologiques	66
1. Evaluation qualitative	66
a) L'épithélium	66
b) Les couches profondes (<i>stratum compactum et stratum spongiosum</i>)	67
2. Evaluation quantitative	70
a) Histologie endométriale (utérus : cornes et corps utérin)	70
(1) Les cellules mononucléées	70
(2) Les neutrophiles	71
(3) Les nodules lymphoïdes	72
b) Histologie cervicale	73
(1) Les cellules mononucléées	73
(2) Les neutrophiles	73
(3) Les nodules lymphoïdes	74
3. Evaluation semi-quantitative	76
4. La sélection des lames histologiques lisibles	80

C. Variabilité intra-opérateur.....	80
D. Homogénéité de l'inflammation : cytologie et histologie	81
1. Homogénéité intra-murale (histologie).....	81
a) Avec les notes d'histologie	81
b) Après regroupement en classes	81
c) Collinéarité	82
2. Homogénéité de l'inflammation entre les différents compartiments génitaux.....	82
a) Evaluation qualitative par l'histologie.....	82
(1) Au niveau de l'épithélium.....	82
(2) Au niveau des couches profondes.....	83
(3) Au niveau de la biopsie entière	83
b) Evaluation qualitative par la cytologie	84
c) Approche pratique avec la cytologie : la relation entre le site d'écouvillonnage et les secteurs génitaux adjacents	84
(1) Note cytologique $_{\text{corps utérin}} = 0$	84
(2) Note cytologique $_{\text{corps utérin}} = 2$	85
d) Approche pratique avec l'histologie : la relation entre le site de biopsie potentiel et les secteurs génitaux adjacents	86
(1) Note histologique $_{\text{col}} = 0$	86
(2) Note histologique $_{\text{col}} \geq 3$	88
E. Corrélation des données histologiques et cytologiques.....	89
1. Approche semi-quantitative	89
a) Entre note d'histologie et note de cytologie.....	89
b) Entre note d'histologie et le pourcentage de neutrophiles	89
(1) L'épithélium	89
(2) Les couches profondes	89
(3) La lame dans son ensemble.....	89
2. Approche qualitative	89
(1) L'épithélium	90
(2) La couche profonde.....	90
(3) La lame dans son ensemble.....	90
3. Approche statistique de la corrélation cytologie-histologie.....	95
a) Régression logistique univariée.....	95
b) Calcul du coefficient de concordance kappa.....	95
F. Approche diagnostique des seuils établis en histologie.....	96
III. Discussion.....	100
A. Protocoles expérimentaux.....	100
1. Constitution de l'échantillon d'étude	100
2. Préparation des lames d'histologie	100
3. La lecture des frottis et des coupes histologiques	101
a) Les frottis.....	101
b) Les biopsies	101
B. Résultats.....	101
1. Qualifier le statut inflammatoire	101
a) Des frottis	101
b) Des biopsies.....	102
2. Définir un échantillon correct à l'analyse des résultats.....	102
3. Homogénéité de l'inflammation entre les différents secteurs génitaux.....	102
4. Homogénéité de l'inflammation intra-murale	103

5.	Corrélations entre les données cytologiques et histologiques.....	103
6.	Approche diagnostique des seuils établis en histologie	104
C.	Perspectives.....	104
	CONCLUSION	105
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	107

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Aspect histologique d'utérus non-gravidique de vache (Pavaux, 1981)

Figure 2 : Microphotographie d'une coupe transversale d'une corne utérine de chienne en anœstrus (Schlafer, 2013)

Figure 3 : Histologie de l'endomètre de jument et des glandes utérines en anœstrus hivernal (peu de glandes et droites) ((Tibary et Bakkoury, 1994)

Figure 4 : Histologie de l'endomètre de vache et des glandes utérines (Barone, 1978)

Figure 5 : Pincettes à biopsie de Pilling (Hanzen, 2013)

Figure 6 : Biopsie utérine : la taille appropriée du prélèvement (Tibary et Bakkoury, 1994)

Figure 7 : Curette de Novak (<http://www.coopersurgical.com>)

Figure 8 : Technique de biopsie utérine trans-cervicale chez la jument (Rossdale, 1992)

Figure 9 : Le cycle œstral de la vache (reprology.com)

Figure 10 : Modifications pathologiques de l'endomètre chez la jument qualifiées d'après la classification de Ricketts (Tibary et Bakkoury, 1994)

Figure 11 : Les différentes formes d'endométrites selon Dubuc et al (2010)

Figure 12 : Prélèvements *ex vivo* sur utérus d'abattoir (Deguillaume, 2011)

Figure 13 : Frottis cytologiques endométriaux (grossissement 1000 x, coloration May-Grünwald-Giemsa ; Deguillaume, 2010)

Figure 14 : Grille de lecture des données cytologiques brutes aux données interprétables

Figure 15 : Qualité de l'épithélium sur les coupes histologiques

Figure 16 : Répartition des frottis en fonction du taux de neutrophiles tous sites confondus (A), de la note d'inflammation (B) et du site de prélèvement (C)

Figure 17 : Epithélium utérin de type cylindrique (HE, x400)

Figure 18 : Coupe histologique de col utérin (A, HE, x400) et de corne utérine (B, HE, x200)
A : Infiltration de l'épithélium par les lymphocytes ; B : Infiltration de l'épithélium par les neutrophiles

Figure 19 : Coupe histologique d'endomètre : difficulté de différencier les fibroblastes des cellules mononuclées dans la zone entourée (HE, x400)

Figure 20 : Coupe histologique utérine

A : Infiltration physiologique du *stratum compactum* par les cellules mononuclées (HE, x400) ; B : Nodule lymphoïde délimité par les flèches noires (HE, x400) ; C : Infiltration du *stratum compactum* par les neutrophiles (HE, x200)

Figure 21: Infiltration par les cellules mononuclées de l'épithélium de l'endomètre utérin (A)
Infiltration par les cellules mononuclées des couches profondes de l'endomètre utérin (B).

Figure 22 : Infiltration par les neutrophiles de :
A : L'épithélium luminal utérin, B : Des couches profondes de l'endomètre utérin

Figure 23 : Présence de nodules lymphoïdes ou de travées de cellules mononucléées dans l'endomètre utérin

Figure 24 : Infiltration par les cellules mononucléées de :
A : L'épithélium luminal cervical, B : Des couches profondes de l'endomètre cervical

Figure 25 : Infiltration par les neutrophiles de :
A : L'épithélium cervical, B : Des couches profondes de l'endomètre cervical

Figure 26 : Présence de nodules lymphoïdes ou de travées de cellules mononucléées dans la muqueuse cervicale

Figure 27 : Attribution des notes semi-quantitatives de l'infiltration cellulaire de l'épithélium et des couches profondes

Figure 28 : Mode de calcul des notes d'inflammation

Figure 29 : Effectif et % de vaches avec un corps utérin non inflammatoire et un autre secteur génital soit non inflammatoire, soit inflammatoire

Figure 30 : Effectif et % de vaches avec un corps utérin inflammatoire et un autre secteur génital soit non inflammatoire, soit inflammatoire (n = 15 vaches).

Figure 31 : Etat inflammatoire histologique des différents secteurs lorsque le col est non inflammatoire (note histologique_{épithélium (A), couche profonde (C), lame (E)} = 0)
A : Notes histologiques de l'épithélium des cornes utérines et du corps utérin ($n_{CD} = 49$ lames, $n_{CG} = 49$ lames, $n_{CU} = 46$ lames, soit 51 vaches) ; B : Proportions de secteur concerné par la note histologique des épithéliums ; C : Notes histologiques des couches profondes des cornes utérines et du corps utérin ($n_{CD} = 34$ lames, $n_{CG} = 34$ lames, $n_{CU} = 33$ lames soit 34 vaches) ; D : Proportion de secteur concerné par la note histologique des couches profondes ; E : Note histologique de la lame des cornes utérines et du corps utérin ($n_{CD} = 25$ lames, $n_{CG} = 25$ lames, $n_{CU} = 25$ lames soit 25 vaches) ; F : Proportion de secteur concerné par la note histologique des lames

Figure 32 : Etat inflammatoire histologique des différents secteurs lorsque le col est inflammatoire (note histologique_{épithélium (A), couche profonde (C), lame (E)} ≥ 3)
A : Notes histologiques de l'épithélium des cornes utérines et du corps utérin ($n_{CD} = 6$ lames, $n_{CG} = 6$ lames, $n_{CU} = 6$ lames, soit 6 vaches) ; B : Proportions de secteur concerné par la note histologique des épithéliums ; C : Notes histologiques des couches profondes des cornes utérines et du corps utérin ($n_{CD} = 7$ lames, $n_{CG} = 6$ lames, $n_{CU} = 6$ lames soit 7 vaches) ; D : Proportion de secteur concerné par la note histologique des couches profondes ; E : Note histologique de la lame des cornes utérines et du corps utérin ($n_{CD} = 17$ lames, $n_{CG} = 16$ lames, $n_{CU} = 16$ lames soit 17 vaches) ; F : Proportion de secteur concerné par la note histologique des lames

Figure 33 : Corrélation entre les notes d'histologie et de cytologie (r= coefficient de corrélation) :

A : de tous les compartiments génitaux (n = 333 lames), $r = 0,59$ ($p < 0,001$) ; B : des cornes droites (n = 85 lames), $r = 0,62$ ($p < 0,001$) ; C : des cornes gauches (n = 83 lames), $r = 0,65$ ($p < 0,001$) ; D : des corps utérins (n = 81 lames), $r = 0,69$ ($p < 0,001$) ; E : des cols (n = 84 lames), $r = 0,48$ ($p < 0,001$)

Figure 34 : Taux de neutrophiles et proportions de lames à inflammation cytologique pathologique en fonction de la note d'histologie des épithéliums pour : le col (n = 84 lames) (A), les cornes droites (n = 80 lames) (B), les cornes gauches (n = 79 lames) (C), les 2 cornes (n = 158 lames) (D), le corps utérin (n = 74 lames) (E).

Figure 35 : Taux de neutrophiles et proportions de lames à inflammation cytologique pathologique en fonction de la note d'histologie des couches profondes pour : le col (n = 84 lames) (A), les cornes droites (n = 85 lames) (B), les cornes gauches (n = 83 lames) (C), les 2 cornes (n = 166 lames) (D), le corps utérin (n = 81 lames) (E).

Figure 36 : Taux de neutrophiles et proportions de lames à inflammation cytologique pathologique en fonction de la note d'histologie des lames entières pour : le col (n = 84 lames) (A), les cornes droites (n = 85 lames) (B), les cornes gauches (n = 83 lames) (C), les 2 cornes (n = 166 lames) (D), le corps utérin (n = 81 lames) (E).

Figure 37 : Proportion de vaches présentant un frottis inflammatoire ou non inflammatoire (cytologie) en fonction du seuil pathologique considéré en histologie :
A : pour l'épithélium du corps utérin (seuil = 1) ; B : pour les couches profondes du corps utérin (seuil = 3) ; C : pour la lame dans son ensemble du corps utérin (seuil = 3)

Figure 38 : Proportion de vaches présentant un frottis inflammatoire ou non inflammatoire (cytologie) en fonction du seuil pathologique considéré en histologie :
A : pour l'épithélium du col (seuil = 2)
B : pour les couches profondes du col (seuil = 2)
C : pour la lame dans son ensemble du col (seuil = 2)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Modifications histologiques de l'endomètre chez la jument au cours du cycle œstral (Tibary et Bakkoury, 1994)

Tableau 2 : Classification des lésions de l'endomètre chez la jument selon Ricketts (Wyers et Rey, 1987)

Tableau 3 : Classification des lésions de l'endomètre chez la jument selon Kenney (Wyers et Rey, 1987)

Tableau 4 : Gradation des endométrites selon Hartigan et al (1972)

Tableau 5 : Classification des lésions d'endométrites chez la vache selon Chaffaux et al (1987)

Tableau 6 : Evaluation des biopsies endométriales chez la vache (Bonnet et al, 1991a)

Tableau 7 : Gradation du degré d'inflammation dans l'endomètre chez la vache (Chapwanya et al, 2009)

Tableau 8 : Taux de poulinage attendus selon le classement de l'endomètre (Kenney et Doig, 1986)

Tableau 9 : Fiche de lecture des prélèvements histologiques

Tableau 10 : Données histologiques sélectionnées et incluses dans l'analyse

Tableau 11 : La variabilité intra-opérateur en fonction du compartiment génital et du secteur histologique (calcul du Kappa de Cohen sur 400 lames).

Tableau 12 : Concordance entre la note de l'épithélium et de la couche profonde en fonction du compartiment génital (calcul du kappa de Cohen)

Tableau 13 : Concordance entre la note de l'épithélium et de la couche profonde en fonction du compartiment génital (calcul du kappa de Cohen)

Tableau 14 : Résultat du test de Spearman rho testant l'intensité de la relation entre la variable ordinaire « note histologique de l'épithélium » et la variable ordinaire « note histologique de la couche profonde ».

Tableau 15 : Concordance de la note histologique de l'épithélium entre deux compartiments génitaux pour une même vache (calcul du kappa de Cohen)

Tableau 16 : Concordance de la note histologique de la couche profonde entre deux compartiments génitaux pour une même vache (calcul du kappa de Cohen)

Tableau 17 : Concordance de la note globale de la lame histologique entre deux compartiments génitaux pour une même vache (calcul du kappa de Cohen)

Tableau 18 : Concordance de la note de cytologie entre deux compartiments génitaux pour une même vache (calcul du kappa de Cohen)

Tableau 19 : Etude du risque inflammatoire par confrontation de l'inflammation cytologique et des notes d'histologie du corps utérin et du col (analyse univariée)

Tableau 20 : Les coefficients de corrélation entre les notes d'histologie définies dans les figures 34-36 et les notes de cytologie dans différents secteurs génitaux et étage histologique de l'endomètre.

Tableau 21 : Valeur diagnostique des notes histologiques, la cytologie étant prise comme référence (%N = 0% soit non inflammatoire et %N \geq 5-6% soit inflammatoire)

INTRODUCTION

L'impératif économique en troupeau laitier est de maximiser la proportion de vaches qui deviennent gravides entre 85 et 120 jours post-partum (Dijkhuizen et al, 1985). Les vétérinaires se concentrent ainsi sur les maladies utérines post-partum. En effet, elles altèrent la fertilité, réduisent la production laitière, et ont plus généralement des répercussions sur la santé de l'animal (Chapwanya et al, 2009). Il faut approximativement 32 jours de plus pour la moitié des vaches atteintes d'endométrite pour devenir gravides par rapport aux vaches non affectées et il est 1,7 fois plus probable que ces vaches soient abattues pour échec de reproduction (LeBlanc et al, 2002). Ainsi, les pertes économiques causées par les endométrites sont estimées à un coût moyen de 2 euros par vache présente et par an auxquelles s'ajoutent les coûts moyens de maîtrise qui s'élèvent à 5 euros par vache présente et par an (ce montant comprend à la fois la maîtrise des endométrites et des troubles de la reproduction en général) (Fourichon et Bareille, 2006).

Chez la vache, une contamination microbienne de l'utérus au moment ou juste après la mise-bas est quasiment systématique. Au cours des vêlages normaux, 90% des utérus sont contaminés dans les 15 jours post-partum (Deguillaume, 2011), ce qui peut aboutir à une inflammation excessive et surtout, persistante. Normalement, la plupart de ces contaminants environnementaux sont éliminés progressivement durant les 6 semaines qui suivent le vêlage (Azawi, 2008). Or, 25 à 30% des vaches ne parviennent pas à juguler et éliminer cette infection/inflammation et développent une maladie utérine telle qu'une endométrite. Cette dernière se définit comme une inflammation de l'endomètre présente au-delà de 21 jours post-partum (la métrite est, elle, une affection des 21 premiers jours post-partum), n'ayant pas d'impact sur l'état général de l'animal mais détériorant les performances de reproduction (Kasimanickam et al, 2004, Gilbert et al, 2005 ; Barlund et al, 2008). On estime chez les vaches laitières à 20-50% des lactations la prévalence de l'endométrite (Deguillaume et Chastant-Maillard 2012). Elles sont davantage définies comme des maladies inflammatoires, voire immunitaires que comme des maladies bactériennes. Concrètement, ce serait l'inflammation utérine et ses molécules associées qui dégraderaient les performances de reproduction : sperme moins fécondant, perturbation du développement embryonnaire (Hendricks et al, 2010), altération de la maturation ovocytaire (Soto et al, 2003) et de la croissance folliculaire... D'après Sheldon et al (2009), ce sont ces produits bactériens et inflammatoires qui supprimeraient la sécrétion de LH par la glande pituitaire et ainsi perturberaient la croissance folliculaire ovarienne et donc l'ovulation. Les endométrites ont par ailleurs été scindées en endométrites cliniques, associées à un écoulement vaginal purulent au-delà de 21 jours postpartum et en endométrites subcliniques, définies par une inflammation de l'endomètre sans signes cliniques apparents mais néanmoins associées à une altération des performances de reproduction (Sheldon et al, 2009).

L'endométrite étant maintenant considérée comme une maladie inflammatoire, la cytologie endométriale est actuellement considérée comme l'examen de référence pour le diagnostic de l'endométrite chez la vache entre 21 et 35 jours post-partum (Deguillaume et Chastant-Maillard, 2009) et elle est le seul examen diagnostique qui permet d'objectiver les endométrites subcliniques (Kasimanickam et al, 2004 ; Overbeck et al, 2013). Peu coûteuse, facilement réalisable et objective, l'examen cytologique est donc utilisé pour comparer la valeur diagnostique des autres techniques (Barlund et al, 2008 ; Deguillaume et al, 2008 ; Dizien et al, 2008). En effet, de nombreuses méthodes diagnostiques sont utilisées sur le terrain afin d'évaluer le statut inflammatoire de l'utérus (Deguillaume, 2011). En 2008, une enquête révèle que 75% des vétérinaires français sondés utilisent la palpation transrectale, 83% l'examen vaginal et seuls 14% des vétérinaires utilisent l'échographie transrectale (Deguillaume et Chastant-Maillard, 2009). La palpation transrectale n'est pas suffisamment sensible, elle sous-diagnostique les cas d'endométrites et est assez subjective. Quant à

l'échographie utérine par voie transrectale, elle surestime les animaux malades, cette technique n'est pas à retenir pour la recherche des animaux atteints d'endométrite. Par contre, l'examen du contenu vaginal est un examen sensible, il s'agit de la moins mauvaise des méthodes en élevage bovin laitier qui permet la détection de 60% des animaux atteints. On pourrait penser à associer les techniques afin de pallier leur incertitude, mais la spécificité est alors détériorée (Deguillaume et Chastant-Maillard, 2009). Les nouvelles approches diagnostiques basées sur la physiopathologie de l'endométrite (bandelettes urinaires sur lavage utérin, dosages sanguins de médiateurs inflammatoires) ne montrent pas de bonnes valeurs diagnostiques (Deguillaume et Chastant-Maillard, 2012).

Pour cet examen cytologique, un seuil pathologique (% de neutrophiles) a donc été défini par des analyses statistiques comme le pourcentage de neutrophiles sur un frottis au dessus duquel les performances de reproduction sont significativement détériorées. Cette corrélation entre l'examen cytologique utérin, la santé utérine et les performances de reproduction ultérieures a aussi été démontrée dans d'autres espèces (chienne, jument). Mais la cytologie n'évalue l'inflammation qu'à travers un prélèvement réalisé dans la lumière utérine et/ou sur la partie superficielle de l'endomètre. De plus, si le prélèvement est réalisé par écouvillonnage avec une cytobrosse, il n'évalue qu'un endroit très localisé de l'appareil génital (environ un cm² du corps utérin). On peut donc s'interroger sur la représentativité de ce prélèvement, i.e sur l'homogénéité de l'inflammation dans les différentes zones de l'appareil génital. De plus, l'examen cytologique, superficiel, reflète-t-il l'inflammation de la totalité de la paroi ?

L'objectif de ce travail était de comparer les observations obtenues par l'examen cytologique et par l'examen histologique ainsi que d'évaluer l'homogénéité de l'inflammation au sein de l'appareil génital chez la vache. L'étude expérimentale présentée ici consiste à prélever, ex-vivo, à l'abattoir, quatre zones distinctes de l'utérus de vache (col, corps utérin, cornes droite et gauche). Sur chaque zone, un prélèvement histologique et un prélèvement cytologique contigus ont été réalisés. Et ce afin de comparer le statut inflammatoire de chaque site au travers de la cytologie et de l'histologie. Une première partie bibliographique est consacrée à la mise en pratique de la biopsie utérine et à une synthèse des lésions histologiques d'endométrite chez plusieurs espèces.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La réalisation de la biopsie utérine

A. Les premières biopsies utérines en médecine vétérinaire

Les biopsies endométriales ont été initialement réalisées chez des juments en 1960 pour évaluer leur fertilité (Brandt et Manning, 1969 cités par Chapwanya et al, 2010). Bien que cette technique ait révolutionné la gestion de la reproduction équine et qu'elle soit mise en œuvre en routine avant la mise à la reproduction dans cette espèce (Noakes et al, 2009), elle n'a pas cependant obtenu un aussi grand développement dans d'autres espèces (Bretzlaff, 1987 ; Chapwanya et al, 2010). La première biopsie utérine réalisée chez la vache le fût dès 1948 (Manspeaker et al, 1984), mais elle n'est pas devenue un outil de routine d'évaluation de la santé utérine dans cette espèce (De Bois et Manspeaker, 1986).

En effet, la biopsie utérine a été réalisée chez les vaches cyclées pour des raisons expérimentales (Mann et Lamming, 1994) mais elle n'a pas été utilisée pour étudier les modifications endométriales du post-partum précoce au cours de l'involution (Chapwanya et al, 2010). L'utilisation de la biopsie a été limitée chez les bovins car les travaux anciens suggéraient qu'elle pouvait altérer la fertilité de ces vaches en provoquant des affections utérines (Zaayer et Van der Horst, 1986) (voir III-c).

Peu d'études sont référencées quant aux lésions d'endométrite chez la truie et la brebis. En effet, l'engouement des auteurs pour ce sujet en bovine, équine, canine s'explique par un objectif d'amélioration de la fertilité. De par la prolificité de la truie et de la brebis et de l'approche collective de ces troupeaux, les éleveurs sont très peu confrontés à une baisse de fertilité, et donc la recherche des facteurs la pénalisant sont moins étudiés.

Néanmoins, l'histologie endométriale a été réalisée chez la brebis pour la description du processus d'involution utérine (Van Wyk et al, 1972 ; Grey et al, 2003).

B. Les principes de la biopsie utérine

La méthode de réalisation du prélèvement doit être rapide, répétable, permettre d'obtenir des échantillons homogènes de haute qualité (Chapwanya et al, 2010) et ce sans nuire à la santé animale.

Ainsi, concrètement, il faut penser à la stérilisation de l'outil de biopsie pour prévenir une contamination utérine, et la manipulation du tissu est extrêmement importante pour éviter des artefacts gênant la lecture microscopique (De Bois et Manspeaker, 1986).

Quant aux nombres de spécimens à prélever, les auteurs ne sont pas tous d'accord sur ce point. Il était recommandé de prélever chaque utérus de vache à trois endroits différents afin d'avoir une vue histopathologique d'ensemble (De Bois et Manspeaker, 1986). En effet, ces derniers rapportent qu'on peut retrouver des degrés de fibrose différents de façon simultanée sur un utérus donné. Mais Bonnet et al (1991b) supposent quant à eux qu'un seul échantillon est représentatif de la totalité de l'utérus. En équine, les auteurs ont aussi des avis divergents à ce sujet. Ces dernières décennies, plusieurs études ont montré qu'une seule biopsie utérine de jument examinée pour la recherche de processus inflammatoires et dégénératifs était représentative de l'ensemble de l'utérus (Waelchli et Winder, 1989 ; Overbeck et al, 2011 ; Overbeck et al, 2013). Overbeck et al (2013) ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative en ce qui concerne l'endométriase et les lésions d'angiosclérose selon la localisation dans l'utérus. Selon Doig et Kenney (1986), si aucune anomalie n'a été détectée à la palpation utérine (forme, taille, texture), une seule biopsie suffit pour représenter l'endomètre dans sa totalité. Si à la palpation, des zones différentes sont

détectées, chacune de ces zones doit être biopsiée (Greenhoff et Kenney, 1975 ; Doig et Kenney, 1986). Wyers et Rey (1987) confirment que la pratique d'une double biopsie n'est pas indispensable mais permet cependant de réduire les causes d'erreur ou les problèmes d'interprétation. Par contre, il est intéressant de réaliser deux biopsies séparées dans le temps, afin d'évaluer l'efficacité du traitement ou pour contrôler l'évolution d'une lésion (Wyers et Rey, 1987). Néanmoins, Gross et LeBlanc (1984) et Fiala et al (2010) ont eux démontré qu'une seule biopsie n'était pas suffisante. En 2010, Fiala et al ont confirmé par une étude consacrée à l'évaluation de l'endométrite chronique dégénérative qu'une seule biopsie d'utérus n'était pas révélatrice du statut de l'utérus dans sa totalité. Cette étude comprenait un échantillon de 40 juments sur lesquelles 3 sites de l'utérus ont été biopsiés (corne gauche, droite, et corps utérin) et classés selon une adaptation de la classification de Kenney et Doig (1986). Les 3 portions d'endomètre n'étaient classées dans la même catégorie que par 30% des juments. Ceci remet en cause l'étude de Bergman et Kenney (1975) qui avait démontré sur un échantillon de 16 juments, qu'une seule biopsie était représentative de la totalité de l'utérus en comparant le type, le degré et la distribution de l'inflammation, le degré et la distribution de la fibrose et la présence ou absence de lacunes lymphatiques.

C. La technique

1. Le prélèvement de matériel endométrial

a) Le site de prélèvement

La paroi utérine se compose d'une séreuse, le périmétrium, d'une musculuse, le myomètre, et d'une muqueuse, l'endomètre (figures 1 et 2). L'endomètre correspond à la muqueuse qui tapisse le corps utérin et les cornes utérines. Il est formé d'un épithélium colonnaire et simple chez la vache, cuboïde à prismatique chez la chienne et la jument, et peut être stratifié à pseudo-stratifié chez les ruminants et le porc, avec deux types de cellules (ciliées et non ciliées de type sécrétoire) et d'un stroma. Le stroma endométrial (la *propria mucosae*) est subdivisé en un *stratum compactum* caractérisé par un conjonctif lâche très riche en cellules (fibroblastes, macrophages, lymphocytes, éosinophiles) et plus en profondeur en un *stratum spongiosum* riche en fibres de collagène (Barone, 1990). Le stroma est infiltré par des cellules en provenance du sang (lymphocytes, granulocytes, plasmocytes). Il contient aussi des glandes utérines, tubulaires, dont l'épithélium est en continuité avec celui de l'endomètre mais les cellules y sont davantage sécrétrices (figures 3 et 4). Chez les ruminants, certaines régions de l'endomètre, les caroncules, sont non glandulaires (Bacha et Bacha, 2010).

L'objectif de la biopsie utérine est de prélever un spécimen représentatif de l'endomètre comprenant l'épithélium, le *stratum compactum* et le *stratum spongiosum*. Pour ce faire, l'outil à biopsie doit venir au contact de la paroi utérine et sectionner, à l'aide de bords tranchants, un échantillon de la totalité de l'épaisseur de l'endomètre.

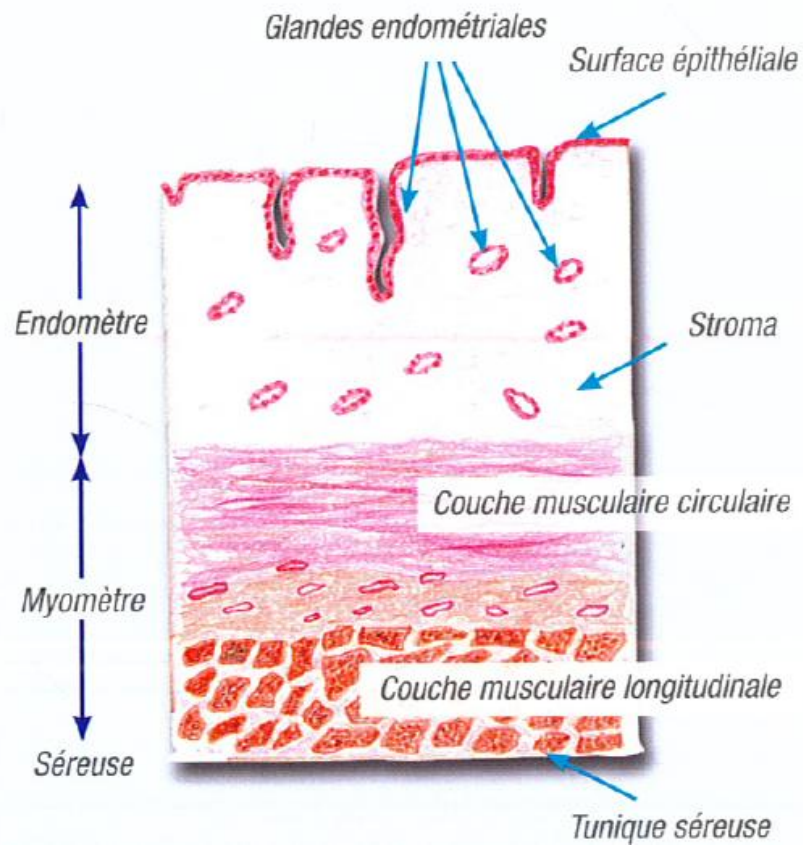


Figure 1 : Aspect histologique d'utérus non-gravidique de vache (Pavaux, 1981)

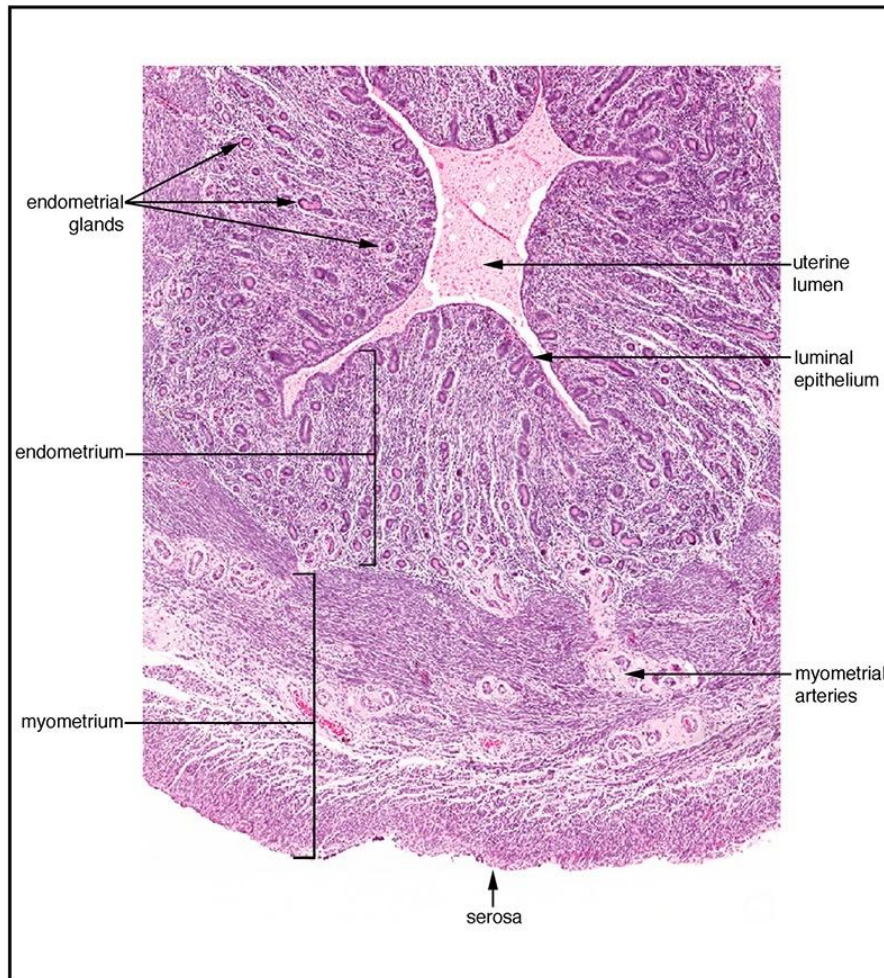


Figure 2 : Microphotographie d'une coupe transversale d'une corne utérine de chienne en anœstrus (Schlafer, 2013)

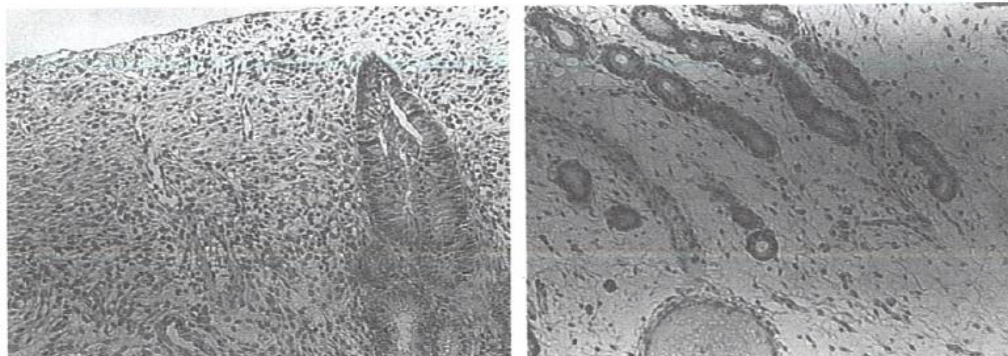


Figure 3 : Histologie de l'endomètre de jument et des glandes utérines en anœstrus hivernal (peu de glandes et droites) (Tibary et Bakkoury, 1994)

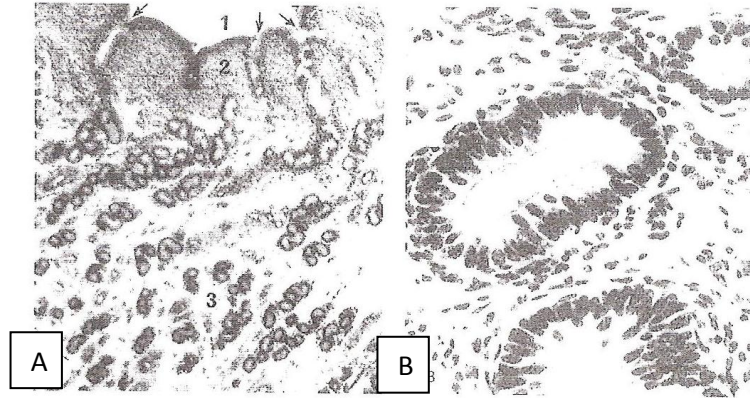


Figure 4 (x30) : Histologie de l'endomètre de vache et des glandes utérines (Barone, 1978)

A : Fin du métœstrus, B : Glandes utérines de vache

1. Lumière utérine, tapissée par l'épithélium. Les flèches indiquent les embouchures des glandes utérines.
2. *Stratum compactum* riche en cellules
3. *Stratum spongiosum* (vaisseaux et nombreuses glandes flexueuses)

b) Le matériel

De nombreux instruments à biopsie ont été utilisés pour obtenir des échantillons endométriaux convenables chez la jument. Les dimensions minimales de la zone de prélèvement sont : 10 à 20×3×3mm (Kenney et Doig, 1986). Par contre, chez la vache, le petit diamètre du col et son incapacité à se dilater amènent à utiliser de petits instruments avec une zone de prélèvement de 4×5mm (Kenney et Doig, 1986). Chez la chienne, les instruments à biopsie utilisés ont une taille de prélèvement allant de 2 à 4 mm (Downs et al, 1994).

L'outil à biopsie devra être assez tranchant pour éviter de compresser les tissus, et ce afin d'éviter les artéfacts qui gêneraient la lecture microscopique. Cet outil devra pouvoir passer le col sans l'endommager.

L'instrument de biopsie utilisé peut être une pince de Kenney (ou une pince à mâchoires ou une pince à mors crocodiles ou une pince Pilling) (figure 5). Chapwanya et al (2010) utilisent l'instrument de biopsie endométriale équine de Hauptner. Ces instruments sont constitués d'un long manche (70 cm) à l'extrémité duquel s'articule une mâchoire de 4 cm de long (Chaffaux et al, 1987). D'après Chaffaux et al (1987), le prélèvement de muqueuse d'endomètre avec une telle pince est considéré comme correct, prenant toute l'épaisseur de cette muqueuse sans que l'instrument ne nuise à sa qualité (figure 6). En médecine humaine, les biopsies utérines peuvent être réalisées avec des curettes de Novak donnant des prélèvements de 3 mm (Cicinelli et al, 2005) (figure 7).

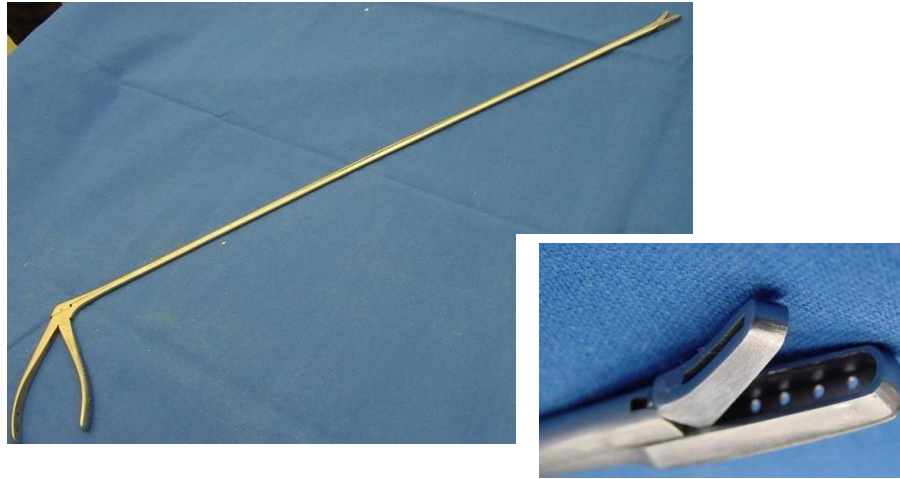


Figure 5 : Pincettes à biopsie de Pilling
(*Hanzen, 2013*)

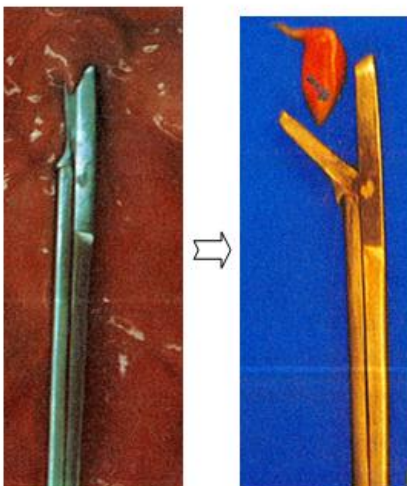


Figure 6 : Biopsie utérine : la taille appropriée du prélèvement (Tibary et Bakkoury, 1994)



Figure 7 : Curette de Novak
<http://www.coopersurgical.com>

2. Mise en pratique

a) Chez la jument

(1) Biopsie trans-cervicale

De par la facilité du cathétérisme cervical à tous les stades du cycle chez la jument, la biopsie est techniquement réalisable à tout moment (Kenney, 1978 ; Doig et Kenney, 1986 ; Noakes et al, 2009). Néanmoins, du fait de l'influence de la progestérone sur l'apparition des glandes utérines, certains préfèrent réaliser la biopsie durant le dioestrus afin d'évaluer l'activité des glandes endométriales qui sont nombreuses et circonvolutionnées (Tibary et Bakkoury, 1994). Par contre, le fait de manipuler l'utérus après l'œstrus favoriserait la lutéolyse prématurée (Kenney, 1978), ce qui ne pose pas de problème majeur puisque la jument ne sera pas mise à la reproduction avant d'avoir diagnostiqué la cause de son infertilité. D'autres préfèrent un prélèvement durant les chaleurs car le col est plus facile à traverser (Noakes et al, 2009) et la présence d'un œdème facilite l'observation des modifications cicatricielles (Tibary et Bakkoury, 1994).

Quand on souhaite obtenir par la même occasion un écouvillon pour la culture bactérienne, il est préférable de réaliser l'écouvillon avant la biopsie afin de limiter la contamination microbiologique de celui-ci (Doig et Kenney, 1986).

Dans l'idéal, il faudrait réaliser des biopsies utérines du plafond et du plancher de chaque corne et du corps utérin, mais ce n'est pas réalisable sur le terrain (Doig et Kenney, 1986). En routine, les biopsies sont pratiquées au niveau du site d'implantation de l'embryon, c'est-à-dire dans le corps utérin, juste à la bifurcation des cornes (Greenhoff et Kenney, 1975).

Deux techniques sont décrites pour le prélèvement de tissu utérin. Dans «la méthode vaginale» (Carleton, 1997), l'index placé dans le col aide à plaquer l'instrument à biopsie contre l'endomètre. Dans la seconde méthode «recto-vaginale» (Kenney, 1978), on vide le rectum et une palpation détaillée de l'appareil génital est réalisée par voie transrectale (Greenhoff et Kenney, 1975). Après nettoyage-désinfection de la vulve et de la région périnéale, l'outil à biopsie est placé dans un gant stérile plutôt que dans un spéculum qui ouvre le vagin au microbisme environnant. Un gant stérile, lubrifié avec du gel chirurgical stérile et sans composant chimique bactériostatique, recouvre le bras passé par voie vaginale pour amener l'instrument à travers le vagin jusqu'au col. Quand l'instrument à biopsie est dans l'utérus, la main gantée passe dans le rectum : elle permet d'exercer une pression ventrale sur le vagin pour faire disparaître un pneumovagin éventuel. Cette même main dirige et localise le bout de l'instrument à l'entrée de la corne droite ou gauche (figure 8). Les mors sont alors ouverts, refermés pour pincer et couper une portion de l'endomètre (Doig et Kenney, 1986).

La biopsie endométriale renseigne de façon fiable sur les remaniements de l'endomètre (Overbeck et al, 2011). Quant à l'innocuité de ce procédé, sur 600 biopsies endométriales réalisées par Doig et Kenney (1986), aucun effet secondaire n'a été relevé chez les juments prélevées. Les auteurs affirment même qu'on pourrait réaliser la biopsie pendant l'œstrus après la monte sans interférer avec la gestation (Doig et Kenney, 1986). Britton (1982) confirme l'innocuité de cette technique en réalisant un frottis cytologique 48 heures après la biopsie afin d'évaluer une potentielle inflammation. Gross et LeBlanc (1984) ont montré que douze biopsies réalisées au même endroit n'augmentaient pas l'incidence de la fibrose.

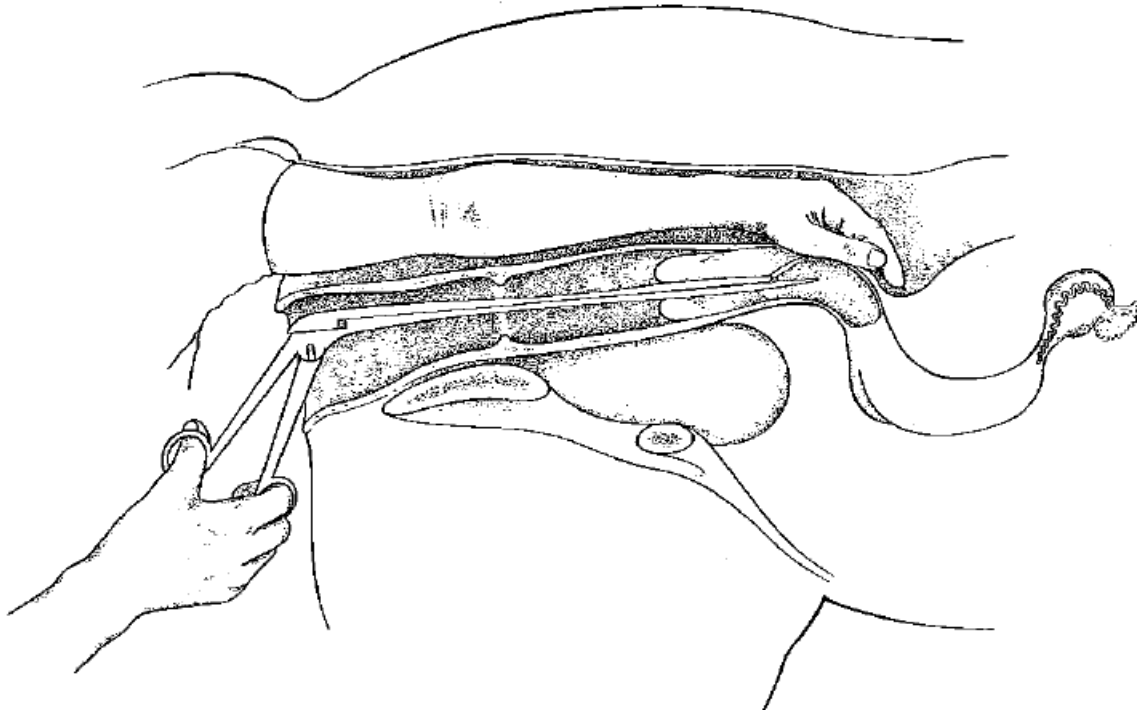


Figure 8 : Technique de biopsie utérine trans-cervicale chez la jument (Rossdale, 1992)

b) Chez la vache

Bien qu'on puisse réaliser, sur des vaches âgées, cette biopsie durant le diœstrus (phase au cours de laquelle on aurait la meilleure lecture histologique des lésions), il est préférable de la réaliser durant l'œstrus car elle est plus facile à réaliser, moins traumatique et moins contaminante. En contrepartie, comme le soulignent Manspeaker et al (1984), si la vache est atteinte d'endométrite, il sera difficile de la diagnostiquer par confusion avec la présence physiologique de neutrophiles à ce stade du cycle. Et comme chez la jument, un examen transrectal est réalisé au préalable, ainsi qu'un examen au vaginoscope afin d'objectiver ou non des écoulements utérins anormaux (Kenney et Doig, 1986).

Dans un premier temps, la région périnéale et la vulve de l'animal sont nettoyées afin d'éviter une infection iatrogène de l'appareil génital. On va utiliser une pince à biopsie stérilisée (Chaffaux et al, 1987) ou protégée dans une gaine (Chapwanya et al, 2010). Elle est introduite jusqu'à l'orifice postérieur du col à l'aide d'une main gantée passée par voie vaginale, puis cette même main va passer par voie rectale pour tenir le col et réaliser le cathétérisme cervical, complexe chez la vache en raison de la présence de trois anneaux cervicaux. Lorsque la pince est placée dans une gaine de protection, cette dernière est rompue au niveau de l'orifice externe du col. La pince est poussée dans une corne utérine, 3 à 5 cm en avant de la bifurcation. A ce niveau, on ouvre les mors de la pince et la main en position rectale, on pousse la paroi utérine de telle sorte à engager la muqueuse entre les mors de la pince. La pince est retirée du tractus génital avec le matériel de prélèvement entre ses mors (Chaffaux et al, 1987).

Bien que cette technique ait été considérée comme délétère dans le passé par les études de Zaayer et Van der Horst (1974) et de Miller et al (1980), il a été démontré plus tard que réaliser des biopsies endométriales n'était pas nuisible et ne présentait en particulier pas d'effets délétères sur la fonction de reproduction de la vache (voir III). De plus, il apparaît que chez les vaches infertiles, l'examen bactériologique de l'utérus serait plus facilement réalisable à partir d'une biopsie que d'un écouvillon (Messier et al, 1984).

c) Chez la chienne

Il est préférable d'éviter la phase lutéale pour réaliser la biopsie car une biopsie faite en dioestrus générerait des pyomètres, à cause de l'effet immunodépresseur de la progestérone. Des dosages de progestérone dans le sérum et des frottis vaginaux pour évaluer le stade du cycle œstral préalablement à la mise en œuvre d'une biopsie sont donc recommandés (Christensen et al, 2012).

(1) Biopsie par laparotomie

Chez les carnivores, la biopsie utérine est généralement réalisée par une laparotomie. Cette biopsie nécessite donc d'anesthésier l'animal. Une laparotomie par la ligne blanche est réalisée, les ovaires et l'utérus sont exposés par une ligne d'incision de 5-8 cm. Lorsqu'il y a du fluide utérin, il faut l'aspirer avec une seringue et une aiguille de 23 gauges. En cas de lésion visible, on récupère un échantillon d'un centimètre de long au site lésionnel avec une lame de scalpel No.10 et une pince en s'assurant que l'endomètre ait été bien échantillonné. Lorsqu'il n'y pas de lésions macroscopiques, une biopsie utérine chirurgicale est réalisée sur chaque corne en utilisant la même technique. On peut en plus faire un prélèvement bactériologique à l'aide d'écouvillon. On suture l'utérus avec un surjet simple et un fil 3-0 monofilament résorbable. Pour minimiser les risques de pyomètre, les chiennes biopsiées durant le dioestrus en France sont traitées en prévention avec 10 mg/kg SC d'aglépristone (Alizine ND) juste après la chirurgie, le lendemain et une semaine après ; aux Etats-Unis, elles sont traitées avec des prostaglandines F2 α à 150 μ g/kg par jour, 5 jours consécutifs (Mir et al, 2013).

Les biopsies utérines chirurgicales par laparotomie sont facilement réalisables, ne demandent pas de matériel spécifique et paraissent être une méthode fiable pour diagnostiquer des lésions endométriales. Selon Downs et al (1994), il s'agit de la meilleure technique pour obtenir des biopsies utérines de chienne. Elle permet aussi de réaliser une inspection externe et une palpation digitale de la totalité de l'utérus. De plus, parallèlement à la biopsie, on peut en profiter pour réaliser des échantillons destinés à l'examen bactériologique qui ne seront pas sujets à la contamination inhérente au passage transcervical (Downs et al, 1994). Enfin, le recours à la biopsie après hystérotomie est incontournable pour le diagnostic définitif des hyperplasies endométriales kystiques, (Johnston et al, 2001).

Les effets secondaires de la biopsie utérine chirurgicale semblent être limités lorsque la biopsie est réalisée chez des femelles en dioestrus car elles reçoivent un traitement post-opératoire (aglépristone ou prostaglandine) (Mir et al, 2013). Downs et al (1994) rapportent seulement des risques de péritonite (si on néglige la phase d'aspiration des liquides utérins avant d'inciser l'utérus) et de sténose utérine. Les risques liés à l'anesthésie sont toutefois présents : 12% de complications (hypothermie, hypotension...) et 0,05% de risque de mortalité pour un animal sain comme le sont les candidats aux biopsies (Verwaerde, 2012).

(2) Biopsie trans-cervicale

Les biopsies utérines sont habituellement réalisées par laparotomie, mais ces trois dernières années, la biopsie par voie trans-cervicale a été développée (Schlafer, 2013). Un endoscope rigide de 43 cm possédant un canal à biopsie est passé par voie trans-vaginale sous contrôle de la vue. L'instrument de biopsie est ensuite passé dans le canal cervical jusque dans l'utérus (Christensen et al, 2012). Cette manipulation peut être réalisée soit sur animal vigile, soit après sédation si la contention manuelle est insuffisante.

Pour certains auteurs, il s'agit d'une procédure relativement facile et non invasive, qui requiert une expérience de l'opérateur mais utilisable sur le terrain (Watts et Wright, 1995 ; Watts et al, 1997, Wilson, 2001 ; Groppetti et al, 2010). C'est un outil intéressant pour le diagnostic des troubles de la reproduction chez la chienne, en permettant la réalisation d'examen cytologiques, histologiques et microbiologiques (Groppetti et al, 2010). Dans l'étude de Christensen et al (2012), la biopsie endométriale trans-cervicale montre une sensibilité similaire à la section totale pour la détection de l'hyperplasie endométriale kystique, l'inflammation et la fibrose. Elle est considérée comme une méthode fiable. Par contre, l'analyse d'un seul échantillon diminue la sensibilité de diagnostic des hyperplasies kystiques de l'endomètre (Christensen et al, 2012). Un autre avantage est l'absence de recours à l'anesthésie, même si une tranquillisation peut être nécessaire pour la contention de l'animal (Schlafer, 2012).

Néanmoins, si ce type de biopsie est une procédure utile et bien intégrée dans la démarche diagnostique des troubles de la reproduction chez la vache, la jument et la femme, elle n'est pas utilisée couramment chez la chienne (Günzel-Apel et al, 2001). D'une part, il est extrêmement difficile de cathétériser le col d'une chienne à cause de sa petite taille et sa conformation particulière (Downs et al, 1994 ; Günzel-Apel et al, 2001). De même, seules les lésions diffuses ou de gravité modérée ou importante pourront être détectées à cause de la petite taille du spécimen. D'autre part, il n'y a pas actuellement de consensus quant à l'innocuité de cette technique chez la chienne. Günzel-Apel et al (2001) rapportent un risque élevé d'hémo-mucomètre (8 chiennes Beagle sur 12 ont développé cette complication dans son étude), d'endométrite et de cicatrices, elle ne peut donc pas être recommandée comme technique de routine chez la chienne (Günzel-Apel et al, 2001). D'après Schlafer (2012), les complications sont rares mais incluent néanmoins la perforation de la paroi utérine et la contamination ascendante de l'utérus.

En bilan, chez la chienne, la biopsie trans-cervicale fournit de petits échantillons de la paroi utérine ne représentant seulement que l'endomètre superficiel et est sujette à d'importants artefacts dû à l'écrasement, alors que la biopsie par laparotomie permet un examen complet de l'appareil génital, la sélection du site à biopsier et l'obtention de toute l'épaisseur de la paroi utérine (Schlafer, 2012).

3. La préparation du tissu pour l'examen histologique

Le protocole classiquement utilisé pour la préparation du tissu biopsié est équivalent en médecine humaine (Cicinelli et al, 2005) et en médecine vétérinaire. Le spécimen est délicatement retiré des mors de l'instrument de biopsie avec une aiguille hypodermique stérile (Doig et Kenney, 1986). Il est fixé dans une solution de formol à 10% (Chaffaux et al, 1987 ; Chapwanya et al, 2010). Après 2 à 24h dans la solution, avec un ratio de 1 pour 10 entre le spécimen et le volume de fixateur, l'échantillon est transporté jusqu'au laboratoire (Chapwanya et al, 2010). Les prélèvements sont ensuite inclus dans de la paraffine et des coupes de 4-6 µm d'épaisseur (Chaffaux et al, 1987 ; Bonnet et al, 1991 ; Chapwanya et al, 2010). Les lames sont colorées avec de l'hémalum-éosine (Chaffaux et al, 1987 ; Chapwanya et al, 2010 ; Mir et al, 2013).

Un protocole plus complexe a été proposé par Christensen et al (2012). Chaque tissu est placé dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 24h et ensuite dans une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline) pendant 24h. Chaque échantillon est par la suite passé dans des bains à 30%, 50% puis 70% d'éthanol sur 24 heures avant l'inclusion en bloc de paraffine, coloré avec de l'hématoxyline de Shandon (colorant nucléaire) puis avec du substitut d'eau du robinet de Scott (réactif de « bleuissement » de la chromatine et des

membranes nucléaires, qui diminue les pertes d'adhérence entre la coupe et les lames en verre).

Une quarantaine de colorants sont également utilisés dans les laboratoires pour mettre en évidence des molécules/structures particulières. Certains soulignent la matrice extracellulaire (trichrome de Masson), le noyau (acide périodique de Schiff), les mastocytes (Giemsa) et d'autres permettent l'identification d'agents infectieux. De par leur coût élevé, leur emploi est limité. Par exemple, dans une étude d'Overbeck et al (2013), le naphthol-AS-D-chloracétate-estérase (CIAE) était utilisé pour colorer les neutrophiles en rouges.

Une autre méthode de marquage est l'immunohistochimie. Les limites de ce procédé sont son coût et le manque de consensus scientifique pour déterminer les réactions non spécifiques (éviter les faux positifs) (Schlafer, 2013). Il serait intéressant de définir quelle protéine cibler afin d'améliorer la lecture ou d'affiner le pronostic.

Bilan :

La biopsie est une technique invasive qui requiert un équipement spécial et d'un laboratoire. L'examen des résultats sont disponibles avec un certain décalage dans le temps (transport, analyse, transmission des résultats), autour d'une à deux semaines. Ainsi sa pertinence pratique est souvent réduite à des cas particuliers (Overbeck et al, 2011).

II. L'analyse histologique de la biopsie utérine dans la recherche d'endométrie

A. L'intérêt de l'histologie chez toutes les espèces

Chez la chienne, cette technique peut être utilisée dans l'identification des stades précoces d'hyperplasie kystique endométriale et d'endométrie. Leur diagnostic est intéressant car il permet d'identifier une cause d'infertilité et un traitement possible (Christensen et al, 2012).

Chez la jument, l'histologie a tout son intérêt dans le diagnostic des juments dites « subfertiles » (repeat-breeder, mort embryonnaire précoce...), dans l'évaluation et la prédiction de la fertilité, dans le suivi de l'efficacité thérapeutique, lors d'une visite d'achat ou encore dans la détection des causes de baisse de fertilité indétectables avec d'autres techniques (Kenney et Doig, 1986 ; Carleton, 1997). D'ailleurs, les modifications dégénératives de l'endomètre (endométriase, angiopathie, atrophie endométriale), qui perturbent la fertilité des juments, ne peuvent être évaluées que par le biais d'un examen histologique mené sur une biopsie endométriale (Overbeck et al, 2013). De plus, d'après Blanchard (2005), plus le diagnostic est réalisé précocement (dès l'apparition de troubles de la reproduction), moins le risque d'apparition de lésions irréversibles est élevé. Toutes les juments diagnostiquées non gravides en automne devraient ainsi faire l'objet d'un examen génital approfondi comprenant une biopsie endométriale. Néanmoins, cette méthode prend toute sa valeur et son intérêt lorsqu'elle est le résultat d'une collaboration étroite et suivie entre le clinicien spécialisé en pathologie équine et l'anatomopathologiste. En effet, il faut replacer les résultats de la biopsie dans un contexte clinique et épidémiologique : l'âge, le passé de la reproductrice, les tentatives thérapeutiques (Wyers et Rey, 1987). Cet examen étant bien intégré en reproduction équine, une bonne interprétation des lésions endométriales conduit à proposer les conduites thérapeutiques les plus adaptées à chaque individu (Blanchard 2005).

Chez la vache, l'examen de l'utérus après vêlage se fait traditionnellement par palpation transrectale et/ou par examen des sécrétions vaginales. Ces techniques sont d'une valeur diagnostique limitée pour le diagnostic de l'inflammation génitale : la palpation transrectale est une technique subjective et l'échographie surestime le nombre d'animaux malades (Barlund et al, 2008 ; Deguillaume et al, 2009). L'objectif de l'examen histologique est de mettre en évidence une inflammation génitale (endométrite/cervicite) qui sera délétère pour les performances de reproduction ultérieures. D'autre part, les causes d'avortement ne sont identifiées que dans environ 30% des cas. La connaissance des modifications microscopiques pathologiques de l'endomètre pourrait ainsi contribuer au diagnostic étiologique (Kenney et Doig, 1986).

B. L'histologie physiologique de l'endomètre

Le terme d'endomètre est réservé au revêtement de la cavité utérine et non de l'ensemble de l'appareil génital. Les variations de l'imprégnation hormonale au cours du cycle œstral se répercutent sur l'histologie de l'endomètre chez toutes les espèces. Ainsi il faut bien connaître ses modifications physiologiques avant de vouloir interpréter des histologies endométriales potentiellement pathologiques. Pour la même raison, la connaissance du délai écoulé depuis la mise-bas est indispensable à une interprétation correcte de l'histologie endométriale.

1. Modifications au cours du cycle œstral

Cette partie sera illustrée avec une espèce non saisonnée (la vache) et saisonnée (la jument), afin d'appréhender l'histologie de l'endomètre en anœstrus (figure 9).

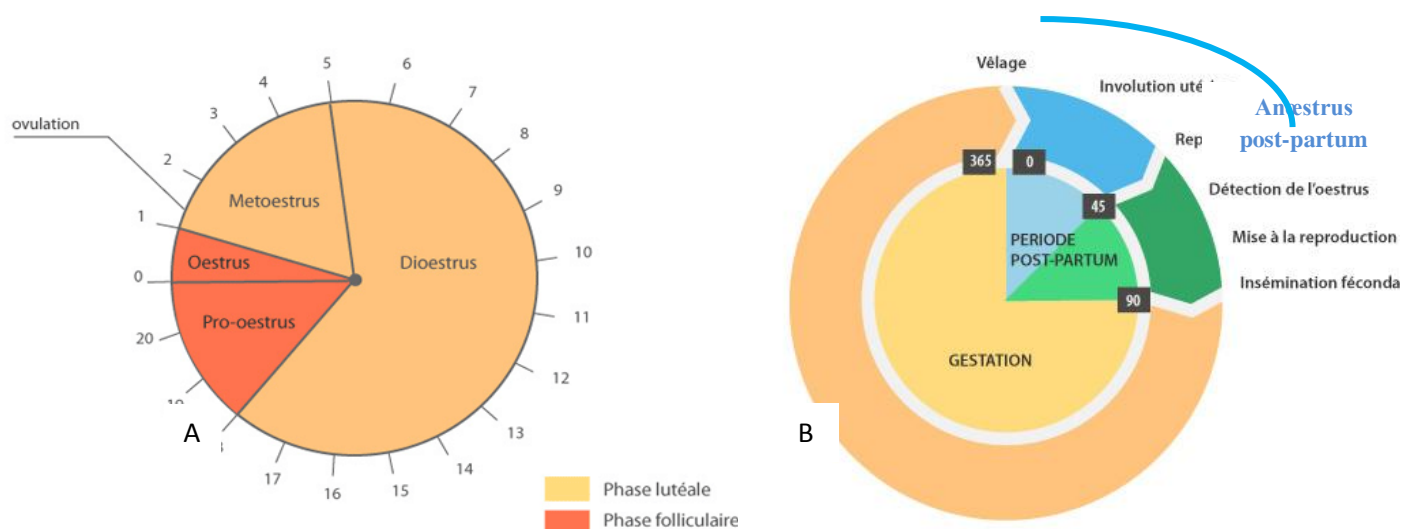


Figure 9 : Le cycle œstral de la vache (reprology.com)

A : Les différentes phases du cycle œstral

B : L'anœstrus post-partum

L'utérus de vache est le siège de remaniements histologiques tout au long du cycle œstral : la progestérone prédomine en phase lutéale, et ce sont au contraire les œstrogènes en phase folliculaire. L'œstradiol stimule l'épithélialisation et la vascularisation de l'endomètre, améliore la contractilité utérine, amorce la réceptivité sexuelle et stimule l'immunité de l'utérus. La progestérone, quant à elle, favorise la différenciation des glandes endométriales et leur sécrétion, diminue la production de mucus cervical, inhibe la contractilité utérine et au

contraire inhibe la fonction immunitaire protectrice du tractus génital (Azawi, 2008). En termes histologiques, l'endomètre subit de fortes variations. Pour l'endomètre, on constate une prolifération de l'épithélium superficiel en début de phase progestative. Des élévations de la muqueuse délimitent des invaginations (cryptes endométriales) dans lesquelles les glandes débouchent en groupe. Le stroma, relativement mince au cours de l'anœstrus, augmente en épaisseur en proœstrus en atteignant son maximum dans l'œstrus et surtout dans le métœstrus (Barone, 1978).

Les glandes endométriales subissent aussi des remaniements. Elles sont peu serrées et à peine sinueuses (davantage flexueuses aux abords du myomètre) pendant l'anœstrus et le diœstrus. Au cours du proœstrus, elles s'allongent, se ramifient, deviennent flexueuses et s'élargissent. Leur épithélium s'élève en hauteur, leurs cellules prolifèrent et prennent un caractère sécrétoire manifeste. Cette évolution s'accroît fortement lors de l'œstrus et atteint son maximum lors du métœstrus. Elles redeviennent peu flexueuses, plus courtes et plus étroites, l'épithélium perd progressivement ses caractères sécrétoires et reprend un type colonnaire bas en début de diœstrus (Barone, 1978).

La vascularisation est aussi remaniée. Les vaisseaux sanguins et lymphatiques se multiplient fortement au moment de l'œstrus et du métœstrus. La congestion est si importante que certains capillaires se rompent, entraînant de petites hémorragies qui se mêlent aux sécrétions glandulaires. La couche profonde de l'endomètre devient œdémateuse et de multiples vaisseaux sanguins apparaissent dans le *stratum compactum*. C'est au début du diœstrus que la vascularisation commence à diminuer (Barone, 1978). Quant aux vaisseaux lymphatiques, dilatés, ils forment des lacunes lymphatiques localisées ou diffuses. Lorsque ces lacunes grossissent et se réunissent, des kystes endométriaux se forment (Kenney, 1978). Histologiquement, ils devraient être différenciés des œdèmes (Kenney, 1978).

D'un point de vue cellulaire, les neutrophiles sont plus nombreux dans l'endomètre au cours de la phase folliculaire qu'en phase lutéale (Dhaliwal et al, 2001). Hors œstrus, on trouve peu de lymphocytes dans l'épithélium de la muqueuse utérine. La présence d'éosinophiles dans l'endomètre est certes plus fréquente chez les vaches non cyclées mais n'est pas systématique. L'infiltration lymphocytaire y est plus importante que chez les vaches cyclées (Chaffaux et al, 1987).

Chez la jument, espèce saisonnée, l'endomètre est le siège d'importantes modifications architecturales entre l'anœstrus hivernal et la saison de reproduction (Kenney, 1978 ; Gross et LeBlanc, 1984) (tableau 1). Par exemple, Gross et LeBlanc (1984) ont montré que selon la saison, le degré de fibrose variait.

Stade du cycle	Epithélium	Glandes endométriales	Œdème	Autres
Proœstrus	Cuboïdal à long Pseudo-stratifié	Etroites Droites +/- branchées	+	Congestion
Œstrus	Taille maximale Cilié Vacuolisé	Simple Droites Moins denses Rectilignes	+++	Leucocytes marginaux dirigés vers l'épithélium
Diœstrus	Hauteur moyenne Noyau para-basal	Branchées Denses Actives Acini glandulaires circonvolutionnés	- - -	Congestion faible Stroma dense
Anœstrus	Cuboïdal bas Cytoplasme basophile	Nombre faible Epithélium bas Activité mitotique	- -	Sécrétions éosinophiles

Tableau 1 : Modifications histologiques de l'endomètre chez la jument au cours du cycle œstral (Tibary et Bakkoury, 1994)

2. Modifications au cours de l'involution utérine chez la vache.

Chez la vache, après la mise-bas, l'endomètre subit d'importants remaniements histologiques. Alors que l'utérus a retrouvé sa taille pré-gravidique entre 20 et 40 jours post-partum (l'involution anatomique du col est plus longue : elle s'achève entre 50 et 60 jours post-partum), il faut encore une vingtaine de jours avant que le statut histologique ne redevienne à son tour normal. L'involution histologique de l'endomètre n'est complète que vers 50 à 65 jours post-partum (Gier et Marion, 1968). Immédiatement après le vêlage, une dégénérescence tissulaire et une nécrose de la partie superficielle des cryptes se propagent à toute la masse caronculeuse. Ces changements dégénératifs facilitent la dissociation entre la caroncule et la houppe chorale. Vers le 10^{ème} jour post-partum, lorsque le col s'ouvre de nouveau, la partie superficielle des caroncules desquame et est éliminée. Ensuite, les artérioles qui alimentaient ces caroncules vont dégénérer. Cette dégénérescence se traduit par la formation de disques blancs au sein d'un endomètre rosé. Alors que l'épithélium gestatif disparaît, un nouvel épithélium apparaît, en se développant au-dessus des vestiges des caroncules. L'endomètre se régénère immédiatement après le part à partir des zones intercotylédonnaires et de l'épithélium des glandes utérines.

La période post-partum se caractérise également par l'afflux de neutrophiles dans la lumière utérine (diapédèse), conséquence d'une contamination de l'endomètre au moment du vêlage. Les neutrophiles sont mobilisés par l'intermédiaire des cytokines libérées par l'endomètre sous l'effet de la contamination bactérienne.

C. Les lésions d'endométrie : descriptions et significations

1. Les pré-requis à l'analyse histologique et les définitions

Quatre composantes sont à prendre en compte pour évaluer correctement un échantillon endométrial : être certain qu'il y ait suffisamment de tissu (plus d'un centimètre de tissu en longueur), évaluer histologiquement le stade œstral, évaluer une réponse inflammatoire, ainsi que le degré et l'étendue des modifications dégénératives (fibrose, lacunes lymphatiques, glandes kystiques) (Kenney et Doig, 1986). En effet, les résultats histologiques doivent être interprétés en étant conscient des modifications saisonnières de l'endomètre et de l'historique de l'animal.

La réponse inflammatoire peut être aiguë ou chronique, ou être constituée d'une réponse chronique à laquelle une réaction aiguë se superpose.

La réaction est dite « aiguë » lorsque les granulocytes neutrophiles prédominent aussi bien dans l'épithélium luminal ou le *stratum compactum* que dans les capillaires du *stratum compactum*. Quelques neutrophiles peuvent se perdre dans la lumière utérine ou dans la lumière des glandes dilatées profondes. L'infiltration cellulaire est une caractéristique incontournable des endométrites aiguës, de même que l'œdème, la congestion vasculaire et l'altération de l'épithélium luminal (De Bois et Manspeaker, 1986).

La réaction est considérée comme chronique quand des neutrophiles se trouvent dans la lumière utérine au dessus d'un stroma infiltré principalement par des lymphocytes et par quelques sidérophages, plasmocytes, éosinophiles et mastocytes. Elle concerne le *stratum compactum* mais implique aussi la profondeur du *stratum spongiosum* (habituellement sous forme de nodules discrets) (Jalakas et Kübar, 2002). Les nodules lymphoïdes sont des masses de petites cellules rondes (lymphocytes) avec un noyau dense, souvent entourés d'un tissu fibrosé (Bois et Manspeaker, 1986). Quant aux sidérophages, ce sont des macrophages ayant phagocyté des hématies. Ils peuvent être également le témoin de saignements anciens et de traumatisme (parturition, avortement ou mort fœtale précoce) (Doig et Kenney, 1986). Cette inflammation chronique de l'endomètre peut être associée à de la fibrose, laquelle entraîne une perte fonctionnelle des glandes (Carleton, 2007 ; Schlafer, 2012). Elle se manifeste par le dépôt de collagène principalement autour des glandes ou en contact avec la membrane basale de l'épithélium luminal ; les fibroblastes sont fusiformes, accolés parallèlement les uns aux autres (De Bois et Manspeaker, 1986). Il s'agit d'une lésion persistante. Elle est très importante à évaluer afin de donner un pronostic sur l'avenir reproducteur : plus elle est diffuse, moins bon est le pronostic. La gravité de la fibrose peut être quantifiée par le degré de fibrose (nombre de couches) combiné à la fréquence (nombre de zones fibrosées par champ). Cependant, chez la jument, pendant l'œstrus et la phase de transition de saison, les îlots de glandes et de petits groupes de sections de glandes bien enroulées et bien séparées des autres par le stroma ne doivent pas être confondus avec des foyers de fibrose (Gross et LeBlanc, 1984). Par contre, il n'y aurait pas de relation entre le développement de fibrose périglandulaire et les lésions de la morphologie glandulaire (dilatée, kystique...) (Chaffaux et al, 1987).

Au début d'une endométrite, les infiltrations cellulaires se font progressivement et sont dominées par les neutrophiles et les lymphocytes. Dès lors que l'inflammation/infection est contrôlée, les neutrophiles disparaissent rapidement, alors que la disparition des lymphocytes est plus progressive. La disparition des cellules inflammatoires peut prendre plusieurs mois. Ainsi, jusqu'à 100 jours post-partum, des cellules infiltrées peuvent être trouvées et signer une endométrite antérieure (Bois et Manspeaker, 1986). Néanmoins, la présence de cellules inflammatoires dans l'endomètre doit être mise en relation avec le stade du cycle œstral au moment de la biopsie. Car lors de l'œstrus, un nombre considérable de neutrophiles infiltre

l'endomètre sans pour autant révéler une endométrite aiguë ; à l'inverse, la présence de nombreux neutrophiles lors de la phase lutéale signe une endométrite (Bois et Manspeaker, 1986). Pour évaluer l'infiltration cellulaire, il est donc important de connaître le cycle œstral de la femelle, le type de cellules, la distribution, la quantité et la localisation de ces dernières (Bois et Manspeaker, 1986).

Paradoxalement, l'inflammation utérine n'est pas systématiquement associée à la mise en évidence de bactéries dans la lumière utérine : chez 50% des vaches souffrant d'inflammation sévère, aucune bactérie pathogène ne peut être cultivée et près de 40 % des vaches ont des cultures avec au moins un agent pathogène sans pour autant être atteintes d'une inflammation endométriale (Deguillaume, 2010). Ceci soulève la question de l'implication de ces pathogènes ou des mécanismes non infectieux dans la genèse de l'inflammation (Kenney et Doig, 1986).

2. Chez la jument

Si la jument est en diœstrus au moment du prélèvement, la présence de neutrophiles dans le *stratum compactum* est considérée comme le signe le plus caractéristique d'une endométrite (Overbeck et al, 2011).

Deux classifications des lésions histopathologiques de l'endomètre ont été proposées, une par un anglais, J.M. Ricketts (1975, tableau 2 ; figure 10) et une par un américain R.M. Kenney (1975 ; tableau 3).

Dans la classification de Ricketts, les lésions d'endométrite aiguë sont caractérisées par un envahissement plus ou moins marqué du stroma par un infiltrat inflammatoire polymorphe où prédominent les granulocytes neutrophiles. Ces lésions doivent être différenciées de l'infiltration physiologique du stroma superficiel par des granulocytes neutrophiles au moment de l'œstrus. Dans les formes suppurées, les granulocytes sont soit normaux soit dégénérés, présents en grand nombre et de façon presque exclusive. Ils migrent à travers le revêtement épithélial et s'accumulent dans la lumière de l'utérus mêlés à un exsudat inflammatoire parfois abondant. Les cellules épithéliales des épithéliums superficiels et glandulaires présentent des lésions de dégénérescence. De la nécrose et l'élimination de l'épithélium de surface peuvent être également visibles (Wyers et Rey, 1987).

Les lésions d'endométrite subaiguë ou chronique infiltrante sont caractérisées par une absence de fibrose, un épithélium intact, une infiltration souvent massive du stroma par des cellules mononucléées (macrophages, lymphocytes et plasmocytes) qui se concentrent autour des vaisseaux et des glandes et peuvent aussi s'organiser en follicules lymphoïdes. Les neutrophiles sont rares voire inexistantes (Wyers et Rey, 1987 ; Kübar et Jalakas, 2002).

L'endométrite chronique dégénérative se caractérise par une fibrose diffuse dans le stroma ou localisée au niveau des glandes, une dégénérescence glandulaire (atrophie des cellules épithéliales avec dilatation de la lumière ou hyperplasie anormale de l'épithélium des tubes glandulaires), un regroupement en îlots des glandes entourées par une capsule scléreuse souvent épaisse. Les lésions d'hyperplasie évoluant isolément sont exceptionnelles, elles sont toujours secondaires à un avortement ou associées à une inflammation aiguë. Des lésions d'hypoplasie sont rarement observées. La lésion d'atrophie est problématique : elle peut être pathologique (le pronostic est alors très sombre) ou physiologique (liée à l'anœstrus hivernal) (Wyers et Rey, 1987).

Dès que des lésions d'infiltration cellulaire sont associées (lésion inflammatoire aiguë, subaiguë, chronique), on tient compte alors de celle qui prédomine si elles ne sont pas équivalentes (en terme d'extension). Le cas échéant on les considère toutes ensemble.

L'endomérite chronique infiltrante et l'endomérite subaiguë (ou leur association) représentent 70% des remaniements observés (Wyers et Rey, 1987).

CATEGORIE	LESIONS
I	Pas de lésion
II	EA
III	ECI
IV	EA + ECI
V	ECD
VI	EA + ECD
VII	ECI + ECD
VIII	AE
IX	EA + AE
X	ECI + ECD + AE
XI	Hypo
XII	Hyper
XIII	EA + Hyper
XIV	ECI + ECD + Hyper
XV	EA + ECI + ECD + Hyper

Tableau 2 : Classification des lésions de l'endomètre chez la jument selon Ricketts (Wyers et Rey, 1987)

EA : endomérite aiguë, ECI : endomérite chronique infiltrante = endomérite subaiguë, ECD : endomérite chronique dégénérative, AE : atrophie de l'endomètre, Hypo : hypoplasie de l'endomètre, Hyper : hyperplasie de l'endomètre

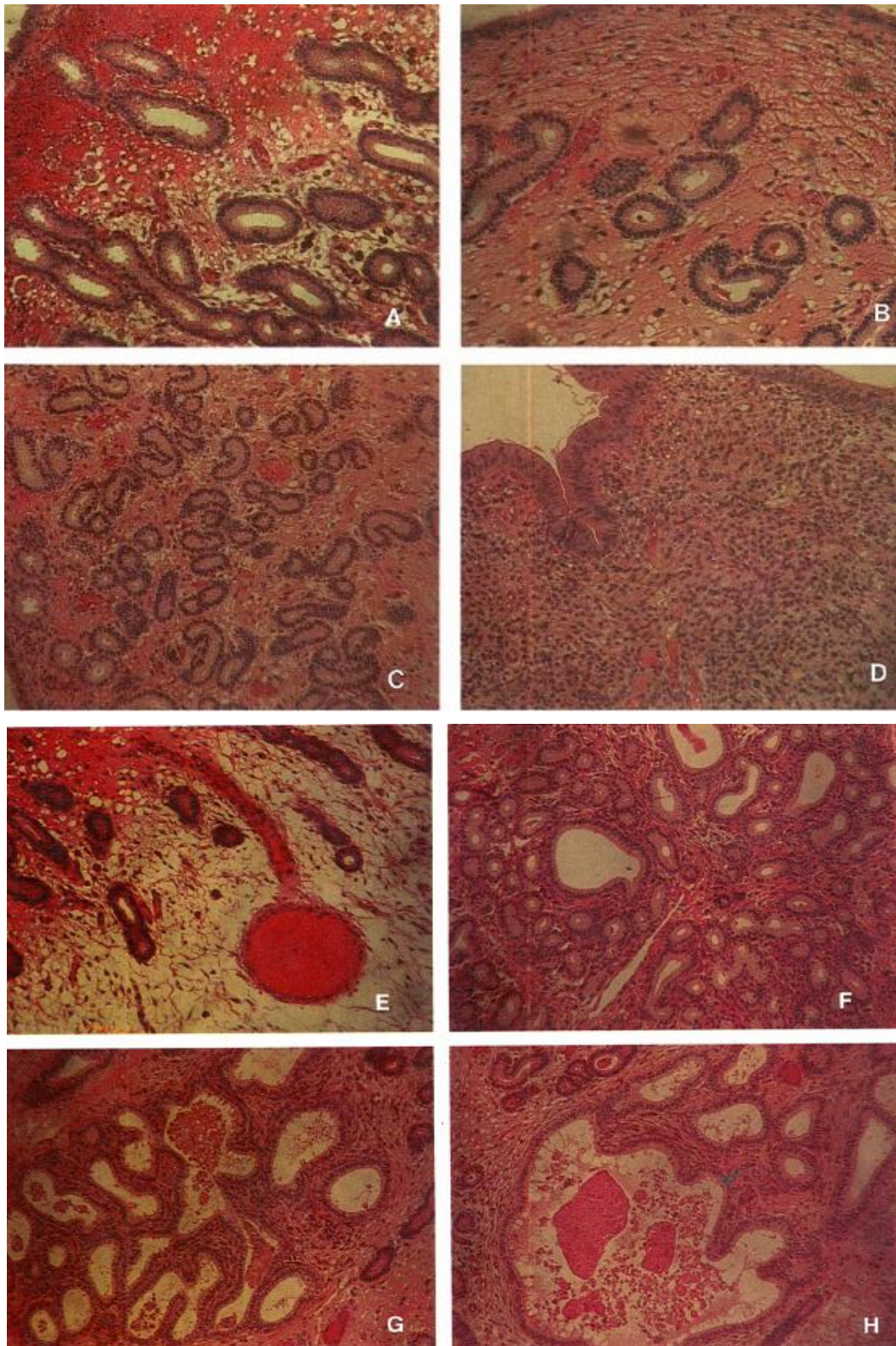


Figure 10 : Modifications pathologiques de l'endomètre chez la jument qualifiées d'après la classification de Ricketts (Tibary et Bakkoury, 1994)

A : Endométrite aiguë avec hémorragie sous-épithéliale ; **B :** Atrophie de l'endomètre ; **C :** Endométrite chronique ; **D :** Endométrite aiguë ; **E :** Endométrite aiguë avec fibrose périvasculaire ; **F, G, H :** Endométrite chronique dégénérative (fibrose périglandulaire, dilatation kystique des glandes endométriales).

Dans la classification de Kenney, les endomètres se répartissent selon trois catégories.

La catégorie I se définit comme des endomètres sans hypoplasie ni atrophie, et s'il y a quelques modifications, elles sont de faible importance et clairsemées. La catégorie IIA est caractérisée par une infiltration cellulaire légère à modérée, diffuse, du *stratum compactum*, irrégulièrement répandue mais avec des foyers d'inclusion fréquents dans le *stratum compactum* et *spongiosum*. Il y a peu de lésions de fibrose. Les lacunes lymphatiques sont importantes (on peut même les identifier à la palpation) ; si ces lacunes disparaissent spontanément ou par thérapie, l'endomètre retombe dans la catégorie I. Une atrophie partielle de l'endomètre pendant la saison de reproduction (avec un comportement sexuel et un cycle ovarien) peut conduire à le classer ainsi jusqu'à ce que la cause d'atrophie soit déterminée (anomalie chromosomique, idiopathique chez les vieilles juments stériles) et corrigée (endomérite chronique, pyomètre). Si ces lésions (infiltration légère, lacunes lymphatiques multiples, atrophie) sont présentes de façon simultanée, l'endomètre est alors classé en catégorie IIB. C'est le cas également pour une jument avec l'une de ces lésions mais présentant une stérilité depuis plus de 2 ans. La catégorie IIB comprend les endomètres présentant de nombreuses modifications inflammatoires, largement répandues, diffuses et modérément sévères. La fibrose est ici plus marquée et étendue (quatre couches et plus).

Une inflammation combinée avec de la fibrose ou des lacunes lymphatiques caractérisent un endomètre de catégorie III. Dans cette catégorie, les modifications de l'endomètre sont nombreuses, diffuses, étendues et graves ; une stase lymphatique grave (toucher spongieux de la paroi utérine) et une atrophie endométriale tout le long de la saison de reproduction sont présentes. A cause de l'importante fibrose et de son étendue, les chances de remonter dans la classification sont faibles.

Catégorie	Lésions histopathologiques
I	<ul style="list-style-type: none"> - Peu ou pas de modification pathologique - Foyers d'inflammation légère, peu nombreux - Hypoplasie ou atrophie de l'endomètre absente - Sclérose légère localisée possible - Lacune lymphatique localisée
II	<ul style="list-style-type: none"> - Infiltration cellulaire diffuse, légère à modérée, du <i>stratum compactum</i> - Sclérose péri-glandulaire, ou foyers disséminés, ou images d'ilôts glandulaires quand ils sont moins de 3 par unité de surface - Lacunes lymphatiques multiples - Atrophie de l'endomètre
III	<ul style="list-style-type: none"> - Sclérose diffuse, très étendue - Sclérose péri-glandulaire, avec images d'ilôts glandulaires quand ils sont plus de 5 par unité de surface - Inflammation diffuse sévère - Plasmocytes présents - Lacunes lymphatiques palpables - Hypoplasie de l'endomètre - Pyomètre (même après traitement)

Tableau 3 : Classification des lésions de l'endomètre chez la jument selon Kenney (Wyers et Rey, 1987)

3. Chez la vache

Dans cette espèce, plusieurs auteurs ont proposé une description et une classification des lésions endométriales (Gonzalez et al, 1985 ; Chaffaux et al, 1987 ; Mc Dougall, 2005 ; Chapwanya et al, 2009).

Hartigan et al (1972) ont utilisé l'infiltration cellulaire pour diagnostiquer et grader la gravité des endométrites en se basant sur les travaux de DeBois (DeBois cité par Hartigan et al, 1972). Ils ont gradé cette maladie selon trois degrés (tableau 4).

L'équipe de Chaffaux et al (1987) a décrit et quantifié les lésions de l'endomètre chez la vache en créant une gradation pour chaque élément histologique (épithélium, glandes, nodules ...) (tableau 5). Les critères retenus sont ceux communément admis par différents auteurs tels que Hartigan et al (1972).

Degré de l'endomérite	Infiltration cellulaire diffuse	Les nodules lymphocytaires
Légère	Infiltration modérée du <i>stratum compactum</i>	1 ou 2
Modérée	Infiltration dense du <i>stratum compactum</i> et de la partie supérieure du <i>stratum spongiosum</i>	3 ou 4
Sévère	Infiltration dense du <i>stratum compactum</i> et <i>spongiosum</i>	> 5

Tableau 4 : Gradation des endométrites selon Hartigan et al (1972)

	Critères	Score
Epithélium luminal	- Absent	0
	- Normal	1
	- Infiltré	2
	- Partiellement ou totalement détruit	3
Morphologie glandulaire	- Normal	1
	- Glandes dilatées (diamètre de la lumière excédant 2 fois la hauteur des cellules épithéliales)	2
	- Glandes kystiques (très dilatées présentant un épithélium aplati, hypoplasique)	3
Fibrose glandulaire	- Absente	0
	- 1 à 2 couches concentriques de fibroblastes	1
	- 2 ou 3 couches concentriques de fibroblastes	2
	- Nombreuses couches de fibroblastes ou sclérose des sites glandulaires	3
Infiltration cellulaire	- Infiltration mononucléée	
	- Absente	0
	- Modérée	1
	- Forte	2
	- Infiltration polynucléée	
	- Absente	0
- Modérée	1	
- Forte	2	
Nodules lymphoïdes	- Présents	1
	- Absents	0

Tableau 5 : Classification des lésions d'endométrites chez la vache selon Chaffaux et al (1987)

Selon ces critères, une note globale « I » a été définie comme étant la somme des notes quantifiant les lésions de l'épithélium et d'infiltration cellulaire (sont exclus les animaux présentant une note de 3 en fibrose périglandulaire). La note devient I1 si la somme des paramètres est inférieure à 6, I2 si elle est de 6 ou 7, et I3 si c'est 8 ou 9. Ce paramètre caractérise un niveau général de l'inflammation.

D'après Chaffaux et al (1987), la fibrose périglandulaire est la lésion la plus rencontrée signant une endomérite chronique sclérosante (Manspeaker et al, 1984 ; Chaffaux et al, 1987), puis ce sont les lésions histologiques d'endomérite subaiguë persistant 30 jours

post-partum (infiltration mononucléée et polynucléée associée à une atteinte épithéliale) (Chaffaux et al, 1987).

Bonnet et al (1991a) ont réalisé des biopsies à 26 et 40 jours post-partum sur une soixantaine de vaches afin d'évaluer leur statut histologique. Celui-ci est une combinaison de critères subjectifs et quantitatifs (tableau 6). Chapwanya et al (2009) ont utilisé les critères préalablement définis par Bonnet et al (1991a) pour obtenir une classification des endomètres en fonction du degré d'inflammation. Les endomètres sont classés de 0 à 3 (tableau 7). Lorsqu'il n'y a aucune inflammation et que le tissu utérin est quiescent et inerte, la coupe histologique reçoit la note de zéro. En cas d'infiltration de lymphocytes et de plasmocytes, de dégénérescence kystique glandulaire limitée, ainsi que quelques modifications vasculaires, la coupe histologique a la note de 1. Si l'inflammation est modérée avec de nombreux leucocytes, une fibrose périglandulaire ou vasculaire limitée, avec très peu ou pas de dégénérescence kystique, alors la coupe reçoit la note de 2. La coupe histologique reçoit la note de 3 lorsqu'il y a une inflammation endométriale importante, une infiltration massive de neutrophiles et de macrophages, une atrophie des glandes utérines, une dégénérescence voire une nécrose utérine, une fibrose périvasculaire étendue, quelques zones œdémateuses, une congestion vasculaire, une hémorragie et une rupture, voire perte, d'épithélium.

	Critère	Critères subjectifs	Critères quantitatifs
Biopsie	Lisibilité	Illisibilité, bonne lisibilité, très bonne lisibilité	Nombre de zones où l'épithélium peut être mesuré
Epithélium	Taille	Columnaire, cuboïde, pavimenteux	Épithélium intact mesuré (x400)
	Cellules inflammatoires	Mononucléaires, polynucléaires	Nombre par champs d'observation (x400)
<i>Stratum compactum</i>	Cellules inflammatoires	Mononucléaires, polynucléaires	Nombre par champ d'observation (sous la membrane basale) (x63)
	Foyers lymphocytaires		Nombre sur la biopsie (x100)
<i>Stratum spongiosum</i>	Foyers lymphocytaires		Nombre sur la biopsie (x100)
Glandes	Densité	Aucune, faible, modérée, marquée	Nombre par champ d'observation (sous la membrane basale) (x100)
	Type Taille	Droites, flexueuses Dilatées ou pas	Diamètres intérieur et extérieur des glandes
	Fibrose	Présente/absente	Nombre de couches autour des glandes
Inflammation		Aucune, faible, modérée, sévère	
Type cellulaire prédominant		Mononucléaires/ polynucléaires	
Présence de muscle ou tissu caronculaire		Présent/ absent	

Tableau 6 : Evaluation des biopsies endométriales chez la vache (Bonnet et al, 1991a)

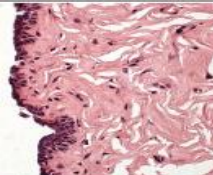
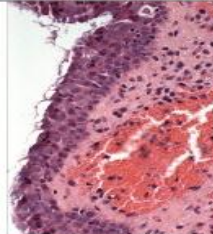
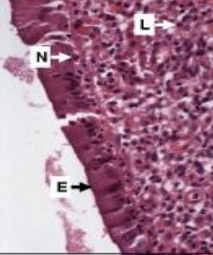
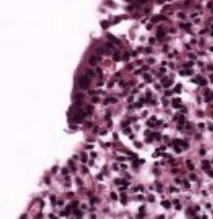
Grade	Histopathologie	Caractéristiques histologiques
0		Inerte ou quiescent Aucune inflammation
1		Inflammation légère : faible infiltration lymphocytaire (L)
2		Inflammation modérée : infiltration lymphocytaire importante
3		Inflammation sévère : migration de monocytes et de neutrophiles (N), œdème, congestion vasculaire et hémorragie.

Tableau 7 : Gradation du degré d'inflammation dans l'endomètre chez la vache (Chapwanya et al, 2009)

N : neutrophiles, L : lymphocytes

En bilan, l'endométrite se caractérise histologiquement par une infiltration inflammatoire de l'endomètre, une altération de l'épithélium (desquamation voire une nécrose), la présence de plasmocytes et une accumulation locale de lymphocytes au niveau des *stratum compactum* et *spongiosum*, des modifications glandulaires, une congestion et un œdème du stroma.

4. Chez la chienne

Alors que le pyomètre de la chienne a été bien étudié sur le plan histologique avec une classification en 4 grades d'évolution (C. Dow cité par Smith, 2006), il n'existe pas de consensus quant aux lésions d'endométrite. En 2001, Johnston et al soulignent déjà le fait qu'aucun système de gradation des lésions utérines n'existe chez la chienne. Une dizaine d'années plus tard ce travail commence à être entrepris. De Bosschere et al (2010) ont retenu comme critères pour décrire une endométrite chez la chienne une réaction inflammatoire légère de l'endomètre, une épaisseur d'endomètre augmentée et une légère prolifération fibroblastique. Schlafer (2012) s'est inspiré de la classification de Kenney et Doig (1986) utilisée pour les juments pour mettre en place une classification pour la chienne en évaluant plus de 500 biopsies utérines (voir infra c.2). Elle comprend 4 catégories basées sur la présence, la distribution, la gravité et la nature des cellules inflammatoires infiltrées, le

contenu luminal, l'état de l'épithélium, la présence d'œdème, d'hémorragie, de kystes, de fibrose et de lésions vasculaires ou de nécrose. A ces lésions, sont associés les commémoratifs médicaux, la qualité de la biopsie et le stade du cycle œstral. En 2013, Mir et al souhaiteraient qu'on produise en reproduction canine, comme en équine, une classification des lésions histologiques des endomètres en fonction de leur association avec la fertilité des chiennes.

5. Chez la femme

L'endométrite aiguë se caractérise histologiquement par la destruction des couches superficielles de l'endomètre associée à une congestion, à un œdème intense, à la dilatation des glandes endométriales envahies par de nombreux neutrophiles (Belaisch et al, 2007) et par la présence de micro-abcès (Frischknecht et Brühwiler, 2008).

Alors que l'endométrite aiguë est rarement rencontrée, l'endométrite chronique a une fréquence estimée entre 0,8 et 19%. Cette dernière est le plus souvent asymptomatique et son diagnostic est rarement suspecté cliniquement. Celui-ci repose théoriquement sur des données histologiques obtenues par biopsie de l'endomètre (Belaisch et al, 2007). Jusqu'en 1981, la littérature n'était pas très étoffée en termes de diagnostic des endométrites chroniques. Celui-ci se basait sur la présence de plasmocytes infiltrant l'endomètre (Rotterdam, 1978 ; Blausteine, 1980, cités par Greenwood et Moran, 1981). Or Couch (1978, cité par Greenwood et Moran, 1981) insiste sur le fait qu'on ne peut pas se limiter à ce simple critère et demande la réévaluation de cette affection d'un point de vue histologique, car les plasmocytes ont été également trouvés dans des endomètres sans inflammation (Cicinelli et al, 2005). De plus, en considérant ce seul critère, les endométrites chroniques sont sous-estimées. De plus, on ne peut pas faire une corrélation entre le nombre de plasmocytes et la gravité de la lésion (Greenwood et Moran, 1981). Néanmoins, à l'heure actuelle le critère diagnostique histologique de référence reste l'identification d'au moins 1 plasmocyte pour 120 champs (Belaisch et al, 2007). La présence de plasmocytes dans le stroma endométrial est donc pathognomonique de l'endométrite chronique (Frischknecht et Brühwiler, 2008). Concrètement, le diagnostic doit se baser sur la présence d'un œdème du stroma superficiel associé à un infiltrat inflammatoire polymorphe dense du stroma endométrial avec présence de plasmocytes (nombreux, rapport nucléo-cytoplasmique élevé). L'œdème est habituellement localisé près de l'épithélium, il est légèrement basophile avec quelques leucocytes et cellules du stroma. Et la forte densité cellulaire du stroma est due à une infiltration leucocytaire. De temps en temps, du tissu fibreux infiltré de cellules inflammatoires peut être observé. L'infiltration leucocytaire est majoritairement localisée dans la portion superficielle de la muqueuse endométriale et dominée par les lymphocytes. Les glandes se trouvent soit en phase précoce de sécrétion soit en phase de prolifération, majoritairement infiltrées par des neutrophiles. Des infiltrations vasculaires intra-luminales par des neutrophiles et des hémorragies artériolaires sous-épithéliales sont également visibles (Greenwood et Moran, 1981). Bien que les données histologiques sur l'endomètre de femme ne soient pas suffisamment étayées comme le précisent Belaisch et al (2007), l'endométrite chronique semblerait être une réelle entité qui aurait un impact sur la fertilité des femmes.

Bilan : La diversité des classifications illustre la difficulté d'interprétation des signes inflammatoires, certains pouvant être présents dans des situations physiologiques. Seule la mise en relation avec les performances de reproduction ultérieures permet la distinction entre les situations normales et pathologiques.

D. Corrélation entre les lésions histologiques et les paramètres de reproduction

1. Chez la jument

Plusieurs études ont montré que l'examen histologique fournit un pronostic fiable quant à la fertilité de la jument (De la Concha-Bermejillo et Kennedy, 1982 ; Van Camp, 1988). Ainsi, la biopsie endométriale est devenue un examen à part entière dans l'évaluation des troubles de reproduction chez les juments.

L'endométrite subclinique est sûrement sous-diagnostiquée de par l'absence des signes cliniques mais elle contribuerait à l'infertilité des juments. La biopsie utérine est un outil de choix pour l'objectiver en mettant en évidence des lésions de dégénérescence utérine comme la lymphagiectasie, la perte de l'épithélium, l'hyperplasie épithéliale, la fibrose périglandulaire, la fibrose autour des vaisseaux... (LeBlanc et Causey, 2009).

a) Les lésions histologiques caractéristiques d'infertilité

En 1975, Ricketts et Kenney (cités par Wyers et rey, 1987)) ont montré que la fréquence et la gravité des lésions augmentent avec l'âge, donc avec l'activité reproductrice, et que les lésions de type chronique (seules ou en association) ont le pronostic le plus sombre, mais elles semblent toujours d'un plus mauvais pronostic lorsqu'elles sont associées avec d'autres lésions (Wyers et Rey, 1987). En effet, les biopsies réalisées avant la saison de monte révèlent que 66% des juments présentant à la fois une endométrite aiguë et une endométrite chronique dégénérative restent non-gravides, contre 33% qui parviennent à être gravides à la saillie suivante (Wyers et Rey, 1987).

De nombreuses lésions diffuses, largement répandues indépendamment de leur degré de gravité sont plus graves que des lésions graves peu nombreuses irrégulièrement répandues et concentrées. Plus les lésions sont diffuses, plus les performances de reproduction sont compromises. (Kenny et Doig, 1986).

Quant aux lacunes lymphatiques, leur rôle dans la réduction de la capacité à mener à terme une gestation n'est pas clair. Mais quand elles sont répandues et détectables par palpation transrectale avec des replis endométriaux épaissis, elles diminueraient la capacité de mener une gestation à terme.

b) Prévision des taux de gestation selon la classe de la biopsie

Selon Kenney et Doig (1986), avec les endomètres de catégorie I (pas ou peu de changements dans l'architecture endométriale), le taux de gestation attendu est de 80-90% (tableau 8). Chez les juments atteintes d'endométrite de catégorie II, les capacités à concevoir ou à mener une gestation à terme dépendent de la fréquence et la distribution des lésions. En effet, après traitement, les femelles en catégorie IIA peuvent mener à bien une gestation dans 50 à 70% des cas. De plus, si ces juments n'ont été stériles qu'un an, elles ont 80 % de chances de devenir gravides contre 50% si elles l'ont été deux ans ou plus. Dans les cas de classement en catégorie IIB, il n'existe pas de traitement et seulement 30 à 50 % des juments porteront un fœtus à terme. Les endomètres classés en catégorie III présentent de graves modifications qui affectent à la fois la capacité à concevoir et à maintenir une gestation (moins de 10% de chance de concevoir et porter à terme un poulain). Une étude qui réalisait des biopsies utérines sur 79 juments a montré que les juments ayant peu de lésions endométriales avaient un taux de poulinage de 78% et un taux d'avortement de 9,7%, celles avec plus de lésions sévères avaient un taux de poulinage de 55% et un taux d'avortement de

23,8% et enfin celles qui présentaient les lésions les plus graves avaient un taux de poulinage de 35% et un taux d'avortement de 44,4% (De La Concha-Bermejillo et Kennedy, 1988). Riddle et al (2007) le confirment en démontrant qu'une très forte baisse du taux de gestation est associée avec une inflammation endométriale grave. Ainsi, une réponse inflammatoire modérée à grave devrait être résolue avant la mise à la reproduction (Kenney et Doig, 1986). Néanmoins, même si une jument en catégorie III a un pronostic sombre, les chances ne sont pas nulles (Kenney et Doig, 1986), probablement parce qu'une biopsie peut ne pas être représentative de l'ensemble de l'utérus (Fiala et al, 2010).

Catégorie	Degré des modifications endométriales	Taux de poulinage attendus
I	Absentes	80-90%
IIA	Légères	50-80%
IIB	Modérées	10-50%
III	Sévères	10%

Tableau 8 : Taux de poulinage attendus selon le classement de l'endomètre (Kenney et Doig, 1986)

2. Chez la vache

Les auteurs sont de façon générale d'accord (sans pour autant être unanimes) sur le fait que les endométrites au sens large ont un effet délétère sur la fertilité des vaches (Gilbert et al, 2005). Une augmentation de l'intervalle vêlage-vêlage, une réduction du taux de réussite en première IA (Hammon et al 2001 ; Gilbert et al, 2005), une augmentation du nombre d'inséminations par IA fécondante, du taux de réforme font parties de ces paramètres de reproduction altérés.

a) Les lésions histologiques caractéristiques d'infertilité

Chez la vache, la gravité des modifications endométriales liées à l'inflammation est corrélée avec les performances de reproduction (Doig, 1980). Le temps qu'une vache reste infertile est corrélée à la sévérité et de la durée de l'inflammation (Bretzlaff, 1987). D'après Hartigan et al (1972), l'infiltration cellulaire de l'endomètre peut être reliée à l'infertilité des vaches à condition de fixer un seuil pathologique. En effet, des endométrites dites modérées ou discrètes ne sont pas forcément synonymes de stérilité (Hartigan et al, 1972), car elles peuvent être liées à la phase du cycle œstral (présence de neutrophiles) et à l'âge de la femelle.

Des portions restreintes d'endomètre infiltrées par les cellules ont peu d'effet sur la fertilité alors qu'une infiltration cellulaire diffuse fait diminuer les chances de fécondation (De Bois et Manspeaker, 1986). En effet, si des lésions modérées d'endométrite sont compatibles avec une gestation, par contre une importante densité en foyers inflammatoires réduit le taux de conception (De Bois, 1961 ; cité par Dawson, 1963). Eduvie et al (1984) ont montré que les biopsies utérines présentant des nodules lymphoïdes augmentent avec le nombre de jours post-partum. L'infiltration lymphocytaire de l'endomètre, l'atteinte de l'épithélium luminal, un degré de fibrose périglandulaire important sont significativement plus marquées chez les animaux dont le délai de guérison est ensuite long (>120 jours)

(Chaffaux et al, 1987). Les signes chroniques d'inflammation, telles que la dilatation des glandes endométriales, la fibrose périglandulaire font augmenter le nombre d'inséminations artificielles nécessaires pour obtenir une insémination fécondante (Bois et Manspeaker, 1986). Quant à la fibrose péri-glandulaire, elle peut interférer avec la fonction de la glande jusqu'à l'atteinte du soutien glandulaire pour le conceptus en début de gestation, causant ainsi une mort embryonnaire précoce (Bretzlaff, 1987 ; Azawi, 2008). Elle signe une véritable dégénérescence du tissu endométrial, à l'origine d'infertilité (Chaffaux et al, 1987). D'après Kübar et Jalakas (2002), la dégénérescence kystique des glandes utérines doit être majeure pour affecter la reproduction ; réciproquement, l'élargissement kystique des glandes utérines ne signifie pas que la vache soit stérile. Il n'y aurait donc pas de relation entre la présence de glandes kystiques et les performances de reproduction (Kübar et Jalakas, 2002).

Il ne semble pas y avoir de corrélation entre la présence ou la gravité des lésions histologiques et l'isolement d'une ou plusieurs espèces bactériennes spécifiques (Messier et al, 1984). Des études précédentes (Griffin et al, 1974 ; Luginbuhl et al, 1981 ; cités par Messier et al, 1984) avaient montré que l'isolement de *T. pyogenes* n'était corrélé avec la présence de lésions graves de l'endomètre que lorsque d'autres espèces bactériennes étaient isolées simultanément. De même, aucune corrélation ne pouvait être établie entre le nombre de bactéries par gramme de tissu utérin et la gravité des lésions (Messier et al, 1984).

Au final, les critères d'intérêt pronostique pour la fertilité ultérieure chez la vache sont l'inflammation, la fibrose péri-glandulaire, et la dégénérescence kystique de nombreuses glandes.

b) Prévision des animaux infertiles en fonction de leur lésion histologique

Gonzalez et al (1985) avaient défini 4 catégories d'utérus (selon la réaction inflammatoire, la fibrose et l'aspect des glandes) : la catégorie 1 comprenait les endomètres normaux avec une gradation croissante jusqu'à la catégorie 4 correspondant aux endomètres présentant les lésions les plus graves. Trente-trois pourcents des vaches de la catégorie 1, 56,5% des vaches de la catégorie 2, 73,5% des vaches de la catégorie 3 et 91,3% de celles en catégorie 4 présentent des troubles de la reproduction (avortement, repeat-breeding, mortinatalité, intervalle vêlage-insémination artificielle fécondante augmenté). Dans l'étude de Chaffaux et al (1987), on se rend compte toutefois que tous les animaux avec des lésions sévères d'endométrites ne sont pas pour autant infertiles (8,7%). En bilan, même si 85% des animaux fertiles ne présentent ni lésions graves d'endométrite ni fibrose périglandulaire (Chaffaux et al, 1987), la gestation reste néanmoins possible en cas d'endométrite légère à modérée. Et réciproquement, une étude de Messier et al (1984) a montré que dans toutes les classes histologiques d'endomètre il existe toujours quelques animaux infertiles. Mais une endométrite initialement peu grave peut devenir persistante et altérer la fertilité (LeBlanc et al, 2002a), autrement dit c'est la chronicité d'une lésion mineure qui peut être à l'origine d'infertilité.

3. Chez la chienne

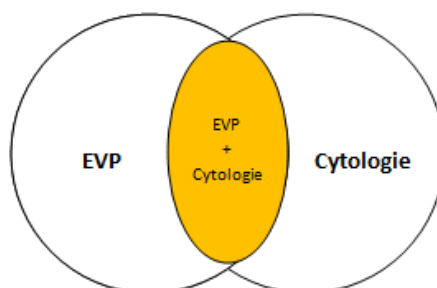
Jusqu'en 2013, même si des relations entre des lésions d'endométrite aiguë ou chronique et une subfertilité des chiennes sont déjà évoquées (Schlafer, 2012), seule une étude démontre ce lien par la cytologie : celle-ci comprenait 26 chiennes infertiles parmi lesquelles 10 chiennes souffraient d'endométrite (Fontaine et al, 2009). Mais peu de données ne caractérisent l'histologie des endomètres des chiennes infertiles ou ayant avorté. En 2013, à l'aide de l'histologie, Mir et al rapportent à leur tour que 28% des chiennes ayant un diagnostic de gestation négatif souffrent d'endométrite.

Les lésions utérines inflammatoires ou hyperplasiques sont considérées comme des causes d'infertilité chez la chienne (Schafler, 2012). En modifiant l'environnement utérin, ces lésions utérines induiraient des échecs d'implantation, des échecs de développement fœtal ou embryonnaire (Freshman, 1991). La pathogénie des réactions inflammatoires endométriales n'est pas encore clarifiée. De même, les conséquences des fibroses et dégénérescence des glandes utérines sont encore incertaines (Mir et al, 2013).

Une hyperplasie endométriale et/ou une fibrose des glandes endométriales en dégénérescence associées ou non avec une endométrite lymphoplasmocytaire sont considérées comme des signes de chronicité (Mir et al, 2013). Il est donc nécessaire de mettre en place un outil diagnostique reconnu permettant de détecter les lésions d'endométrite avant qu'elles ne deviennent chroniques. L'examen échographique a été montré comme étant un bon outil de terrain pour permettre un diagnostic d'hyperplasie glandulo-kystique avancée et les formes suppurées (Bigliardi et al, 2004), mais il ne permet pas d'identifier l'endométrite et les cas précoces d'hyperplasie glandulo-kystique endométriale (Christensen et al, 2012).

III. L'examen histologique dans le diagnostic d'endométrite chez la vache

Le diagnostic des endométrites dans les troupeaux a été gêné par un manque de définition de la maladie (Gilbert et al, 2005 ; Sheldon et al, 2006). Récemment, les endométrites ont été subdivisées en formes clinique et subclinique (Sheldon et al, 2009). Les endométrites cliniques sont associées à un écoulement vaginal purulent au-delà de 21 jours postpartum alors que les endométrites subcliniques sont définies par une inflammation de l'endomètre sans signes cliniques apparents. Elles se caractérisent à l'examen cytologique, par un taux de neutrophiles entre 5,5% et 10% dans des échantillons obtenus par lavage utérin ou avec une cytobrosse autour de 5 semaines post-partum (sans signe clinique). Ces vaches ne présentent pas d'écoulement vaginal mais l'inflammation utérine est associée à une altération des performances de reproduction (Sheldon et al, 2009). Néanmoins, en 2010, Dubuc et al ont remis en cause cette distinction des endométrites en endométrite clinique et cytologique. En effet, ils ont mis en évidence que sur un même lot de vaches la cytologie (au seuil de 6% de neutrophiles) a détecté 13,5% d'endométrite, l'examen clinique (écoulement vaginal purulent ou muco-purulent) en a détecté 9,4% et les deux examens simultanés 5,8%. Ceci suggère qu'il y a trois types d'endométrites différents : celles avec un écoulement vaginal purulent (EVP), celles avec une cytologie utérine montrant plus de 6% de neutrophiles et celles présentant à la fois un écoulement vaginal purulent et une cytologie utérine positive (figure 11).



EVP : Écoulement vaginal purulent

Figure 11 : Les différentes formes d'endométrites selon Dubuc et al (2010)

L'examen histologique de l'endomètre fournit de nombreux détails sur l'inflammation endométriale, des détails précis sur les lésions, et permet une évaluation des différents éléments tissulaires. Cet examen a une sensibilité de 44% et une spécificité de 92 % pour diagnostiquer les endométrites subcliniques en utilisant l'examen cytologique comme référence (Meira et al, 2012). Il s'agit donc d'une méthode diagnostique très spécifique mais peu sensible. Déjà en 1956, Skjerven suggérait, que les « possibilités d'une biopsie endométriale » devraient être envisagées afin d'améliorer le diagnostic de l'infertilité bovine (Bonnet et al, 1991a). D'après certains auteurs, la biopsie utérine est effectivement une solution clé pour identifier la nature du problème d'infertilité (Bretzlaff, 1987), dont les endométrites (Gilbert et al, 2005).

Néanmoins, contrairement au milieu équin, bien qu'il existe à l'heure actuelle une échelle de gradation des lésions histologiques utérines chez la vache (Chapwanya et al, 2009), il manque des études évaluant la relation entre le statut de la biopsie et la fertilité de la vache biopsiée (Madoz et al, 2014). Seul un travail mené par Meira et al (2012) a évalué l'emploi de la biopsie utérine comme outil diagnostique des endométrites subcliniques.

En pratique, lorsque la clinique, la palpation transrectale et l'examen vaginal convergent de façon évidente vers une endométrite, la biopsie utérine n'est pas nécessaire (Bois et Manspeaker, 1986). Bien qu'elle ne soit pas justifiée dans la pratique quotidienne, elle peut être extrêmement utile lors de repeat-breeding (vaches infertiles à chaleurs normales). De plus, chez les vaches de haute valeur, le recours à la biopsie utérine permet une évaluation complète du tractus génital (DeBois et Manspeaker, 1986).

Quant aux endométrites subcliniques, les examens diagnostiques de routine comme l'examen au vaginoscope ne permettent pas de les identifier. Or, elles altèrent, insidieusement, les performances de reproduction. On peut donc considérer des vaches comme saines avec les examens de routine, alors que simplement elles ne manifestent pas de signes cliniques (endométrite subclinique). D'après Sheldon et al (2009), 37-74% des animaux sont touchés par cette affection. Elles représenteraient plus de 40% des vaches déclarées saines (Deguillaume, 2010). Certes, la cytologie a prouvé son efficacité pour déceler ce type d'endométrite, mais la biopsie utérine a peut-être son rôle à jouer aussi si on parvient à montrer qu'elle est plus prédictive des performances de reproduction ultérieures que ne l'est la cytologie.

Le recours à la biopsie utérine chez la vache a sans doute été limité par le questionnement quant à son innocuité. Certaines études affirment que la biopsie utérine perturbe la fertilité (Zaayer et Van der Horst, 1974 ; Miller et al, 1980) et/ou induit des affections utérines. Zaayer et Van der Horst (1974) montraient que deux biopsies séparées dans le temps et réalisée chacune sur une corne différente étaient délétères pour une vache. En effet, en se basant sur les observations des éleveurs (chez qui ces chercheurs avaient pratiqué les biopsies utérines), un retard et une diminution d'expression des chaleurs étaient constatés. Sur huit vaches dites « fertiles », quatre n'ont pas exprimé de chaleurs et trois sont revenues en chaleur plus tardivement. Dans l'étude de Miller et al (1980), les vaches ayant été biopsiées entre 21 et 35 jours post-partum ont un taux de réussite à la première insémination légèrement réduit, sans pour autant que cette démonstration soit très scientifique. En effet, sur les 207 vaches biopsiées sur les 2691 vaches de l'étude, le taux de réussite en première insémination est d'environ 30%, comparé à celui de la population totale qui est de 43%. Cependant, les vaches biopsiées provenaient du groupe de vaches ayant une endométrite modérée (cornes utérines de 3-4 cm, 0,5 à 1 cm de différence de diamètre entre les deux cornes, parfois écoulement utérin léger à modéré), alors que la population totale était constituée à la fois de vaches avec des utérus normaux (1140 vaches), avec des endométrites modérées (550 vaches) et des endométrites sévères (111 vaches).

D'autres auteurs comme DeBois et Manspeaker (1986), Sheldon et al (2006), Chapwanya et al (2010) défendent eux l'innocuité de cette technique. Ces derniers ont étudié les conséquences des biopsies utérines réalisées sur 13 vaches à 15, 30, 60 jours post-partum. Pour ce faire, un examen clinique (examen externe, température, couleur des muqueuses, fréquence respiratoire, fréquence cardiaque) a été réalisé sur chaque vache à 1, 6, 24 et 48 heures post-biopsie en se concentrant particulièrement sur les écoulements vulvaires anormaux et sur les signes d'inconfort. Les vaches étaient par la suite synchronisées et inséminées. Un diagnostic de gestation était mis en place 27 jours après l'insémination. Le taux de gestation n'était pas perturbé, et aucun effet délétère sur la santé, la cyclicité ou la fertilité n'ont été détectés. Par ailleurs, la cicatrisation est rapide, les hémorragies et autres lésions se résorbent facilement. En 2014, l'équipe de Binelli (Pugliesi et al, 2014) révèle dans leur étude, dans laquelle été évalué l'impact de la biopsie utérine la semaine après l'insémination artificielle sur le taux de gestation et le maintien d'une gestation, qu'aucun marqueur d'infection ou d'affection utérine n'était observé postérieurement à la biopsie.

Bien que la biopsie endométriale ait été sans doute l'outil diagnostique de certitude chez les juments, son coût financier et en temps de travail limitent son utilisation chez la vache (Gilbert et al, 2005). La réalisation du cathétérisme cervical est également beaucoup plus complexe chez la vache que chez la jument, en particulier chez les primipares. Il est conseillé de pratiquer la biopsie pendant l'œstrus, de ne pas hésiter à faire un échantillon de taille suffisante soit de 4x8 mm (De Bois et Manspeaker, 1986 ; Chapwanya et al 2010) et autant qu'il soit possible de la reconnaître, d'effectuer la biopsie dans la corne qui n'hébergeait pas le veau lors de la gestation précédente car les biopsies y seraient plus lisibles selon Bonnet et al 1991a.

La préparation et la lecture microscopique des échantillons ne permettent pas d'obtenir une réponse « au chevet » de la femelle, d'autant plus qu'il faut des compétences d'un anatomopathologiste pour l'interprétation des lésions histologiques. Des méthodes moins invasives pour évaluer l'inflammation endométriale incluent la cytologie avec recueil de l'échantillon par cytobrosse ou par lavage utérin, considérée comme la technique de référence et est devenue le standard auquel les autres techniques sont comparées (Kasimanickam et al, 2004 ; Deguillaume et Chastant, 2009 ; Sheldon et al, 2009 ; Deguillaume et Chastant, 2012).

Au-delà du diagnostic, l'analyse des biopsies par PCR ou RT-PCR offre un potentiel sans précédent pour comprendre les mécanismes moléculaires régulant la réponse immunitaire du post-partum, les profils cellulaires et moléculaires en réponse aux modifications tissulaires et/ou aux affections post-partum. La biopsie pourrait donc faciliter la découverte de nouveaux marqueurs ou de cibles thérapeutiques nécessaires pour soigner des maladies utérines qui contribuent à la réduction de la fertilité (Chapwanya et al, 2010). De même, afin de comprendre les mécanismes génétiques et physiologiques de l'implantation embryonnaire et donc de la réceptivité de l'endomètre utérin à une gestation, Pugliesi et al (2014) ont montré que la biopsie utérine pouvait être un outil intéressant sans nuire à la fertilité bovine. En effet, elle est compatible avec le maintien de la gestation mais elle réduit néanmoins les taux de gestation de 35% (Pugliesi et al, 2014).

Plus récemment, des études en médecine humaine ont mis en évidence l'effet bénéfique d'une lésion induite par une biopsie sur l'endomètre avant la stimulation ovarienne au cours du cycle ovarien, sur la gestation. En effet, chez les femmes connaissant des échecs d'implantation embryonnaire récidivants, elles ont 71% de chance d'être enceintes après une lésion endométriale causée par une biopsie (Potdar et al, 2012). D'un point de vue mécanisme physiologique, la réceptivité endométriale est une des clés régulant l'implantation du blastocyste dans l'endomètre et il a été montré qu'une atteinte de l'endomètre modifie l'expression de gènes améliorant ainsi la sécrétion de facteurs de croissance et donc une meilleure implantation de l'embryon (Kalma et al, 2009).

CONCLUSION

Pour l'instant, sur le terrain, l'examen cytologique de l'endomètre et du col « reste le seul moyen diagnostique fiable de l'inflammation génitale vers un mois post-partum » (Chastant-Maillard et Deguillaume, 2012). Il est à l'heure actuelle considéré comme le « gold standard » du diagnostic de l'endométrite chez la vache alors que c'est plutôt la biopsie utérine qui occupe cette position pour l'évaluation de la fertilité dans la plupart des espèces. Compte tenu des inconvénients de la mise en œuvre de la biopsie utérine chez la vache par rapport à l'examen cytologique, il est intéressant d'évaluer les deux techniques de façon comparative.

L'étude expérimentale présentée ici consiste à prélever, ex vivo, à l'abattoir, quatre zones distinctes de l'utérus de vache (col, corps utérin, cornes droite et gauche). Sur chaque zone, un prélèvement histologique et un prélèvement cytologique contigus ont été réalisés. L'objectif est de comparer le statut inflammatoire de chaque site obtenu par les deux techniques (cytologie et histologie) et d'évaluer l'homogénéité de l'inflammation au sein du tractus génital.

PARTIE EXPERIMENTALE

Actuellement, l'examen de référence pour évaluer l'état inflammatoire de l'utérus de vache est la cytologie. Or, seules les cellules en surface sont visualisées dans un tel examen. La question se pose donc de savoir si ce prélèvement est réellement représentatif du statut inflammatoire réel de l'utérus tel qu'il peut par exemple être évalué par histologie. De plus, le prélèvement en vue de l'examen cytologique est réalisé grâce à une cytobrosse, ainsi seule une partie bien localisée de l'utérus (à la bifurcation des cornes) est évaluée. L'étude présentée ici vise tout d'abord à comparer les conclusions des examens cytologique et histologique en ce qui concerne le statut inflammatoire d'une zone donnée. Puis quatre secteurs génitaux (col, corps utérin, corne droite et gauche) ont été échantillonnés avec comme second objectif d'évaluer l'homogénéité de l'inflammation au sein de l'appareil génital.

I. Matériels et méthodes

A. Constitution de l'échantillon d'étude

Cette étude expérimentale est une étude *ex vivo*. Elle s'est déroulée dans l'abattoir de Noeux-les-Mines (62, groupe Bigard), avec l'aimable autorisation des Docteurs Roze et Machacova. Sur les 400 prélèvements cytologiques réalisés (donc sur 100 vaches), 74% ne présentaient aucune inflammation (Daragon, 2011). Or, dans notre étude nous souhaitons avoir autant de vaches dites «cytologiquement» positives que négatives. Pour ce faire, nous avons dû compléter cette collection en allant prélever d'autres appareils génitaux dans les abattoirs de Puylaurens (81) et de St Gaudens (31).

Les tractus utérins étaient récupérés en triperie, au fur et à mesure de leur arrivée. Aucune donnée individuelle concernant l'animal (parité, production laitière, délai *post-partum*, performances de reproduction, stade du cycle œstral) n'était disponible. Les utérus découverts gravides suite à l'incision des cornes utérines étaient exclus de l'étude.

Finalement, les prélèvements issus de 100 appareils génitaux ont été analysés (dont 75 utérus issus de Noeux-les-Mines, 8 de Puylaurens, 17 de St Gaudens).

B. Protocole expérimental

Un prélèvement pour examen cytologique et un prélèvement pour examen histologique ont été réalisés côte à côte à quatre sites distincts de l'appareil génital : au niveau du deuxième anneau cervical, à la base des deux cornes dans le corps utérin et dans la partie moyenne de chaque corne utérine (bord anti-mésométrial ; figure 12).

Les prélèvements dans le corps et les cornes utérines étaient réalisés après incision de l'utérus avec une lame de bistouri non stérile. Une cytobrosse (CytotakTM Brush, Medical wire equipment co.ltd, Corsham, Wiltshire, Angleterre), était appliquée contre la muqueuse utérine et tournée dans un sens horaire, en appliquant une légère pression (figure 12-3). Une cytobrosse était utilisée par site de prélèvement. Ensuite, la totalité de l'épaisseur de l'utérus était prélevée à chaque site, à proximité du site de prélèvement cytologique, grâce à Punch à biopsie 8 mm (LCH medical products, Paris, France).

Le prélèvement cytologique endocervical ne nécessitait pas d'incision de la paroi cervicale. La brosse était directement insérée dans l'orifice externe de col jusqu'au deuxième anneau cervical (figure 12-4). Quant à la biopsie cervicale, réalisée également au punch à biopsie, elle était faite après incision aux ciseaux de la partie dorsale du col.

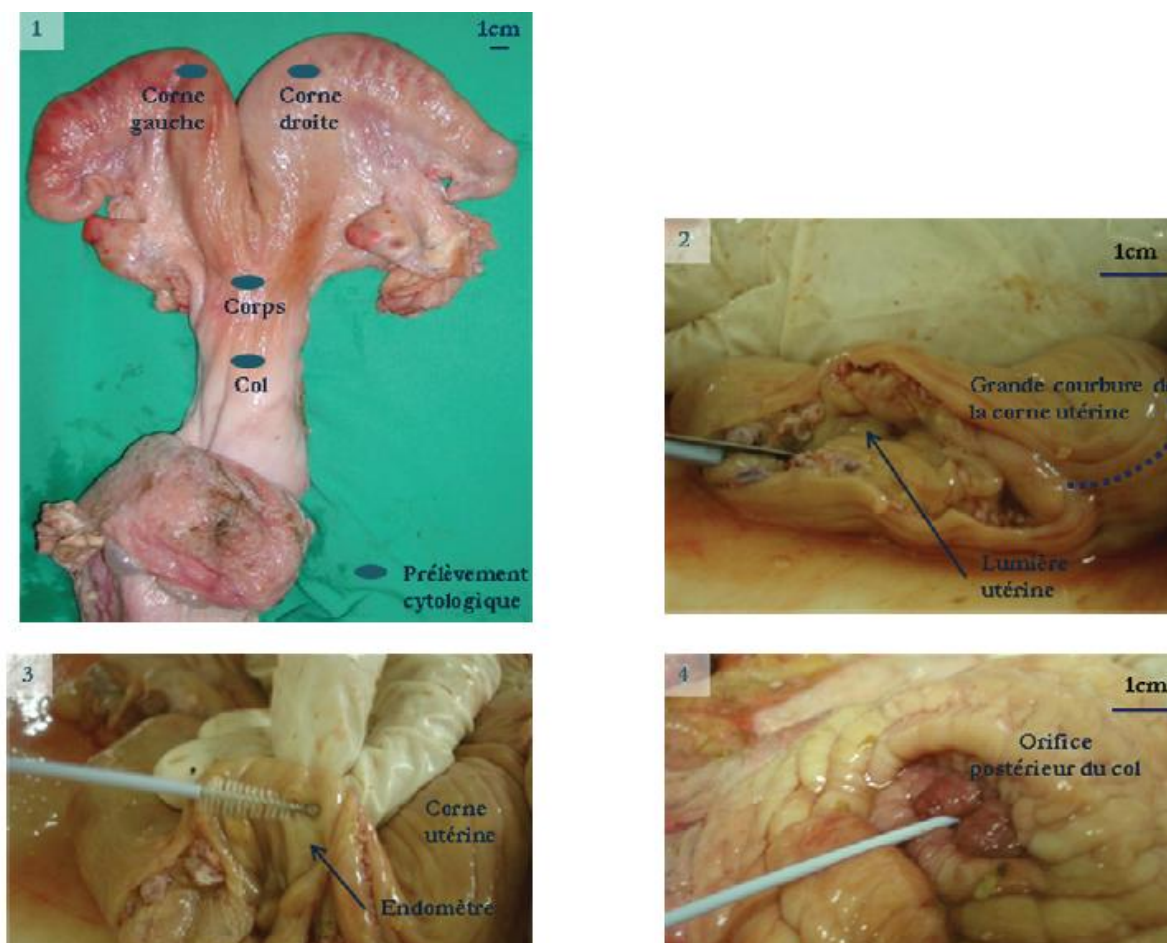


Figure 12 : Prélèvements *ex vivo* sur utérus d'abattoir (Deguillaume, 2011).

1. Sites des prélèvements
2. Incision de la corne jusqu'à la lumière utérine, sur la grande courbure, par une lame de bistouri
3. Réalisation du frottis endométrial par rotation de la cytobrosse contre la paroi de l'endomètre
4. Réalisation du frottis endocervical par introduction de la cytobrosse dans l'orifice postérieur (externe) du col jusqu'au deuxième anneau cervical

C. Préparation des échantillons

La cytobrosse était ensuite roulée sur une lame en verre pour microscope. Si le prélèvement était fortement muqueux ou contaminé par du sang, plusieurs frottis successifs étaient réalisés. Les frottis étaient ensuite séchés à l'air libre et rangés dans des boîtes de transport.

Les biopsies étaient retirées délicatement des mors de l'outil à biopsie et déposées dans des flacons préalablement remplis par du formaldéhyde 10%.

Au final, on obtenait un frottis et un prélèvement biopsique par site, soit 4 frottis et 4 biopsies pour chaque tractus.

D. Coloration des lames

1. Cytologie

Les lames ont été colorées par la coloration de May-Grünwald-Giemsa, réalisée de manière automatisée (modèle Aerospray, marque Wescor, Kitvia, Labarthe Inard, France) par un automate de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

2. Histologie

Les biopsies plongées dans du formol 10% (1/10) ont été transportées telles quelles jusqu'au laboratoire d'Anatomopathologie des ruminants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Elles ont été préparées après l'inclusion dans des blocs de paraffine. Ces blocs ont fait l'objet de coupe de 4-6 µm au microtome et ces coupes ont été colorées à l'hémalum-éosine (HE).

E. Lecture des lames

1. Cytologie

La méthode de lecture comprend, tout d'abord, une observation de la lame au grossissement x100 pour évaluer son homogénéité et rechercher une zone de lecture correcte, puis à l'objectif à immersion (x1000) en progressant par créneaux. Deux cent cellules sont comptées par frottis et le statut inflammatoire est évalué par la proportion de neutrophiles parmi 200 cellules dénombrées (%N).

Pour être comptée, une cellule doit avoir un contour nucléaire visible et intègre, un contour cytoplasmique visible et intègre et faire partie de l'une des trois catégories suivantes : granulocyte neutrophile (GNN), autres leucocytes (les granulocytes éosinophiles, les lymphocytes et les monocytes) et cellule épithéliale (quel que soit son type : agranulaire, granuleuse ou squameuse) (figure 13). Ne sont pas comptées : les cellules anucléées (hématies et squames), les cellules abimées, les noyaux nus, les amas de cellules tridimensionnels, les cellules fortement fusiformes, isolées ou en paquets, évoquant des fibroblastes. Par ailleurs, la contamination sanguine est évaluée selon les caractéristiques suivantes : (0) pas d'hématie, (+) quelques hématies, (++) plusieurs plages de lecture fortement hémorragiques et (++++) plages hémorragiques incluant toutes les cellules à compter, lesquelles sont de morphologie altérée. Les causes des éventuelles difficultés de lecture étaient notées. Lors d'impossibilité de lecture de la lame (nombre de cellules insuffisantes, contamination trop importante), la lame jumelle était colorée à son tour et lue.

Mise à part les 25 dernières vaches prélevées pour compléter la collection d'échantillons qui n'ont été lues que par un seul opérateur, les 75 prélèvements issus de l'étude de Deguillaume (2010) ont été lus par un opérateur qui avait évalué sa reproductibilité sur un % de frottis de cette étude (partie *in vivo*).

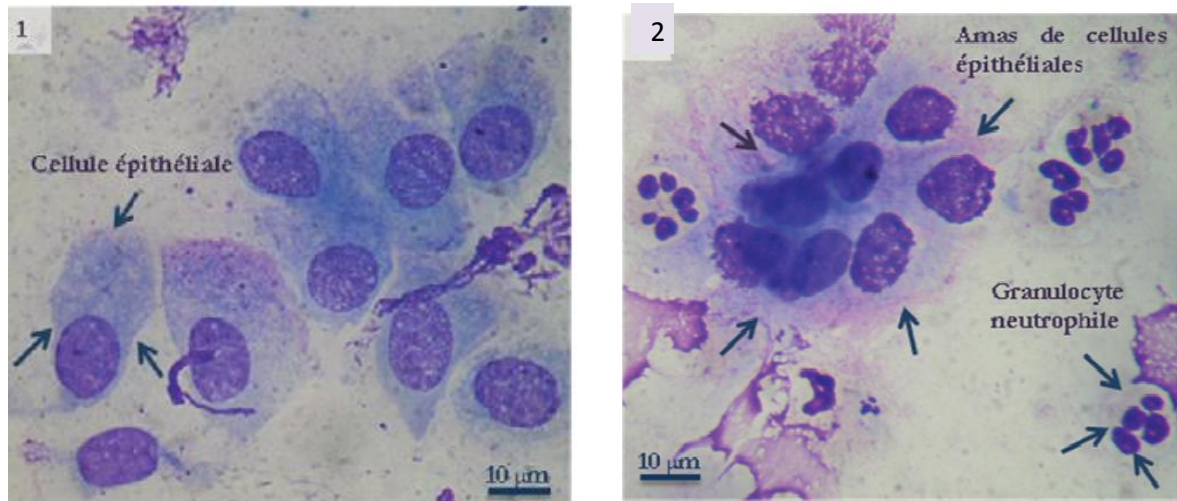


Figure 13 : Frottis cytologiques endométriaux (grossissement 1000 x, coloration May-Grünwald-Giemsa ; Deguillaume, 2010) :

Les flèches délimitent les contours des cellules d'intérêt : 1. Cellules épithéliales, 2. granulocytes neutrophiles.

2. Histologie

Les 400 lames ont été lues en suivant une grille de critères construite d'après la littérature (Bonnet et al, 1991a ; Chaffaux et al, 1987, tableau 9). Toutes les lames ont été lues par le même opérateur. La variabilité intra-opérateur a été évaluée après la double lecture des 400 lames par le même opérateur. A de nombreuses reprises, de nombreuses lames ont été lues par un autre opérateur afin de valider les résultats du premier, sans pour autant évaluer une concordance entre ces deux opérateurs.

Chaque lame était lue de la façon suivante. Au faible grossissement (x100), elle était balayée afin d'avoir un aperçu général de la coupe. On pouvait d'ores et déjà apprécier la densité et l'aspect des glandes utérines, la présence et le nombre de nodules lymphoïdes et la qualité de l'épithélium (absent, détruit). L'appellation de nodule lymphoïde a été ici extrapolée à toute concentration circulaire ou linéaire de cellules mononucléées, visible du grossissement 40 au grossissement 200. Au grossissement 200, on évaluait la fibrose péri-glandulaire en nombre de couches de fibroblastes concentrées autour des glandes. A ce stade, il s'agissait d'une évaluation subjective de la lame (sauf pour le nombre de nodules lymphoïdes) : la caractéristique la plus représentative de la lame était notée. Ensuite, au fort grossissement (x400), les lames étaient lues objectivement. D'une part, l'infiltration de l'épithélium était notée en nombre de cellules (mononucléées ou neutrophiles) si au moins trois champs non superposés étaient infiltrés. Pour l'épithélium, un champ était défini comme un épithélium intact mis au centre de l'objectif. D'autre part, l'infiltration des couches profondes (*stratum compactum* et *stratum spongiosum*) était quantifiée en nombre de cellules (mononucléées ou neutrophiles) sur au moins trois champs non superposés. En effet, pour être représentatif, il fallait que le nombre de cellules annoncées soit au moins lu trois fois distinctement sur la coupe. Pour les couches profondes, un champ correspondait à l'épithélium mis au deux tiers supérieur de l'objectif avec aucune glande utérine sous-jacente à cet épithélium : toute cellule (mononucléée ou neutrophile) présente sous l'épithélium était alors comptabilisée. Le comptage cellulaire était lu manuellement en créneau sur chaque champ. Pour être comptée, une cellule devait avoir un contour nucléaire visible et intègre, un contour cytoplasmique visible et intègre et faire partie de l'une des catégories suivantes : granulocyte neutrophile (GNN), cellule mononucléée (lymphocyte, plasmocyte, mastocyte...).

VACHE n° :	Col	Corne droite	Corne gauche	Corps utérin
<p>Aspect de l'épithélium luminal:</p> <ul style="list-style-type: none"> - absent - normal - infiltré: mononucléaires ou polynucléaires (+ faible/ ++modérée/ +++ forte) <ul style="list-style-type: none"> * nombre par champs au grossissement 400 - partiellement ou totalement détruit (% d'épithélium intact) 				
<p>Stratum compactum</p> <ul style="list-style-type: none"> -cellules inflammatoires (mononuclée/ polynuclées: 0/ +/ ++/ +++) <ul style="list-style-type: none"> * nombre par champs sous la membrane basale au grossissement 400 - nodules lymphoïdes: Présents/ absents <ul style="list-style-type: none"> * nombre sur toute la biopsie 				
<p>Stratum spongiosum:</p> <ul style="list-style-type: none"> Nodules lymphoïdes : <ul style="list-style-type: none"> - présents - absents * nombre sur toute la biopsie 				
<p>Glandes utérines:</p> <p>Densité des glandes utérines:</p> <ul style="list-style-type: none"> - aucune/ rare/ modérée/ nombreuses <ul style="list-style-type: none"> * nombre sous la membrane basale au grossissement 10 sur toute la biopsie <p>Aspect des glandes utérines:</p> <ul style="list-style-type: none"> - normal (diamètre de la lumière < 2 fois la hauteur des cellules épithéliales) - glandes dilatées (diamètre...> 2 fois la hauteur) - glandes kystiques (glandes très dilatées avec épithélium aplati hypoplasique) <p>Fibrose péri-glandulaire:</p> <ul style="list-style-type: none"> - absente - faible (1 à 2 couches concentriques de fibroblastes) - modérée (2 ou 3 couches) - forte (> 3 couches ou sclérose) 				

Tableau 9 : Fiche de lecture des prélèvements histologiques

F. Collecte, saisie et synthèse des données

Pour chaque utérus, les lames et les flacons étaient numérotés et identifiés de sorte à ce qu'ils correspondent au compartiment prélevé d'une vache donnée.

Les résultats obtenus à l'aide des fiches de lecture cytologique et histologique ont été saisis sur le logiciel Excel (Microsoft Office Excel 2007). Les tableaux informatiques de la première saisie brute des données ont été transformés pour générer des données interprétables.

1. Cytologie

A l'issue de cette première lecture, chaque compartiment (col utérin, corne droite, corne gauche, corps utérin) de chaque vache était affecté d'un taux de granulocytes neutrophiles (figure 14). Ce taux est le rapport entre le nombre de neutrophiles comptabilisés sur deux cents cellules comptées sur le frottis.

Etape 1 : lecture

N° lame	GNN	Autres leucocytes	Cellules épithéliales	Taux GNN = GNN/200	Remarques Difficultés
1 COL					
1 CD					
1 CG					
1 CU					

Etape 2 : transformation des données



N° lame/vache	txneutrocol	txneutrocd	txneutrocg	txneutrocu

Figure 14 : Grille de lecture des données cytologiques brutes aux données interprétables
« 1 COL » = lame du col de la vache n°1 ; txneutrocol = taux de neutrophiles cervical; cd = corne droite, cg = corne gauche, cu = corps utérin, GNN = nombre de granulocytes neutrophiles comptés

2. Histologie

Seules l'infiltration cellulaire de l'épithélium, des couches profondes et la présence des nodules lymphoïdes ont été retenues dans la notation finale des lames (tableau 10). En effet, les glandes utérines n'ont pas pu être prises en considération du fait d'un manque de précision dans le protocole de prélèvement. Celui-ci ne précisait pas que le prélèvement devait être réalisé sur une zone inter-caronculaire, car les caroncules sont dépourvues de glandes utérines.

Par ailleurs, il était impossible de juger de la qualité de l'épithélium, on ne pouvait pas savoir s'il était absent ou détruit à cause de l'affection utérine ou de la préparation technique de la lame. Néanmoins, pour des lames avec moins de 50% d'épithélium présent, des lames ont été refaites à partir des blocs préexistants mais très peu d'amélioration a été constatée :

seules 23,7% (18/76) des lames présentaient plus de 50% d'épithélium intact à la seconde coupe, figure 15-A). Au final, parmi les prélèvements utérins, 65 lames (soit 23% des lames (65/286) avec moins de 50% d'épithélium intact) et parmi les prélèvements cervicaux 10 lames (soit 10% des lames (10/99) avec moins de 50% d'épithélium intact) ont moins de 50% d'épithélium intact. De plus, les lames avec moins de 50% d'épithélium intact sont éparpillées sur de nombreuses vaches et ne concernent que très rarement les quatre lames de la même vache. Seules 7% (6/86) des vaches avaient trois lames avec moins de 50% d'épithélium intact (figure 15-B). Cette dispersion entre vaches suggère que l'absence d'épithélium est probablement un problème technique entre le prélèvement à l'abattoir et la mise en bloc de paraffine, et peu probablement un signe d'affection utérine.

Quant aux notes attribuées à l'infiltration de l'épithélium et des couches profondes, et de la lame, elles seront expliquées dans la partie *Résultat II-A et II-B* (description des résultats cytologiques et histologiques).

Au final, les données interprétables de la cytologie ont été confrontées à celles de l'histologie, et ce pour chaque lame.

N° LAME	Secteur	EPITHELIUM SUPERFICIEL					COUCHES PROFONDES							
		% épithélium	Nombre de Mononucléées (M)	Note M	Nombre de Neutrophiles (N)	Note N	NG (note globale)	M	Note M	N	Note N	Nodules lymphoïdes (NL)	Note NL	Note globale
1	COL													
1	CD													
1	CG													
1	CU													

Tableau 10 : Données histologiques sélectionnées et incluses dans l'analyse
CD : corne droite, CG : corne gauche, CU : corps utérin

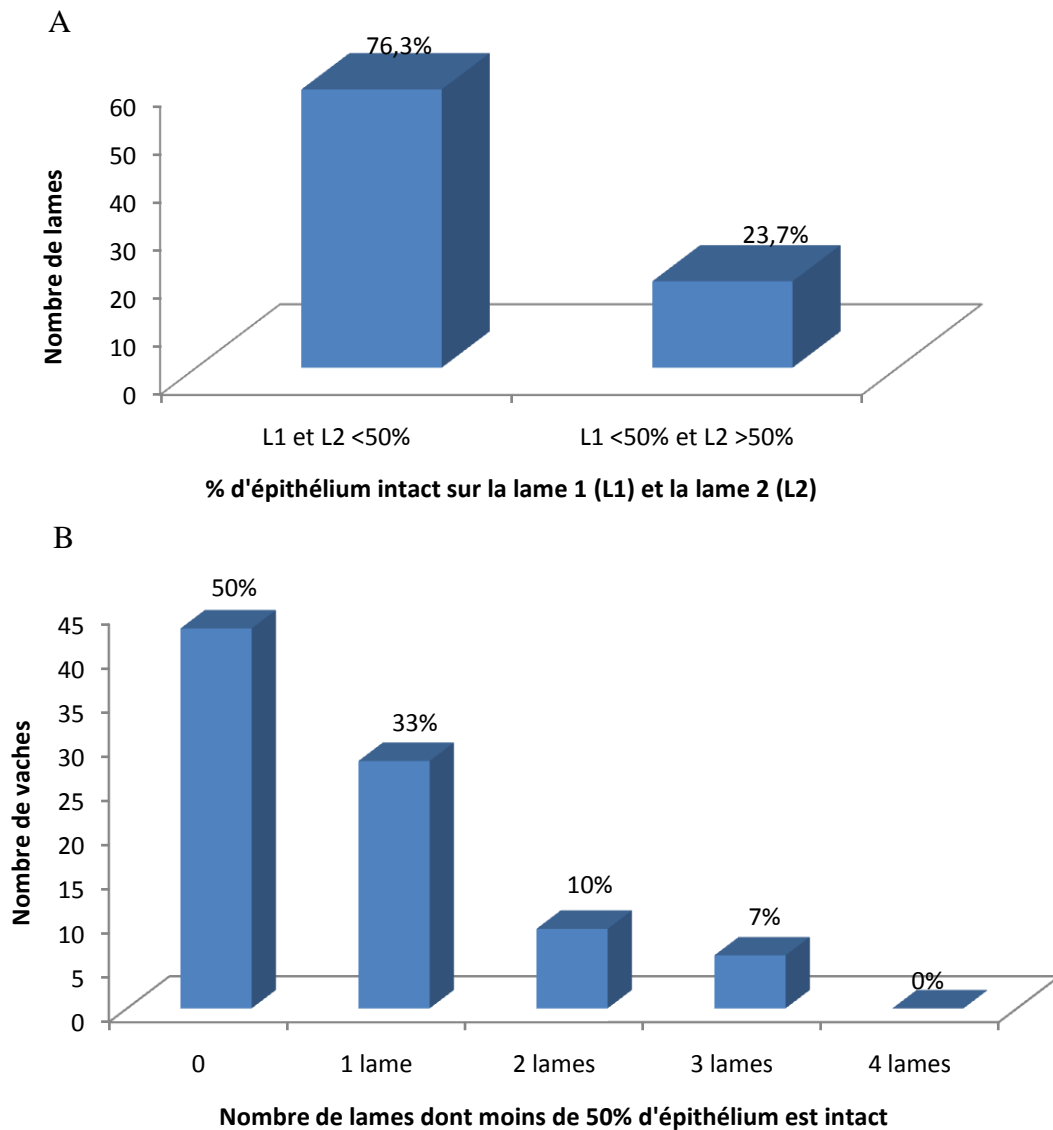


Figure 15 : Qualité de l'épithélium sur les coupes histologiques

A- Influence de la recoupe sur la qualité de l'épithélium. Lorsque la lame issue de la première coupe (L1) présentait moins de 50% d'épithélium intact, le bloc a été découpé pour préparer la nouvelle lame (L2) pour 76 lames.

B- Nombre de lames présentant moins de 50 % d'épithélium intact pour une vache donnée (n=86 vaches, 14 vaches avec des erreurs d'identification de lame ou lames illisibles)

Les chiffres indiqués au sommet des barres indiquent le pourcentage de lames en % des 76 lames avec < 50% épithélium intact en 1^{ère} coupe (A) et le % de vaches touchées par le nombre de lames avec moins de 50% d'épithélium intact en % du nombre total de vaches ayant les 4 lames bien identifiées et lisibles

G. Analyse statistique

La description des données cytologiques et histologiques, le calcul des coefficients kappas ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel (Microsoft Office Excel 2007). Les tests statistiques ont été analysés à l'aide du logiciel Tanagra® (*Tanagra 1.4, Lyon, France*). Les valeurs du degré de significativité P étaient bilatérales. Le risque d'erreur a été situé à 5%.

1. Validation des supports d'étude (épithélium, couches profondes, lames entières)

Afin d'évaluer si les différentes zones (épithélium, couche profonde, lame dans son ensemble) étaient de bons supports pour qualifier une vache avec inflammation de l'endomètre ou non, un test de collinéarité a été effectué. Celui-ci a mis en évidence que ces trois éléments étaient interdépendants ($p < 0,001$), d'où la nécessité de tester chacun d'entre eux indépendamment dans les régressions logistiques univariées.

2. Homogénéité de l'inflammation

Trois notes histologiques ont été attribuées pour chaque lame histologique, une pour l'épithélium, une pour la couche profonde de l'endomètre et une pour la lame dans sa globalité. Quant aux frottis, la variable d'intérêt (%N : % de neutrophiles) a été classée qualitativement en trois notes en fonction du seuil inflammatoire pathologique défini par Deguillaume (2010) : 6%N pour l'utérus et 5%N pour le col pour les prélèvements entre 21 et 35 jours post-partum. En effet, on a utilisé ces seuils malgré l'absence de données individuelles sur les vaches prélevées, afin de pouvoir grader le statut inflammatoire des frottis (*Résultats II-A-3*).

L'homogénéité intra-murale de l'inflammation (entre la note histologique de l'épithélium et la note de la couche profonde) a été évaluée d'une part par le coefficient de concordance kappa ($p < 0,001$) et d'autre part par le coefficient rho de Spearman. La concordance est nulle si le coefficient kappa est < 0 , faible entre 0,01 et 0,2, légère entre 0,21 et 0,40, moyenne entre 0,41 et 0,60, importante entre 0,61 et 0,8 et presque parfaite entre 0,81 et 1,00 ($p < 0,05$). Quant au coefficient rho de Spearman, il y a corrélation lorsque $\rho > 0,4$ ($p < 0,05$).

L'homogénéité de l'inflammation entre deux compartiments génitaux a été analysée à l'aide du coefficient de concordance kappa, d'abord sur les notes cytologiques, puis sur les notes histologiques attribuées.

3. Corrélation entre les données cytologiques et histologiques

a) Le coefficient de corrélation (r)

Des nuages de points entre les notes de cytologie et d'histologie pour chaque secteur ont été faits afin d'apprécier le coefficient de corrélation (r ; p -value). L'interprétation du coefficient de corrélation (r) s'interprète ainsi : plus r est proche de 1 avec une p -value $< 0,05$ plus les valeurs sont corrélées entre elles.

b) Comparaison des médianes

Dans un premier temps, nous avons vérifié la normalité de la variable continue (taux de neutrophiles endométriaux, endocervicaux) par le test de Shapiro-Wilk. Cette variable n'étant pas normale ($p < 0,001$), les tests non paramétriques ont été utilisés pour comparer les médianes (plus de 2 médianes) de cette variable discontinue entre les différentes notes d'histologie établies. Ainsi, le test de Kruskal-Wallis a été employé pour voir globalement entre les groupes si certains étaient différents entre eux. Puis le test de Mann Whitney a permis de connaître les groupes qui se différencient (obtention de nouveaux groupes de notes histologiques notés A, B, C, D). Avant de réaliser ces tests non paramétriques, certains groupes fixés préalablement par les notes d'histologie avaient des effectifs trop petits d'où le regroupement de certains groupes en classes.

c) La proportion de vaches malades ou saines en fonction du couple (note histologique ; note cytologique)

On a reporté le % de vaches avec 0%N et celles avec plus de 4-5%N et en fonction du secteur étudié et de la note d'histologie. On a extrapolé le seuil pathologique du corps utérin aux cornes utérines en émettant l'hypothèse que ce compartiment (corps utérin et les deux cornes utérines) fonctionnait de la même façon.

4. Approche diagnostique d'un seuil histologique

En utilisant les seuils pathologiques disponibles en cytologie, une roc-curve a été réalisée afin de fixer un seuil pathologique pour l'histologie au dessus duquel on a plus de risque d'avoir une lame inflammatoire. Un index de Youden $> 0,5$ avec une AUC élevée caractérise un test utile pour le diagnostic. La précision du diagnostic est fonction de l'AUC : 0.9-1.0 excellent, 0.8-0.9 très bon, 0.7-0.8 bon, 0.6-0.7 correct, 0.5-0.6 mauvais, < 0.5 test inutile.

II. Résultats

Dans les résultats qui vont suivre, il faut préciser que les prévalences qui apparaissent ne peuvent être extrapolées à la population totale de vaches car l'échantillon de vaches utilisé dans cette étude est biaisé (vaches envoyées à l'abattoir, aucun statut physiologique connu...).

A. Descriptions cytologiques (figure 16)

1. Evaluation quantitative

a) Cytologie endométriale

Sur les 100 utérus prélevés, les médianes (EIQ : écart inter-quartile) d'inflammation étaient de 0%N [0-3%N], 0%N [0-2%N], et 0%N [0-1%N] pour les prélèvements de la corne droite, de la corne gauche et du corps utérin respectivement.

Les leucocytes étaient absents de près de 64% à 72% (64/100 à 72/100) des frottis endométriaux (0%N) et 56% (56/100) des vaches ont une inflammation nulle aux trois sites utérins.

Dans notre échantillon, 71% (71/100) des vaches présentaient un taux de neutrophiles < 6%N et seulement 8% (8/100) des individus ont une inflammation endométriale sévère ($\geq 40\%N$).

b) Cytologie cervicale

Sur les 100 tractus génitaux prélevés, la médiane (EIQ) d'inflammation était de 0%N (0-7,5%N).

Les granulocytes neutrophiles étaient absents de 64% (63/99) des frottis endocervicaux, soit 63 vaches avec des frottis endocervicaux sans inflammation parmi lesquelles 46 présentent une inflammation nulle aux quatre sites de prélèvement. Le %N variait entre 0 et 78%, avec 71% (70/99) des frottis dont le %N endocervicaux était < à 6%, 66% (65/99) des frottis dont le %N endocervicaux < à 2%. Seuls 4% (4/99) des vaches présentaient une inflammation sévère (%N $\geq 40\%$).

2. Evaluation qualitative

Le délai entre le dernier vêlage de la vache et la date d'abattage était inconnu. Or, les seuils pathologiques pour le %N en dépendent : ils sont de 6%N pour l'utérus et 5% pour le col à 21-35 jours post-partum alors qu'ils baissent respectivement à 1% et 2% si le prélèvement est réalisé plus tardivement, dans les 7 jours qui précèdent l'IA (Deguillaume, 2010).

En ne considérant que les seuils les plus faibles pour définir l'endométrite (assurant une bonne sensibilité de détection), la prévalence de celle-ci était de 33% (33/99) pour le col, 36% (36/100) pour la corne droite, 32 % (32/100) pour la corne gauche et de 28% (28/100) pour le corps utérin.

3. Evaluation semi-quantitative

Afin de pouvoir par ailleurs comparer les résultats cytologiques à ceux de l'histologie, le statut inflammatoire cytologique a été codifié en attribuant une note allant de 0 à 2. Nous avons formé 3 classes pour isoler d'une part tous les frottis ne présentant pas d'inflammation (note de zéro, taux de neutrophiles = 0), d'autre part la classe de 1 à 4-5 de %N (donc entre les seuils définis pour les deux délais post-partum) et enfin les frottis avec plus de 5-6% de neutrophiles. En effet, dans la littérature, en cytologie, les seuils pathologiques sont de $\geq 5\%N$ pour le col et $\geq 6\%N$ pour le corps utérin à 21-35 jours post-partum (J21-35 PP). Au-delà, dans la période de mise à la reproduction, les seuils sont inférieurs (Deguillaume, 2010). En l'absence d'information sur le délai post-partum des vaches dans notre étude, mais en supposant que peu de vaches étaient abattues entre 8 (date légale) et 35 jours post-partum (i.e avant le pic de lactation), nous avons utilisé les seuils connus à J21-35 PP pour considérer les compartiments génitaux comme inflammatoires. Seules les cytologies à 0% de neutrophiles ont été considérées comme non inflammatoires afin de s'affranchir de cette classe intermédiaire de vaches avec 1-4%N pour le col et 1-5%N pour le corps utérin.

Ainsi, il sera possible de vérifier au cas par cas si une cytologie de note zéro est bien corrélée avec une histologie ne témoignant pas d'inflammation, i.e si une cytologie qui ne conduirait pas le praticien à mettre en œuvre un traitement est conforté par l'histologie. D'après la figure 16-B, 67 % (267/399) des lames ont une note de zéro, 11% (44/399) des lames ont une note de 1 et 22% (88/399) une note de 2.

Comme le met en évidence la figure 16-C, pour chaque zone de prélèvement, plus de 60% des frottis ont un taux de neutrophile nul et entre 14 et 18% des frottis sur chaque site ont des frottis avec 11% ou plus de neutrophiles (frottis dit cytologiquement très positif).

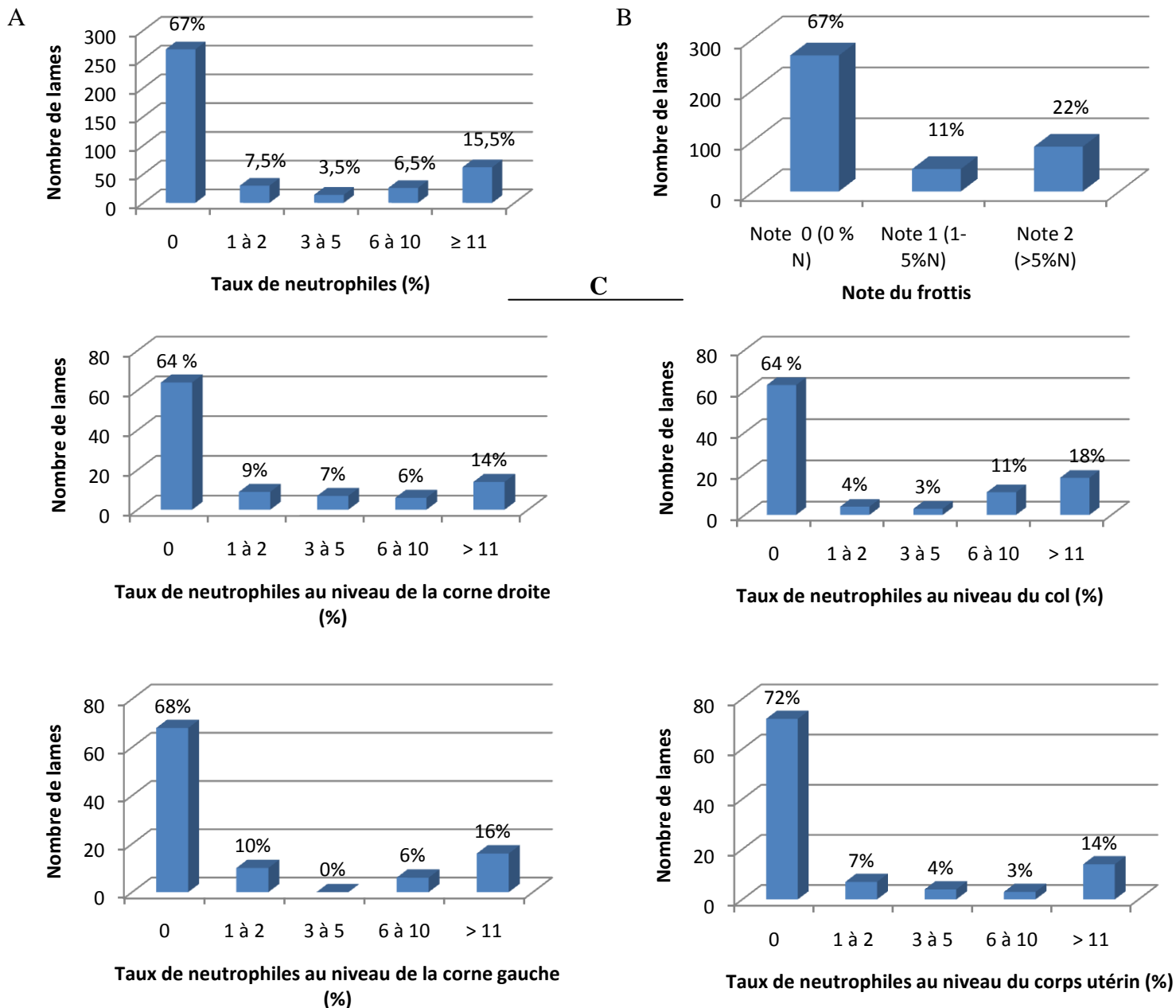


Figure 16 : Répartition des frottis en fonction du taux de neutrophiles tous sites confondus (n=399 frottis) (A), de la note d'inflammation (n=399 frottis) (B) et du site de prélèvement (n cornes, corps utérin = 100 lames ; n_{col} = 99 lames)(C)

Les chiffres indiqués au sommet des barres indiquent le pourcentage de frottis en % du nombre total de frottis pour chaque classe de taux de neutrophiles

B. Descriptions histologiques

1. Evaluation qualitative

a) L'épithélium

L'épithélium cervical comme utérin était majoritairement de type cylindrique simple à pseudo-stratifié (figure 17). Pour l'épithélium cervical, si le prélèvement était réalisé à proximité de l'ostium externe du col, alors l'épithélium pouvait être pavimenteux et stratifié (Barone, 1990).

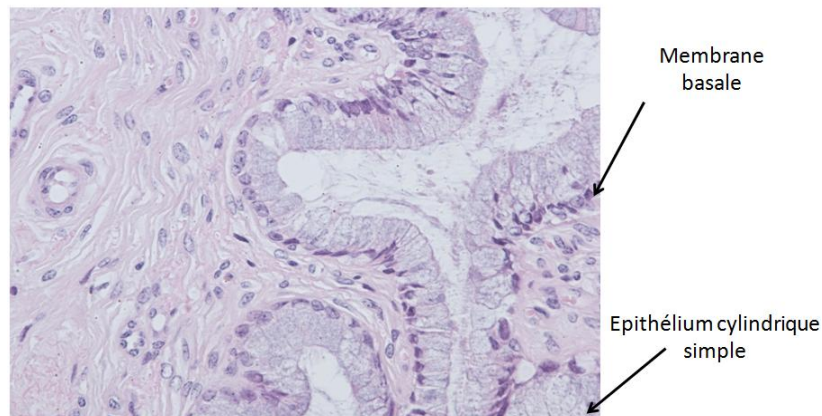


Figure 17 : Epithélium utérin de type cylindrique (HE, x400)

Il pouvait être infiltré par différents types de cellules : mononucléées (lymphocytes, plasmocytes, macrophages) et neutrophiles (figure 18). L'infiltration par les cellules mononucléées n'était jamais importante contrairement à celle des neutrophiles qui pouvait parfois envahir l'épithélium. Néanmoins, il était courant de retrouver quelques cellules mononucléées (jusqu'à cinq cellules par champ ; x400) infiltrant l'épithélium contrairement aux neutrophiles qui eux étaient soit totalement absents soit présents en grande quantité. Certains épithéliums étaient imprégnés par des pigments d'hémosidérine ou de lipofuscine, impossible à différencier.

Certaines modifications de l'épithélium pouvaient être le reflet d'un processus inflammatoire, comme sa morphologie (aplatis, cubique...) et son intégrité (absence totale, décollé de la membrane basale...). Or, il était impossible de savoir s'il s'agissait d'un artéfact de préparation des prélèvements ou réellement des signes d'inflammation. Ces éléments n'ont donc pas été pris en considération.

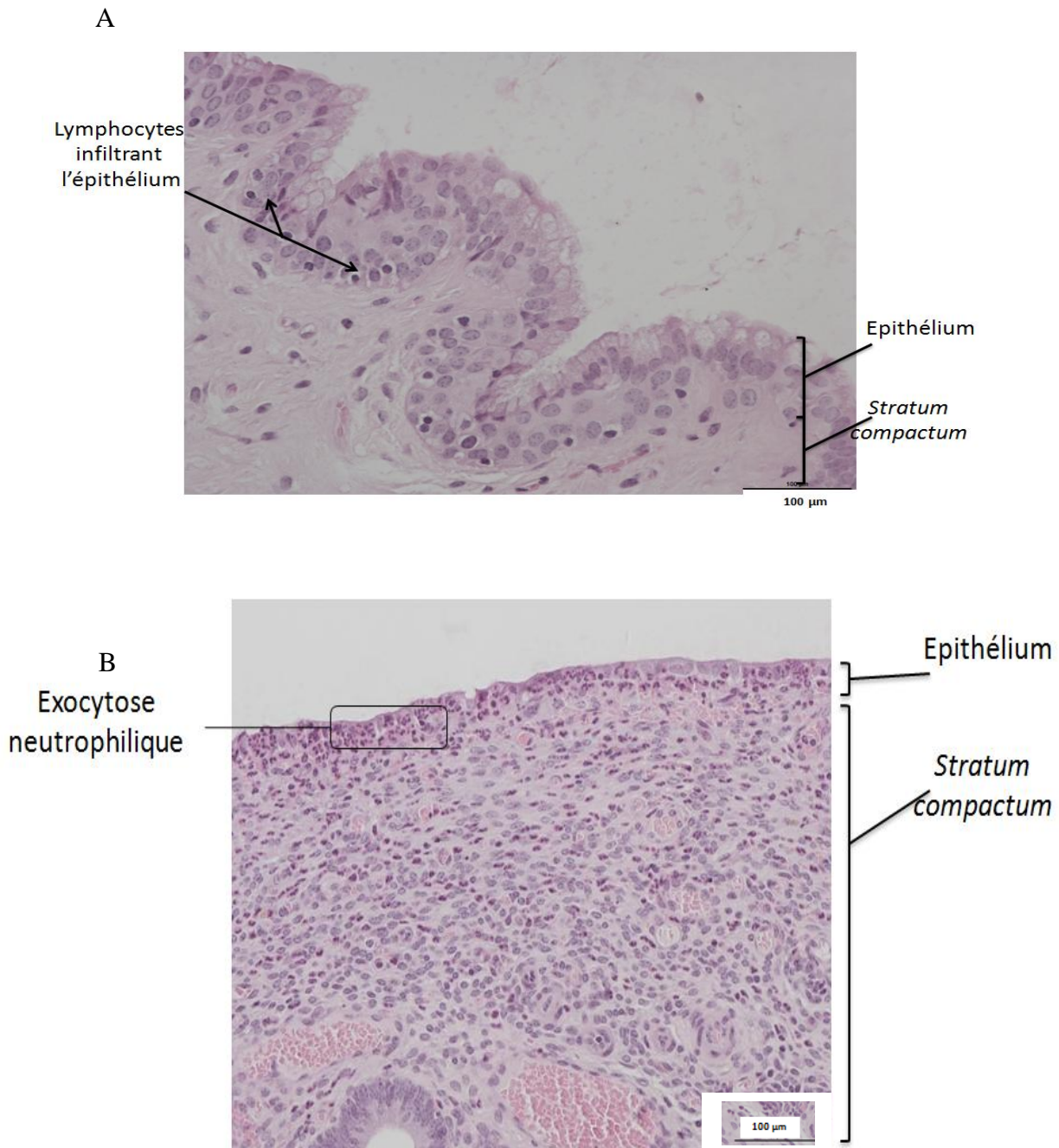


Figure 18 : Coupe histologique de col utérin (A, HE, x400) et de corne utérine (B, HE, x200)

A : Infiltration de l'épithélium par les lymphocytes

B : Infiltration de l'épithélium par les neutrophiles

b) Les couches profondes (*stratum compactum* et *stratum spongiosum*)

Le *stratum compactum* était caractérisé par un conjonctif lâche très riche en cellules (fibroblastes, macrophages, lymphocytes, éosinophiles) et plus en profondeur par un *stratum spongiosum* riche en fibres de collagène. Le stroma était infiltré par des cellules en provenance du sang (lymphocytes, granulocytes, plasmocytes). Il contenait aussi des glandes utérines, tubulaires, avec un épithélium en continuité avec celui de l'endomètre mais les cellules y étaient davantage sécrétrices (Barone, 1990).

Les cellules mononucléées (lymphocytes, macrophages, plasmocytes, mastocytes) sont toujours présentes dans l'endomètre jusqu'à un certain seuil sans pour autant être le témoin d'une quelconque inflammation. Ainsi, la quasi-totalité des coupes histologiques ont toutes révélé un nombre minimal de cellules mononucléées infiltrant l'endomètre. Il était parfois difficile d'identifier correctement ces cellules car selon la qualité de la coloration, elles pouvaient avoir une apparence similaire à celles des fibroblastes (figure 19). Ces cellules mononucléées se regroupaient de temps en temps en nodules lymphoïdes ou sous forme de travées (figure 20). Les neutrophiles sont, quant à elles, des cellules qui témoignent d'un processus inflammatoire : ils sont quasiment absents des lames, soit présents en quantité. Et de temps en temps, on pouvait apercevoir quelques éosinophiles infiltrant l'endomètre.

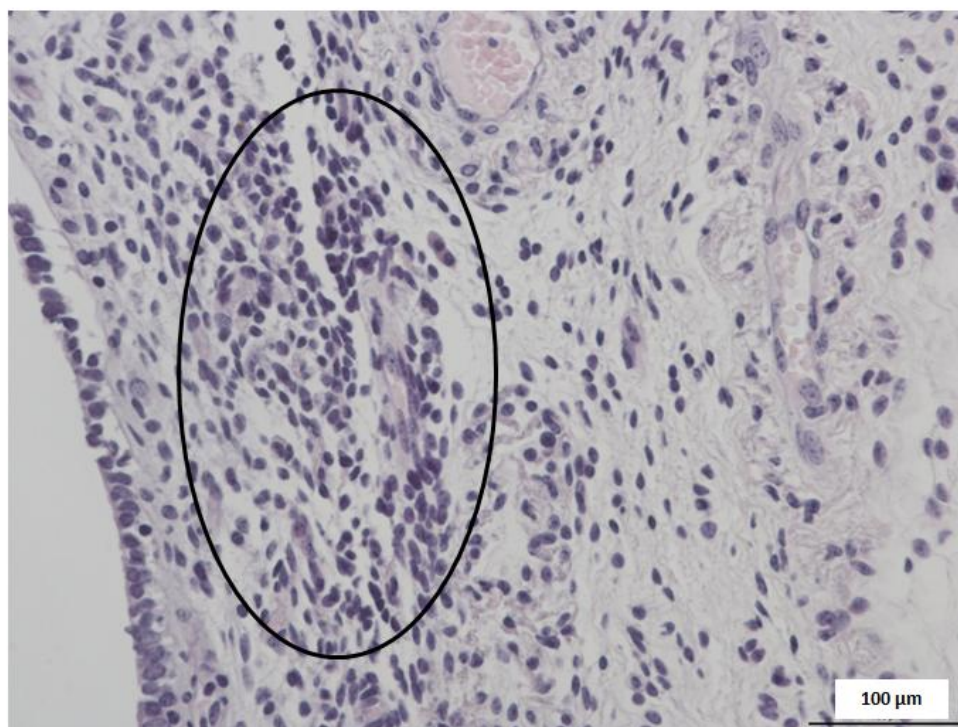


Figure 19 : Coupe histologique d'endomètre : difficulté de différencier les fibroblastes des cellules mononucléées dans la zone entourée (HE, x400)

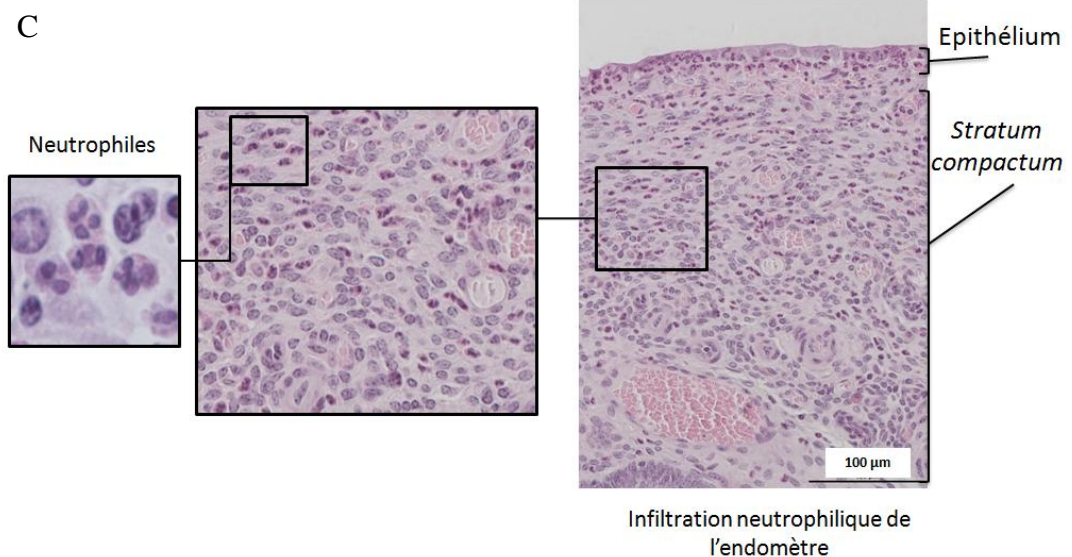
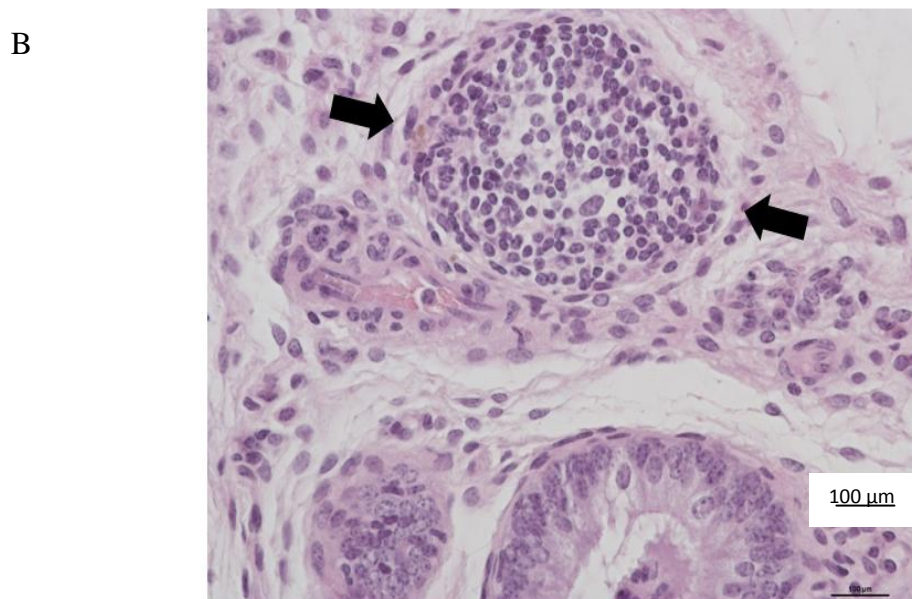
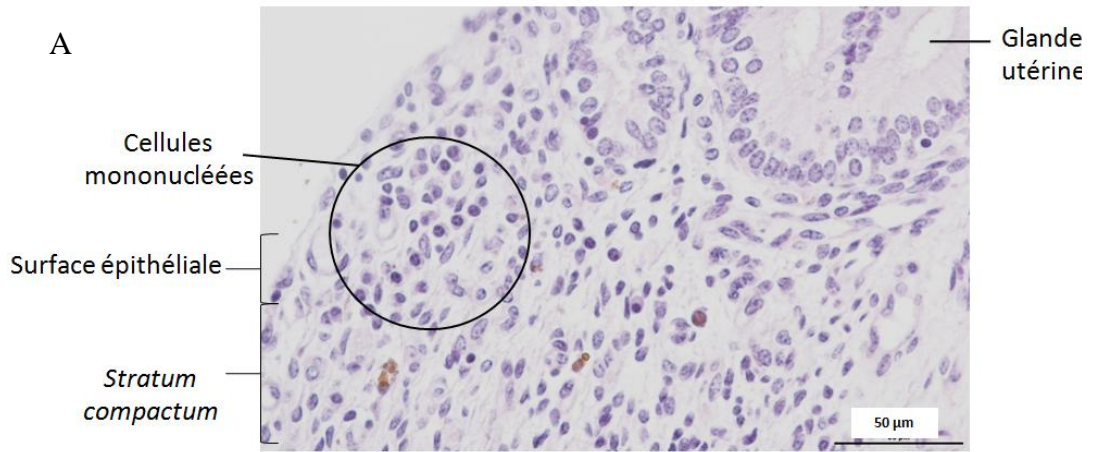


Figure 20 : Coupe histologique utérine

A : Infiltration physiologique du *stratum compactum* par les cellules mononucléées (HE, x400)

B : Nodule lymphoïde délimité par les flèches noires (HE, x400)

C : Infiltration du *stratum compactum* par les neutrophiles (HE, x200)

2. Evaluation quantitative

Parmi les 400 lames préparées pour cette étude, de nombreuses n'ont pas pu être lues ou interprétées pour plusieurs raisons : 35 lames étaient totalement dépourvues d'épithélium et 15 lames étaient illisibles (problème d'identification de lame, qualité de la coupe histologique). Donc sur les 300 lames de l'utérus (cornes et corps utérin) : seules les couches profondes étaient interprétables pour 35 d'entre elles, 14 lames n'ont pas pu être lues en raison de la mauvaise qualité de la coupe ou de la coloration, et 30 lames présentaient moins de 50 % d'épithélium lisibles (même pour certaines après la seconde découpe). Sur les 100 lames d'origine cervicale, 10 lames présentaient moins de 50 % d'épithélium intact et une seule lame était ininterprétable.

a) Histologie endométriale (utérus : cornes et corps utérin)

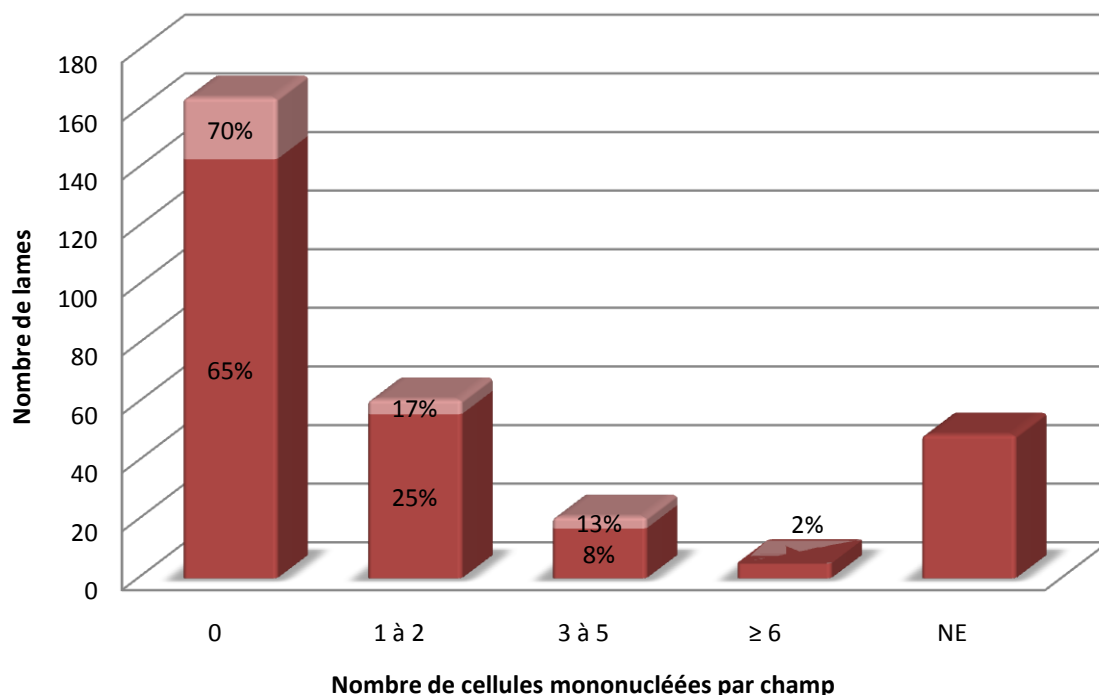
(1) Les cellules mononucléées

Sur les 100 utérus prélevés, les médianes (EIQ) du nombre de cellules mononucléées (M) étaient de 0M [0-1M], et 18M [10-25M] pour l'épithélium et les couches profondes de l'utérus respectivement (figures 21 A et B). La figure 21-A va distinguer les lames avec moins de 50% d'épithélium de celles avec plus de 50% d'épithélium afin de tenir compte du biais potentiel dans l'évaluation de l'infiltration par les cellules mononucléées de l'épithélium. Douze pourcents (30/251) des lames utérines présentent moins de 50% d'épithélium intact lisible.

Les leucocytes mononucléés étaient absents de près de 65% (164/251) des lames dans les épithéliums utérins.

Sur les 300 lames de l'utérus, on constate que 16,3% (49/300) des lames ne peuvent être lues pour quantifier le nombre de cellules mononucléées infiltrant l'épithélium luminal contre 4,6% (14/300) pour quantifier ce nombre de cellules dans les couches profondes.

A



B

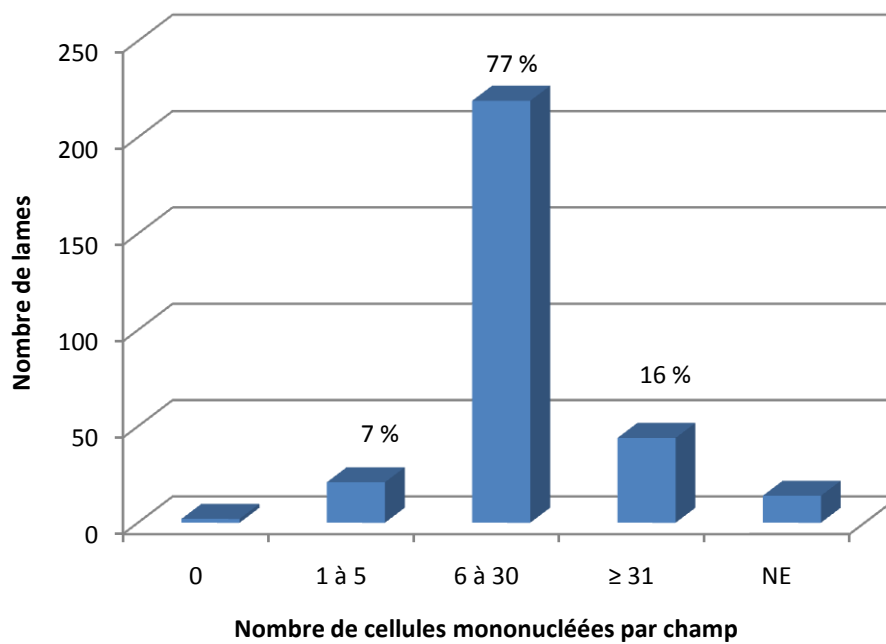


Figure 21 :

A : Infiltration par les cellules mononucléées de l'épithélium de l'endomètre utérin (grossissement 400, n=251 lames, rose clair : lames avec <50% d'épithélium intact, rouge : lames avec > 50% d'épithélium intact). Les chiffres indiqués au sommet des barres indiquent le % de lames en % du nombre total des lames évaluables pour chaque classe.

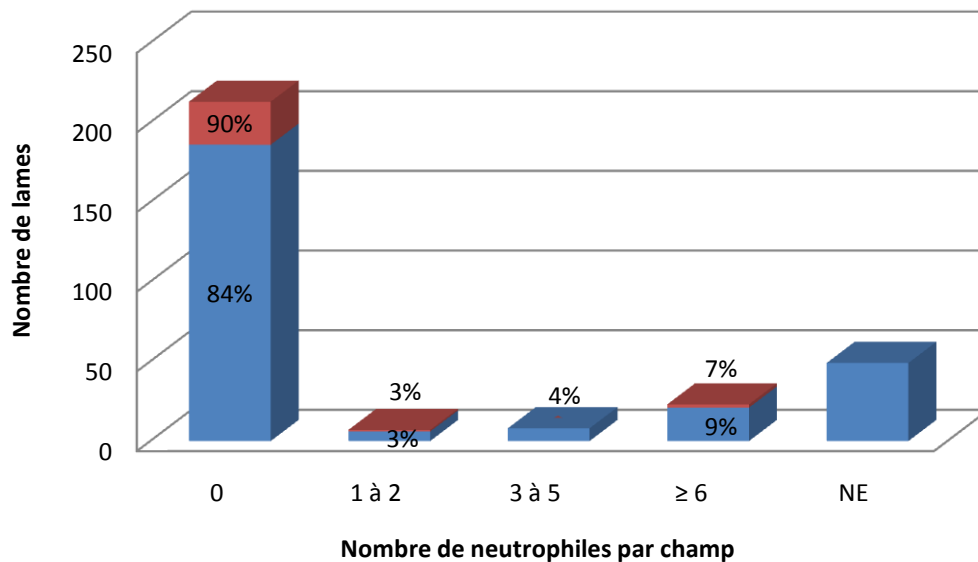
B : Infiltration par les cellules mononucléées des couches profondes de l'endomètre utérin (grossissement 400, n=286 lames). Les chiffres indiqués au sommet des barres indiquent le pourcentage de lames en % du nombre total de lames pour chaque classe. NE : lames non évaluables.

(2) Les neutrophiles

Sur les 100 utérus prélevés, les médianes (EIQ) du nombre de neutrophiles (N) étaient de 0N [0-0N], 0N [0-1N] pour l'épithélium et les couches profondes de l'utérus respectivement (figure 22).

Les leucocytes neutrophiles étaient absents de près de 85% (213/251) des lames dans les épithéliums utérins et de 75 % (214/286) des lames dans les couches profondes utérines.

A



B

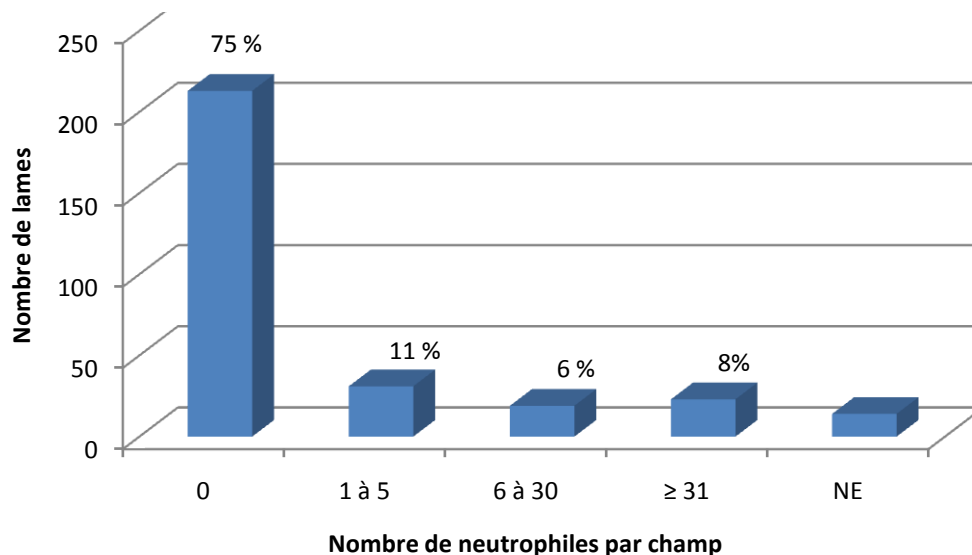


Figure 22 : Infiltration par les neutrophiles de :

A : L'épithélium luminal utérin (grossissement 400, n=251 lames, rouge : lames avec <50% d'épithélium intact, bleu : lames avec > 50% d'épithélium intact)) Les chiffres indiqués au sommet des barres indiquent le pourcentage de lames en % du nombre total des lames évaluables par classe

B : Des couches profondes de l'endomètre utérin (grossissement 400, n=286 lames) Les chiffres indiqués au sommet des barres indiquent le pourcentage de lames en % du nombre total de lames par classe.

NE : lames non évaluables.

(3) Les nodules lymphoïdes

Ils étaient absents de près de 84% (241/286) des lames provenant de l'utérus (figure 23).

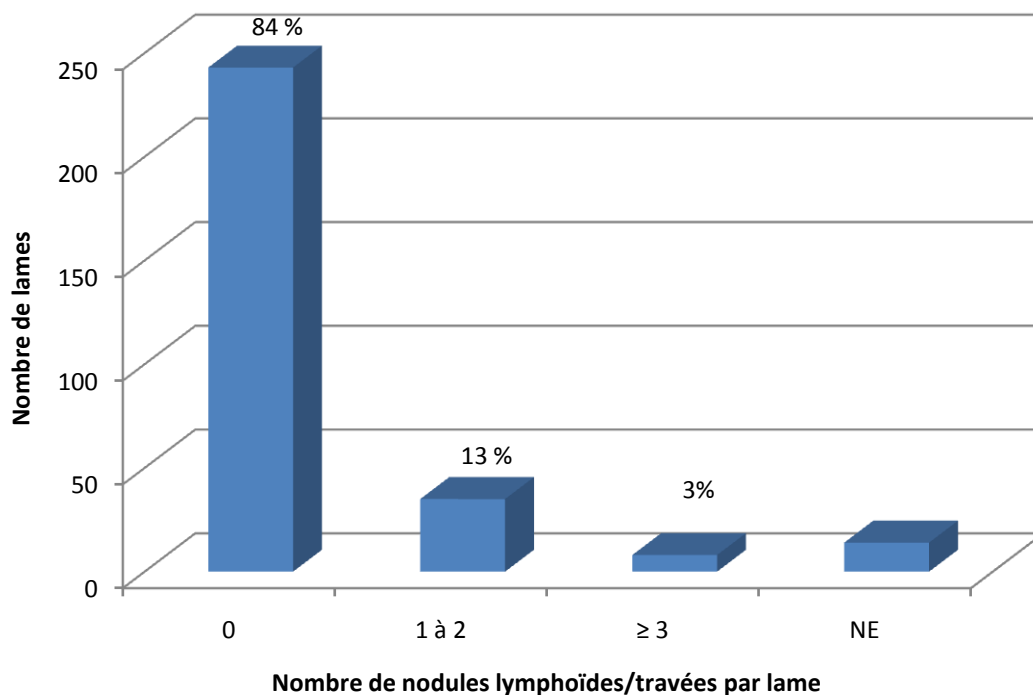


Figure 23 : Présence de nodules lymphoïdes ou de travées de cellules mononucléées dans l'endomètre utérin (n = 286 lames).

Les chiffres indiqués au sommet des barres indiquent le pourcentage de lames en % du nombre total de lames évaluables par classe.

NE : lames non évaluables.

b) Histologie cervicale

(1) Les cellules mononucléées

Sur les 100 utérus prélevés, les médianes (EIQ) du nombre de cellules mononucléées étaient de 0M [0-1M], 8M [4-11M] pour l'épithélium et les couches profondes du col respectivement (figure 24).

Les leucocytes mononucléés étaient absents de près de 65% (64/99) des lames dans les épithéliums cervicaux et de 7 % (7/99) des lames dans les couches profondes du col.

Quant aux lames présentant moins de 50% d'épithélium intact lisible, notre échantillon en était composé de 10%.

(2) Les neutrophiles

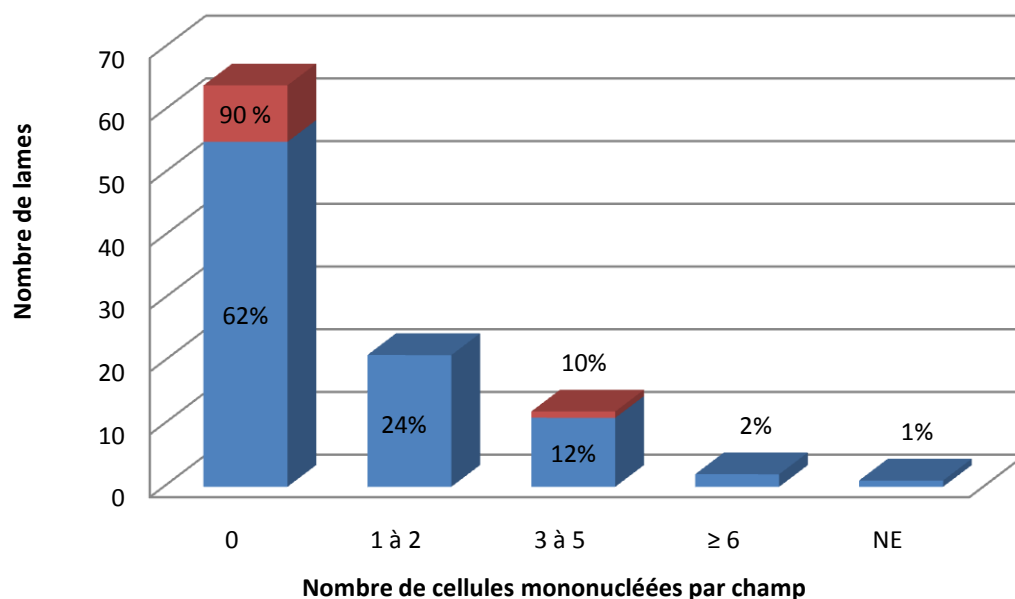
Sur les 100 utérus prélevés, les médianes (EIQ) du nombre de neutrophiles étaient de 0N [0-0,8N], 0N [0-5N] pour l'épithélium et les couches profondes du prélèvement cervical respectivement (figure 25).

Sur la totalité des lames, 2% des lames (7/350) n'ont montré aucune cellule infiltrée ni dans l'épithélium, ni dans les couches profondes.

(3) Les nodules lymphoïdes

Ils étaient absents de près de 81% (80/99) des lames provenant du col (figure 26).

A



B

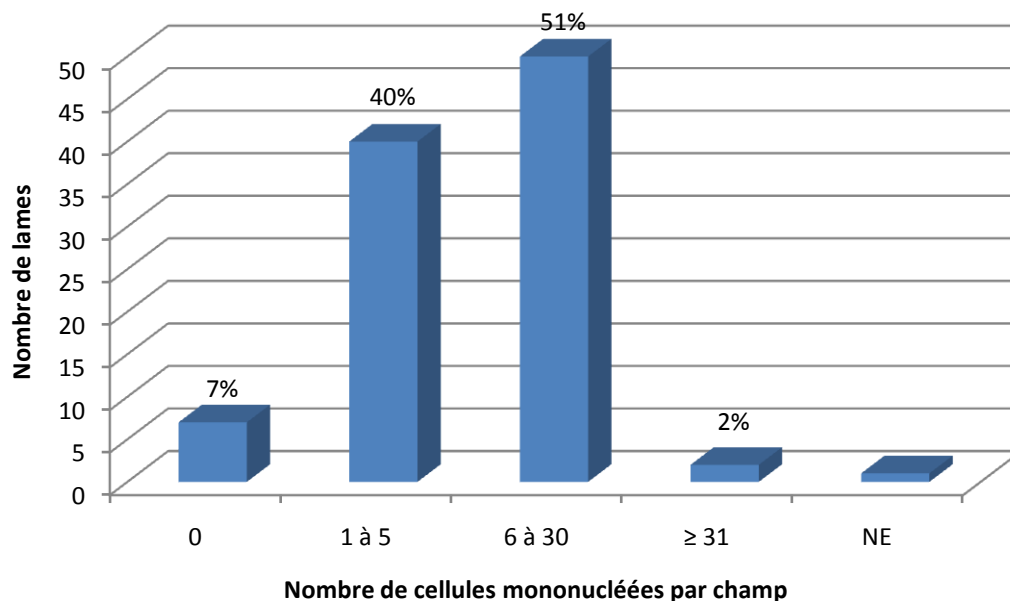


Figure 24 : Infiltration par les cellules mononucléées de :

A : L'épithélium luminal cervical (grossissement 400, n=99 lames, rouge : <50% épithélium intact, bleu : >50% épithélium intact)

Les chiffres indiqués au sommet des barres indiquent le pourcentage de lames en % du nombre total des lames pour chaque classe.

B : Des couches profondes de l'endomètre cervical (grossissement 400, n=99 lames). Les chiffres indiqués au sommet des barres indiquent le pourcentage de lames en % du nombre total de lames pour chaque classe.

NE : lames non évaluables.

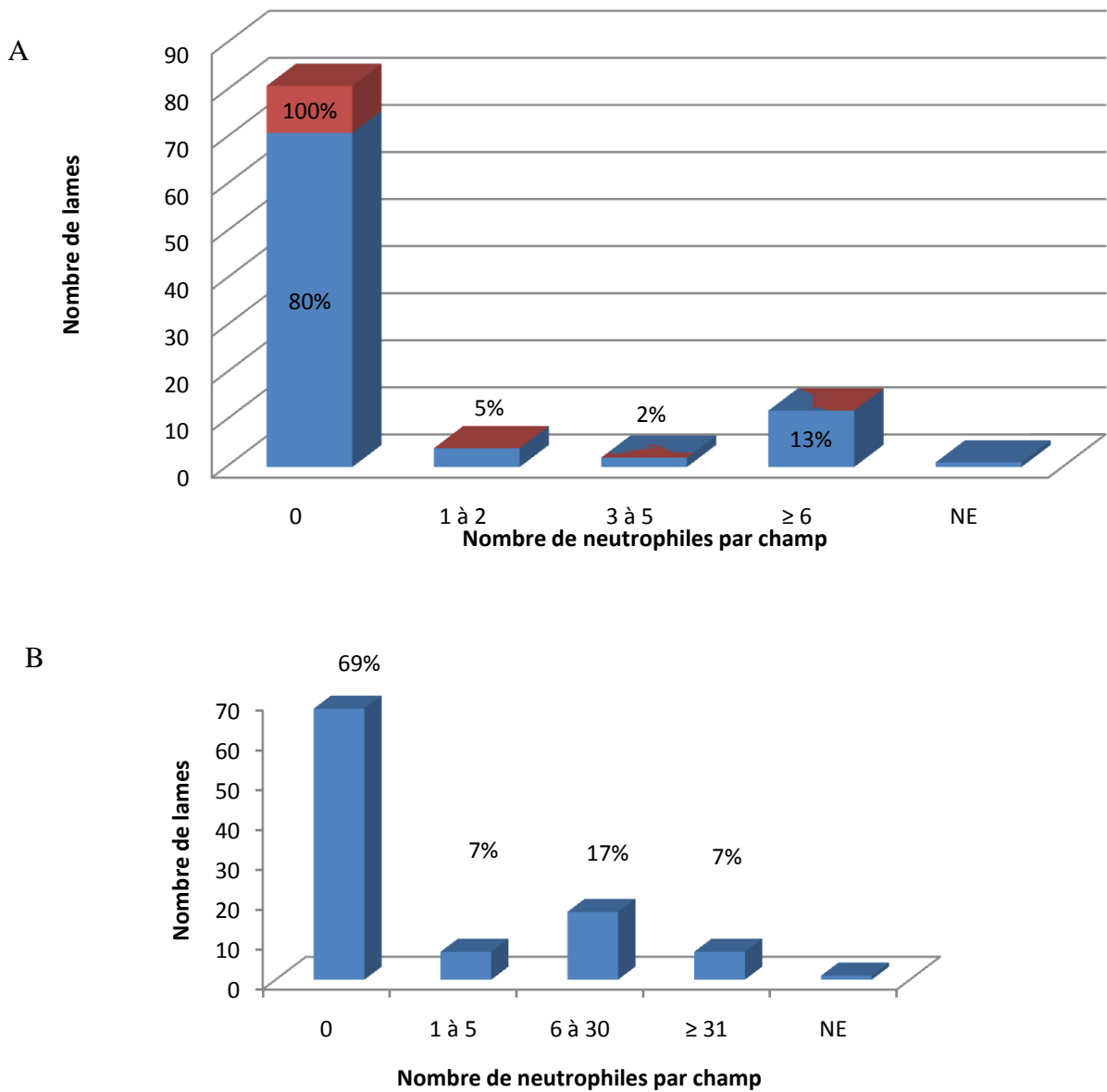


Figure 25 : Infiltration par les neutrophiles de :

A : L'épithélium cervical (grossissement 400, n=99 lames) Les chiffres indiqués au sommet des barres indiquent le pourcentage de lames en % du nombre total des lames pour chaque classe.

B : Des couches profondes de l'endomètre cervical (grossissement 400, n=99 lames). Les chiffres indiqués au sommet des barres indiquent le pourcentage de lames en % du nombre total de lames pour chaque classe.

NE : lames non évaluables.

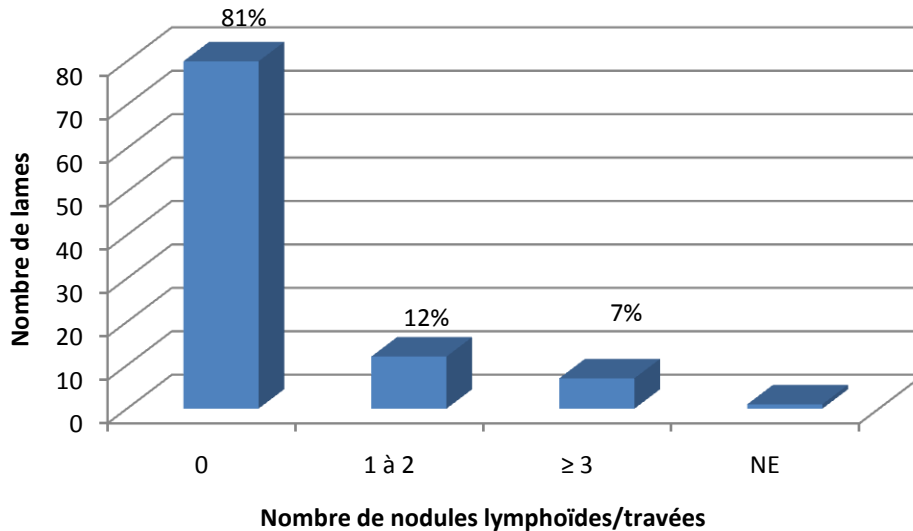


Figure 26 : Présence de nodules lymphoïdes ou de travées de cellules mononucléées dans la muqueuse cervicale (n= 99 lames).

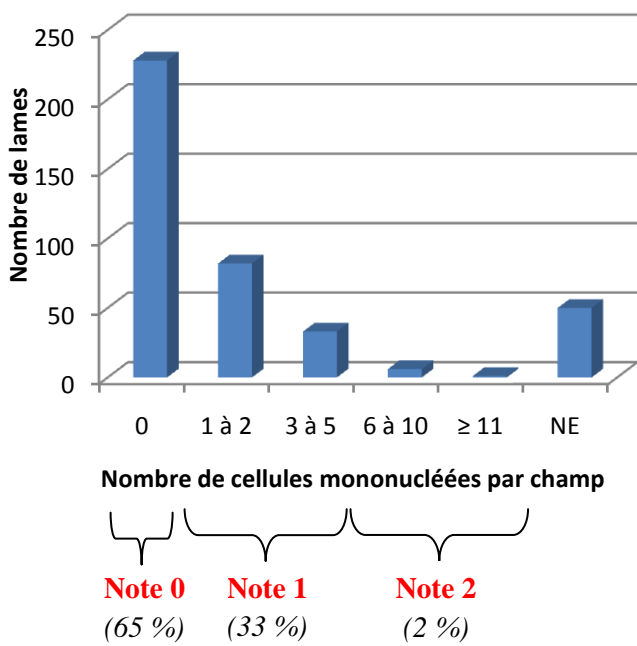
*% : pourcentage de lames examinées avec un nombre donné de nodules lymphoïdes par lame.
NE = lames non évaluables*

3. Evaluation semi-quantitative

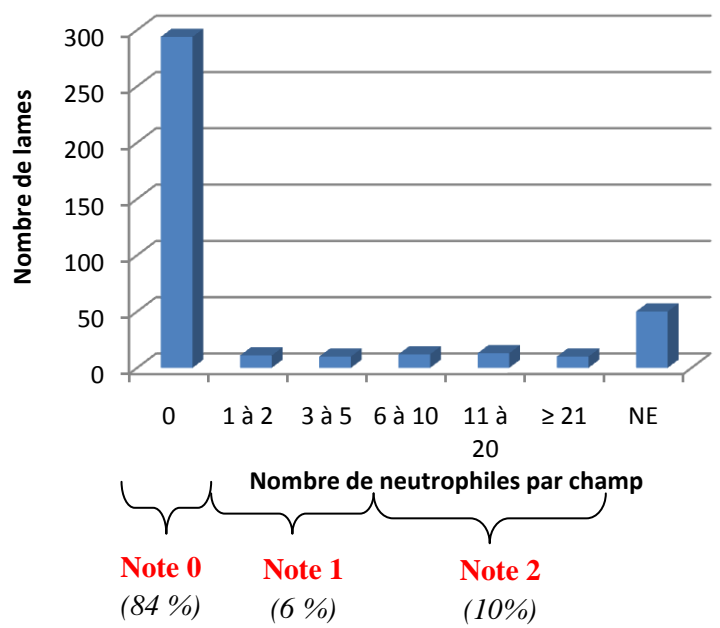
Comme précédemment pour la cytologie, il est nécessaire de codifier le statut inflammatoire en attribuant une note de l’infiltration cellulaire de l’épithélium et des couches profondes. Une étude menée en équine par Overbeck et al (2013) utilisait, comme seuil témoin d’inflammation à l’examen histologique, la présence de cinq neutrophiles par champ au grossissement 400 sur trois champs distincts.

Dans notre étude nous avons souhaité que la note soit à la fois représentative de l’état de l’épithélium et de celui des couches profondes. Pour ce faire, l’infiltration de l’épithélium a été qualifiée par une note d’inflammation dite « superficielle » et une note d’inflammation dite « profonde » a été attribuée en fonction de l’infiltration cellulaire des couches profondes et de la présence des nodules lymphoïdes. La note d’inflammation « superficielle » était la somme de la note de l’infiltration de l’épithélium par les cellules mononucléées et de la note qualifiant l’infiltration par les neutrophiles. Les bornes et la distribution pour chaque note sont indiquées sur la figure 27-A et 27-B. Quant à la note d’inflammation « profonde », elle est obtenue en additionnant la note la plus élevée entre la note d’infiltration par les cellules mononucléées et celle des nodules lymphoïdes, à celle de la note d’infiltration des couches profondes par les neutrophiles (figure 27 C-E). Enfin, la note finale d’une lame donnée était la somme des notes « superficielles » et « profondes » de cette même lame. Cette note pouvait être comprise entre zéro et huit (figure 28).

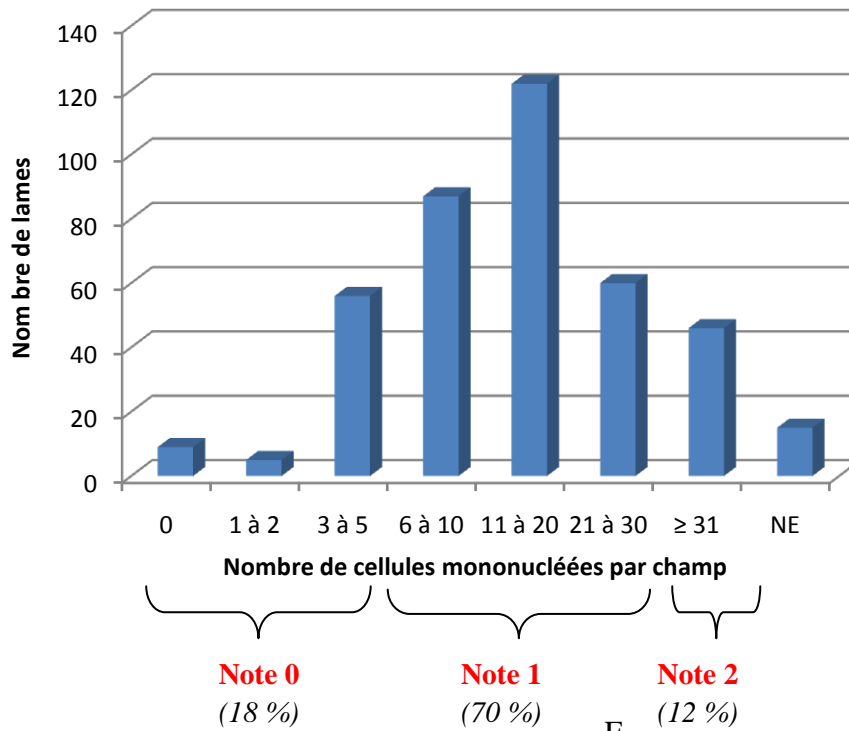
A



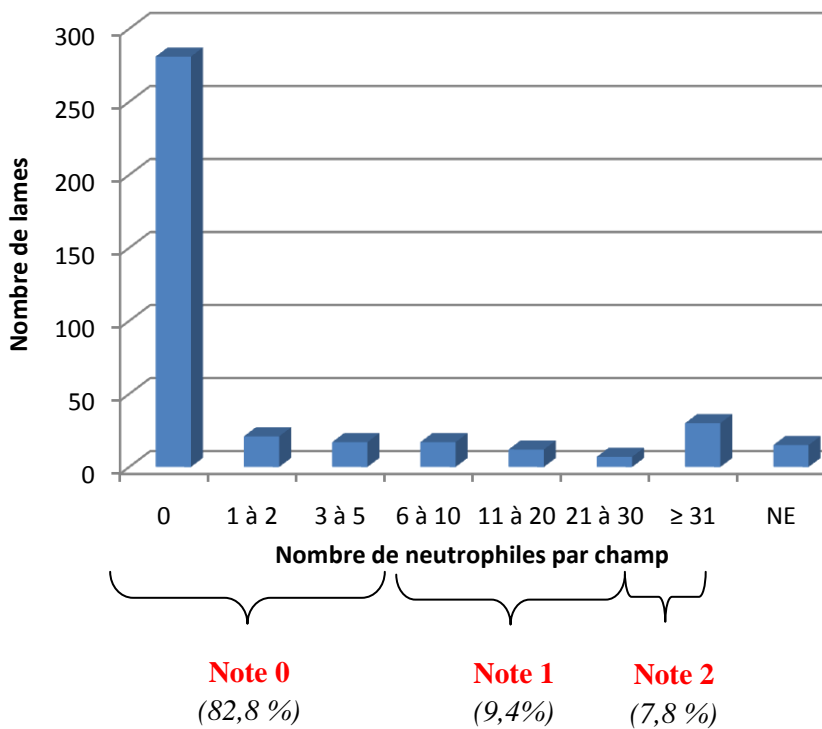
B



C



D



E

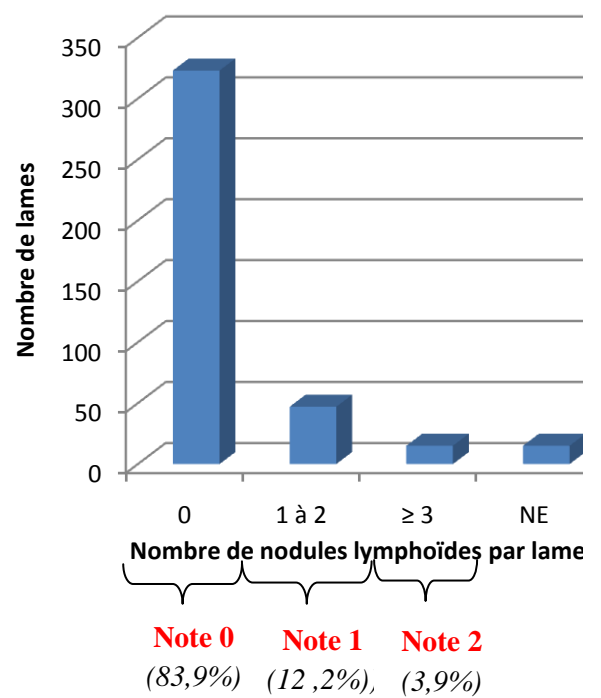


Figure 27 : Attribution des notes semi-quantitatives de l'infiltration cellulaire de l'épithélium et des couches profondes (% : pourcentage de lames concernées par la note) :

A : Cellules mononucléées infiltrant l'épithélium luminal (n = 360 lames lisibles) (note « cellules mononucléées ») ; B : Neutrophiles infiltrant l'épithélium luminal (n = 360 lames lisibles) (note « neutrophiles ») ; C : Cellules mononucléées infiltrant les couches profondes (n = 385 lames lisibles) ; D : Neutrophiles infiltrant les couches profondes (n = 385 lames lisibles) ; E : Nodules lymphoïdes (n = 385 lames lisibles) ; NE = lames non évaluables

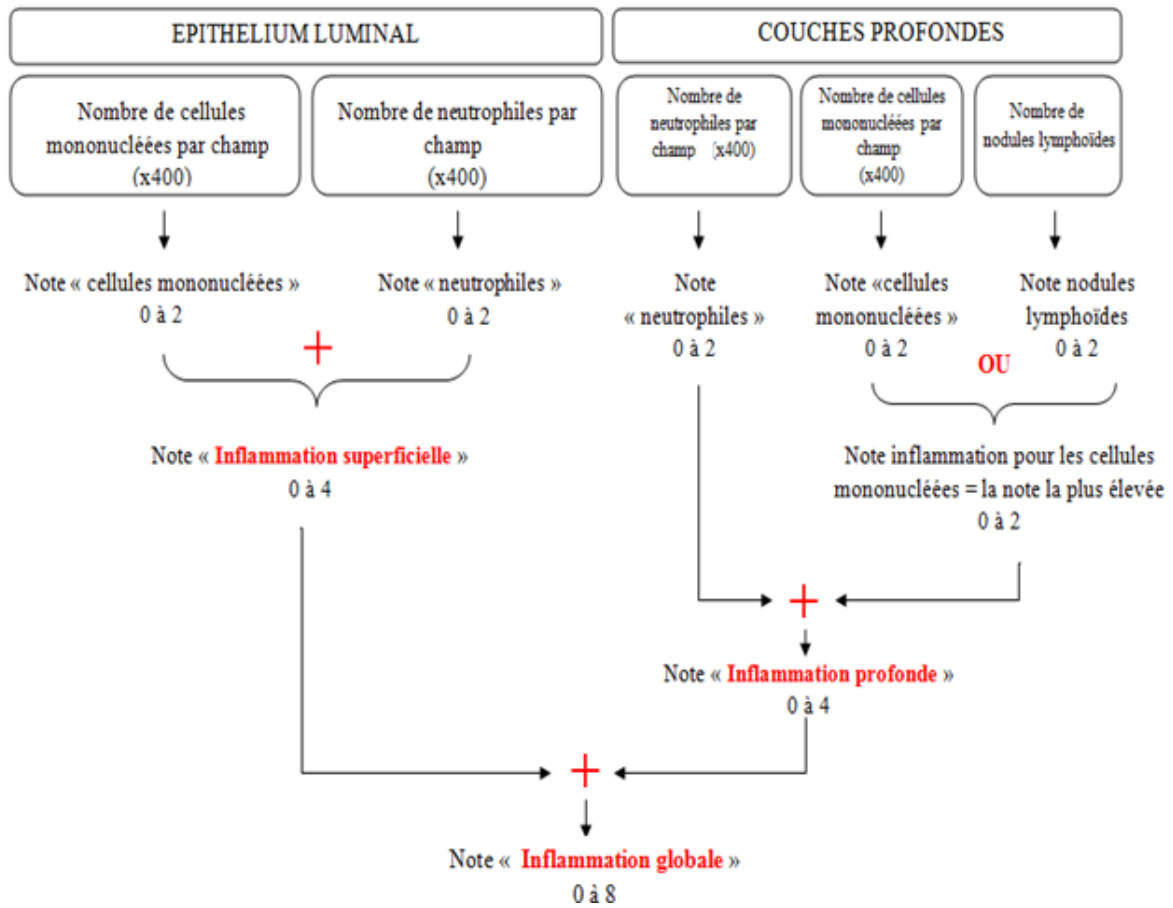


Figure 28 : Mode de calcul des notes d'inflammation

4. La sélection des lames histologiques lisibles

Afin d'avoir un échantillon de lames histologiques le plus correct possible, c'est-à-dire avec un maximum de lames avec un endomètre de qualité (épithélium et couches profondes lisibles) pour l'interprétation des résultats concernant l'homogénéité de l'inflammation et la corrélation entre les données histologiques et cytologiques, 15% des lames (60/400 lames) ont été exclues soit 15% des vaches (15/100).

Les critères de sélection de cet échantillonnage ont été de :

- conserver un maximum de vaches avec des frottis cytologiques positifs
- conserver un maximum de vaches avec 4 lames histologiques lisibles.

C. Variabilité intra-opérateur

Le calcul de la variabilité intra-opérateur a été réalisé après double lecture de 400 lames (100 lames endocervicales et 300 lames endométriales) par un même individu. La concordance du diagnostic par le même opérateur a été évaluée par le calcul du coefficient kappa. L'évaluation de la concordance a été réalisée sur les notes histologiques attribuées d'une part à l'épithélium, d'autre part aux couches profondes et puis à la lame dans son ensemble.

Les coefficients kappa obtenus ont confirmé la bonne à très bonne répétabilité de lecture ($\kappa=0,68$ à $0,91$; tableau 11).

	Notes de l'épithélium	Notes de la couche profonde	Notes de la lame
Col	0,80 [0,67 ; 0,94] p<0,0001	0,85 [0,77 ; 0,92] p<0,0001	0,84 [0,76 ; 0,92] p<0,0001
Corne droite	0,82 [0,72 ; 0,92] p<0,0001	0,88 [0,82 ; 0,95] p<0,0001	0,91 [0,86 ; 0,95] p<0,0001
Corne gauche	0,68 [0,54 ; 0,82] p<0,0001	0,88 [0,82 ; 0,94] p<0,0001	0,88 [0,82 ; 0,93] p<0,0001
Corps utérin	0,82 [0,71 ; 0,92] p<0,0001	0,87 [0,80 ; 0,93] p<0,0001	0,88 [0,83 ; 0,96] p<0,0001
Tous les secteurs	0,79 [0,72 ; 0,85] p<0,0001	0,86 [0,83 ; 0,90] p<0,0001	0,88 [0,85 ; 0,91] p<0,0001

Tableau 11 : Variabilité intra-opérateur en fonction du compartiment génital et du secteur histologique (calcul du Kappa de Cohen sur 400 lames).

D. Homogénéité de l'inflammation : cytologie et histologie

1. Homogénéité intra-murale (histologie)

a) Avec les notes d'histologie

Les associations entre les variables discontinues (notes allant de 0 à 4) ont été analysées à l'aide du Kappa de Cohen. Il a été utilisé pour tester la concordance de la note de l'épithélium et de la couche profonde d'un même compartiment génital (tableau 12). Au niveau utérin (corps utérin et cornes), l'histologie de l'épithélium est moyennement corrélée à celle de l'histologie des couches profondes ($\kappa=0,52-0,54$). Au niveau du col, ces notes ne sont que légèrement corrélées ($\kappa=0,40$).

	Notes histologiques (0,1,2,3,4)
Tous les secteurs n = 318 lames	0,49 [0,41 ; 0,57] p<0,0001
Col n = 85 lames	0,40 [0,23 ; 0,57] p<0,0001
Corps utérin n = 74 lames	0,54 [0,39 ; 0,69] p<0,0001
2 cornes n = 159 lames	0,52 [0,42 ; 0,62] p<0,0001

Tableau 12 : Concordance entre la note de l'épithélium et de la couche profonde en fonction du compartiment génital (calcul du kappa de Cohen)

Les notes ont été fixées comme décrit figure 28.

b) Après regroupement en classes

Afin d'apprécier la qualité des seuils fixés par les notes histologiques (0,1,2,3,4 ; figure 28), les kappa ont été calculés en regroupant certaines de ces notes (tableau 13). La valeur du Kappa est augmentée lorsqu'on réunit les notes histologiques 0 et 1. Ainsi au niveau utérin (corps utérin et cornes), l'histologie de l'épithélium est à présent fortement corrélée à celle de l'histologie des couches profondes ($\kappa=0,67-0,74$). Au niveau du col, ces notes sont ici moyennement corrélées ($\kappa=0,42-0,47$). Autrement dit, les notes histologiques 0 et 1 précédemment fixées pourraient être réunies en une même et seule note (nouvelle note 0).

	Notes 0-1,2,3,4 => notes 0,1,2,3	Notes 0-1,2,3-4 => notes 0,1,2	Notes 0-1,2-4 => notes 0,1
Tous les secteurs n = 318 lames	0,57 [0,47 ; 0,67] p<0,0001	0,58 [0,48 ; 0,68] p<0,0001	0,58 [0,47 ; 0,69] p<0,0001
Col n = 85 lames	0,42 [0,23 ; 0,61] p<0,0001	0,47 [0,30 ; 0,67] p<0,0001	0,54 [0,33 ; 0,74] p<0,0001
Corps utérin n = 74 lames	0,68 [0,49 ; 0,87] p<0,0001	0,67 [0,45 ; 0,88] p<0,0001	0,57 [0,34 ; 0,80] p<0,0001
2 Cornes n = 159 lames	0,74 [0,66 ; 0,83] p<0,0001	0,68 [0,56 ; 0,81] p<0,0001	0,72 [0,57 ; 0,86] p<0,0001

Tableau 13 : Concordance entre la note de l'épithélium et de la couche profonde en fonction du compartiment génital (calcul du kappa de Cohen)

Soit 0-1 = regroupe les notes 0 et 1 (II.D.1.A) en la nouvelle note 0

c) Collinéarité

Une autre façon d'appréhender la corrélation entre l'épithélium et sa couche profonde est le coefficient rho de Spearman (tableau 14).

Y	X	r	r ²	t	Pr(> t)
Note épithélium	Note couche profonde	0,5972	0,3567	5,9103	0,0000

Tableau 14 : Résultat du test de Spearman rho testant l'intensité de la relation entre la variable ordinaire « note histologique de l'épithélium » et la variable ordinaire « note histologique de la couche profonde ».

Ces résultats vont dans le même sens que les précédents, la note histologique de l'épithélium et celle de la couche profonde sont bien corrélées.

2. Homogénéité de l'inflammation entre les différents compartiments génitaux

Nous avons étudié quatre sites de prélèvement, pour voir si l'inflammation était homogène dans tous les secteurs de l'appareil génital (col, corne droite, corne gauche, corps utérin).

a) Evaluation qualitative par l'histologie

(1) Au niveau de l'épithélium

Pour tester la reproductibilité de la note de l'épithélium entre deux compartiments génitaux, le kappa a été utilisé (tableau 15). Au niveau utérin (corps utérin et cornes), les notes histologiques données à l'épithélium des cornes et au corps utérin sont fortement corrélées entre elles ($\kappa=0,64-0,73$). Alors qu'entre le secteur utérin et le col, ces notes ne sont que légèrement corrélées entre elles ($\kappa=0,25-0,34$). Autrement dit, avec la note de l'épithélium, la distinction entre l'inflammation utérine et l'inflammation cervicale apparaît.

	Col	Corne droite	Corne gauche	Corps utérin
Col n = 85 lames	1	0,34 [0,09 ; 0,58] p<0,003	0,25 [0,02 ; 0,49] p<0,0001	0,33 [0,07 ; 0,58] p<0,005
Corne droite n = 80 lames		1	0,64 [0,49 ; 0,79] p<0,0001	0,73 [0,61 ; 0,84] p<0,0001
Corne gauche n = 79 lames			1	0,70 [0,57 ; 0,83] p<0,0001
Corps utérin n = 74 lames				1

Tableau 15 : Concordance de la note histologique de l'épithélium entre deux compartiments génitaux pour une même vache (calcul du kappa de Cohen)

(2) Au niveau des couches profondes

La même démarche a été appliquée à la couche profonde (tableau 16). Au niveau utérin (corps utérin et les cornes), l'histologie des couches profondes des cornes et du corps utérin sont fortement à très fortement corrélées entre elles ($\kappa=0,72-0,85$). Alors qu'entre le secteur utérin et le col, ces notes ne sont que légèrement à moyennement corrélées entre elles ($\kappa=0,36-0,42$). Autrement dit, avec la note de la couche profonde, la distinction entre l'inflammation utérine et l'inflammation cervicale apparaît aussi.

	Col	Corne droite	Corne gauche	Corps utérin
Col n = 85 lames	1	0,36 [0,20 ; 0,52] p<0,0001	0,40 [0,24 ; 0,55] p<0,0001	0,42 [0,21 ; 0,59] p<0,0001
Corne droite n = 85 lames		1	0,72 [0,57 ; 0,86] p<0,0001	0,85 [0,78 ; 0,92] p<0,0001
Corne gauche n = 83 lames			1	0,74 [0,59 ; 0,89] p<0,0001
Corps utérin n = 81 lames				1

Tableau 16 : Concordance de la note histologique de la couche profonde entre deux compartiments génitaux pour une même vache (calcul du kappa de Cohen)

(3) Au niveau de la biopsie entière

En ce qui concerne la note globale de la lame histologique (tableau 17), l'histologie de la lame dans sa globalité des cornes et du corps utérin sont fortement à très fortement corrélées entre elles ($\kappa=0,75-0,87$). Alors qu'entre le secteur utérin et le col, ces notes ne sont que légèrement à moyennement corrélées entre elles ($\kappa=0,36-0,44$). La note de la lame histologique met également en évidence la distinction entre l'inflammation utérine et l'inflammation cervicale.

	Col	Corne droite	Corne gauche	Corps utérin
Col n = 85 lames	1	0,37 [0,14 ; 0,60] p<0,001	0,36 [0,16 ; 0,55] p<0,002	0,44 [0,23 ; 0,64] p<0,0001
Corne droite n = 80 lames		1	0,75 [0,62 ; 0,88] p<0,0001	0,87 [0,80 ; 0,95] p<0,0001
Corne gauche n = 79 lames			1	0,76 [0,62 ; 0,90] p<0,0001
Corps utérin n = 74 lames				1

Tableau 17 : Concordance de la note globale de la lame histologique entre deux compartiments génitaux pour une même vache (calcul du kappa de Cohen)

b) Evaluation qualitative par la cytologie

Après avoir attribué des notes cytologiques à chaque frottis, le kappa a été calculé pour évaluer la concordance des notes cytologiques entre deux compartiments génitaux (tableau 18). Au niveau utérin (corps utérin et les cornes), la cytologie des cornes et du corps utérin sont fortement corrélées entre elles ($\kappa=0,63-0,75$). Alors qu'entre le secteur utérin et le col, ces notes ne sont que légèrement corrélées ($\kappa= 0,28-0,37$).

L'histologie comme la cytologie montrent cette distinction entre le secteur utérin (cornes et corps utérin) et le col en termes de statut inflammatoire.

	Col	Corne droite	Corne gauche	Corps utérin
Col n = 84 lames	1	0,37 [0 ,17 ; 0,58] p<0,0005	0,28 [0 ,07 ; 0,48] p<0,01	0,29 [0 ,08 ; 0,49] p<0,005
Corne droite n = 84 lames		1	0,75 [0 ,62 ; 0,88] p<0,0001	0,63 [0 ,45 ; 0,80] p<0,0001
Corne gauche n = 84 lames			1	0,70 [0 ,54 ; 0,86] p<0,0001
Corps utérin n = 84 lames				1

Tableau 18 : Concordance de la note de cytologie entre deux compartiments génitaux pour une même vache (calcul du kappa de Cohen)

c) Approche pratique avec la cytologie : la relation entre le site d'écouvillonnage et les secteurs génitaux adjacents

Sur le terrain, le prélèvement pour examen cytologique est réalisé au niveau du corps utérin. Nous avons cherché à évaluer la corrélation entre le statut inflammatoire du corps utérin et celui des autres secteurs selon que le corps était non inflammatoire au sens cytologique (note cytologique_{corps utérin} = 0 ; 0%N) ou inflammatoire (note cytologique_{corps utérin} = 2 ; >5%N) (figure 29 et 30).

(1) Note cytologique_{corps utérin} = 0

Dans cette étude, 58 vaches ont un corps utérin avec une note cytologique de 0. Lorsque le corps utérin est non inflammatoire, le col était dans 67,2% (39/58) des cas non inflammatoire et dans 22,4% (13/58) inflammatoire. Par contre, lorsque le corps utérin est sain, une corne ou les 2 sont saines dans 88% (51/58) des cas, contre 8,6% (5/58) inflammatoire (figure 29).

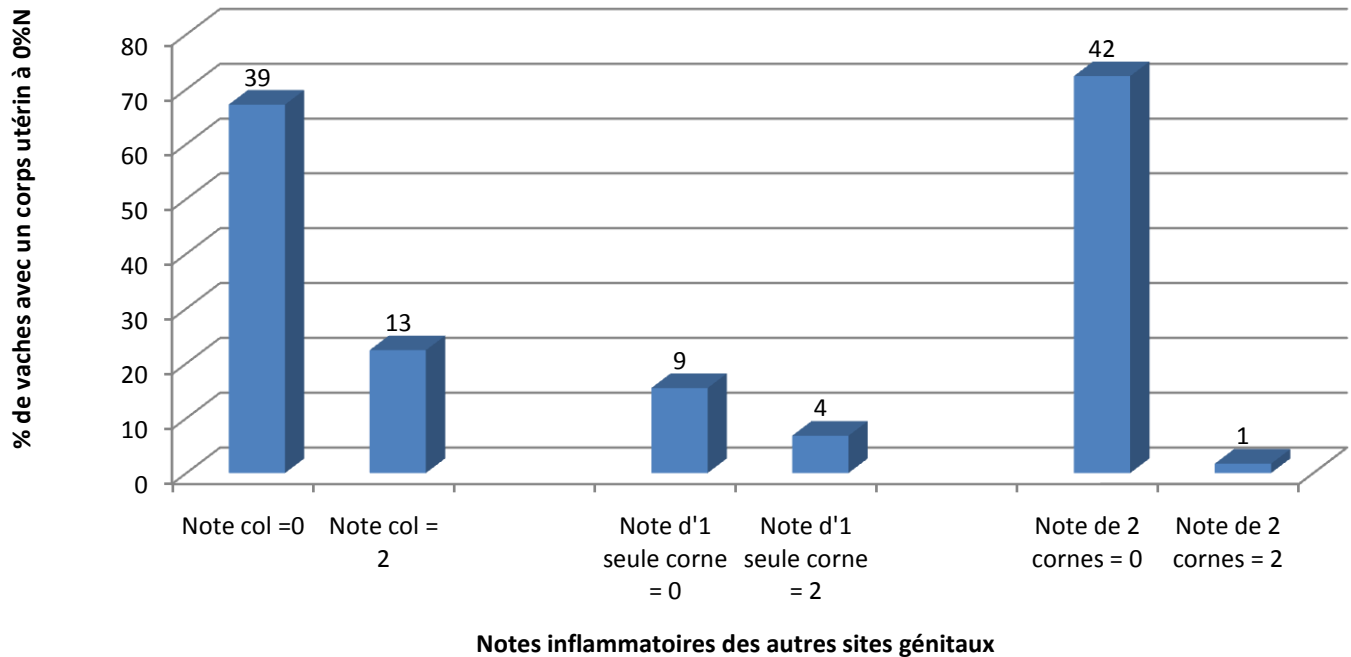


Figure 29 : Effectif et % de vaches avec un corps utérin non inflammatoire et un autre secteur génital soit non inflammatoire, soit inflammatoire (n = 58 vaches)
Chiffre = nombre de vaches concernées

(2) **Note cytologique_{corps utérin} = 2**

Dans cette étude, 15 vaches ont un corps utérin avec une note cytologique de 2. Lorsque le corps utérin est inflammatoire, le col peut être dans 60% (9/15) des cas inflammatoire et dans 33,3% (5/15) non inflammatoire. Par contre, lorsque le corps utérin est inflammé, une corne ou les 2 sont saines dans 20% (3/15) des cas, contre 86,6% (13/15) inflammatoire (figure 30). Ces résultats vont dans le même sens que précédemment, c'est-à-dire qu'au niveau statut inflammatoire le corps utérin est similaire à celui des cornes utérines et indépendant de celui du col.

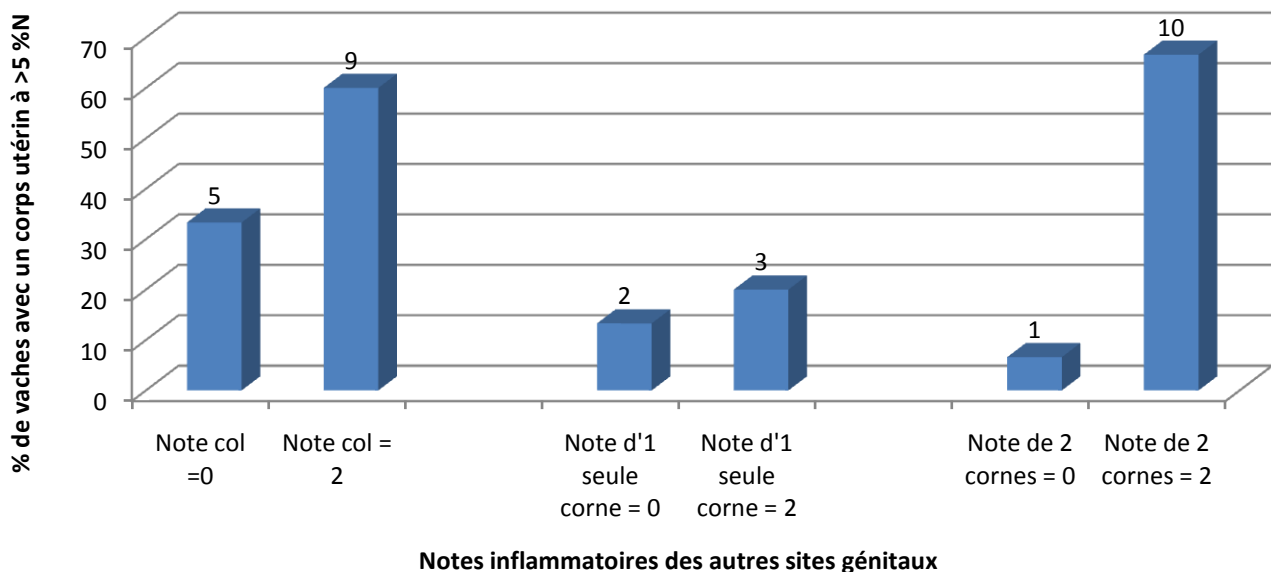


Figure 30 : Effectif et % de vaches avec un corps utérin inflammatoire et un autre secteur génital soit non inflammatoire, soit inflammatoire (n = 15 vaches). *Chiffre = nombre de vaches concernées*

d) Approche pratique avec l'histologie : la relation entre le site de biopsie potentiel et les secteurs génitaux adjacents

Nous avons cherché à évaluer la corrélation entre le statut inflammatoire du col (site de biopsie potentiel) et celui des autres secteurs selon que le col était non inflammatoire au sens histologique (note histologique_{col} = 0 ; 0%N) ou inflammatoire (note histologique_{col} = 3) (figure 31 et 32). Pour l'histologie, on ne dispose pas de seuil pathologique. Pour cela, il faudrait qu'une étude mette en relation les résultats d'une biopsie et les performances de reproduction ultérieures. Mais inversement, il est possible de définir ce qu'est une lame non pathologique (au sens de non inflammatoire) lorsqu'aucun signe n'a été mis en évidence et donc que la note d'histologie est égale à zéro. En effet, les prélèvements cervicaux pourraient être réalisés en pratique sous prétexte que le cathétérisme cervical ne serait pas nécessaire.

(1) Note histologique_{col} = 0

L'intérêt de la figure 31 est d'apprécier le statut inflammatoire des secteurs génitaux adjacents au col lorsque celui-ci est non-inflammatoire avec une note d'histologie de zéro pour l'épithélium, pour la couche profonde ou la lame dans son ensemble du col.

Au sens histologique, une note épithéliale nulle pour le col est associée, pour la majorité des lames (63% des lames soit 91/144), avec des notes histologiques nulles pour les autres secteurs utérins (figure 31-A). Quand ce n'est pas le cas, une note histologique plus élevée pour les autres secteurs génitaux n'est pas préférentiel à un secteur donné (figure 31-B).

Une note histologique nulle pour les couches profondes du col est associée, pour la majorité des lames (90% des lames soit 91/101), avec des notes histologiques de 0 à 1 pour les autres secteurs utérins (figure 31-C). Mais, comme le démontre ultérieurement la figure 35, une note d'histologie (couches profondes) qui a du sens d'un point de vue statistique est le regroupement des notes actuelles de 0 et 1. Par ailleurs, une note histologique plus élevée pour les autres secteurs génitaux n'est pas préférentiel à un secteur donné (figure 31-D).

Les résultats de la lame dans son ensemble sont les mêmes que ci-dessus. On retrouve les mêmes tendances et notamment pour le regroupement en une note histologique des notes histologiques de 0 à 3. Avec un tel regroupement des notes, une note nulle pour la lame du col dans son ensemble est associée, pour la majorité des lames (96% des lames soit 72/75), avec des notes histologiques de 0 pour les autres secteurs utérins (figure 31-E).

Lorsqu'un col est sain avec la note histologique de l'épithélium, 52% (22/42) des appareils génitaux ont un corps et les 2 cornes saines (note histologique des épithéliums), avec un col sain, en considérant la note de la couche profonde nous avons 6% (2/33) des appareils génitaux qui sont sains et 4% (1/24) en considérant les notes des lames dans leur globalité.

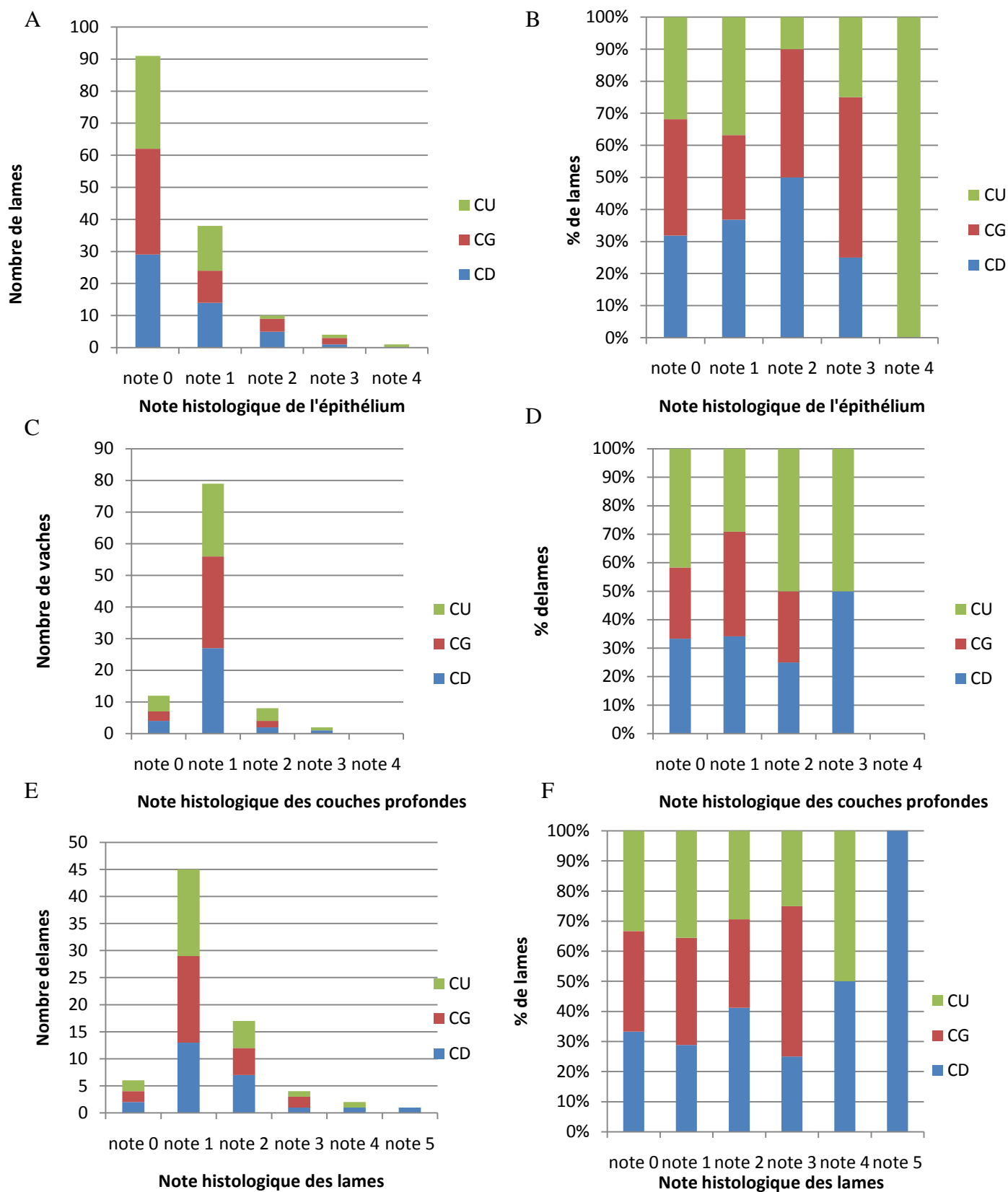


Figure 31 : Etat inflammatoire histologique des différents secteurs lorsque le col est non inflammatoire (note histologique_{épithélium} (A, B), couche profonde (C, D), lame (E, F)= 0)

A : Notes histologiques de l'épithélium des cornes utérines et du corps utérin ($n_{CD} = 49$ lames, $n_{CG} = 49$ lames, $n_{CU} = 46$ lames, soit 51 vaches)

B : Proportions de secteur concerné par la note histologique des épithéliums

C : Notes histologiques des couches profondes des cornes utérines et du corps utérin ($n_{CD} = 34$ lames, $n_{CG} = 34$ lames, $n_{CU} = 33$ lames soit 34 vaches)

D : Proportion de secteur concerné par la note histologique des couches profondes

E : Note histologique de la lame des cornes utérines et du corps utérin ($n_{CD} = 25$ lames, $n_{CG} = 25$ lames, $n_{CU} = 25$ lames soit 25 vaches)

F : Proportion de secteur concerné par la note histologique des lames (CD : corne droite, CG : corne gauche, CU : corps utérin)

(2) Note histologique_{col} ≥ 3

Lorsque le col est inflammatoire par l'histologie, 92% des cornes utérines (11/12) et 67% des corps utérins (4/6) ont une note d'histologie de l'épithélium inférieure ou égale à 2, 69% des cornes (9/13) et 50% des corps utérins ont une note d'histologie des couches profondes inférieure ou égale à 2 et 48,5% des cornes et 32% des corps utérins ont une note d'histologie de la lame entière inférieure ou égale à 2 (figure 32). Autrement dit, lorsque le col est inflammatoire, l'histologie du secteur utérin peut-être autant inflammatoire que non inflammatoire.

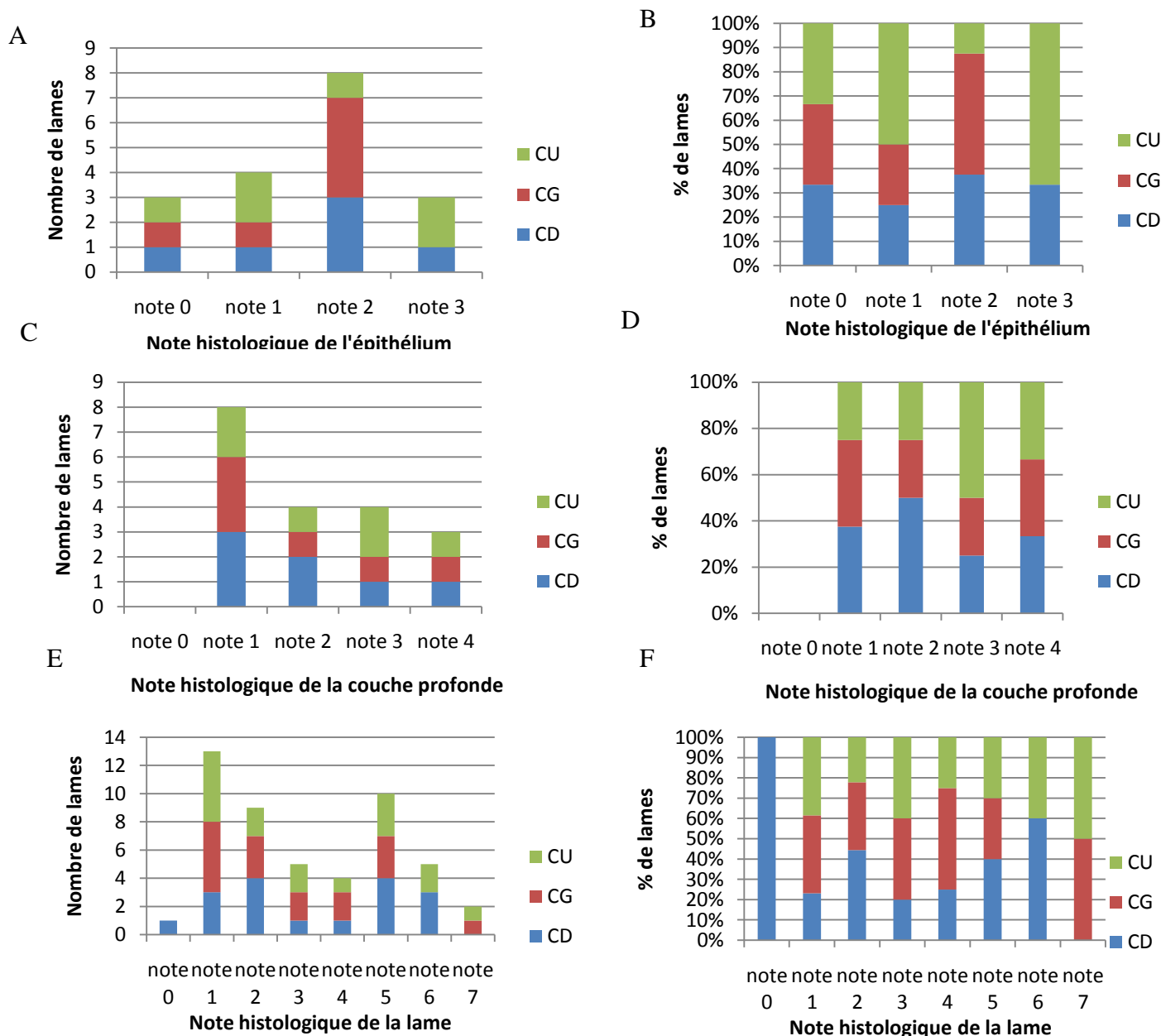


Figure 32 : Etat inflammatoire histologique des différents secteurs lorsque le col est inflammatoire (note histologique_{épithélium} (A, B), couche profonde (C, D), lame (E, F) ≥ 3)

A : Notes histologiques de l'épithélium des cornes utérines et du corps utérin ($n_{CD} = 6$ lames, $n_{CG} = 6$ lames, $n_{CU} = 6$ lames, soit 6 vaches)

B : Proportions de secteur concerné par la note histologique des épithéliums

C : Notes histologiques des couches profondes des cornes utérines et du corps utérin ($n_{CD} = 7$ lames, $n_{CG} = 6$ lames, $n_{CU} = 6$ lames soit 7 vaches)

D : Proportion de secteur concerné par la note histologique des couches profondes

E : Note histologique de la lame des cornes utérines et du corps utérin ($n_{CD} = 17$ lames, $n_{CG} = 16$ lames, $n_{CU} = 16$ lames soit 17 vaches)

F : Proportion de secteur concerné par la note histologique des lames (*CD : corne droite, CG : corne gauche, CU : corps utérin*)

E. Corrélation des données histologiques et cytologiques

1. Approche semi-quantitative

a) Entre note d'histologie et note de cytologie

Si l'on considère la note d'histologie globale de la lame et sa note cytologique la corrélation au niveau des cornes utérines et du corps utérin peut être qualifiée de moyenne ($0,62 < r < 0,69$; $p < 0,001$) et de faible pour le col ($r = 0,48$; $p < 0,001$) (figure 33).

b) Entre note d'histologie et le pourcentage de neutrophiles

Les notes ont été regroupées afin d'avoir des effectifs de lames suffisants. Sur ces nouveaux groupes, les tests de Kruskal Wallis et de Mann Whitney ont été réalisés. Ces tests ont définis des notes (A, B, C) qui sont des groupes qui sont significativement différents entre eux. Ainsi c'est à partir de ces regroupements de nos notes histologiques que nous allons comparer le comportement des taux de neutrophiles en fonction des notes d'histologie.

(1) L'épithélium

La figure 34 met en évidence une corrélation entre les notes d'histologie et le taux de neutrophiles. Autrement dit, lorsque en histologie la lame s'avère être inflammatoire, alors la cytologie donne un fort taux de neutrophiles. Cette observation pour l'épithélium est vraie pour tous les secteurs génitaux.

(2) Les couches profondes

Pour les couches profondes, on retrouve les mêmes résultats que pour l'épithélium, à savoir une augmentation des médianes des taux de neutrophiles en même temps que les notes d'histologie augmentent (figure 35).

(3) La lame dans son ensemble

Les résultats trouvés pour l'épithélium et les couches profondes se retrouvent également pour l'ensemble de la lame, soit une corrélation entre les taux de neutrophiles qui augmentent et les notes d'histologie qui évoluent en termes de gravité pour l'ensemble de l'endomètre (figure 36).

2. Approche qualitative

Il s'agit de classer les notes de cytologie selon qu'elles sont pathologiques ou non. Seuls le corps utérin et le col ne devraient être étudiés ici car ce sont les seuls pour lesquels un seuil pathologique en cytologie a été déterminé. Néanmoins, nous avons émis l'hypothèse que le seuil de %N pathologique pour les cornes était le même que pour le corps utérin. Ainsi, nous pouvons apprécier la cohérence entre le nombre de frottis pathologiques et non pathologiques en fonction des notes histologiques.

(1) **L'épithélium**

La figure 34 montre que, pour l'épithélium de chaque secteur génital, la proportion de lames dites pathologiques d'après la cytologie augmente en même temps que la note d'histologie croît.

(2) **La couche profonde**

Comme précédemment, la figure 35 illustre le lien entre la note histologique et la proportion de frottis pathologiques.

(3) **La lame dans son ensemble**

Les résultats obtenus pour l'épithélium et les couches profondes se retrouvent au niveau de l'ensemble (épithélium + couches profondes). Donc, plus la note d'histologie de l'endomètre augmente, plus la proportion de frottis pathologique est élevée (figure 36).

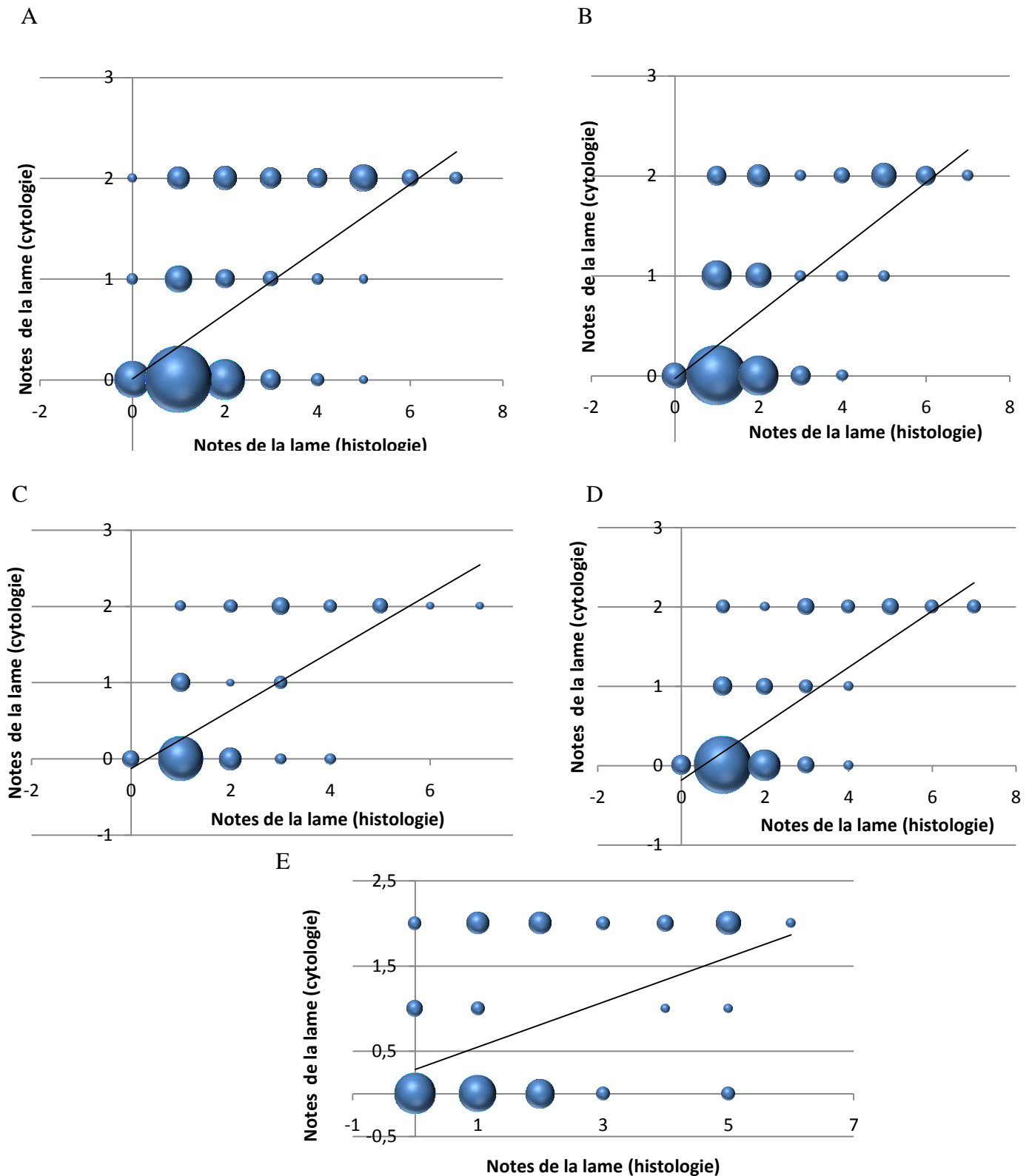


Figure 33 : Corrélacion entre les notes d'histologie et de cytologie (r = coefficient de corrélacion) :

A : de tous les compartiments génitaux (n = 333 lames), $r=0,59$ ($p<0,001$)

B : des cornes droites (n = 85 lames), $r=0,62$ ($p<0,001$)

C : des cornes gauches (n= 83 lames), $r=0,65$ ($p<0,001$)

D : des corps utérins (n = 81 lames), $r=0,69$ ($p<0,001$)

E : des cols (n = 84 lames), $r=0,48$ ($p<0,001$)

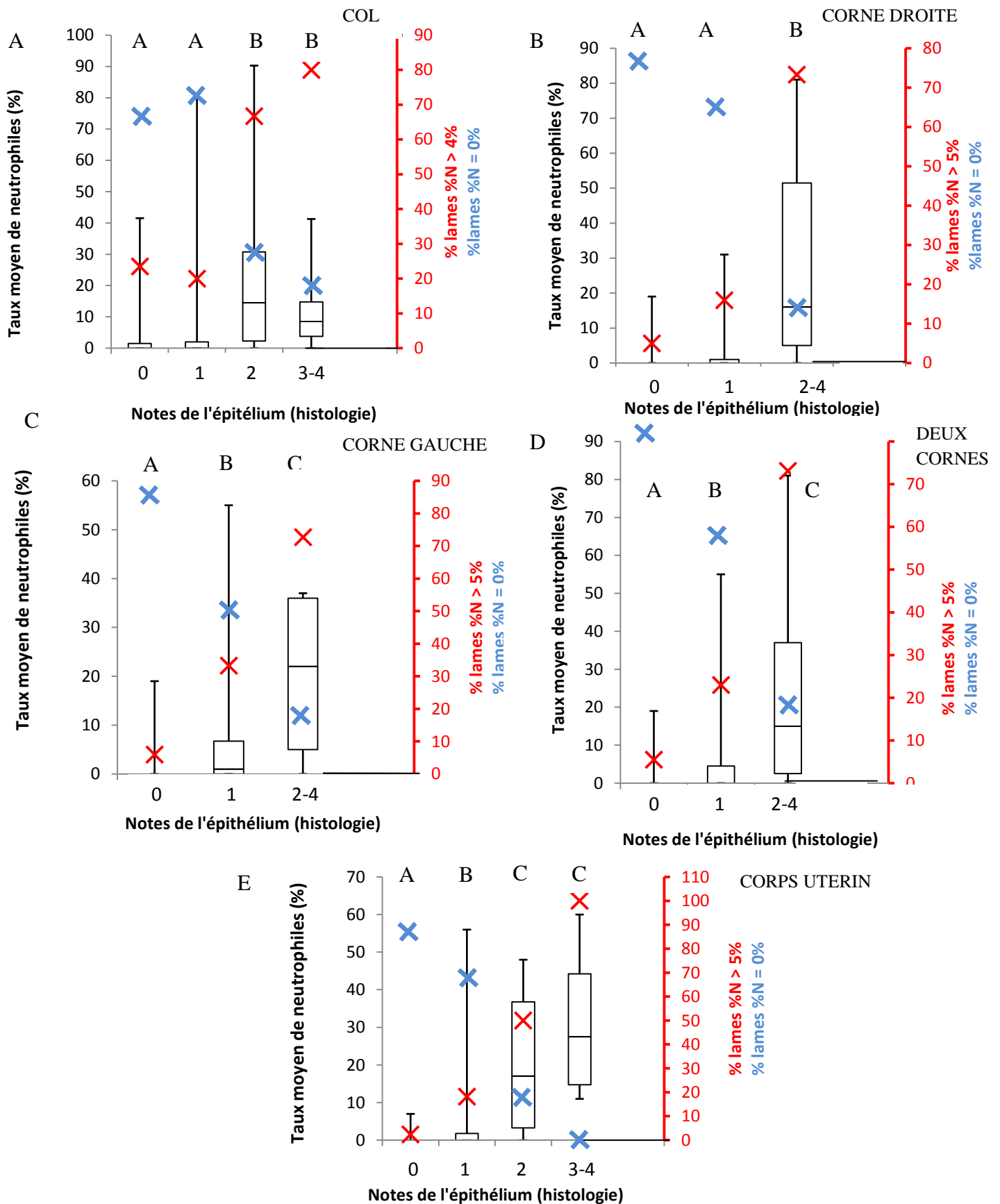


Figure 34 : Taux de neutrophiles et proportions de lames à inflammation cytologique pathologique en fonction de la note d'histologie des épithéliums pour : le col (n = 84 lames) (A), les cornes droites (n = 80 lames) (B), les cornes gauches (n = 79 lames) (C), les 2 cornes (n = 158 lames) (D), le corps utérin (n = 74 lames) (E).

Les lettres noires représentent les groupes d'individus avec une différence significative entre eux. Les box plots sont limités par une borne inférieure soit q1 (1^{er} quartile), une borne supérieure q3 (3^{ème} quartile) et au milieu de ceux-ci se trouve la médiane. Les « moustaches » de ces box plots sont délimités par une borne inférieure soit la valeur minimale et une borne supérieure soit la valeur maximale de chaque série.

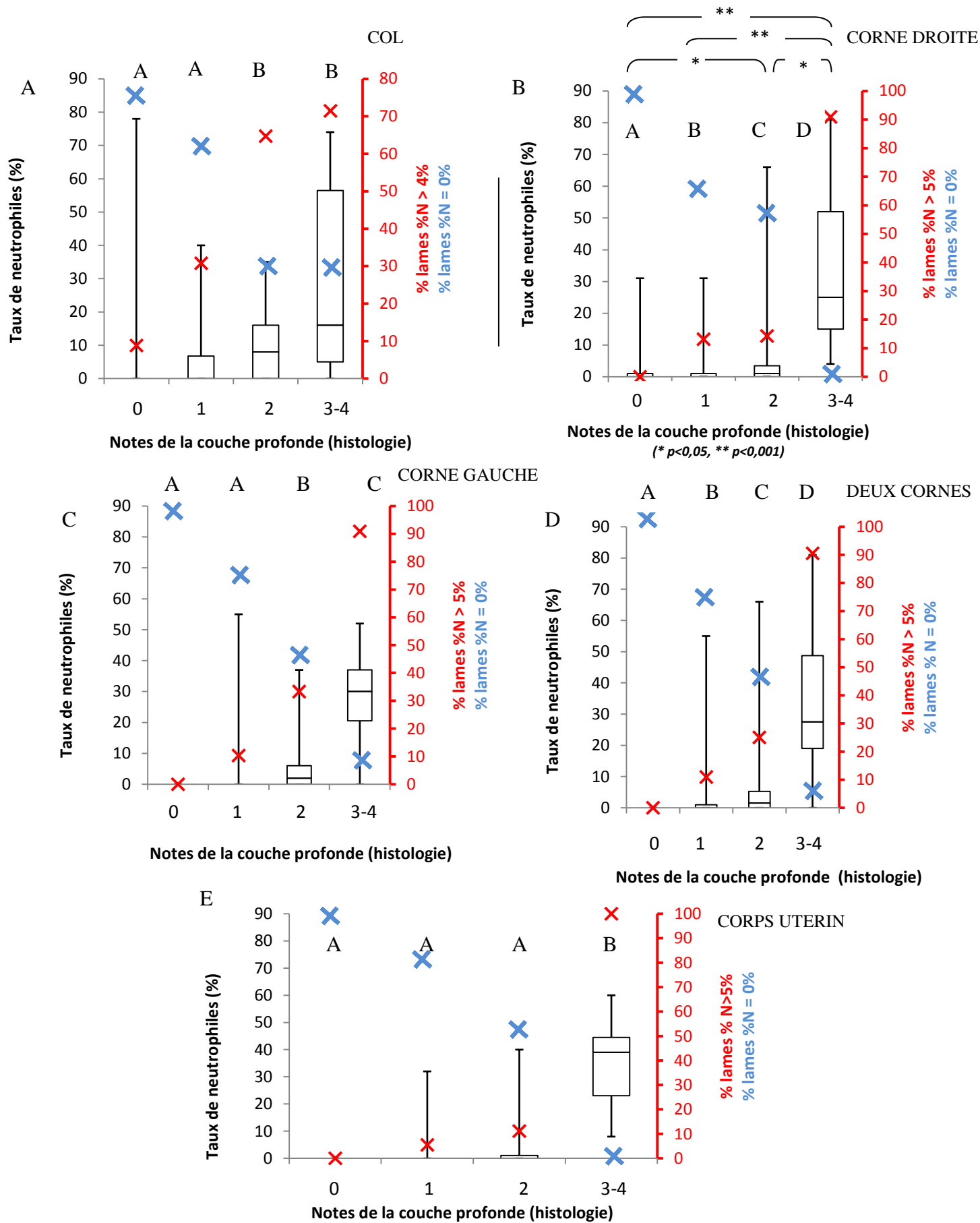


Figure 35 : Taux de neutrophiles et proportions de lames à inflammation cytologique pathologique en fonction de la note d’histologie des couches profondes pour : le col (n = 84 lames) (A), les cornes droites (n = 85 lames) (B), les cornes gauches (n = 83 lames) (C), les 2 cornes (n = 166 lames) (D), le corps utérin (n = 81 lames) (E). Les lettres noires représentent les groupes d’individus avec une différence significative entre eux. Les box plots sont limités par une borne inférieure soit q1 (1^{er} quartile), une borne supérieure q3 (3^{ème} quartile) et au milieu de ceux-ci se trouve la médiane. « Les moustaches » de ces box plots sont délimités par une borne inférieure soit la valeur minimale et une borne supérieure soit la valeur maximale de chaque série.

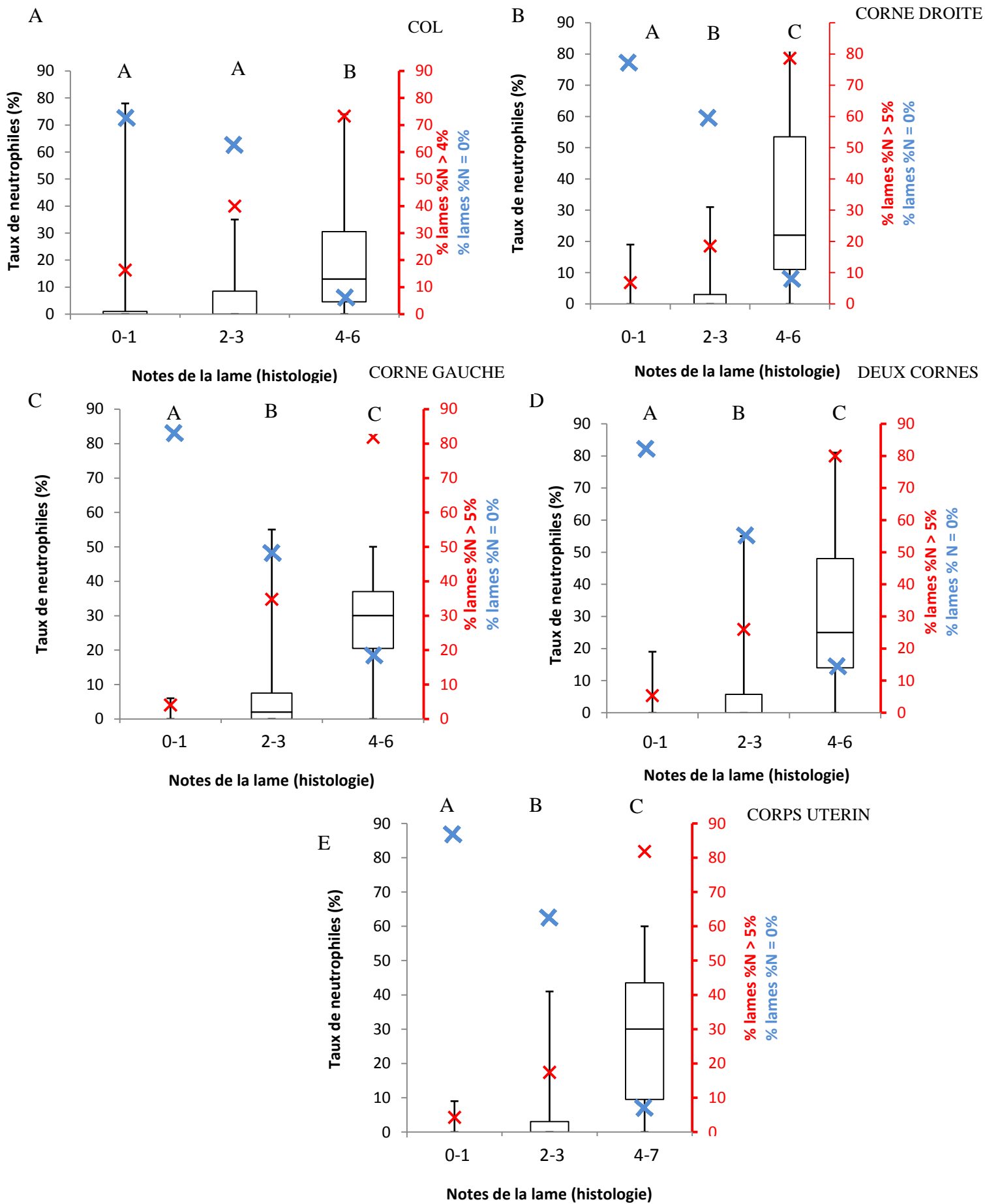


Figure 36 : Taux de neutrophiles et proportions de lames à inflammation cytotologique pathologique en fonction de la note d'histologie des lames entières pour : le col (n = 84 lames) (A), les cornes droites (n = 85 lames) (B), les cornes gauches (n = 83 lames) (C), les 2 cornes (n = 166 lames) (D), le corps utérin (n = 81 lames) (E).

Les lettres noires représentent les groupes d'individus avec une différence significative entre eux. Les box plots sont limités par une borne inférieure soit q1 (1^{er} quartile), une borne supérieure q3 (3^{ème} quartile) et au milieu de ceux-ci se trouve la médiane. Les « moustaches » de ces box plots sont délimités par une borne inférieure soit la valeur minimale et une borne supérieure soit la valeur maximale de chaque série.

3. Approche statistique de la corrélation cytologie-histologie

a) Régression logistique univariée

Ainsi, en ne considérant que les vaches cytologiquement « saines » (0%N) ou pathologiques ($\geq 5\%N$ pour le col et $\geq 6\%N$ pour le corps utérin), des régressions logistiques sur chacun de ces compartiments ont été réalisées.

Qu'il s'agisse du corps utérin ou du col, quand les notes d'histologie augmentent alors le risque de l'inflammation aussi (tableau 19 ; odds-ratio appartient à l'IC avec l'IC >1). Autrement dit, l'histologie va dans le même sens que la cytologie pour qualifier ces deux secteurs comme inflammatoire ou non.

Note histologique du secteur étudié	Inflammation cytologique *					
	CORPS UTERIN			COL		
	<i>Odds-ratio</i>	<i>IC</i>	<i>p-value</i>	<i>Odds-ratio</i>	<i>IC</i>	<i>p-value</i>
Epithélium	4,61 (n=74)	[1,97 ; 10,80]	<0,001	2,33 (n=77)	[1,36 ; 4,01]	<0,001
Couches profondes	9,39 (n=74)	[3,45 ; 25,6]	<0,001	3,35 (n=77)	[1,82 ; 6,18]	<0,001
Epithélium + couches profondes	3,42 (n=74)	[1,85 ; 6,30]	<0,001	2,11 (n=77)	[1,45 ; 3,07]	<0,001

Tableau 19 : Etude du risque inflammatoire par confrontation de l'inflammation cytologique et des notes d'histologie du corps utérin et du col (analyse univariée)

* $\geq 5\%N$ pour le col, $\geq 6\%$ pour le corps utérin, IC=intervalle de confiance.

b) Calcul du coefficient de concordance kappa

D'après les notes d'histologie redéfinies dans les figures 34-36, il est possible pour certain secteur génital et étage de l'endomètre de calculer des coefficients de concordance kappa entre les notes de cytologie et d'histologie. Seuls les secteurs et étages avec 3 notes d'histologie ont pu être soumis à ce calcul du coefficient kappa, car celui-ci nécessite un tableau carré pour être calculé (3 notes en cytologie ; 3*3). On obtient en majorité des concordances dites moyennes ($0,56 < \kappa < 0,59$; tableau 20).

	Cornes	Corne droite	Corne gauche	Corps utérin
Epithélium	-	-	0,57 (n=79) [0,38 ; 0,76] p<0,0001	0,59 (n=74) [0,42 ; 0,77] p<0,0001
Couches profondes	-	-	0,58 (n=83) [0,39 ; 0,77] p<0,0001	-
Lame entière	0,58 (n=168) [0,46 ; 0,69] p<0,0001	0,56 (n=85) [0,39 ; 0,73] p<0,0001	0,59 (n=89) [0,42 ; 0,76] p<0,0001	0,62 (n=81) [0,45 ; 0,79] p<0,0001

Tableau 20 : Les coefficients de corrélation entre les notes d'histologie définies dans les figures 34-36 et les notes de cytologie dans différents secteurs génitaux et étage histologique de l'endomètre.

Seuls sont concernés les secteurs et les étages de l'endomètre avec 3 notes d'histologie afin de pouvoir calculer le coefficient kappa avec les 3 notes de cytologie. Notes de cytologie et d'histologie : 0,1,2.

n = nombre de lames.

F. Approche diagnostique des seuils établis en histologie

La cytologie est utilisée ici comme le test de référence par rapport auquel on va fixer un seuil pathologique à un autre test diagnostique, la biopsie utérine, grâce à une courbe ROC (Receiver Operating Characteristic ; tableau 21).

Il est inutile de réaliser de l'histologie sur le col à des fins diagnostiques (index de Youden $(J) < 0,5$). Par contre, l'histologie du corps utérin paraît intéressante dans le diagnostic des inflammations utérines (Youden $>0,5$) (tableau 21). De plus, la couche profonde peut suffire pour des fins diagnostiques ($Y=0,73$) contrairement à l'épithélium qui à lui seul n'est pas aussi performant ($J=0,61$). En effet, la figure 37 met en évidence que le seuil pathologique de la couche profonde et de la lame du corps utérin est plus cohérent en termes de répartition des frottis pathologiques et non pathologiques contrairement au seuil fixé pour l'épithélium. L'analyse de cette répartition des frottis confirme également que le col est un mauvais site de prélèvement pour différencier les frottis pathologiques des non pathologiques (figure 38).

De plus, ces courbes Roc permettent, pour le corps utérin, de définir une note dite « pathologique » au dessus de laquelle les utérus correspondants ont davantage de risque de présenter une inflammation cytologique pathologique. Ainsi, la note seuil de l'épithélium est la note 1. Quant à la couche profonde et à la lame dans sa globalité, c'est la note 3 qui a été retenue.

	CORPS						COL					
	n = nombre de lames	Sensibilité (%) [intervalle de confiance]	Spécificité (%) [intervalle de confiance]	AUC	J	Seuil note histologique	n = nombre de lames	Sensibilité (%) [intervalle de confiance]	Spécificité (%) [intervalle de confiance]	AUC	J	Seuil note histologique
Epithélium	65	91,7 [80,98 ; 96,54]	69,8 [56,55 ; 80,09]	0,89	0,61	1	77	44,4 [32,84 ; 55,93]	92 [83,81 ; 97,09]	0,67	0,36	2
Couche profonde	71	73,3 [61,41 ; 83,06]	100 [94,94 ; 100]	0,90	0,73	3	77	59,3 [47,94 ; 70,77]	86 [75,87 ; 92,65]	0,79	0,45	2
Lame	71	80 [69,13 ; 83,78]	92,9 [84,33 ; 97,67]	0,90	0,73	3	77	70,4 [58,62 ; 80,03]	72 [60,00 ; 81,15]	0,79	0,42	2

Tableau 21 : Valeur diagnostique des notes histologiques, la cytologie étant prise comme référence (%N = 0% soit non inflammatoire et %N \geq 5-6% soit inflammatoire)

J : index de Youden, AUC : aire sous la courbe de ROC

Un index de Youden >0,5 avec une AUC élevée caractérise un test utile pour le diagnostic.

La précision du diagnostic est fonction de l'AUC :

0,9-1,0 excellent, 0,8 -0,9 très bon, 0,7-0,8 bon, 0,6-0,7 correct, 0,5-0,6 mauvais, < 0,5 test inutile.

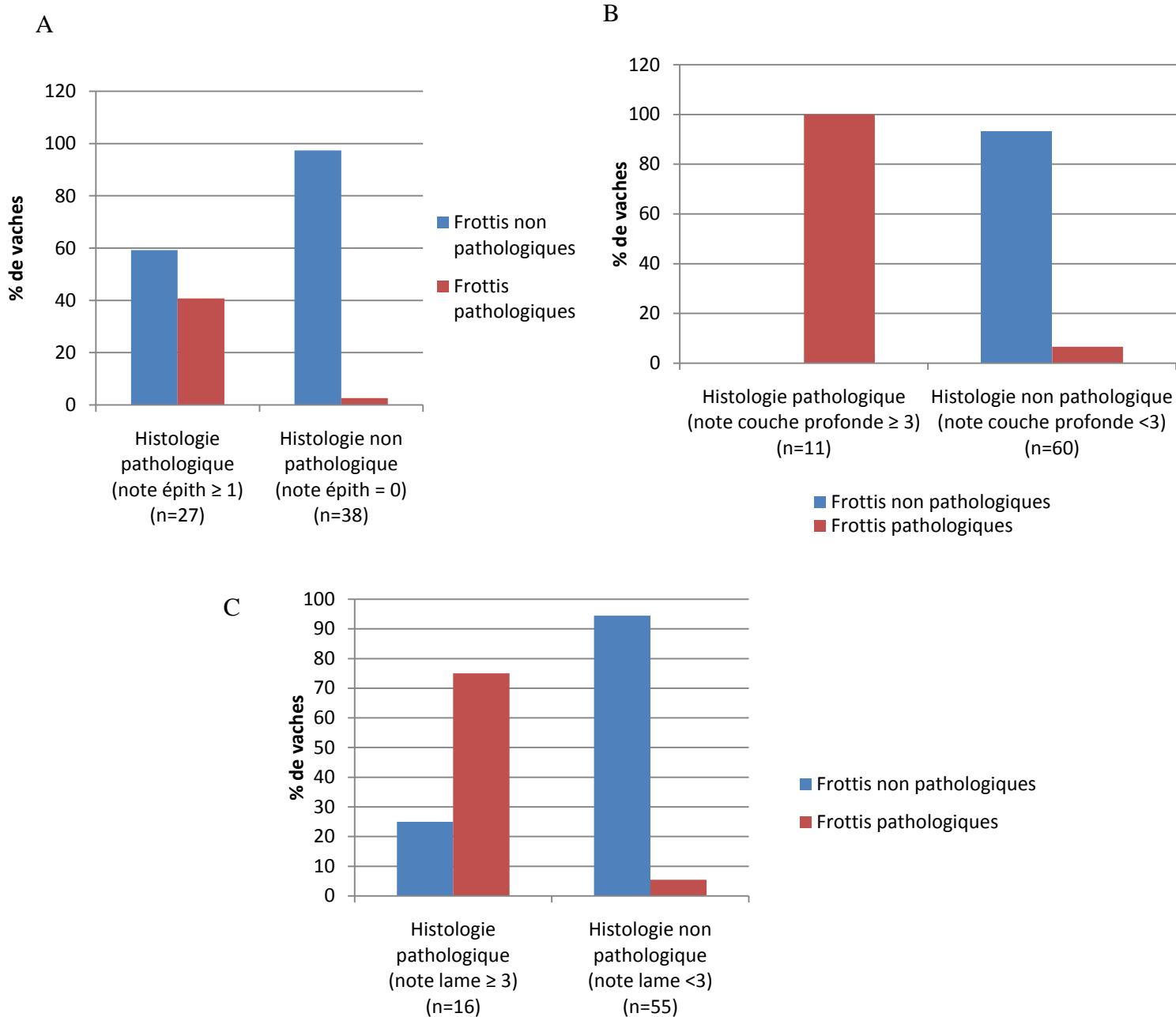


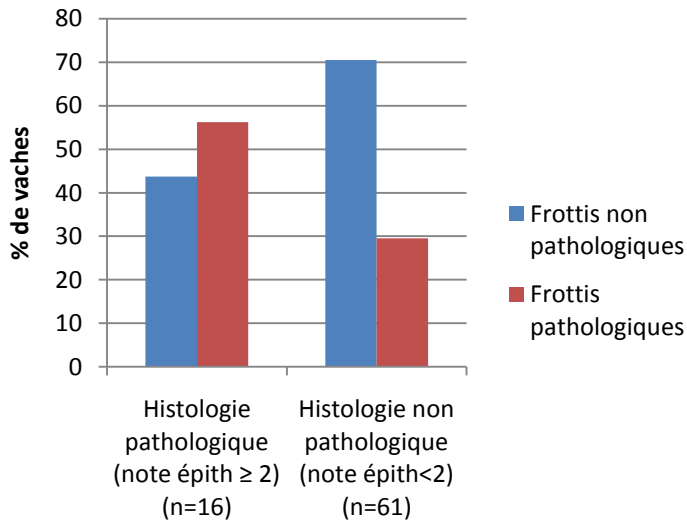
Figure 37 : Proportion de vaches présentant un frottis inflammatoire ou non inflammatoire (cytologie) en fonction du seuil pathologique considéré en histologie :

A : pour l'épithélium du corps utérin (seuil = 1)

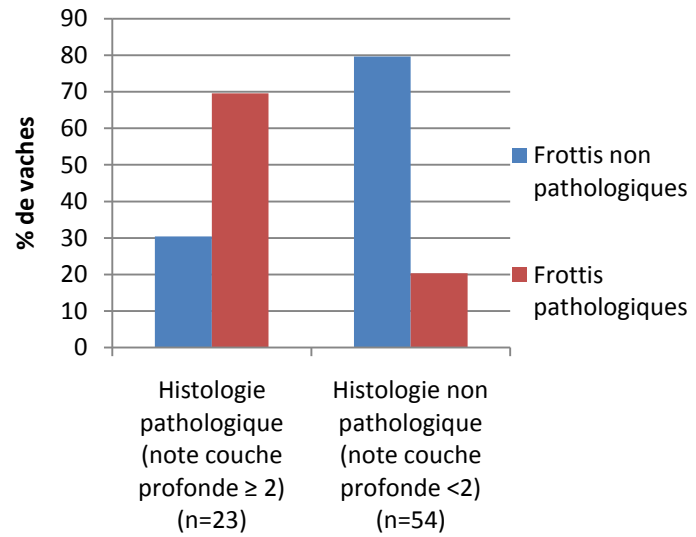
B : pour les couches profondes du corps utérin (seuil = 3)

C : pour la lame dans son ensemble du corps utérin (seuil = 3)

A



B



C

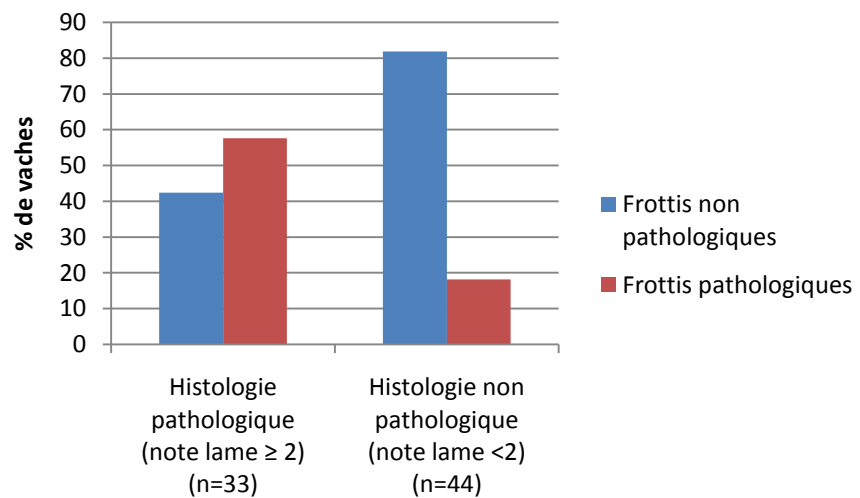


Figure 38 : Proportion de vaches présentant un frottis inflammatoire ou non inflammatoire (cytologie) en fonction du seuil pathologique considéré en histologie :

A : pour l'épithélium du col (seuil = 2)

B : pour les couches profondes du col (seuil = 2)

C : pour la lame dans son ensemble du col (seuil = 2)

III. Discussion

L'objectif de cette étude était d'appréhender, par la cytologie et l'histologie, d'une part l'homogénéité de l'inflammation au sein de l'appareil génital chez la vache et d'autre part, la corrélation entre les résultats donnés sur le statut inflammatoire de l'appareil génital par l'examen de référence (la cytologie) et par l'histologie.

A. Protocoles expérimentaux

1. Constitution de l'échantillon d'étude

L'étude a été réalisée sur des utérus de bovins obtenus dans des abattoirs. L'inconvénient de l'utilisation des utérus d'abattoir est la forte fréquence des cas sans inflammation (67% -267/399- des frottis dans notre étude), car les animaux abattus sont en général des génisses et des vaches loin du vêlage (peu de vaches laitières hautes productrices ou peu de vaches allaitantes avec leur veau non sevré ne sont réformées). Ainsi, cet échantillon est biaisé dans sa composition, il est donc impossible d'analyser les prévalences obtenues sur cet échantillon. En particulier, la prévalence des frottis de corps utérin pathologique de 19% (16/85) dans notre étude est très inférieure à celle observée chez les vaches laitières qui oscillent entre 43 et 57% selon le moment du prélèvement (Deguillaume, 2010), 35% entre 20 et 33 JPP pour Kasimanickam *et al.* (2004).

Par ailleurs, aucune donnée individuelle concernant l'animal (race, parité, note d'état corporel, production laitière, délai postpartum) n'était disponible. C'est une limite à l'analyse biologique des résultats. En effet, la présence de neutrophiles dans l'endomètre peut être le reflet d'une inflammation ou leur diapédèse physiologique au cours de la phase folliculaire du cycle ovarien (Dhaliwal et al, 2001) et les seuils pathologiques fixés en cytologie sont applicables sur un intervalle de temps connu (nombre de jours post-partum). Par ailleurs, le biais qu'il peut exister dans cette étude est la variation des données fournies par l'histologie et la cytologie à un même site donné puisque la biopsie serait influencée par le cycle œstral contrairement à la cytologie (Madoz et al, 2013). En effet, une étude menée par Deguillaume et al (2010) a démontré que le stade du cycle œstral n'avait aucun impact dans le diagnostic cytologique des endométrites subcliniques.

2. Préparation des lames d'histologie

La mise en pratique de la biopsie utérine est d'une part traumatique pour les tissus de l'endomètre (plus invasive que la cytologie) et d'autre part difficile à réaliser avec succès sur un tissu inflammatoire. Le prélèvement est une phase délicate qui affecte directement la qualité des lames ensuite. On peut donc obtenir de nombreuses coupes histologiques avec moins de 50% d'épithélium intact (19,5% (75/385) des lames dans notre étude). Malgré la recoupe des blocs initiaux pour améliorer la qualité des coupes, seules 24% des lames ont plus de 50% d'épithélium intact à la seconde tentative. Ceci illustre la difficulté de conserver l'épithélium dès le moment du prélèvement.

3. La lecture des frottis et des coupes histologiques

a) Les frottis

Il a été montré que les neutrophiles constituaient la population leucocytaire dominante des frottis génitaux et que le taux de neutrophiles caractérisait le statut inflammatoire génital bovin (Deguillaume, 2010). Néanmoins, dans la littérature, une incertitude persiste pour définir la population cellulaire inflammatoire de l'appareil génital, car est employé le terme de « polymorphonucléaire » (PMN), or selon les auteurs ce terme désigne soit uniquement les neutrophiles, soit l'association neutrophiles-macrophages-lymphocytes. Il est donc pas évident de comparer les résultats des différentes publications (Daragon, 2011). Et parmi ces polymorphonucléaires, les neutrophiles représentent la population leucocytaire dominante des frottis génitaux (Daragon 2011).

Dans notre échantillon, 75% des résultats des frottis proviennent de l'étude de Deguillaume (2010). La reproductibilité de la lecture elle-même a été étudiée par Deguillaume (2010). Cent cinquante quatre frottis endométriaux et 168 frottis endocervicaux utilisés dans son étude *in-vivo* ont été lus par deux opérateurs. Chaque opérateur comptait manuellement un total de 200 cellules par frottis, afin de calculer le taux de neutrophiles. Les deux opérateurs lisaient successivement les mêmes lames, à l'aveugle des résultats de la lecture de l'autre opérateur. L'étude a montré qu'il y avait une bonne concordance inter-opérateur pour la lecture des frottis : le coefficient de concordance de Lin était $\rho = 0,91$ et le coefficient kappa était $\kappa = 0,75$ (Deguillaume, 2010).

La répétabilité, après double lecture de 45 lames (23 frottis endométriaux et 22 endocervicaux) par un même individu a également été réalisée par Deguillaume (2010). Elle a montré qu'il y avait une bonne concordance des résultats intra-opérateur pour la lecture des frottis avec un coefficient de Lin $\rho = 0,88$ et un coefficient kappa $\kappa = 0,81$.

b) Les biopsies

Dans la littérature, les auteurs ont utilisé chacun des grilles de lecture différentes avec des points de convergence tels que l'infiltration mononucléée et neutrophilique de l'épithélium et des couches profondes et la présence de nodules lymphoïdes. Ainsi, il est difficile de comparer les résultats entre publications.

Dans notre étude, nous avons évalué la répétabilité (variabilité intra-opérateur) après double lecture des 400 lames par un même individu. Elle a été calculée par le coefficient kappa et ce pour chaque compartiment génital et plan de l'endomètre (épithélium, couche profonde, endomètre dans sa totalité). Il a montré qu'il y avait une bonne concordance puisqu'il oscille entre 0,68 et 0,95.

B. Résultats

1. Qualifier le statut inflammatoire

a) Des frottis

Bien qu'on ne connaisse pas le nombre de jours post-partum des vaches, nous avons toutefois maintenu les seuils pathologiques de 5% de granulocytes neutrophiles pour le col et 6% pour l'utérus à 21-35 jours post-partum en référence aux travaux de Deguillaume (2010) basés sur l'altération significative des performances de reproduction ultérieures. Avant cette

étude de Deguillaume, aucun seuil d'inflammation endocervicale n'avait encore été proposé dans la littérature. Concernant l'inflammation endométriale, le seuil de 6%N est proche de certains de ceux proposés dans d'autres études avant 35 jours post-partum (Kasimanickam et al, 2004 ; Gilbert et al, 2005 ; Barlund et al, 2008). A cette période post-partum, les seuils proposés dans la bibliographie varient de 6,5 à 18%N.

Si on s'éloigne du vêlage, le seuil pathologique diminue puisque l'appareil génital se débarrasse de l'inflammation. Ainsi, en période de mise à la reproduction, 7 jours avant l'insémination artificielle les seuils sont de 1%N pour l'utérus et 2%N pour le col. Nous avons donc choisi la valeur la plus élevée pour être sûr que l'utérus soit pathologique. Mais en corollaire, cela signifie que l'on est en dessous de la vérité (nous n'avons pas tenu compte de tous les utérus effectivement pathologiques). Il en est de même pour les appareils génitaux non pathologiques : nous avons pris 0% de neutrophiles pour être certain que ces frottis soient forcément issus d'appareils génitaux non pathologique, mais par voie de conséquence nous sous-estimons cette classe. C'est ainsi que 3 notes dites cytologiques ont été attribuées.

b) Des biopsies

L'examen histologique ne permet pas réellement une évaluation quantitative du statut inflammatoire, mais une analyse qualitative ou semi-quantitative. Néanmoins, avec la difficulté de trouver dans la littérature une gradation commune de l'inflammation entre les auteurs, il n'est pas aisé d'affecter un statut inflammatoire à une coupe histologique. Et ce d'autant plus, qu'aucune étude n'a analysé le lien entre les résultats d'une biopsie utérine et les performances de reproduction de la vache biopsiée. Ainsi, l'attribution d'une note histologique à chaque prélèvement s'est appuyée sur les gradations de certains auteurs (Hartigan et al, 1972 ; Chapwanya et al, 2009) et notamment sur les témoins d' « inflammation » comme les leucocytes et les nodules lymphoïdes. Ces notes histologiques sont plus arbitraires que celles appliquées en cytologie. Overbeck et al (2013) ont été également confrontés à ce problème dans l'espèce équine où ils ont fixé arbitrairement le seuil de 5 neutrophiles par champ au grossissement 400 sur 3 champs distincts au dessus duquel la lame histologique est dite « inflammatoire » (aucune relation n'était établi avec les performances de reproduction).

2. Définir un échantillon correct à l'analyse des résultats

Entre les difficultés de préserver les épithéliums au moment des biopsies, de réussir la coloration des lames d'histologie empêchant d'obtenir 4 lames d'histologie lisibles par vache et l'intérêt de conserver un maximum de vaches dites « cytologiquement » malades, l'échantillon qui a permis d'extraire les résultats comprend 15% de vaches en moins que l'échantillon initial. Ceci était nécessaire afin de conserver un maximum de vaches chez lesquelles sont représentés les 4 compartiments génitaux étudiés et éviter les données manquantes, en particulier pour l'étude de l'homogénéité de l'inflammation au sein des différents compartiments de l'appareil génital

3. Homogénéité de l'inflammation entre les différents secteurs génitaux

Les prélèvements cytologiques comme histologiques de différents sites de l'appareil génital bovin (col, corps utérin et les 2 cornes utérines) ont révélé que l'inflammation n'était pas homogène au sein du tractus bovin femelle. Cette hétérogénéité avait été observée en cytologie : l'inflammation endométriale mesurée au niveau du corps et l'inflammation endocervicale (Deguillaume, 2010). Une étude menée par Overbeck et al sur des juments confirme aussi qu'aucune différence significative existe dans le nombre de neutrophiles dénombrés au niveau utérin (corps utérin et cornes utérines) que ce soit par la cytologie ou par

l'histologie, et ce à l'aide du coefficient kappa ($p_{\text{value}} = 0,78$ pour la cytologie ; $p_{\text{value}} = 0,79$ pour l'histologie).

Cette hétérogénéité peut s'expliquer par la position anatomique du col entre une cavité vaginale septique et une cavité utérine stérile, qui de plus constitue un obstacle physique à une contamination extérieure vers la lumière utérine. Autrement dit, une inflammation endocervicale peut exister sans pour autant avoir une inflammation de la lumière utérine. Par ailleurs, les différences entre les muqueuses cervicale et utérine peuvent expliquer une résolution non simultanée de la contamination bactérienne physiologique post-partum (Daragon, 2011). Par conséquent, d'un point de vue pratique on ne peut pas substituer le prélèvement cervical au prélèvement endométrial, bien que plus facile à réaliser.

L'hétérogénéité de certains paramètres au sein de l'appareil génital a été aussi démontrée par El-Sheikh et al (2013) pour la température. Ainsi, un gradient de température a été mis en évidence, qui augmente progressivement en allant du vagin aux cornes utérines. Par contre, le fait que le secteur utérin (corps et cornes utérines) soit homogène au niveau du statut inflammatoire n'est pas transposable pour tous les paramètres étudiés. Une étude menée par Trigal et al (2014) a montré une hétérogénéité fonctionnelle au niveau moléculaire entre les deux cornes utérines au cours d'une gestation. En effet, les concentrations en hexoses (glucose et en fructose), les proportions de certaines protéines (albumine, fibrinogène ...) diffèrent entre ces 2 cornes au début du développement embryonnaire, sans pour autant altérer les taux de gestation mais agissant sûrement sur la régulation du développement embryonnaire. La comparaison du micro-environnement de chaque corne utérine post-partum reste à réaliser.

4. Homogénéité de l'inflammation intra-murale

Les examens histologiques des épithéliums et des couches profondes sont fortement corrélés au niveau du secteur utérin ($0,67 < \kappa < 0,74$) et faiblement corrélés au niveau du col ($0,42 < \kappa < 0,47$). Autrement dit, au niveau du corps utérin, secteur actuellement écouvillonné, un prélèvement biopsique sur lequel l'épithélium est manquant donnerait les mêmes informations que lorsque l'épithélium reste présent.

5. Corrélations entre les données cytologiques et histologiques

A partir des notes histologiques initialement choisies (figure 28), la corrélation avec les résultats cytologiques correspondants est qualifiée de moyenne pour le secteur utérin ($0,62 < r < 0,69$, $p < 0,001$) et faible pour le col ($r = 0,48$, $p < 0,001$). Par contre, après regroupement de certaines notes d'histologie (figure 34-36), on observe une relation entre la sévérité des notes histologiques et le taux de neutrophiles. Par ailleurs, un autre point qui est en faveur de cette corrélation est l'augmentation du % de vaches dites malades par la cytologie avec une note d'histologie élevée.

Afin d'objectiver par des données chiffrées cette corrélation, des régressions linéaires ont permis de confirmer qu'une note histologique élevée va de pair avec une vache qui a un risque plus élevé d'avoir une inflammation cytologique (exemple : $\text{odd-ratio}_{\text{corps utérin, épithélium}} = 4,61$ [1,97 ; 10,80], $p < 0,001$). Cette corrélation a été retrouvée dans l'espèce équine par Overbeck et al (2013). Une légère corrélation avait été démontrée entre ces deux techniques diagnostiques ($\kappa = 0,29$; $p < 0,01$). Dans cette étude aussi, le seuil pathologique en histologie a été fixé arbitrairement à un nombre de neutrophiles ≥ 5 (dans le *stratum compactum*) au grossissement $\times 400$ sur 3 champs distincts et à ≥ 2 % de neutrophiles pour la cytologie. L'utilisation de coefficient kappa a été applicable dans notre étude, pour certains secteurs génitaux et étage de l'endomètre, car on avait avec les nouveaux groupes définis après

regroupement 3 notes pour la cytologie et l'histologie. Ainsi, on obtenait une corrélation moyenne au niveau des cornes utérines et à peine importante au niveau du corps utérin ($\kappa_{\text{cornes}} = 0,59$; $\kappa_{\text{corps utérin}} = 0,62$). Par contre, récemment des études ont travaillé sur cette corrélation entre les données cytologiques et histologiques pour le diagnostic des endométrites subcliniques chez les vaches, Meira et al (2012) ont obtenu une légère corrélation entre ces données ($\kappa = 0,39$) et l'équipe de Madoz et al (2014) ont montré une faible corrélation avec un coefficient kappa $\kappa = 0,151$.

Bien que ces dernières années plusieurs études se soient intéressées à cette corrélation entre les données cytologiques et histologiques, il reste difficile de comparer les différentes publications puisqu'il n'y a pas de consensus scientifique ni sur une grille de lecture, ni sur la gradation du statut inflammatoire d'une biopsie utérine et ni sur les seuils pathologiques en cytologie.

6. Approche diagnostique des seuils établis en histologie

Les résultats des Roc curves ont un impact direct sur la réalisation pratique des biopsies utérines. En effet, cette dernière se heurtait souvent à la difficulté de conserver l'épithélium utérin au moment du prélèvement ou de la phase de « techniquage » du prélèvement, or il semble suffisant d'avoir la couche profonde dans le but de statuer sur l'état inflammatoire de l'utérus.

C. Perspectives

A l'issue de cette étude, il ressort l'intérêt de prélever à la fois le col et le corps utérin si on souhaite avoir un aperçu global du statut inflammatoire de l'appareil génital.

Comme le suggère cette étude, l'absence d'un seuil pathologique fixé pour le diagnostic histologique est une des limites. En effet, une tentative de fixer un seuil a été réalisée à l'aide d'une courbe ROC, en se basant sur l'examen actuellement reconnu comme technique de référence (cytologie) pour statuer sur l'inflammation utérine. C'est un examen de référence car objectif, répétable, fournissant un résultat quantitatif, utilisable *in vivo* et *ex vivo* et garantissant une totale innocuité pour la fertilité ultérieure des animaux (Deguillaume, 2010). Or, comme toute valeur fixée par les statistiques, il est nécessaire de la vérifier sur le terrain en réalisant des études *in vivo* qui comparent le statut d'une biopsie avec les performances de reproduction de la vache biopsiée. Par ailleurs, cette étude *in vivo* permettrait d'avoir des données sur la vache (stade physiologique...) et les résultats seraient alors transposables à la population bovine actuelle avec un sens clinique.

L'histologie est un examen qui aurait pu être choisi en pratique car il est très performant pour le diagnostic des endométrites et apporte des renseignements plus complets sur le statut inflammatoire de l'endomètre, mais son coût élevé (50 euros pour la lecture, 300 euros pour la pince de biopsie contre 20 euros pour la lecture et moins d'un euro pour la cytobrosse), le délai d'obtention du résultat et sa mise en pratique délicate rendent son emploi sur le terrain difficile (Daragon, 2011). Au niveau expérimental, elle garde néanmoins une place fondamentale pour à la fois valider ou infirmer les résultats cytologiques et pour affiner les recherches moléculaires, immunitaires, les changements physiologiques et pathologiques de l'utérus (Chapwanya et al, 2010).

CONCLUSION

Ce travail a montré l'évolution distincte de l'inflammation entre les deux secteurs utérin et cervical mais une relative homogénéité au sens de l'utérus lui-même. Par conséquent, l'examen cytologique endocervical n'est donc pas une alternative au cathétérisme cervical. Néanmoins, bien que la cytologie s'avère donner des résultats du même ordre que l'examen histologique, la corrélation entre ces deux examens reste moyenne.

Reste maintenant à déterminer lequel des deux examens (cytologique du col et du corps versus histologique du corps) serait le meilleur témoin des performances de reproduction ultérieures ou plus exactement de l'intérêt d'un traitement de l'endométrite pour l'amélioration des performances de reproduction. Tout ceci sans oublier que, le choix de la ou des techniques diagnostiques revient en premier lieu au praticien : or à l'heure actuelle, il s'avère difficile pour les vétérinaires de mettre en œuvre la cytologie, pourtant non invasive et peu coûteuse mais nécessitant coloration, temps de lecture et une seconde visite pour traiter les animaux malades identifiés. Même si l'histologie se révélait de meilleure valeur diagnostique, cet examen présente plusieurs inconvénients en pratique : la plus grande difficulté du prélèvement qu'en cytologie, le délai nettement supérieur pour l'obtention du résultat ainsi que la nécessité d'un envoi à un laboratoire extérieur et le coût.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, Enseignant-chercheur, de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **LARROQUE Elodie** intitulée « *Comparaison des données cytologiques et histologiques pour le diagnostic de l'endométrite chez la vache* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.



Fait à Toulouse, le 2014
Professeure Sylvie CHASTANT-MAILLARD
Enseignant chercheur
de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse




Vu :
Le Directeur de l'École Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président du jury
Professeur Olivier PARANT

Olivier PARANT
Praticien Hospitalier
Gynécologie Périnatale
Tél: 05 87 77 11 09
CHU Toulouse - Hôpital Paule de Viguer
TSA 70034 - 31059 TOULOUSE Cedex 9

Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT
Par déléation, la Vice-Présidente du CEVU
Madame Régine ANDRÉ OBRECHT



Mlle LARROQUE Elodie

a été admis(e) sur concours en : 2009

a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2013

a validé son année d'approfondissement le : 02/06/2014

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

École nationale Vétérinaire - 23, chemin des capelles - 31076 Toulouse Cedex 3 - France

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ahmadi M.R., Nazifi S., Ghaisari H.R. (2006) Comparison of hormonal changes of oestrous cycle with cytology of cervical mucosa and hematological parameters in dairy heifers. *Comp Clin Pathol*, 15, 2, 94-97.

Azawi O.I. (2008). Postpartum uterine infection in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 105, 187-208.

Bacha B., Regassa F.G. (2009) Subclinical endometritis in Zebu x Friesian crossbred dairy cows: its risk factors, association with subclinical mastitis and effect on reproductive performance. *Trop. Anim. Health Prod.*, 42, 397-403.

Bacha W.J., Bacha L.M. (2010) Color atlas of veterinary histology second edition. *Female reproductive system*, ed Dona Balado, Maryland, Baltimore, 221-243.

Barlund C.S., Carruthers T.D., Waldner C.L., Palmer C.W. (2008) A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*, 69, 714-723.

Barone R. (1978) Anatomie comparée des animaux domestiques, tome 3, Splanchnologie II, 269-449, Vigot, Lyon.

Belaisch J, Zilberman S., Castaing N., Moumim H., Segard L. (2007) Endomètre et implantation : l'endométrite existe-t-elle en infertilité ? Extrait des mises à jour en gynécologie médicale. Extrait des mises à jour en gynécologie médicale, Paris, 31^{ème} journées nationales, 2007, 96-109.

Bergman R.V, Kenney R.M. (1975) Representativeness of a uterine biopsy in the mare. *Proc 21^o annual convention of the Amer. Assoc. of Equine Pract*, 1-3/12/1975, Boston, Ed: Frank J, Milne D.V.M, University of Guelph, Ontario, 355-362.

Blandivdekar A.H., Koide S.S., Sheth A.R. (1991) Antifertility effects of human sperm antigen in female rats. *Contraception*, 44, 559-569.

Bonnett B.N., Miller R., Etherington W.G., Martin S.W., Johnson W.H. (1991a) Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows I. Technique, histological criteria and results. *Can J Vet Res.*, 55(2), 155-61.

Bonnett B.N., Miller R., Martin S.W., Etherington W.G., Buckrell B.C. (1991b) Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows II. Correlations between histological criteria. *Can J Vet Res.*, 55(2), 162-7.

Bonnett B.N., Miller R., Gannon V.P., Miller R.B., Etherington W.G. (1991c) Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can J Vet Res.*, 55(2), 168-73.

Bretzlaff K. (1987) Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Prac*, 3, 1987, 593-598.

Carleton C.L. (1997) Clinical examination of the nonpregnant equine female reproductive tract. In : Youngquist and Threlfall, editor. *Current therapy in large animal theriogenology 2*. WB Saunders Compagny, St Louis, 1997, 74-90.

L'équipe ruminants CEVA santé animale. Le cycle œstral de la vache. Reprology.com

Chaffaux S., Recorbet Y., Bhat P., Crespeau F., Thibier M. (1987) Biopsie de l'endomètre au cours du post-partum pathologique chez la vache. *Rec. Med. Vet.*, 163 (2), 199-209.

Chapwanya A., Kieran G.M., Doherty M.L., Callanan J.J., Mee J.F., O'Farrelly C. (2009) Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology*, 71, 1396-1407.

Chapwanya A., Meade K.G., Narciandi F., Stanley P., Mee J.F., Doherty M.L., Callanan J.J., O'Farrelly C. (2010) Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology*, 73, 988-994.

Christensen B.W., Schlafer D.H., Agnew D.W., Wang C., Kozlowski C., Asa C.S. (2012) Diagnostic value of transcervical endometrial biopsies in domestic dogs compared with full-thickness uterine sections. *Reprod. Dom. Anim.*, 47 (Suppl. 6), 342-346.

Cicinelli E., Resta L., Nicoletti R., Zappimulso V., Tartagni M., Saliani N. (2005) Endometrial micropolyps at fluid hysteroscopy suggest the existence of chronic endometritis. *Human Reprod.*, 20 (5), 1386-1389.

Daragon B. (2011) L'inflammation génitale chez la vache : comparaison de l'état inflammatoire des différents compartiments. Thèse Doct Vet ENVA, 72.

De Bois C.H.W., Manspeaker J. (1986) Endometrial biopsy of the bovine. In : Morrow DA, editor *Current therapy in theriogenology*. WB Saunders Compagny, Philadelphia, 1980, 424-6.

De Bosschere H., Ducatelle R., Vermeirsch H., Van Den Broeck W., Coryn M. (2001) Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected?. *Theriogenology* 2001, 55, 1509-1519.

De la Concha-Bermejillo A., Kennedy P.C. (1982) Prognostic value of endometrial biopsy in the mare: a retrospective analysis. *J Am Vet Med Assoc.*, 1982, 181(7), 680-1.

Deguillaume L., Boulouis H.J., Thoumire S., Vorniere C., Constant F., Geffre A., Fournier R., Chastant-Maillard S. (2008) Comparative study of different methods for the diagnosis of chronic endometritis in cows. World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary, 2008, 186.

Deguillaume L., Chastant-Maillard S. (2009) Comment bien diagnostiquer les endométrites de la vache. *Bulletin des GTV*, 49, 101-105.

Deguillaume L. (2010) L'inflammation génitale chez la vache. Thèse Doc Institut des Sciences et Industries du vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech) 2010 :206.

- Deguillaume L., Pineau C., Choukroun H., Fournier R., Chastant-Maillard S.** (2010) Influence of the oestrus cycle stage on post-partum endometrial inflammation in the cow. *Reprod. Dom. Anim*, 45 (suppl 3), 45.
- Deguillaume L., Chastant-Maillard S.** (2012) Physiopathologie et diagnostic des infections utérines chez la vache. *Le Nouveau Praticien*, 5 (21), 19-23.
- Dhaliwal G.S., Murray R.D., Woldehiwet Z.** (2001) Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Anim. Reprod. Sci.*, 67, 2001, 135-152.
- Dhaliwal G.S., England G.C.W, Noakes D.E.** (2002) The effects of endometrial scarification on uterine steroid receptors, bacterial flora and histological structure in the bitch. *Anim. Reprod Sci.*, 2002, 69, 239-249.
- Dijkhuizen A.A., Stelwagen J., Renkema A.** (1985) Economic aspects of reproductive failure in dairy cattle. I. Financial loss at the farm level. *Prev. Vet. Med.*, 3, 251-263.
- Dizien A.** (2008) Etude interspécifique des cytologies génitales pour le diagnostic de l'endomérite : intérêt diagnostique chez la vache. Thèse Doct. Vét, ENVA, 97.
- Downs M., Miller-Liebl D., Fayerer-Hosken R., Caudle A.** (1994) Obtaining a useful uterine biopsy specimen in dogs. *Vet Med*, 89, 1055-9.
- Dawson F.L.M.** (1963) Uterine pathology in bovine infertility. *J Reprod Fert*, 5, 397-407.
- Dumoulin D.** (2004) Pathologie utérine de la vache, depuis les oviductes jusqu'au col. Thèse Doct Vet Lyon, 86.
- Dubuc J., Duffield T.F, Leslie K.E., Walton J.S., LeBlanc S.J.** (2010) Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2010, 93, 5225-5233.
- Eduvie L.O., Osori D.I., Addo P.B., Njoku C.O.** (1984) Bacteriological investigation of the post-partum uterus: relationship to involution and histopathological findings. *Theriogenology*, 21(5), 733-745.
- El-Sheik Ali H., Kitahara G., Tamura Y., Kobayashi I., Hemmi K., Torisu S., Sameshima H., Horii Y., Zaabel S., Kamimura S.** (2013) Presence of a temperature gradient among genital tract portions and the thermal changes within these portions over the estrous cycle in beef cows. *J. Reprod. Dev* 59, 1, 59-65.
- England G.C.W, Russo M.** (2006) Ultrasonographic characteristics of early pregnancy failure in bitches. *Theriogenology*, 2006, 66, 1694-1698.
- Fiala S.M., Esmeraldinon A., Jobim M.I.M, Garbade P., Wolf C.A., Richter G., Gregory R.M., Mattos R.C.** (2010) Endometrial fibrotic changes. Is one biopsy enough to diagnose degenerative changes? *Anim. Reprod. Sci.*, 2010, 121S, 89-90.
- Fontaine E., Levy X., Grellet A., Luc A., Bernex F., Boulouis H.J., Fontbonne A.** (2009) Diagnosis of endometritis in the bitch: a new approach. *Reprod Domest Anim*, 44, 196-199.
- Fontaine E., Fontbonne A., Mir F.** (2011) L'hystérocopie et les biopsies utérines se justifient. *La Semaine Vétérinaire*, n°1438, 34-35.

Fourichon C., Bareille N. (2006) Facteurs de risque des affections post-partum. *Point vét*, n° spécial « Reproduction des ruminants : gestation, néonatalogie et post-partum », 37, 116-121.

Freshman J.L. (1991) Clinical approach to infertility in the cycling bitch. *Vet. Clin. North Am.* 21 ; 427-435.

Frischknecht F, Brühwiler H. (2008) Endométrite/endomyométrite. *Forum med Suisse*, 8(25) ; 471-474.

Gabler C., Drillich M., Fischer C., Holder C., Heuwieser W., Einspanier R. (2009) Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. *Theriogenology*, 71, 993-1004.

Galvao K.N., Greco L.F., Vilela J.M., Sa Filho M.F., Santos J.E. (2009) Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 92, 1532-1542.

Gilbert R.O., Shin S.T., Guard C.L., Erb H.N., Frajblat M. (2005) Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, 64, 1879-1888.

Gier H.T., Marion G.B. (1968) Uterus of the cow after parturition: involutinal changes. *Am. J. Vet. Res.*, 29(1), 83-95.

Gonzalez E., Crowell W.A., Caudle A.B., Thompson F.N. (1985) Morphometric studies of the bovine uterus: microscopic lesions and retrospective reproductive history. *Am. J. Vet. Res.*, 46, 2588-2595.

Gray C.A., Stewart M.D., Johnson G.A., Spencer T.E. (2003). Postpartum uterine involution in sheep: histoarchitecture and changes in endometrial gene expression. *Reproduction*, 125, 185-198.

Greenhoff G.R., Kenney R.M. (1975) Evaluation of reproductive status of non pregnant mares. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1975, 167 (1), 449-458.

Greenwood S.M., Moran J.J. (1981). Chronic endometritis: morphologic and clinical observations. *Obstetric and Gynecology*, 58 (2), 176.

Griffin J.F.T, Hartigan P.J, Nunn W.R. (1974) Non-specific uterine infection and bovine fertility II. Infections patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology* 1, 91-106.

Groppetti D., Pecile A., Arrighi S., Di Giancamillo A., Cremonesi F. (2010) Endometrial cytology and computerized morphometric analysis of epithelial nuclei: a useful tool for reproductive diagnosis in the bitch. *Theriogenology*, 73, 927-941.

Gross L., LeBlanc M.M. (1984) Seasonal variation of histomorphologic features of equine endometrium. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 184 (11), 1379-82.

Günzel-Apel A.R., Wilke M., Aupperle H., Schoon H.A. (2001) Development of a technique for transcervical collection of uterine tissue in bitches. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl 57, 61-5.

- Hammon D.S., Holyoak G.R., Jenson J., Bingham H.R.** (2001) Effects of endometritis at the beginning of the breeding period on reproductive performance in dairy cows. *Am. Assoc. Bov. Prac. Proc.*, 34, 142-143.
- Hanzen C.** (2012-2013) Les infections utérines chez la vache. Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Service de Thériogénologie des animaux de production, 2012-2013, <http://orbi.ulg.ac.be/>, 25-10-2013.
- Hartigan P.J., Griffin J.F.T., Nunn W.R., Murphy J.A.** (1972) An investigation into the causes of reproductive failure in dairy cows. I. Gross and microscopic observations on the genitalia of slaughtered non-pregnant cows. *Irish vet. J.*, 26, 245-247.
- Hendricks K.E., Hansen P.J.** (2010) Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to oxidative stress. *Aust. Vet. J.*, 88, 307-10.
- Immegart H.** (1997) Infertility due to noninflammatory abnormalities of the tubular reproductive tract. In: Youngquist and Threlfall, editor. *Current therapy in large animal theriogenology 2*. WB Saunders Compagny, St Louis, 153-157.
- Johnston S.D, Root Kustritz M.V, Olson P.N.S.** (2001) Canine and feline theriogenology. *Saunders, Philadelphia, 2001, 592 pages.*
- Kalma Y., Granot I., Gnainsky Y., Or Y., Czernobilsky B., Dekel N., Barash A.** (2009) Endometrial biopsy-induced gene modulation : first evidence for the expression of bladder-transmembranal uroplakin Ib in human endometrium. *Fertil. Steril.* 91, 1042-1049.
- Kamada M., Maegawa M., Yan Y.C., Koide S.S., Aono T.** (1999) Antisperm antibody: a monkey wrench in conception/magic bullet of contraception. *J Med Invest*, 46, 19-28.
- Kasimanickam R., Duffield T., Foster R.A., Gartley C.J., Leslie K.E., Walton J.S., Johnson W.H.** (2004) Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 62, 9-23.
- Kasimanickam R., Duffield T., Foster R.A., Gartley C.J., Leslie K.E., Walton J.S., Johnson W.H.** (2005) A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J.*, 46(3), 255-9.
- Kenney R.M.** (1978) Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 172, 241.
- Kenney R.M., Doig P.A.** (1986) Equine endometrial biopsy. In : Morrow DA, editor. *Current therapy in theriogenology 2. Diagnostic, treatment and prevention of reproduction diseases in small and large animals*. WB Saunders Compagny, Philadelphia, 723-729.
- Kübar H., Jalakas M.** (2002) Pathological changes in the reproductive organs of cows and heifers culled because of infertility. *J. Vet. Med. A*, 49, 365-372.
- LeBlanc S.J., Duffield T.F., Leslie K.E., Bateman K.G., Keefe G.P., Walton J.S., Johnson W.H.** (2002) Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci.*, 85(9), 2223-36.

- LeBlanc M.M., Causey R.C.** (2009) Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reprod Dom Anim*, 44 (S3), 10-22.
- Madoz L.V, Giuliadori M.J, Migliorisi A.L., Jaureguiberry M., De la Sota R.L.** (2014) Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci*, 97, 1-7.
- Mann G.E., Lamming G.E.** (1994) Use of repeated biopsies to monitor endometrial oxytocin receptors in the cow. *Vet. Rec.*, 135, 403-5.
- Manspeaker J.E., Haaland M.A., Robi M.G., Edwards G.H., Russek E.** (1984) Endometrial biopsy in the bovine and endometrial pathology that affects fertility. In *Proc. XIIIth world Congress 1984*, on diseases of cattle, Durban, Hoechst ed 2, 818-825.
- McDougall S.** (2005) Gross abnormalities, bacteriology and histological lesions of uteri of dairy cows failing to conceive or maintain pregnancy. *New Zealand Vet J*, 53(4), 253-256.
- Messier S., Higgins R., Couture Y., Morin M.** (1984) Comparison of swabbing and biopsy for studying the flora of the bovine uterus. *Can Vet J*, 25, 283-288.
- Meira E.B.S, Henriques L.C.S, Sa L.R.M, Gregory L.** (2012) Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.*, 95, 2012, 1-5.
- Miller A.N.A., Williams E.J., Sibley K., Herath S., Lane E.A., Fishwick J., Nash D.M., Rycroft A.N., Dobson H., Bryant C.E., Sheldon I.M.** (2007) The effects of *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function in vitro, and on uterine and ovarian function in vivo. *Theriogenology*, 68, 972-980.
- Mir F., Fontaine E., Albaric O., Greer M., Vannier F., Schlafer D.H., Fontbonne A.** (2013) Findings in uterine biopsies obtained by laparotomy from bitches with unexplained infertility or pregnancy loss: an observational study. *Theriogenology*, 79, 312-322.
- Noakes D.E., Parkinson T.J., England G.C.W.** (2009) Veterinary Reproduction and Obstetrics, 9^{ème} ed Elsevier Saunders, London, 582-631.
- Overbeck W., Witte T.S., Heuwieser W.** (2011) Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*, 75, 1311-1318.
- Overbeck W., Jäger K., Schoon H.-A, Witte T.S.** (2013) Comparison of cytological and histological examinations in different locations of the equine uterus-an in vitro study. *Theriogenology*, 79, 1262-1268.
- Pavaux C.** (1981) Eléments d'anatomie. In : Constantin A, Meissonnier E, éditeurs. L'utérus de la vache. Toulouse : Société Française de Buiatrie, 9-53.
- Potdar N., Gelbaya T., Nardo L.G.** (2012) Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure : a systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 25, 561-571.
- Pugliesi G., Scolari SC., Mesquita FS., Maturana Filho M., Araujo ER., Cardoso D., Sales JN., Martin I., Sa Filho M., Bertan CM., Binelli M.** (2014) Impact of probing the

reproductive tract during early pregnancy on fertility of beef cows. *Reprod Dom Anim*, doi : 49(4):e35-9.

Ribeiro A.P.C., Vicente W.R.C, Apparicio M., Gadelha C.R.F., Alves A.E., Covizzi G.J. (2006) Uterine leucocyte infiltration after artificial insemination in bitches. *Theriogenology*, 66, 1462-1464.

Riddle W.T., LeBlanc M.M., Stromberg A.J. (2007) Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a thoroughbred practice. *Theriogenology*, 68, 395-402.

Risco C.A., Youngquist R.S., Dawn Shore M. (1997) Postpartum uterine infections. In : Youngquist and Threlfall, editor. *Current therapy in large animal theriogenology 2*. WB Saunders Company, St Louis, 339-343.

Rosenthal R.C., Meyers W.L., Burke T.J. (1984) Detection of canine antisperm antibodies by indirect immunofluorescence and gelatin agglutination. *Am J Vet Res* 1984, 45, 370-374.

Rossdale P. (1992) Le cheval : reproduction et élevage. Ed Maloine, Paris, 184-185.

Santos N.R., Lamb G.C., Brown D.R., Gilbert R.O. (2009) Postpartum endometrial cytology in beef cows. *Theriogenology*, 71, 739-745.

Schlafer D.H. (2012) Diseases of the canine uterus. *Reprod. Dom. Anim.* 47 (S6), 318-322.

Schlafer D.H. (2013) Histopathologic features of canine uterine diseases. *Proc. 16th EVSSAR Congress Toulouse, 5-6 juillet 2013*, 71-74

Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. (2006) Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65, 1516-30.

Sheldon I.M., Cronin J., Goetze L., Donofrio G. Schuberth H.J. (2009) Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod* 81, 1025-1032.

Smith O. (2006) Canine pyometra. *Theriogenology*, 66, 610-612.

Soto P., Natke R.P., Hansen P.J. (2003) Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 50, 263-272.

Tibary A. (1997) Breeding soundness evaluation and subfertility in female llamas and alpacas. In : Youngquist and Threlfall, editor. *Current therapy in large animal theriogenology 2*. WB Saunders Company, St Louis, 878-883.

Tibary A., Bakkoury M. (1994) Reproduction Equine, tome I, La jument, ed Actes, Rabat, 129-139.

Trigal B., Diez C., Munoz M., Caamano J.N., Goyache F., Correia-Alvarez E., Corrales F.J, Mora M.I., Carrocera S., Martin D., Gomez E. (2014) Elements of functional genital asymmetry in the cow. *Reprod fertility and development*, 26, 493-501.

Van Camp S.D. (1988) Endometrial biopsy of the mare. A review and update. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2, 229-45.

Van Wyk L.C, Van Niekerk C.H., Belonje P.C. (1972) Involution of the post-partum uterus of the ewe. *J. S. Af. Vet. Ass.*, 43 (1), 1972, 19-33.

Verwaerde P. (2012) Notions de base en anesthésiologie. Cours ENVT 3^{ème} année.

Waelchli R.O., Winder N.C. (1989) Distribution of histological lesions in the equine endometrium. *Vet. Rec.*, 124, 271-3.

Walter J., Neuberg K.P., Failing K., Wehrend A. (2012) Cytological diagnosis of endometritis in the mare: investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. *Anim. Reprod. Sci.*, 132, 178-186.

Watts J.R., Wright P.J. (1995) Investigating uterine disease in the bitch: uterine cannulation for cytology, microbiology and hysteroscopy. *J. Small. Anim. Pract.*, 36, 201-6.

Watts J.R., Wright P.J., Lee C.S., Whithear K.G. (1997) New techniques using transcervical uterine cannulation for the diagnosis of uterine disorders in bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 51, 283-93.

Wilson M.S. (2001) Transcervical insemination techniques in the bitch. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 31, 291-304.

Wolfsdorf K., Caudle A.B. Inflammation of the tubular reproductive tract of the mare. *In* : Youngquist and Threlfall, editors. *Current therapy in large animal Theriogenology 2*. WB Saunders Compagny, St Louis, 158-167.

Wyers M., Rey J.M. (1987) La biopsie de l'endomètre chez la jument. *Rec. Méd. Vét.*, 163 (2), 165-170.

Zaayer D., Van der Horst C.J. (1986) Non-fertility in cows: treatment with PGF and investigation of uterine biopsies. *Cytobios*, 1986, 45, 55-70.

NOM : LARROQUE

Prénom : Elodie

TITRE : COMPARAISON DES DONNEES CYTOLOGIQUES ET HISTOLOGIQUES POUR LE DIAGNOSTIC DE L'ENDOMETRITE CHEZ LA VACHE

La technique de référence pour le diagnostic des endométrites de la vache en post-partum, est actuellement la cytologie, sur la base d'un prélèvement réalisé à l'aide d'une cytobrosse stérile au niveau du corps utérin. Néanmoins, la cytologie n'évalue que l'état de la muqueuse et de plus en un seul site de l'appareil génital. L'objectif de cette étude était double : évaluer la concordance entre les résultats cytologiques et les résultats histologiques et apprécier l'homogénéité de l'inflammation au sein de l'appareil génital. Une étude *ex vivo* a été réalisée sur 100 utérus collectés à l'abattoir en réalisant deux prélèvements à 4 sites différents de l'utérus (col, corps utérin, corne droite et corne gauche), un pour l'examen cytologique et un pour l'histologie. D'après cette étude, pour un secteur donné, on observe une relation entre la sévérité des notes histologiques et le taux de neutrophiles sur le frottis, et entre la sévérité des notes histologiques et l'augmentation de la proportion de vaches diagnostiquées malades par la cytologie. Néanmoins, la concordance entre les résultats des deux techniques est moyenne ($\kappa_{\text{cornes utérines}}=0,56-0,59$). Nous avons pu définir un seuil de la note d'histologie pathologique de 3 pour la couche profonde et également de 3 pour la lame entière du corps utérin. L'épithélium, souvent absent des lames, n'est pas indispensable à la notation. En ce qui concerne l'homogénéité de l'inflammation au sein de l'appareil génital, l'histologie et la cytologie montrent toutes deux l'existence de deux compartiments : l'utérus d'une part (corps et les deux cornes) et le col d'autre part. Les taux de neutrophiles des deux cornes et du corps utérin sont fortement concordants ($\kappa=0,63-0,75$), les notes histologiques de ces secteurs sont fortement à très fortement concordantes ($\kappa=0,64-0,87$). Au contraire, les taux de neutrophiles du secteur utérin (cornes et corps utérin) et ceux du col ne sont que faiblement concordants ($\kappa=0,28-0,37$) et les notes d'histologie sont légèrement à moyennement concordantes ($\kappa=0,25-0,44$). Quant à l'homogénéité au sein de la paroi utérine (entre l'épithélium et les couches profondes), elle a été évaluée par l'examen histologique qui a montré une forte concordance entre eux, uniquement pour le secteur utérin ($\kappa=0,67-0,74$). En conclusion, la cytologie ne reflèterait pas de façon convenable l'inflammation de la totalité de la paroi. Néanmoins, une étude complémentaire entre les résultats de l'examen histologique et les performances de reproduction de la vache serait indispensable pour fixer une note seuil définissant un état inflammatoire pathologique. Ce travail montre également le clivage de l'appareil génital en termes de statut inflammatoire entre le secteur cervical et le secteur utérin : en pratique, il n'est donc pas possible de substituer un prélèvement cervical à un prélèvement endométrial, plus complexe à réaliser.

Mots-clés : COL UTERIN, ENDOMETRITE, CERVICITE, INFLAMMATION, POST-PARTUM, CYTOLOGIE, HISTOLOGIE, BIOPSIE UTERINE, VACHE.

TITLE : COMPARISON OF CYTOLOGY AND HISTOLOGY FOR ENDOMETRITIS DIAGNOSIS IN THE COW

Reference endometritis diagnosis currently relies on endometrial cytology, performed with a cytobrush into the uterine corpus. Nevertheless, cytology only evaluates the inflammatory status of the mucosa, and only at a specific location. This study aimed at evaluating the concordance between cytology and histology results and at appreciating the homogeneity of inflammation within the genital tract. One hundred uterus were collected at slaughterhouse and two samples were performed at each of 4 different sites (cervix, uterine corpus, right horn, left horn), one prepared for cytology and the second for histology. At a given site, the severity of the histological score is correlated with the percentage of neutrophils on smear and with the proportion of cows affected by endometritis. Nevertheless, the concordance between the results of both techniques is moderate ($\kappa=0,56-0,59$). A threshold for the histological score has been determined at 3 for the deeper layers of the uterine wall and also 3 for the global note in the uterine corpus. Concerning the homogeneity of inflammation within the genital tract, histology and cytology both evidence two distinct compartments: uterus on one hand (two horns and corpus), cervix on the other hand. Percentage of neutrophils in both horns and in the corpus are highly concordant ($\kappa=0,63-0,75$), histological scores are highly or very highly concordant ($\kappa=0,64-0,87$). At the opposite, the percentage of neutrophils in the uterine compartment and those of the cervix are only weakly concordant ($\kappa=0,28-0,37$), histological scores weakly to moderately concordant ($\kappa=0,25-0,44$). Concerning the homogeneity within the uterine wall, histological scores of the epithelium and in the deeper layers) are highly concordant, but only in the uterine compartment ($\kappa=0,67-0,74$). In conclusion, cytology does not reliably reflect the inflammation of the whole genital tract. Nevertheless, further studies are required to evaluate the relationship between histological scoring and reproductive performances of the cow. This work also demonstrates the distinction within the genital tract between uterine and cervical compartments in terms of inflammation. In practice, this implies that endocervical sampling cannot be advised in replacement of the endometrial sample, much more complex to perform.

Key words : UTERINE CERVIX, ENDOMETRITIS, CERVICITIS, INFLAMMATION, POSTPARTUM, CYTOLOGY, HISTOLOGY, UTERINE BIOPSY, BOVINE, COW