



592THV-1

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



Université SAAD DAHLEB-BLIDA  
Faculté Des Sciences Agrovétérinaires Et Biologiques  
Département Des Sciences vétérinaires

Mémoire De Fin D'étude Pour L'obtention Du  
Diplôme De Docteur Vétérinaire

**Thème :**

Vulgarisation de l'utilisation des frottis vaginaux  
chez la chienne  
(Support vidéo)

**Présenté par :**

KEBAILY MERIEM

MAMRI SAMAH

**Encadré par :**

Mr.M.DJOUDI

**MEMBRES DU JURY :**

**PRESIDENT: Mr. R.BELLALA**

(MA.USD)

**EXAMINATEUR : M<sup>me</sup> .N.OUAKLI**

(MA.USD)

*Promotion 2011/2012*

# remerciement

Nous tenons a exprimer nos sincères remerciements a :

Notre promoteur *Dr- DJOUDI.MUSTAPHA* qui nous a guide tout le long de ce travail par son soutien, sa patience, sa disponibilité et sa gentillesse. Hommage respectueux

A *Dr-Ouakfi.Nadia* et *Dr- Bellala.Redha* pour nous avoir fait l'honneur de juger ce travail et les remercier pour le temps qu'ils nous ont accorde.

Tous nos professeurs du département vétérinaire à l'université de Blida.

Nos très chers parents, pour leur encouragement leur soutien, leur patience et leur amour.

*A nos mères*, qui nous toujours soutenues et encouragées. Merci d'être les meilleures des mamans!

*A nos pères*, qui sont pour nous un modèle de réussite et qui nous pousse toujours à aller plus loin et plus haut.

Notre grande reconnaissance a toutes les personnes qui ont contribue a la réalisation de ce travail et qui nous ont été d'une aide très précieuse surtout : *Mr-OUNESS HICHEM* qu'il trouve ici l'expression de nos profonde gratitude.

# Dédicace

*C'est avec immense plaisir que je dédie ce travail a mes très chers parents que je remercierais jamais assez pour le soutien qu'ils m'apportent durant mon parcours.*

*A mes très chers frères : **Marouane, Hichem, Noha** je vous remercie pour tout ce qu'ils ont toujours fait pour moi c est aussi grâce a eux j'en suis arrive la aujourd'hui.*

*A mes tantes et oncles que j aime énormément*

*UN remerciement particuliers a **Dr HICHEM OUNESS** qui ma beaucoup soutenu et qui à même contribue dans la réalisation de ce travail.*

*A Isra ,Meriem ben sidi et monira, j ai en effet rarement eu l occasion de vous dire que vous comptez énormément pour moi et j ai beaucoup de chance pour de vous avoir.*

*Tout mes amies avec lesquelles j ai passé des moments inoubliable: Jouhare, Farida, les 2 Hayat, Aicha, mima, Tenhinane, Lilia.*

*A tout les membres de l' association BIAV*

***MERTEM** je te remercie de m'avoir accompagne dans mes études et d avoir croire en notre amitié.*

*A toute la promotion 5 eme année vétérinaire 2012.*

# DÉDICACE

Je dédis ce travail à :

*Ma mère* qui m'apprendre qu'es que l'amour entre une maman et sa fille  
.....Merci d'être la meilleur des mamans

*Mon cher père* qui était mon exemple de réussite et qui m'incite  
toujours d'aller plus loin...dieu merci car j'ai un père comme toi.

Mes frères *AMRANE \_ YASSER* et mon espoir *ANESS*, merci d'être  
à côté de moi

Mes deux petits anges *SOUMIA \_ NOUR-EL-ISLAM* ..... merci  
d'être mon porte bonheur

Mes grandes mères *SADIA-FATIMA*.....j'ai réussi grâce à vos  
prières.

Toute la famille *KEBAILY, KEFIF* surtout *ZAHRA-SARA-TOUTA-  
FATIHA*

Tout mes enseignants qui depuis mon enfance m'ont transmis le goût  
d'apprendre.

*Mr. Nadjem* mon enseignant au primaire....je suis où vous avez toujours  
rêvé que je sois.

À mes meilleurs amis d'enfances :

*ZINOUBA, ASMA, IMEN, IKRAM, CHAFIA, LOUBNA,  
RABIHA*

Pour les moments passés ensemble.

Mes amies à l'université :

*DJOUHAR, JAMILA, ISRA, LILIA, ASMA, LILA YASMINA,  
Ainsi que RAHIMA, BARKAHOM, NABILA, NADIA, WASSILA,  
MANEL et HOUDA*

-et tous les autres pour les merveilleuses années passées et ceux à venir.

Mes collègues du *groupe '5'* et d'association « *BIAV* »

Ma belle *SAMAH*.....merci d'être à côté de moi, ainsi que *HICHEM*  
et *AREZKI* je n'oublie jamais notre amitié.

La fabuleuse Promotion 2012....que Dieu soit toujours avec vous.

*MERJEM*

## *RESUME*

La reproduction canine se distingue de la reproduction des autres espèces domestiques par les particularités physiologique de l'ovulation, de la maturation ovocytaire et du développement embryonnaire.

Cette étude du cycle œstral de la chienne a pour objectif d'évaluer l'intérêt des frottis vaginaux dans la détermination du moment optimale de la saillie a partir de critères cytologique simple et peu couteuse qui peut être utilise au sein des cliniques vétérinaires.

Dans la première partie bibliographique, nous décrivons le cycle œstral de la chienne, puis la mise en pratique des frottis vaginaux.

La deuxième partie est consacrée à notre étude expérimentale. Nous avons étudié 11 frottis vaginaux effectués a la clinique du département vétérinaire Blida et qui ont été observes sous microscope optique.

En outre, cette étude est accompagnée d'un support vidéo expliquant la technique de réalisation des frottis vaginaux.

**MOT CLES :** REPRODUCTION, CYCLE OESTRAL, CHALEUR, OVULATION, PERIODE FERTILE, PERIODE DE FECONDABILITE, FROTTIS VAGINAUX, PROGESTERONE, CHIENNE, CARNIVORE DOMESTIQUE.

## Abstract:

Canine reproduction differs from reproduction of other domestic species with the physiologic particularities of ovulation, oocyte maturation and embryonic development.

This study of the estrus cycle of the bitch aims to evaluate the interest of vaginal smears in the determination of the optimal period of the projection based on simple and inexpensive cytological criteria that can be used in veterinary clinics.

In the first bibliographic part, we describe the estrus cycle of the bitch, and then the practice of vaginal smears.

The second part is devoted to our experimental study. We have studied 11 vaginal smears carried out at the clinic of the veterinary department at Blida that were observed under the microscope...

By the way, this study is pillared of supporting video which explain the technique of realization of smears vaginal.

**KEY WORDS:** REPRODUCTION, ESTRUS CYCLE, HEAT, OVULATION, FERILE PERODE, FERTILIZATION PERIOD, VAGONAL SMEARS, PROGESTERONE, BOTCH, DOMESTIC CARNIVORES.

## ملخص

### تعميم استخدام طريقة الحك المهبلي لدى أنثى الكلاب ( مدعمة بفيديو )

التكاثر عند الكلاب يختلف عن تكاثر الحيوانات الأليفة الأخرى بالخصائص الفيزيولوجية للتبويض، للنضج البيضوي والنضج الجنيني.

هذه الدراسة للدورة النزوية لدى أنثى الكلاب الهدف منها تقييم أهمية الحك المهبلي لتحديد فترة التلقيح انطلاقاً من معايير بسيطة وغير مكلفة يمكن استعمالها في العيادات البيطرية.

في الجزء الأول، هناك تذكير بأهم الخصائص الفيزيولوجية المتعلقة بالتكاثر عند أنثى الكلاب.

بعد ذلك تم وصف طرق الحك المهبلي.

في الجزء الثاني للدراسة التجريبية، لقد قمنا بدراسة 11 عملية حك مهبلي منجزة بالعيادة البيطرية لجامعة سعد دحلب بالبلدية .

كما أن هذه الدراسة مدعمة بفيديو يشرح طريقة تطبيق الحك المهبلي عند أنثى الكلاب.

مفتاح: تكاثر، دورة نزوية ، احتياج ، تبويض، فترة تخصيب، فترة تلقيح، فحص الحك المهبلي، أنثى الكلاب .

## **TABLE DES MATIERES**

Remerciement

Dédicaces

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Glossaire

Introduction

### **I-ETUDE BIBLIOGRAPHIAUE**

CHAPITRE 1 : Etude du cycle œstrale chez la chienne .....	1
1. Représentation générale de l'appareil reproducteur de la chienne.....	1
1-1. L'UTERUS.....	1
1-2. Le vagin.....	2
2. Rappel physiologique.....	2
2-1. la puberté.....	2
2-2. Le rythme des chaleurs et saisonnalité.....	5
2-2-1. Le rythme des chaleurs.....	5
2-2-2. La Saisonnalité.....	6
2-3. Cycle œstral de la chienne.....	7
2-3-1. Introduction.....	7
2-3-2. Les différents des stades du cycle œstral .....	7
2-3-2-1. Le proestrus.....	7
2-3-2-2. L'œstrus.....	8
2-3-2-3. Le metoestrus.....	8
2-3-2-4. L' Anoestrus.....	8



3. Equilibre endocrinien du cycle sexuel.....	12
3-1. Généralité.....	12
3-1-1. Les hormones du cycle.....	12
3-1-2. Les facteurs hypothalamique.....	12
3-1-3. Les facteurs hypophysaires.....	12
3-1-3-1. La FSH.....	12
3-1-3-1. La LH.....	12
3-1-4. Les stéroïdes ovariens.....	13
3-1-4-1. Les œstrogène.....	13
3-1-4-2. La progestérone.....	13
3-1-4-3. Les cibernines.....	13
3-1-5. Profil hormonal du cycle.....	14
3-1-5-1. L'anoestrus.....	14
3-1-5-2. Le proestrus.....	14
3-1-5-3. L'oestrus.....	15
3-1-5-4. Le metoestrus.....	15
4. Les modifications histologiques au cours du cycle.....	16
4-1. Le cycle ovarien.....	16
4-1-1. Définition.....	16
4-1-2. La phase folliculaire.....	16
4-1-3. La phase lutéale.....	17
CHAPITRE 2. Frottis vaginaux et cytologie vaginale.....	18
2-1. Généralité.....	18
2-2. Technique de réalisation d'un frotti vaginal.....	18
2-2-1. Techniques de prélèvement.....	18
2-2-1-1. Prélèvement avec une pipette.....	18

2-2-1-2.Ecouvillonnage.....	18
2-2-2.Etalement.....	19
2-2-3.Fixation.....	20
2-2-4.Coloration.....	20
2-2-4-1.La coloration de Hariss Schorr.....	20
2-2-4-2.La coloration de May-Grünwald-Giemsa.....	21
2-2-4-3. Le bleu de méthylène.....	21
2-3.Les types cellulaires observés sur les frottis vaginaux.....	21
2-4.Cycle sexuel et frottis vaginaux.....	22
2-4-1.Proestrus.....	22
2-4-2.Oestrus.....	24
2-4-3.Metoestrus.....	24
2-4-4.Anoestrus.....	24
2-5.Les index cytologiques.....	25
2-5-1.L'index eosinophylique.....	25
2-5-1-1. La définition.....	25
2-5-2.L'index caryopycnotique.....	26
2-5-2-1. La définition.....	26
2-5-3.L'index superficiel.....	26
2-5-3-1.La définition.....	26
2-6.Intérêts et limites.....	26
II- ETUDE EXPERIMENTALE.....	28
II-1. Objectifs.....	28
II-2. Matériel et méthode.....	28
II-2-1.Les animaux.....	28
II-2-2.Choix de l'échantillon.....	28
II-3 .Méthode.....	29

II-3-1.L'observation des lames.....	29
II-3-2. La classification des cellules.....	29
II-3-2-1 Les cellules parabasales.....	29
II-3-2.2 Les cellules intermédiaire.....	30
II-3-2.3 Les cellules superficielles.....	30
CONCLUSION.....	31

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

## Liste des figures

Figure 1: Distribution de l'interoestrus chez la chienne.....	05
Figure 2: Durée de l'interoestrus suivant chez les femelles gestantes , et chez les non gestantes en fonction du mois de l'année où elles ont présenté des chaleurs.....	06
Figure 3: Survenue du proestrus chez la chienne en fonction du mois de l'année.....	06
Figure 4: Ecoulements vulvaires séro-hémorragiques.....	07
Figure 5: Oedème de la vulve et du périnée d'une chienne en début de proestrus.....	07
Figure 6: Evolution hormonale (LH, Progestérone et Oestradiol) au cour du cycle sexuel chez la chienne.....	09
Figure 7: Le cycle oestral canin .....	11
Figure 8: Représentation schématique des variations sériques hormonales en œstrogènes, progestérone, LH, FSH, prolactine, testostérone, au cours du cycle sexuel de la chienne, et corrélation avec les différentes phases du cycle œstral .....	15
Figure 9: Rappels anatomiques et technique de prélèvement.....	18
Figure 10 : Technique de prélèvement par écouvillonnage.....	19
Figure 11: Technique de prélèvement à l'aide d'un spéculum.....	19
Figure 12: Etalement d'un écouvillon sur une lame de microscope.....	19
Figure 13: Epithélium pavimenteux non kératinisé pluristratifié .....	21
Figure 14: Les cellules du frottis vaginal.....	22

Figure 15: Frottis de proestrus moyen .....	22
Figure 16: Frottis d'oestrus .....	24
Figure 17: Frottis de metoestrus.....	24
Figure 18: Frottis d'anoestrus .....	24

## *Liste des tableaux*

Tableau 1: Age de la puberté dans certaines races .....	04
Tableau 2 : Le cycle œstral de la chienne.....	10
Tableau 3: Coloration de Harris-Shorr .....	20
Tableau 4: Coloration Diff-Quick <sup>(R)</sup> .....	21
Tableau 5: Présentation de l'aspect des frottis vaginaux après étalement, fixation et coloration en fonction des phases sexuel de la chie.....	23

## GLOSSAIRE

Cytoplasme Acidophile : une cellule ou une zone cellulaire est acidophile lorsqu'elle présente une affinité sélective pour un colorant qui est sous forme anionique (la partie colorante est chargée négativement). Parmi les colorants acides les plus utilisés : l'éosine, l'organe G, la fushine acide, le bleu d'aniline et le vert lumière <sup>(1)</sup>

Cytoplasme Basophile : A l'inverse de l'acidophilie, la basophilie d'une structure ou d'une cellule dans son ensemble correspond a une affinité dominante pour un colorant basique, c'est-à-dire une molécules dont la partie colorante présente des charges positive. Un tel colorant aura la faculté de colorer des structures ou des zones cytoplasmiques riches en charge négatives comme les acides nucléique par exemple. Parmi les colorants basiques : le bleu de toluidine et le bleu de méthylène. <sup>(1)</sup>

## *Introduction*

Les études sur la reproduction chez la chienne ont débuté dès le début du XXème siècle. Ainsi en 1900 Walter Heape a défini les différentes phases du cycle sexuel. En 1931 Herbert McLean Evans et Herold Harrison Cole, ont les premiers, étudié les frottis vaginaux.

Enfin, dans les années 60 et 70 de très nombreuses recherches ont permis de mieux connaître l'endocrinologie sexuelle femelle.

Par la suite, la médecine vétérinaire du contrôle de la reproduction chez les carnivores domestiques a connu un essor très important. Celle-ci tend alors à ressembler à celle déjà pratiquée chez les animaux de rente : sélection des reproducteurs, recherche de la période optimale de fécondité, banques de semence et insémination artificielle

Notre mémoire expérimentale, vise à étudier l'intérêt des frottis vaginaux dans l'identification des différentes phases du cycle œstral et la détermination du moment optimal de la saillie. Les frottis vaginaux sont une technique cytologique simple, et peu coûteuse pouvant être employée au sein des cliniques vétérinaires, mais manquant de précision.

En outre, cette mémoire est renforcée par un support vidéo expliquant la technique de réalisation d'un frottis vaginale



# PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1 .Représentation générale de l'appareil reproducteur de la chienne

Les organes génitaux de la chienne comprennent dans l'ordre : Les ovaires, les oviductes, l'utérus, le vagin, le clitoris et la vulve. Dans notre étude on s'intéresse beaucoup plus de l'utérus.

### 1.1.L'UTERUS

L'utérus de la chienne se compose d'un corps bref (2-3cm en moyenne, toutes races confondues) qui se poursuit crânialement par de deux longues cornes (9-10cm) grêles, uniformes et divergentes, incurvées dorsalement. Cet utérus est qualifié de bipartite, c'est-à-dire que les deux cornes sont unifiées sur une courte partie. Le col représente la limite caudale de l'utérus. C'est un orifice permettant la communication entre le vagin et l'utérus, ou à l'inverse assurant l'étanchéité de la cavité utérine. Il mesure environ 1cm de long.

La stabilité de la position du corps de l'utérus dans la cavité pelvienne est assurée par les ligaments larges. Ceux-ci fixent fortement le vagin, et donc l'utérus, en région sous lombaire. Il est attaché à la partie crâniale de la corne utérine ipsilatérale et caudalement il est la continuation du ligament propre de l'ovaire. En revanche, les cornes utérines ont une position relativement lâche dans l'abdomen.

L'irrigation artérielle utérine est assurée par les artères ovarienne et utérine, provenant de l'aorte. Les veines ovarienne et utérine, suivant le même trajet que les artères correspondantes excepté concernant leur terminaison, se chargent de l'irrigation veineuse. La veine ovarienne droite rejoint la veine cave caudale tandis que la veine ovarienne gauche pénètre dans la veine rénale gauche.

Le plexus pelvien assure l'innervation sympathique et parasympathique de l'utérus. Ainsi les nerfs hypogastriques droit et gauche arrivent au plexus et sont responsables de l'innervation sympathique tandis l'innervation parasympathique est effectuée par les nerfs pelviens. Des fibres viscérales afférentes atteignent l'utérus via les nerfs pelviens et le plexus pelvien.(11)

### 1 .2.Le vagin

Le vagin est un conduit impair et médian qui s'étend du col utérin au vestibule, il mesure 12 à 15 cm chez une chienne de taille moyenne.il se caractérise par un vestibule long (5 a 6 cm) dont l'orientation oblique dorso-ventralement est pratiquement verticale, et fait une sorte de coude avec le reste du vagin, beaucoup plus horizontal. (27)

La paroi du vagin est facilement mobilisable en raison des nombreux plis longitudinaux qui permettent à la lumière vaginale de s'accommoder à la dilatation des bulbes érectiles du gland du pénis en érection lors du coït, elle est également dotée à son extrémité postérieure d'un sphincter qui se resserre très fortement en arrière de la verge du male ce qui permet de maintenir l'érection plus longtemps et de déclencher des contractions fortes du vagin favorisant la remontée des spermatozoïdes à travers le col. (27)

## 2. Rappel physiologique

### 2.1. la puberté

La puberté correspond à une étape charnière dans la vie de la chienne. Elle est définie comme le moment où la capacité à se reproduire est effective. Elle marque chez la chienne le début de l'activité cyclique des ovaires et la maturité de l'axe hypothalamus. Hypophyse. Gonades. Cliniquement, cela correspond chez la chienne à la survenue des premières chaleurs.

Elle intervient entre le moment où les chiennes ont atteint 2/3 de leur poids adulte(14) et la fin de leur croissance (31, 13).

Cependant il existe des variations très importantes intra et interraciales. Le beagle, par exemple, présente ses premières chaleurs entre 7 et 10 mois en moyenne. Dans un cadre expérimental strictement défini, le premier proestrus est survenu entre 6 et 13 mois (5, 25, 18, 31).

La puberté débute entre 6 et 10 mois pour les chiennes de petit format. Bien que la survenue des premières chaleurs se produise aussi avant l'âge d'un an, les chiennes de grand format peuvent être impubères jusqu'à 18 voire 24 mois (25, 18, 31)

D'autres facteurs interviennent dans l'âge d'apparition des premières chaleurs. Les chiennes élevées par l'homme sont plus tardives que les chiennes vivant en liberté. En revanche, le climat ou la nutrition ne semblent pas influencer l'apparition de la puberté. La période de la puberté est plutôt courte de 4 à 6 semaines. On parle de :

- phase pré-pubertaire (à partir de 10 à 12 semaines).
- phase de puberté (jusqu'à l'âge adulte où le chien atteint sa maturité sociale).
- phase d'adolescence. (L'âge adulte entre 18 et 36 mois selon la race du chien. Cette phase est très importante pour son développement, sa vie future et sa relation avec le maître va se former).

Le cycle œstral des chiennes pubères peut différer de celui des chiennes adultes. Lors du premier cycle on peut observer de «fausses chaleurs» (« split heat » ou « false heat »). Les chiennes présentent des signes de chaleurs tels que des écoulements vulvaires séro-hémorragiques, Un œdème vulvaire, ou l'attraction des mâles. Cependant après quelques jours, ces signes rétrocedent. On observera un véritable œstrus plusieurs semaines après (une semaine à deux mois) (19,25,5,14).

Les chiennes pubères peuvent présenter également des chaleurs silencieuses, durant lesquelles une ovulation se produit en absence d'un comportement de proœstrus et d'œstrus ou de signe clinique notable. (18,14).

Ceci s'explique par des concentrations circulantes très réduites de LH, d'œstradiol et de progestérone. (34,25). La capacité maximale de reproduction n'est pas atteinte avant le deuxième, troisième voire le quatrième cycle (30,13).

C'est pourquoi une chienne ne doit être mise à la reproduction qu'à partir de l'âge de deux ans, et après que le propriétaire ait observé un cycle sexuel normal et complet (13).

Il n'y a pas de ménopause chez les chiennes, les chaleurs dureront donc toute la vie de l'animal. Les chaleurs ont toutefois tendance à s'espacer et à devenir plus discrètes avec l'âge, mais même ralentie, l'activité hormonale continue.

Tableau 1 Age de la puberté dans certaines races (d'après Johnston et al. 2001 a).

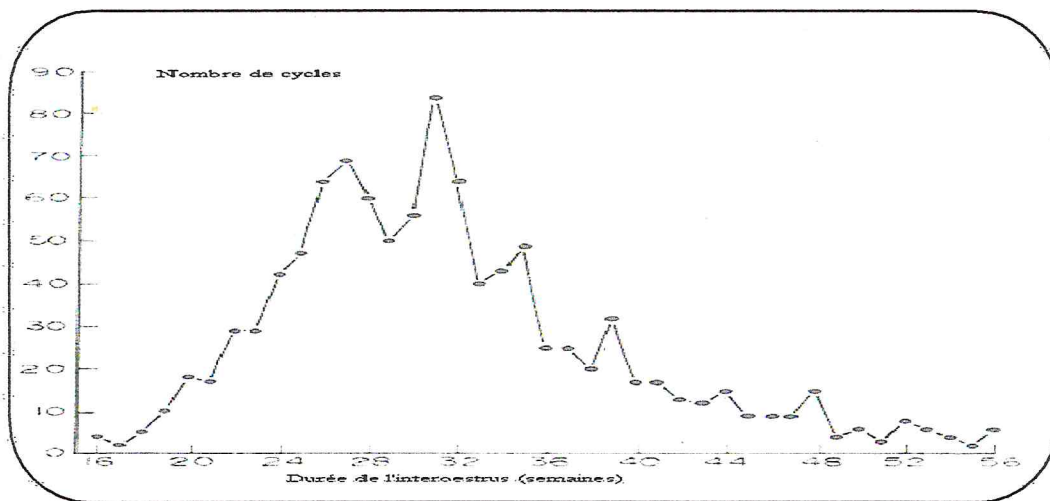
Races	Poids adulte (kg)	Age à la puberté (mois)	Races	Poids adulte (kg)	Age à la puberté (mois)
Airedale Terrier	22	15	Mastiff	57	11-12
Akita Inu	43	5	Montagne des Pyrénées	41	12
American Staffordshire Terrier	22	10	Petit Lévrier Italien	3	18-24
Barzoï	34	15-18	Pinscher	3	8-14
Basenji	10	10	Rottweiler	39	8
Bearded Collie	20	8-12	Saint Bernard	68	9-15
Berger Australien	16	6-18	Saint Hubert	41	12
Bichon Frisé	8	8-9	Saluki	20	8-24
Border Collie	19	6-8	Samoyede	18	jusqu'à 12
Bouvier Bernois	29	9-12	Schipperke	8	12-24
Boxer	28	8-24	Setter Anglais	27	7-20
Bull Terrier	20	7-11	Spitz Loup	18	8-18
Bullmastiff	45	6-16	Tervueren	32	10-12
Caniche moyen	29	12-15	Welsh Corgi	11	9
Carlin	7	9-12	Welsh Springer Spaniel	17	12
Cavalier King Charles	8	6-9	Whippet	10	12-24
Clumber Spaniel	24	jusqu'à 24	Yorkshire Terrier	3	8-16
Dogue Allemand	45	jusqu'à 18			
Epagneul breton	16	9-12			
Golden Retriever	29	9-11			
Greyhound	29	11-30			
Griffon Bruxellois	4	jusqu'à 18			
Irish Wolfhound	33	jusqu'à 16			
Komondor	49	12			
Lakeland Terrier	7	jusqu'à 24			
Lévrier Afghan	22	7-30			

## 2.2 .le rythme des chaleurs et saisonnalité

### 2.2.1.Le rythme des chaleurs

L'interœstrus est la période qui s'étend de la fin d'un épisode de chaleur jusqu'au début du proœstrus suivant. Les chiennes sont habituellement en chaleur en moyenne tous les 7 mois avec un « intervalle moyen » de 5 à 11 mois). Ce rythme doit rester constant durant la majeure partie de la vie de l'animal (5-18-31) mais l'intervalle peut être plus court ou nettement plus long. Chez certaines races, la chienne n'a qu'une saison de chaleurs par an. Les chaleurs sont parfois irrégulières, mais rien d'anormal à cela. L'ensemble du phénomène dure environ trois semaines).

La phase de repos sexuel est donc très importante



**Figure 1:** Distribution de l'interœstrus chez la chienne (d'après 1094 cycles (Christie et Bell 1971a)).

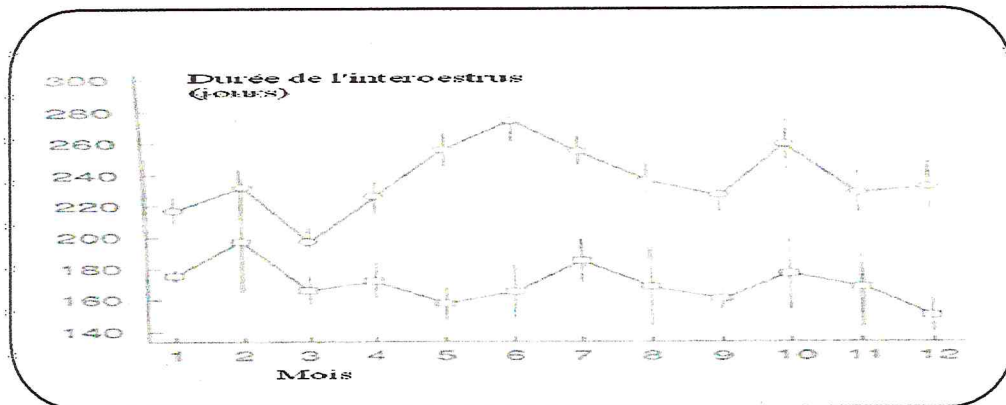
Dans une étude effectuée sur des animaux de même race (des chiennes beagles), l'interœstrus peut varier entre 3.5 et 13 mois (5).

Il apparaît que les chiennes de petit format ont souvent un interœstrus plus court que celles de plus grand format. Cependant par exemple, le berger allemand présente plus de cycles œstraux que le boston terrier (31). Il existe une exception concernant les chiennes de race africaine telle que le basenji ; celles-ci ne sont cyclées qu'une fois par an.

L'héritabilité de ce caractère a été estimée à 35% (18).

A partir de l'âge de 5 à 7 ans selon les études, cet intervalle tend à augmenter de manière physiologique (32). Dans une expérimentation menée sur 12 chiennes beagles par Andersen en 1973 (13), l'intervalle passe de 240 à 332 jours après qu'elles aient atteint 8 ans.

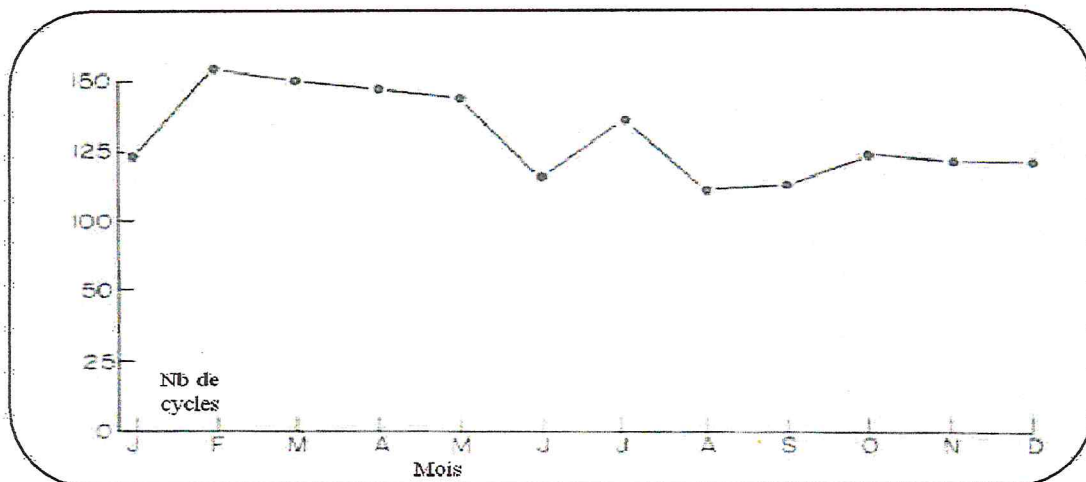
La gestation ainsi que la lactation augmenteraient également cet intervalle. (4, 21).



**Figure 2:** Durée de l'interoestrus suivant chez les femelle gestante,et chez les non gestantes en fonction du mois de l'année où elles ont présenté des chaleurs.(Lindforsberg et Wallèn1992).

**2.2.2. La Saisonnalité**

L'influence de la saison est moins marquée chez le chien que chez les canidés sauvages (13). Les chaleurs sont observées sur l'ensemble de l'année. Cependant une étude qui a compilé les inscriptions de 87 880 chiots à l'American Kennel Club de 1971 à 1973, montre des valeurs plus élevées qui correspondent à l'oestrus. Il survient à la fin de l'hiver et pendant le printemps (2, 33, 21).



**Figure 3:** Survenue du proestrus chez la chienne en fonction du mois de l'année (établi à partir de 1561 cycles (Christie et Bell 1971a)).

Cette saisonnalité est influencée par l'environnement. Des beagles maintenus en extérieur exprimaient ce pic en mai (18), ce que ne montraient pas des chiennes gardées en intérieur (21). Le rythme circadien de la prolactine chez les femelles vivant en extérieur pourrait expliquer ce fait (20).

## 2.3. Cycle œstral de la chienne

### 2.3.1. Introduction

Chienne est une espèce monoœstrienne ovulant 1 à 2 fois par an. 65 % des chiennes domestiques ont 2 cycles par an, 8.7% ont 3 cycles. L'âge à la puberté de la chienne est situé entre 7 et 12 mois (6-23 mois). Le cycle œstral de la chienne présente des particularités qui justifient sa présentation sous la forme d'un cas particulier.

### 2.3.2. Les différents des stades du cycle œstral

#### 2.3.2.1. Le proœstrus

Dure en moyenne 9 jours (3-17 jours) Sous l'influence des œstrogènes, se manifestent l'attrait pour les mâles, L'augmentation de la taille et de la turgescence de la vulve associée à un écoulement vulvaire sérosanguin qui résulte de la diapédèse des érythrocytes. La muqueuse vaginale est lisse (œdème).



**Figure 4:**Écoulements vulvaires séro-hémorragiques  
(Fayrer-Hosken 1996. avec son autorisation).



**Figure 5:**Oedème de la vulve et du périnée d'une chienne en début de proœstrus (England et Concannon 2002 avec leur autorisation).



### 2.3.2.2. L'œstrus

(Acceptation de la saillie) dure 9 jours (3-21 jours) peut se prolonger plusieurs jours après l'ovulation. Chez cette espèce, l'ovulation survient à un moment peu précis par rapport au début du comportement sexuel qui définit l'œstrus. L'épithélium vaginal est crénelé (déshydratation) et le frottis vaginal riche en cellules kératinisées.

La décharge de LH qui a lieu 24-48h après le début de l'œstrus est responsable de la croissance terminale rapide et d'un début de lutéinisation des follicules pré ovulatoires qui sécrètent des œstrogènes puis de la progestérone. Ainsi, les ovulations surviennent environ 24-48 heures après le pic de LH et durent 24h alors que le taux circulant de progestérone est déjà élevé. La maturation des ovocytes I ovulés dure 48h et les spermatozoïdes conservent leur pouvoir fécondant pendant 5 jours. La fertilité optimale de la chienne se situe entre 3 et 6 jours après le pic de LH.

### 2.3.2.3. Le metoestrus

Dans toutes les autres espèces que la chienne, le metoestrus est considéré comme la phase d'installation du corps jaune alors que le dioestrus en est la phase d'état. Chez la chienne, il représente tout autre chose puisque la progestérone est déjà sécrétée avant l'ovulation suite à un phénomène de lutéinisation corticale préovulatoire. Le metoestrus (durée de 75 jours) est une phase du cycle identique que la chienne soit saillie ou non, fécondée ou non, le début du metoestrus étant défini comme le premier jour de refus de la saillie.

### 2.3.2.4. L'anoestrus

C'est en théorie la phase de repos sexuel. La femelle est calme et ne présente plus aucun comportement sexuel. La durée moyenne de l'anoestrus est de 4-5 mois, mais elle peut varier de 2 à 10 mois sans cause ni conséquence pathologique selon DUMON. La régularité de l'anoestrus est très importante car elle optimise la fonction de reproduction, ainsi les chiennes dont la fréquence des chaleurs est irrégulière souffrent plus souvent de troubles de la reproduction. En outre, l'involution utérine dure deux mois environ. Des chaleurs trop rapprochées sont donc moins favorables à une bonne reproduction.

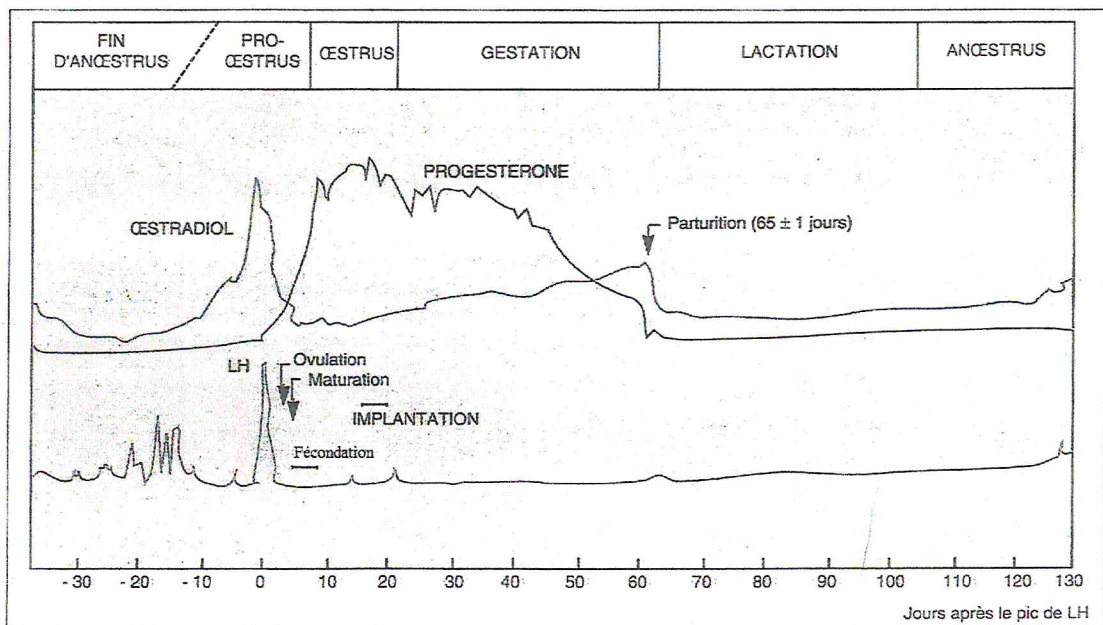
La durée de la gestation définie par l'intervalle entre la décharge de LH et la parturition est de 64-66 jours. Les profils hormonaux observés durant la gestation ne sont pas réellement différents de ceux observés en l'absence de gestation. D'un point de vue de la sécrétion de progestérone, la phase de metoestrus est équivalente à une gestation. Le dosage de progestérone ne peut donc être utilisé pour établir un diagnostic de gestation. La progestérone d'origine ovarienne est indispensable au maintien de la gestation pendant toute sa durée. Les concentrations plasmatiques d'œstradiol

augmentent en fin de gestation ou de pseudogestation. Le terme pseudogestation est utilisé chez la chienne pour définir les perturbations du comportement pouvant faire penser à l'imminence de la mise-bas et l'établissement d'une lactation au cours d'un metoestrus non gravide. La prolactine et la relaxine s'élèvent à partir de la deuxième moitié de cette phase seulement s'il y a gestation.

C'est la seule différence notable entre une gestation et un metoestrus non gravide. Le maintien du corps jaune dépend des actions lutéotropes de LH et de la prolactine. La sécrétion de prolactine par l'hypophyse est sous le contrôle inhibiteur des systèmes dopaminergiques.

L'administration d'un agoniste des récepteurs dopaminergiques inhibe la synthèse de prolactine et induit une diminution de la sécrétion de progestérone. Des études cliniques ont démontré qu'une telle administration pouvait induire un avortement chez la chienne gestante à partir de la deuxième moitié de la gestation.

La chienne présente également des périodes d'anoestrus prolongé (durée : de 2-10 mois, valeur moyenne 7 mois) qui augmentent l'intervalle interoestrus.



**Figure 6:** Evolution hormonale (LH, Progestérone et Oestradiol) au cours du cycle sexuel chez la chienne

Tableau 2 : Le cycle œstral de la chienne.

Phase du cycle œstral	Durée	Comportement	Activité ovarienne
<b>PRO-ŒSTRUS</b> (chaleurs)	7 à 10 jours	La femelle attire le mâle mais refuse l'accouplement. La vulve grossit et des pertes de sang sont visibles	Début de la folliculogenèse entraînant la production et la libération d'œstrogènes
<b>ŒSTRUS</b> (chaleurs)	7 à 10 jours	La femelle attire le mâle et accepte l'accouplement. Les pertes de sang sont moins importantes	Période d'ovulation
<b>METŒSTRUS</b>	60 à 120 jours	Pas de comportement particulier	Formation du corps jaune et synthèse de progestérone
<b>ANŒSTRUS</b>	variable	Pas de comportement sexuel particulier	Repos sexuel

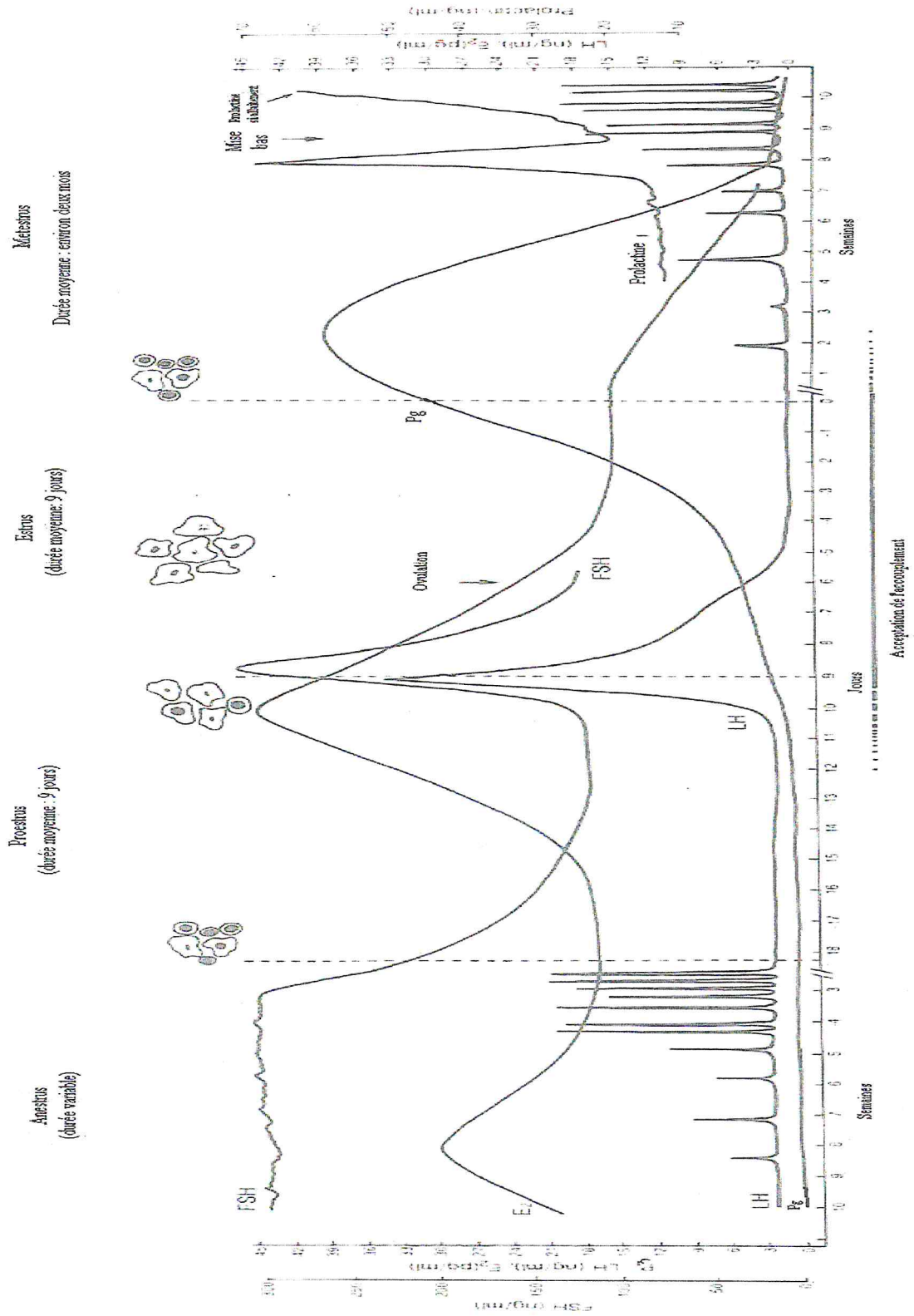


Figure 7: Le cycle oestral canin (Johnston et al. 2001 a)

### 3. Equilibre endocrinien du cycle sexuel

#### 3.1. Généralité

L'activité gonadique fait intervenir le système neuroendocrinien. Par l'intermédiaire de neurotransmetteurs, le système nerveux régule le complexe hypothalamo-hypophysaire, qui lui-même oriente l'activité gonadique.

##### 3.1.1. Les hormones du cycle

##### 3.1.2. Les facteurs hypothalamique

La GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone ou Gonadolibérine) est sécrétée de manière pulsatile et permanente par l'hypothalamus. Elle stimule la synthèse de LH et de FSH.

La libération de la GnRH se trouve elle-même influencée par des facteurs nerveux et hormonaux. Des stimuli sensitifs tels que la vue ou l'odorat peuvent stimuler sa sécrétion. Ceci explique notamment qu'en collectivité, la venue en chaleurs d'une chienne peut modifier le cycle des autres femelles. La lumière a également une action stimulante sur la fréquence de libération de GnRH, au printemps avec l'augmentation de l'exposition quotidienne à la lumière et en fin d'été après une forte intensité lumineuse

##### 3.1.3. Les facteurs hypophysaires

Il s'agit des gonadotrophines : la LH et la FSH. Ce sont des glycoprotéines synthétisées par le lobe antérieur de l'hypophyse. Leur taux sérique est caractérisé par un niveau de base faible : la sécrétion tonique, soumise à de petites fluctuations rythmiques à peine perceptibles. Il se produit périodiquement un pic important de sécrétion de ces gonadotrophines: la sécrétion cyclique, peu avant l'ovulation. L'alternance entre ces deux sécrétion est régie par l'hypothalamus d'une part, et par les hormones gonadiques d'autre part.

###### 3.1.3.1. La FSH

La FSH (Folliculo Stimulating Hormone ou folliculostimuline ou follitropine), au niveau gonadique déclenche et stimule la croissance folliculaire. En synergie avec la LH, elle induit la synthèse d'strogènes par la thèque interne des follicules.

###### 3.1.3.1. La LH

La LH (Luteostimulating Hormone ou lutéostimuline ou lutropine) est l'hormone de la lutéinisation, sa durée de vie est plus courte que celle de la FSH, et le rythme de sa sécrétion varie de 1 décharge

toutes les 1,5 à 7 heures. Son action complète celle de la FSH : elle active la maturation folliculaire, et sur l'ovaire préalablement sensibilisé par la FSH, elle provoque l'ovulation et la formation du corps jaune. Elle stimule globalement la synthèse des stéroïdes sexuels en favorisant la conversion du cholestérol en progestérone (elle-même précurseurs des androgènes et œstrogènes).

### **3.1.4. Les stéroïdes ovariens**

#### **3.1.4.1. Les œstrogène**

Ils sont présents essentiellement sous la forme d'œstrone et d'œstradiol-17 $\beta$ , sécrétés par la thèque interne des follicules et des corps jaunes. Ils régissent notamment les modifications histologiques et comportementales qui ont lieu pendant le pro-œstrus.

#### **3.1.4.2. La progestérone**

La progestérone est principalement sécrétée par le corps jaune, mais également en faible quantité par les follicules ovariens matures.

Cette lutéinisation pré-ovulatoire des cellules de la granulosa est une particularité du cycle sexuel de la chienne. La progestérone prépare l'utérus à la nidation et assure le maintien de la gestation. Elle est également responsable des manifestations comportementales de l'œstrus, après imprégnation œstrogénique de l'organisme.

#### **3.1.4.3. Les cibernines**

Il s'agit de polypeptides sécrétés par les follicules ovariens et les corps jaunes, qui exercent autant que les hormones stéroïdes, des rétrocontrôles importants sur le système hypothalamo-hypophysaire. Parmi les cibernines, nous pouvons citer :

-OMI : Inhibiteur de la Maturation de l'Ovocyte, sécrété par les follicules primordiaux ; il bloque le développement des ovocytes primordiaux en follicules cavitaires. Cette inhibition peut être levée par l'élévation des taux de LH et FSH, lors de la reprise d'un nouveau cycle.

-LI : Inhibiteur de la Lutéinisation, synthétisé par les follicules jusqu'au stade De Graaf, il empêche la lutéinisation des follicules avant l'ovulation.

-FSH-RBI : Inhibiteur de la fixation de LH sur les follicules, sécrété par les follicules en développement, il empêche le développement des autres follicules primordiaux.

-Gonadocrine : GnRH-like, sécrétée au cours du développement folliculaire, elle stimule la sécrétion des gonadotropines.

-Inhibine : Sécrétée dans la première partie du développement par la granulosa, c'est un anti-FSH.

La sécrétion de chaque cibernine dépend étroitement de l'activité ovarienne.

Elles agissent temporairement sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Des interactions complexes permettent de mieux comprendre le fonctionnement cyclique de l'activité ovarienne.

### 3.1.5. Profil hormonal du cycle

#### 3.1.5.1. L'anoestrus

Les concentrations de progestérone et d'œstrogènes restent basales pendant la phase de repos sexuel. Le taux de FSH est modérément élevé et les décharges de LH se font par pulses espacés (>3 heures) et peu importants. En fin d'anoestrus, la concentration sanguine de FSH augmente, et permet la sélection et le développement des futurs follicules ovariens. L'amplitude et la fréquence de la libération de LH augmentent, favorisant la reprise d'un nouveau cycle. L'inhibition qu'exerçaient l'OMI et la LI sur le développement des follicules primordiaux est levée, et certains poursuivent leur croissance.

#### 3.1.5.2. Le proestrus

La concentration d'œstrogènes augmente avec le développement folliculaire et forme un pic en fin de pro-œstrus. Le taux basal qui était de 5 à 10 pg/ml en fin d'anoestrus, atteint 50 à 100 pg/ml au moment du pic, (la valeur de ce pic sérique est en fait très variable d'une chienne à l'autre).

La progestérone est synthétisée par les follicules, son taux sanguin reste faible, avoisinant 1 ng/ml au moment du pic d'œstrogènes. Pendant la première partie du pro-œstrus, l'augmentation du taux des œstrogènes exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, et limite (avec l'inhibine) la libération de LH et de FSH. Après le pic d'œstrogène, ces inhibitions sont levées et les décharges de LH et FSH se déroulent simultanément.

L'augmentation du taux de LH a lieu sous la forme d'un pic sérique court et franc (la concentration est multipliée par 10 à 40), 1 à 2 jours après le pic d'œstrogène. La demi-vie de FSH est plus longue que celle de LH et son taux sérique reste élevé plus longtemps.

#### 3.1.5.3. L'œstrus

La phase pré-ovulatoire : le pic de LH se situe entre la fin du proestrus et le début de l'œstrus, il dure 1 à 3 jours, son taux sérique s'élève en moyenne à 10-50 ng/ml.

Il détermine le début de la phase lutéale, en stimulant la synthèse de progestérone par les follicules ovariens matures. La progestéronémie atteint 2 à 4 ng/ml au moment du pic de LH, puis augmente rapidement les jours suivants.

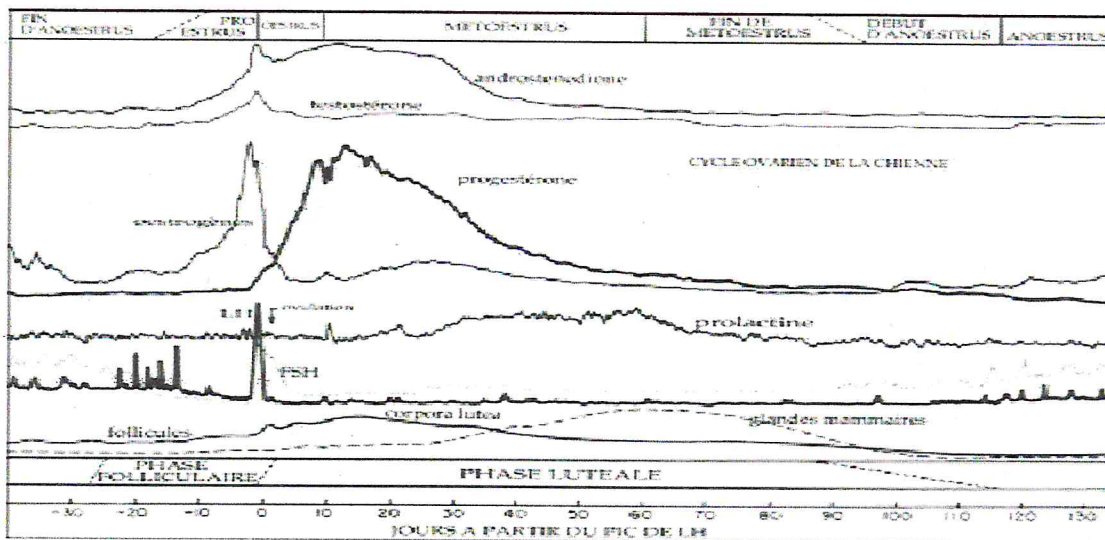
L'ovulation : Le pic pré-ovulatoire de LH déclenche l'ovulation 48 heures plus tard (36 à 50 heures - 16). La progestéronémie est entre 4 et 10 ng/ml au moment de l'ovulation.

La phase post-ovulatoire : Les œstrogènes, la FSH et la LH retrouvent progressivement leur taux de base. La progestéronémie augmente rapidement avec l'installation des corps jaunes, et dépasse 10 ng/ml après l'ovulation.

**3.1.5.4. Le metoestrus**

Le corps jaune sécrète de la progestérone à des taux très importants que la chienne soit gestante ou non. Elle atteint un plateau 2 à 3 semaines après le début du métœstrus (15 à 80 ng/ml), qui sera maintenu jusqu'à la lutéolyse.

Cette dernière s'effectue de manière progressive et asymptotique si la chienne n'est pas gestante, et la progestérone retrouve son taux de base (inférieur à 1 ng/ml) très progressivement, entre le 50° et le 120° jour du cycle. A l'inverse, en fin de gestation, la progestéronémie chute brutalement dans les 48 heures qui précèdent la mise bas.



**Figure 8:** Représentation schématique des variations sériques hormonales en œstrogènes, progestérone, LH, FSH, prolactine, testostérone, au cours du cycle sexuel de la chienne, et corrélation avec les différentes phases du cycle œstral .

**4. Les modifications histologiques au cours du cycle**

**4.1. Le cycle ovarien**

**4.1.1. Définition**

Il s'agit d'une série de phénomènes liés à la maturation de l'ovocyte (ovogénèse) et des cellules folliculaires. Le cycle ovarien est décomposé en phase folliculaire et phase lutéale séparées par l'ovulation. La première dure de une à trois semaines. Les chiennes ovulent spontanément à son terme. Elle se déroule donc durant la fin de l'anoestrus et le proestrus. La seconde commence après l'ovulation et dure 2 mois que la chienne soit gestante ou non. Cependant elle peut atteindre trois



mois lorsque la chienne est non gestante. La phase lutéale se produit lors du metestrus et au début de l'anoestrus. (6).

#### 4.1.2. La phase folliculaire

Pendant l'anoestrus, des follicules secondaires peuvent commencer à se développer. Ils échoueraient à cause du manque d'hormone folliculo-stimulante (FSH). Néanmoins ce fait n'a pas été prouvé chez la chienne (13). La croissance folliculaire intervient donc lorsque le taux de FSH est suffisant. Les follicules recrutés connaissent d'abord une croissance et une prolifération des cellules de la granulosa ce qui les conduit au follicule à antrum. La croissance est caractérisée par une augmentation de la vascularisation thécale ainsi qu'une augmentation de l'activité aromatasase par les cellules de la granulosa et donc de la production d'estrogènes (6, 21).

Parmi les follicules entrés en croissance seuls quelques-uns seront sélectionnés pour la maturation selon un mécanisme méconnu (sans doute les plus sensibles à la FSH). Ils vont subir une véritable différenciation concomitante à l'augmentation de la taille de l'antrum.

Les fonctions sécrétoires subissent alors une augmentation d'activité synchrone permettant l'augmentation de la production d'androgènes par la thèque et de l'aromatisation par les cellules de la granulosa assurant ainsi la production d'estradiol (21).

Juste avant l'ovulation le follicule préovulatoire atteint une taille maximale et un nombre de cellules de la granulosa maximum. On constate une concentration élevée d'estradiol dans le liquide folliculaire, la présence de récepteurs à la lutéotropine (LH) sur la granulosa. L'expansion du cumulus est FSH dépendante.

Celui-ci fournit des métabolites, et transmet des signaux vers l'ovocyte (21).

#### 4.1.3. La phase lutéale

On observe une lutéinisation des cellules de la thèque interne et de la granulosa conduisant au corps jaune. Les cellules de la granulosa se multiplient, leur taille augmente, et leur noyau est souvent polyploïde. Elles se chargent de pigment, la lutéine. Les cellules thécales restent petites et se mêlent aux cellules de la granulosa. Ces deux types de cellules secrètent la même hormone pendant deux mois minimum: la progestérone (6, 21).

La lutéolyse est la régression fonctionnelle du corps jaune. Elle marque la fin du metoestrus. Cette interruption fonctionnelle est plus rapide que la régression morphologique. Elle débute 20 jours après l'ovulation et les modifications histologiques (une dégénérescence vacuolaire) sont nettement visibles à partir du 50ème jour post ovulation. Cette dernière se poursuit après la fin du cycle et sur les cycles suivants (généralement jusqu'au 3e) (31). C'est alors une structure inerte qui involue lentement, devenant blanc (corpus albicans) ou brun pâle, tout en s'enfonçant dans la medulla ovarienne. Elle présente alors une allure de tissu cicatriciel (21).

## 2.1. Généralité

L'épithélium vaginale est une cible pour de nombreuses hormones sexuelles, et subit ainsi des modifications très importantes en fonction des sécrétions hormonales et par conséquent du cycle sexuel.

Le frottis vaginal est donc un outil précieux dans la détermination de la phase du cycle mais aussi dans la détection de pathologie ou dans la confirmation de saillie.

## 2.2. Technique de réalisation d'un frotti vaginal

### 2.2.1. Techniques de prélèvement

Plusieurs méthodes pour le prélèvement des cellules vaginales exfoliées sont possibles. Le prélèvement doit être rapide, facile, avec un minimum d'inconfort pour la chienne, praticable à toutes les phases du cycle et permettant d'obtenir un échantillon cellulaire viable (13, 23, 19).

#### 2.2.1.1. Prélèvement avec une pipette

Cette méthode consiste à introduire sur toute sa longueur un compte-goutte médical dans le vagin. Celle-ci contient de 0.25 à 1 millilitre de solution saline stérile. On peut également rattacher la pipette à une seringue contenant au minimum 5 millilitres d'air pour pouvoir expulser le liquide dans la lumière vaginale.

La solution est injectée et réaspirée plusieurs fois. Puis la pipette est extraite du vagin en veillant à ne pas presser son extrémité. Il est probable que l'intégralité du sérum ne soit pas récoltée, mais il suffit d'une goutte pour obtenir une lame probante.

Cette technique est la moins douloureuse pour l'animal. Néanmoins, le prélèvement avec une pipette peut altérer la morphologie des cellules. La quantité des cellules prélevées peut être insuffisante. Il tend à minorer les comptages cellulaires, ce qui entraîne des pourcentages peu fiables et augmente les index (10, 15, 25).

### 2.2.1.2. Ecouvillonnage

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

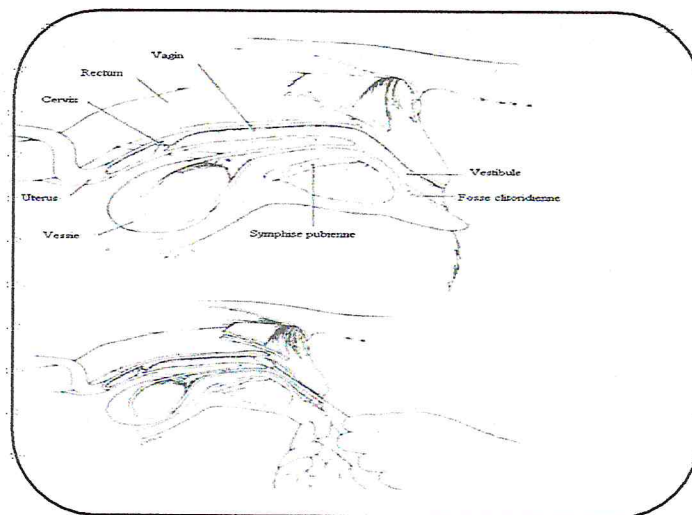
Précédemment certains écouvillonnages étaient effectués avec des « abaisses langue » coupés en quatre, polis et humidifiés avec du sérum physiologique (3). Ce matériel, outre son manque d'asepsie, rendait l'examen douloureux pour l'animal. On a également utilisés des spatules en métal (10).

L'écouvillon stérile doit être humidifié avec du sérum physiologique stérile. Cela peut ne pas être nécessaire si la chienne présente des écoulements vaginaux suffisants (pendant le proestrus ou l'oestrus) (19). Néanmoins, lorsqu'on utilise du matériel non humidifié, le coton collecte les cellules mais également du mucus, ce qui peut gêner l'étalement du prélèvement.

Les lèvres vulvaires peuvent être écartées manuellement avec le pouce et l'index.

L'écouvillon est introduit au niveau de la commissure dorsale de la vulve. Puis il est orienté crânio-dorsalement en direction de la colonne vertébrale. Une fois passé au dessus de l'arcade ischiatique, l'instrument est dirigé crânialement sur une quinzaine de centimètres.

Au contact de la muqueuse du vestibule ou de la partie caudale du vagin, l'écouvillon subit une rotation. Le mouvement doit être imprimé avec une force suffisante pour assurer un bon contact avec la muqueuse vaginale. Puis l'écouvillon est extrait délicatement des voies génitales (28, 17,6, 23).



**Figure 9:** Rappels anatomiques et technique de prélèvement (d'après Johnston et al. 2001b).



**Figure 10:** Technique de prélèvement par écouvillonnage (Bowen 2000 avec son autorisation).

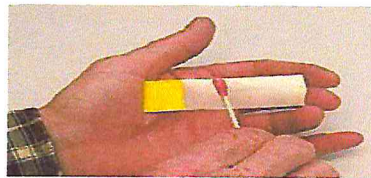
Certains auteurs ont conseillé l'utilisation de spéculums. Ils évitent tout contact de l'écouvillon avec la muqueuse de la fosse clitoridienne et du vestibule caudal, ce qui assure de prélever dans la zone souhaitée. Il n'y a également aucun risque de léser le méat urinaire (6, 16, 22,23, 13). Cependant ils sont rarement nécessaires en pratique courante.



**Figure 11:** Technique de prélèvement à l'aide d'un spéculum (Fayrer-Hosken 1996 avec son autorisation).

### 2.2.2. Etalement

Après avoir retiré l'écouvillon du vagin, l'extrémité de coton est roulé sur une lame de verre propre afin d'y transférer le matériel cellulaire. Le coton ne doit pas glisser sur la lame mais rouler afin de ne pas altérer les cellules.



**Figure 12:** Etalement d'un écouvillon sur une lame de microscope (Bowen 2000 avec son Autorisation).

### 2.2.3. Fixation

La lame de verre peut immédiatement être fixée à l'aide d'une solution contenant un mélange d'alcool et d'éther pendant 5 minutes. Des cyto-fixateurs en aérosol existent également et permettent une fixation plus facile et plus rapide.

### 2.2.4. Coloration

Il existe trois types de coloration usuellement pratiqués :

- La coloration de Harris-Schorr
- La coloration de May-Grünwald-Giemsa
- La coloration monochrome au bleu de méthylène

#### 2.2.4.1. La coloration de Harris Schorr

Cette coloration trichrome elle est longue et nécessite environ 15 minutes pour être réalisée. Elle permet une coloration des cellules vaginales respectant les affinités tinctoriales liées à la présence de kératine et donc une différenciation aisée des différents types cellulaires

Tableau 3 Coloration de Harris – Shorr (d'après Neveux 1999).

Ordre de passage	Produits	Temps
1	mélange alcool-ether 1/2	5 minutes
2	alcool à 70°	plonger 10 fois
3	alcool à 50°	plonger 10 fois
4	eau distillée	plonger 10 fois
5	hématoxyline de Harris	2 minutes
6	eau distillée	passage
7	eau distillée	passage
8	alcool ammoniacal	1 minute
9	eau distillée	passage
10	alcool à 70°	passage
11	alcool à 95°	passage
12	colorant de Shorr	2 minutes
13	alcool à 95°	passage
14	alcool absolu	passage

### 2.2.4.2. La coloration de May-Grünwald-Giemsa

Ne permet pas une coloration aussi fine des cellules vaginales. En revanche elle met en évidence les cellules granulocytes neutrophiles, ce qui peut être utile pour différencier plus aisément différentes phases du cycle.

Tableau 4 coloration Diff-Quick ® (d'après Bowen 2000).

Ordre de passage	Produits	Temps
1	méthanol	10 passages
2	solution 1	10 passages
3	solution 2	10 passages

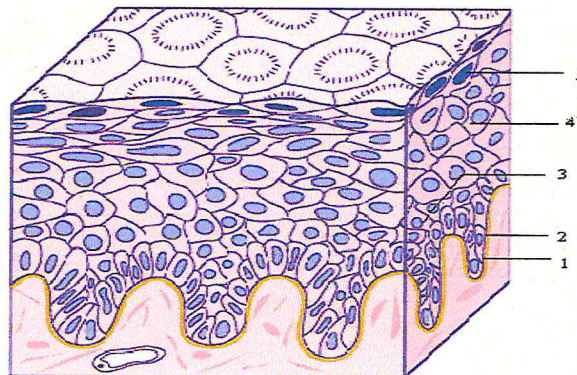
### 2.2.4.3. Le bleu de méthylène

Coloration monochrome n'est presque plus utilisée à l'heure actuelle. Apporte un grand nombre d'imprécisions et ne présente aucun avantage par rapport aux deux précédentes colorations.

## 2.3. Les types cellulaires observés sur les frottis vaginaux

L'épithélium vaginal est de type stratifié pavimenteux non kératinisé ou épithélium Malpighie. Une couche de cellules germinatives repose sur une lame basale.

Depuis cette couche vers la lumière utérine, on trouve successivement des cellules Parabasales, des cellules intermédiaires (issues de la différenciation des cellules parabasales), puis des cellules superficielles (29).



**Figure 13:** Epithélium pavimenteux non kératinisé pluristratifié (d'après la division d'histologie du département de médecine de l'université de Fribourg). 1 : lame basale, 2 : cellule germinative, 3 : cellule parabasale, 4 : cellule intermédiaire, 5 : cellule superficielle.

Les cellules de l'épithélium vaginal se modifient sous l'action des hormones activées pendant les chaleurs, en particulier les oestrogènes produits durant le pro-oestrus. La cytologie vaginale est donc un outil utile au vétérinaire pour déterminer approximativement le pro-oestrus, l'oestrus et le début de metoestrus, et pour donner une estimation du moment de l'ovulation.

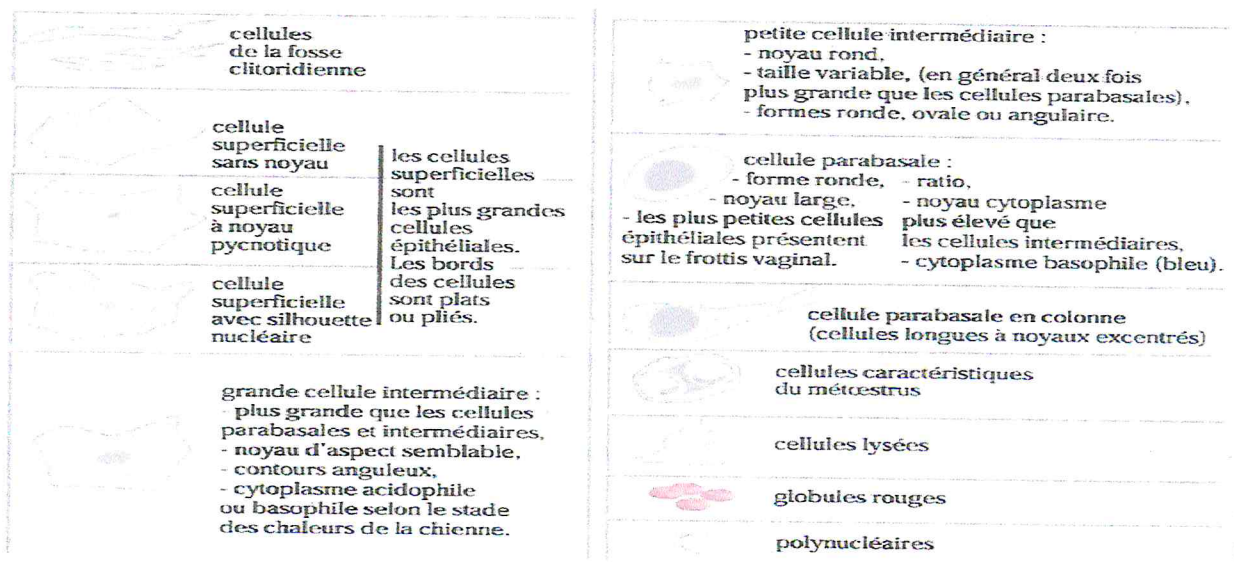


Figure 14: Les cellules du frottis vaginal ( Neveux 1999)

**2-4.Cycle sexuel et frottis vaginaux**

Les frottis vaginaux permettent de déterminer dans quelle phase du cycle se situe la chienne. Ils permettent l'analyse cytologique de la muqueuse vaginale.

**2-4-1.Proestrus**

L'écouvillon utilisé pour réaliser le frottis vaginal est rouge vif en début de pro oestrus et devient rosé au fur et à mesure que l'oestrus approche.

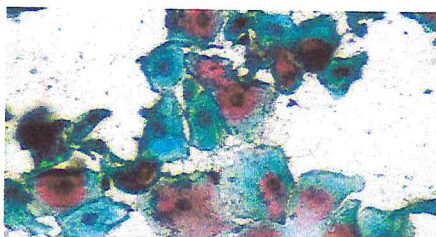


Figure 15: Frottis de proestrus moyen (cliché Alain Fontbonne).

**Tableau 5:** Présentation de l'aspect des frottis vaginaux après étalement, fixation et coloration en fonction des phases sexuel de la chienne.

<u>Début de proestrus</u>	<u>Milieu de proestrus</u>	<u>Fin de proestrus</u>
<p>Frottis sale.</p> <p>Prédominance de cellules basophiles intermédiaires (indice éosinophilique &lt; 30%).</p> <p>Présence habituelle de globules rouges.</p>	<p>Frottis sale, riche en cellules.</p> <p>Présence en nombre équivalent de cellules basophiles et éosinophiles (indice éosinophilique = 50%).</p> <p>Présence de globules rouges.</p>	<p>Frottis assez propre, riche en cellules.</p> <p>Présence de cellules acidophiles, intermédiaires et superficielles, non regroupées en amas (indice éosinophilique &gt; 70%).</p> <p>Présence de GR</p>



### 2.4.2.Oestrus

L'écouvillon est rose pâle ou blanc. Le frottis est propre, riche en cellules. Il y a présence d'une majorité de cellules superficielles acidophiles regroupées en amas (indice éosinophilique  $>80\%$ ), et pas de globules rouges.

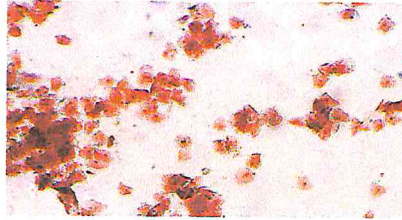


Figure 16: Frottis d'oestrus (cliché Alain Fontbonne).

### 2.4.3.Metoestrus

L'écouvillon est marron ou grisâtre en tout début de metoestrus puis blanc. Le frottis vaginal est plus ou moins propre. Les cellules nucléées basophiles prédominent rapidement. Des cellules parabasales réapparaissent. Des polynucléaires neutrophiles sont habituellement présents, et parfois des globules rouges dans les tous premiers jours du metoestrus.

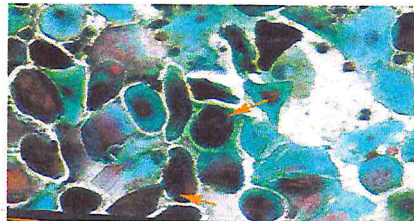


Figure 17: Frottis de metoestrus (cliché Alain Fontbonne).

### 2.4.4.Anoestrus

L'écouvillon vaginal est blanc. Le frottis est sale, pauvre en cellules avec présence quasi exclusive de cellules basophiles, parabasales ou intermédiaires (indice éosinophilique  $< 10\%$ ). Des hématies ou des polynucléaires peuvent être observés en très faible nombre.

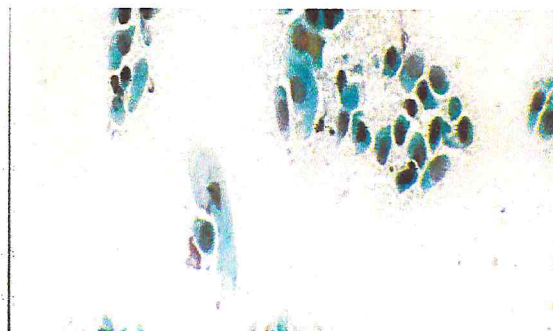


Figure 18: Frottis d'anoestrus (cliché Alain Fontbonne)

## 2.5. Les index cytologiques

Les index ont été établis pour décrire quantitativement les images cellulaires visualisées sur les frottis et suivre plus précisément l'évolution du frottis au cours du cycle oestral. Ils sont similaires à ceux utilisés pour la cytologie vaginale humaine.

### 2.5.1. L'index Eosinophylique (IE)

#### 2.5.1.1. La définition

Il s'agit du pourcentage de cellules réellement kératinisées (i.e. squames, cellules superficielles nucléées et de grandes cellules intermédiaires kératinisées) par rapport à celles qui pourraient l'être mais ne le sont pas (i.e. grandes cellules intermédiaires polychromatophiles et basophiles). Ne sont pas prises en compte les petites cellules intermédiaires et les cellules parabasales (29).

L'IE est calculé par la relation suivante :

$$\text{IE} = \frac{\text{Nombre de cellules acidophiles}}{\text{Nombre de cellules basophiles}} \times 100$$

(Sans les petites cellules intermédiaires et les cellules basophiles)

**2.5.2.L'index caryopycnotique (ICP)****2.5.2.1. La définition**

L'ICP se base sur la quantité en cellules superficielles présentant un noyau pycnotique. Cette transformation nucléaire est une indication des effets des estrogènes sur la muqueuse vaginale (29).

Il s'agit du pourcentage de cellules superficielles avec un noyau pycnotique par rapport à celles dont le noyau est encore vésiculaire (29).

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

**2.5.3.L'index superficiel (IS)****2.5.3.1.La définition**

L'IS mesure la proportion entre les cellules des couches superficielles de l'épithélium vaginal (squames, cellules superficielles, grandes cellules intermédiaires) et aux cellules des couches plus profondes (cellules parabasales et petites cellules intermédiaires) (29).

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

**2.6.Intérêts et limites**

En pratique, en raison du coût des dosages de la progestérone plasmatique, on couple ces dosages avec la réalisation de frottis vaginaux.

Ainsi, on utilise les dosages de progestérone à bon escient et il est inutile de débiter les dosages tant que la chienne est toujours en pro-œstrus, à moins que l'on ait des doutes ou des difficultés à interpréter les autres tests (chienne présentant des chaleurs atypiques- ne perdant pas de sang à la commissure vulvaire- refusant systématiquement l'accouplement à toute période- montrant une kératinisation très précoce des frottis vaginaux bien avant l'ovulation

ou au contraire une évolution incomplète de ces mêmes frottis qui n'atteignent jamais un aspect caractéristique de frottis d'œstrus).

De même les dosages de progestérone ne permettent pas de déterminer la fin de la période de fécondabilité ; dans ce cas, le frottis vaginal est beaucoup plus utile car il peut montrer des signes avant-coureurs de métœstrus indiquant que la chienne n'est plus fécondable.

En outre ; les frottis vaginaux reste aléatoire. Les catégories cellulaires ne correspondent en fait qu'à un découpage réalisé sur un phénomène se réalisant de manière continue. Il est ainsi délicat de distinguer la fin du proœstrus du début de l'œstrus. Les changements dans l'épithélium vaginal sont due à l'imprégnation oestrogénique et non à l'évolution de la progestérone. Le frottis donne donc une indication approximative du moment de l'ovulation. La kératinisation maximale peut apparaître 4 jours avant l'ovulation ou même trois jours plus tard. Et même si l'œstrus se détermine de façon relativement aisée, Taradach montre la difficulté de dater exactement le moment de l'ovulation.

Ramette met en évidence plusieurs phénomènes importants pour le suivit des chaleurs. Il apparaît que l'analyse d'un frottis vaginal ne devrait pas être réalisé de manière isolée et nécessite un suivi des chiennes. L'utilisation d'une autre méthode de détection complétant l'étude des frottis semble judicieux. Les deux paramètres les plus intéressants dans l'étude des frottis sont l'indice éosinophile pouvant cerner la période fertile et l'apparition du métœstrus. Les frottis vaginaux, bien qu'utiles pour fixer la période de fertilité de la chienne et donc le moment de l'insémination, ne sont donc que des indicateurs très médiocres du moment de l'ovulation.

## II- ETUDE EXPERIMENTALE

### II.1. Objectifs

La détermination du moment de saillie est une opération délicate. Le suivi de chaleurs par frottis vaginaux est un procédé simple et peu onéreux a pour but de déterminer approximativement le moment optimale de la saillie.

Cette étude a pour objectif de pousser l'exploitation des frottis vaginaux par la recherche d'un ou plusieurs critères cytologiques nous permettant de déterminer les différentes phases du cycle en limitant les dosages de progestérones donc limite les frais.

### II.2. Matériel et méthode

#### II.2.1. Les animaux

Les chiennes incluses dans l'étude appartient essentiellement a des éleveurs (amateurs et professionnels) sont de différentes races reçues en consultation a la clinique du département vétérinaire BLIDA qui est l'un des centres pédagogiques consacré par l'université Saad Dahlab pour les étudiants afin d'investir leur informations théorique .

En effet, nous n'avons pas étudié les dossiers de chiennes puisque ils ont été reçues pour différents motifs de consultations autre que la réalisation des frottis vaginaux et nos prélèvements ont été aléatoire juste pour la détermination des phases du cycle œstrale.

#### II.2.2. Choix de l'échantillon

L'étude porte sur observation des frottis vaginaux réalisés sur une période s'étalant de novembre 2011 jusqu'à juin 2012 Pour augmenter la précision des résultats, nous nous devons de travailler sur un échantillon de taille suffisante. 15 frottis vaginaux seulement avaient réalisés pendant cette période. Par ailleurs d'autres frottis vaginaux ont dû être supprimés de notre étude Cela a été effectué au fur et à mesure de la lecture des lames

Quatre frottis ont été éliminés car ils étaient illisibles :

- Par manque de coloration globale,
- Par excès d'un des colorants
- Par une technique défectueuse de coloration (les colorants n'étaient pas mélangés ; ceci entraînait des plages acidophiles et des plages basophiles).

deux lames avaient été égarées. On peut imaginer que lorsqu'une lame n'était pas présente au sein d'une boîte complète, c'est qu'elle avait été brisée. Par ailleurs 4 lames avaient disparues Au final, c'est 7 lames qui ont été analysées.

## II-3 Méthode

### II.3.1. L'observation des lames

Les lames ont été visualisées à l'aide d'un microscope binoculaire muni d'un oculaire d'un grossissement de 10. Quatre objectifs étaient disponibles, d'un grandissement respectif de x4, x10, x40, et x100. Les grossissements

Indiqués par la suite représentent ceux du microscope. Les frottis visualisés au grossissement (x10), (x40) dans leur totalité.

Ceci nous donnait les informations suivantes :

- La coloration majoritaire du frottis (acidophilie ou basophilie) ;
- La concentration cellulaire.

D'autres données ont été notées même si elles n'ont pas été prises en compte pour les résultats finaux. Il s'agit de la présence d'érythrocytes et de PNN ainsi que l'aspect du fond du frottis. On n'a pas pu visualisées les lames au grossissement plus fort (x100) en raison la non disponibilité du l'huile d'immersion.

### II.3.2. La classification des cellules

Nous avons choisi de classer les cellules en fonction de deux paramètres : leur morphologie et leur affinité tinctoriale.

#### II.3.2.1 Les cellules parabasales

Leur morphologie a été décrite dans la partie bibliographique. Nous avons rencontrés des cellules parabasales arrondies et allongées. Elles étaient toujours basophiles.

#### II.3.2.2 Les cellules intermédiaires

La distinction entre petites et grandes cellules intermédiaires n'a pas été effectuée. Les cellules appartenant à cette classe, sont de taille variable, mais leur cytoplasme est nettement visualisable et le noyau bien rond.

Nous avons défini deux types cellulaires en ne nous basant que sur leur affinité tinctoriale.

Les premières sont les cellules intermédiaires basophiles (IB). Leur noyau ainsi que leur cytoplasme sont entièrement bleuté.

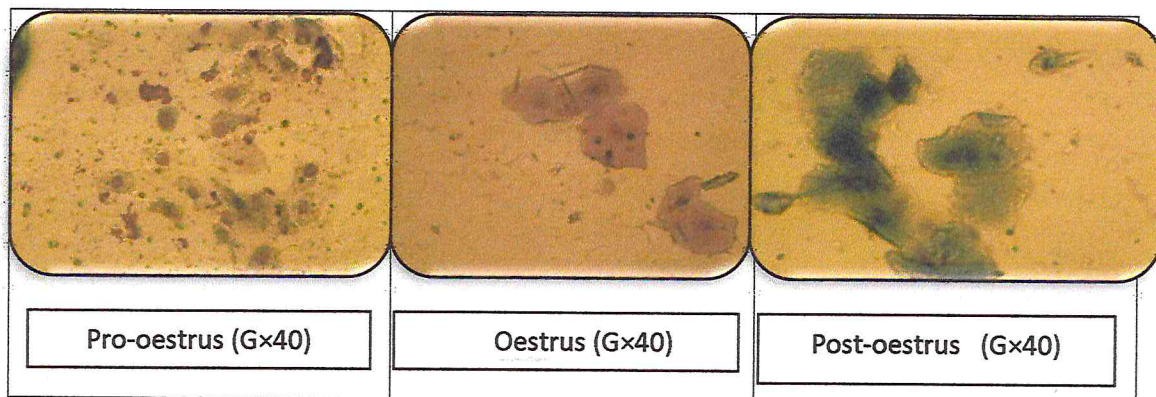
Les secondes sont les cellules intermédiaires polychromatophiles (IPC). L'expression de la kératinisation cellulaire débute par une coloration acidophile qui marque le noyau puis gagne progressivement la périphérie du cytoplasme de manière plus ou moins concentrique, régulière et continue. Font partie de cette catégorie les cellules contenant à la fois une coloration acidophile et une coloration basophile.

Les cellules les plus basophiles de cette catégorie sont celles dont le noyau est acidophile mais avec un cytoplasme basophile.

Les cellules les plus acidophiles sont presque entièrement rouges cependant des zones de leur périphérie sont encore nettement basophiles.

### II.3.2.3 Les cellules superficielles

Il s'agit des cellules acidophiles avec un noyau pycnotique, et des squames.



### Conclusion

Notre étude expérimentale montre qu'il est possible d'optimiser l'utilisation des frottis vaginaux dans le cadre d'un suivi de chaleur correctement réalisé en s'appuyant sur des critères suffisamment objectifs pour repérer la période optimale de fécondabilité.

La méthode des frottis vaginaux, est une méthode fiable à précision limitée, elle exige néanmoins la préparation minutieuse des prélèvements, et la connaissance préalable des types cellulaires présents sur des lames. Son coût abordable favorise son utilisation en pratique.

Sur le plan scientifique, cette étude s'inscrit beaucoup dans le cadre de sensibilisation aux particularités du cycle œstrale de la chienne. La connaissance de la physiologie de la reproduction, et les problèmes posés par la particularité représente la première étape vers sa maîtrise.

En outre, ce travail est accompagné d'un support vidéo simplifiant la technique de réalisation des frottis vaginaux qui pourraient rendre service aux futurs praticiens vétérinaires, dans tel cadre, cette étude revêt toute son importance.



# BIBLIOGRAPHIE

## *Bibliographie*

### **A**

**1-ALLIET J., LALGERIE P (1997)** Cytobiologie Ellipses, Paris, 860 p

### **B**

**2-BELL ET, CHRISTIE DW. (1971)** Erythrocytes and leucocytes in the vaginal smear of the beagle bitch. *Vet. Rec.*, **88**, 546-549.

### **C**

**3-CHRISTIE DW, BAILEY JB, BELL ET. (1970)** The collection of vaginal smears from the beagle bitch. *Vet. Rec.*, **87**, 265.

**4-CHRISTIE DW, BELL ET. (1971)** Some observations on the seasonal incidence and frequency of oestrus in breeding bitches in Britain. *J. small Anim. Pract.*, **12**, 159-167.

**5-CONCANNON PW. (1987)** Endocrinology of the oestrous cycle in the bitch. *In* Burke editor. *Small animal reproduction and infertility*. Philadelphia : Lea & Febiger. 23-77.

**6-CONCANNON PW, DIGREGORIO GB. (1987)** Canine vaginal cytology. *In* Burke editor. *Small animal reproduction and infertility*. Philadelphia : Lea & Febiger. 96-111.

### **D**

**7-DUHAUTOI B.** système reproducteur in : Guide pratique du chirurgie des tissu mou chez le chien et le chat. Paris MED'COM, 2003, 382-390.

**8-DUMON C.** physiologie sexuelle de la chienne in : reproduction du chien et du chat. Collection des indispensables .Paris PMCAC Ed. 1992, 11-16.

### **E**

**9-ENGLAND G, CONCANNON PW. (2002, modifié le 8 juin 2002)** Determination of the optimal breeding time in the bitch : basic considerations. [en-ligne]. Ithaca (USA) : International Veterinary Information Service [http://ivis.org/advances/Concannon/england2/chapter\_frm.asp?LA=1].

**10-EVANS JM, SAVAGE TJ. (1970)** The collection of vaginal smears from bitches. *Vet. Rec.*, **87**, 598-599.

11-EVANS S.A., EVANS H.E..Female genital organs. *Anatomy of the dog, 3rd edition.*; Saunders, 1993; 532-541

## F

12-FAYRER-HOSKEN R. (1996) Canine theriogenology notes (female). [en-ligne] . Georgia (USA): University of Georgia. [<http://lam.vet.uga.edu/LAM/LM000029.HTM>].

13-FELDMAN , NELSON (1996) Ovarian cycle and vaginal cytology. *In : Canine and feline endocrinology and reproduction.* 2nd ed. Philadelphia : WB Saunders, 526-546.

14-FONTBONNE A (2000) Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine. *Point vét.*, **31**, 395-401.

## G

15-GUYANT L. (1988) Canine vaginal cytology. *Vet. Tech.*, **9**, 513-523.

## H

16-HOLST PA. (1986) Vaginal cytology in the bitch. *In: Moorw editor. Current therapy in theriogenology.* Philadelphia : WB Saunders. 457-461.

## J

17-JOHNSTON SD. (1988) The bitch. *In : Reproduction : Small companion animals proceedings.* Sydney, 8-12 août 1988. Sydney : Post Graduate in Veterinary Science, 69-87.

18-JOHNSTON SD, OLSON PNS., ROOT KUSTRITZ MV. (2001) The canine estrous cycle. *In: Canine and feline theriogenology.* Philadelphia : WB Saunders, 16-31.

19-JOHNSTON SD, OLSON PNS, ROOT KUSTRITZ MV. (2001) Vaginal cytology. *In :Canine and feline theriogenology.* Philadelphia : WB Saunders, 32-41.

## K

20-KREEGER TJ, SEAL US. (1992) Circannual prolactin rhythm in intact dogs housed outdoor. *In: Chronobiologia*, **19**, 1-8.

## L

21-LINDE-FORSBERG C, WALLÉN A. (1992) Effects of whelping and season of the year on the interoestrous intervals in dogs. *J. small Anim. Pract.*, **33**, 67-70.

21-LEFRANCOIS T, TIRET L. (2000) *Physiologie de l'appareil reproducteur*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique, 88p.

## M

22-MIALOT JP. (1984) Examen de l'appareil génital femelle. *In : Pathologie de la reproduction chez les carnivores domestiques*. Maisons-Alfort : éditions du point vétérinaire, 29-44.

## N

23-NEVEUX M. (1999) Les frottis vaginaux chez la chienne. *Point Vet.*, **30**, 557-564.

## O

24-OLSON PN, BOWEN R., BEHRENDT MD, OLSON JD, NETT TM. (1984) Concentrations of progesterone and luteinizing hormone in the serum of diestrous bitches before and after hysterectomy. *Am. J. Vet. Res.*, **45** (1), 149-153.

25-OLSON PN, THRALL MA, WYKES PM, HUSTED PW, NETT TM, SAWYER HR Jr. (1984) Vaginal cytology. Part I. A useful tool for staging the canine estrous cycle. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.*, **6** (4), 288-297.

## P

26-Part1 lundi 18 avril 2011, 21:07 VALR ANALYSE *IN VIVO* DE LA FECONDATION DANS L'ESPECE CANINE : DOSAGES HORMONAUX ,SUIVI ECHOGRAPHIQUE DE L'OVULATION ET IMMUNOCYTOCHIMIE SUR OVOCYTES.

27-PINEDA M. H., KAINER R. A., FAULKNER L.C. (1973) Dorsal median post cervical fold in the canine vagina. *Am. J. Vet. Res.*, n°34, p. 1487-1491.

## R

28-ROSZEL JF. (1977) Normal canine vaginal cytology. *Vet. Clin. North. Am.*, **7** (4), 667-681.

## S

29-SCHUTTE AP. (1967) Canine vaginal cytology –I Technique and cytological morphology. *J. small Anim. Pract.*, **8**, 301-306.

30-SOKOLOWSKI JH. (1973) Reproductive Features and patterns in the bitch. *J. Am. An. Hosp. Assoc.*, **9**, 71-81

**31-SOKOLOWSKI JH.** (1977) Reproductive patterns in the bitch. *Vet. Clin. North Am.*, 7 (4),653-666.

**32-STRASSER H, SCHUMACHER W.** (1968) Breeding dogs for experimental purposes. II :Assessment of 8-year breeding records for two beagle strains. *J. small Anim. Pract.*, 9, 603-612.

## **T**


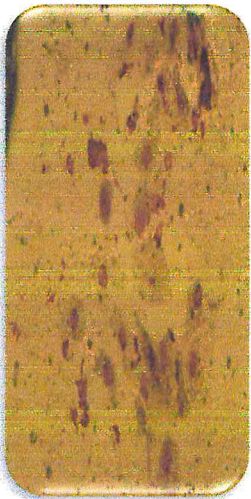


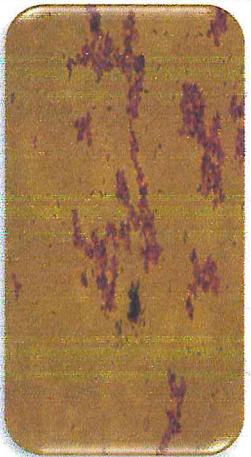

**33-TEDOR JB, REIF JS.** (1978) Natal patterns among registered dogs in the united states. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 172, 1179-1185.

## **W**

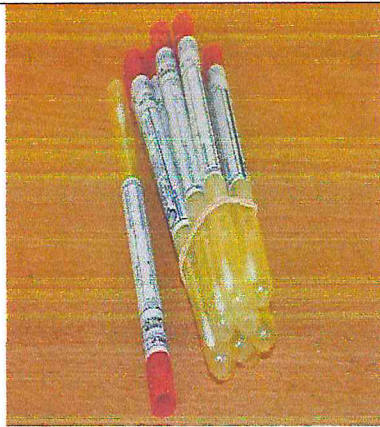
**34-WILDT DE, CHAKRABORTY PK, PANKO WB, SEAGER SWJ.** (1978) Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biol.Reprod.* , 18, 561-570.

# ANNEXES

*ANNEXE 1 : Exemples de frottis vaginaux*

		
LINA (G×10)	LINA (G×40)	CINDY (G×40)
		
DIANA (G×40)	DIANA-2 (G×40)	DIANA-2 (G×40)

## ANNEXE2 : Le matériel utilisé



Ecouvillon



Lame



Fixateur



Boite de pétri



Gant



MAY-GRUMWALD



GIEMSA



MG-KIT



MICROSCOPE  
OPTIQUE



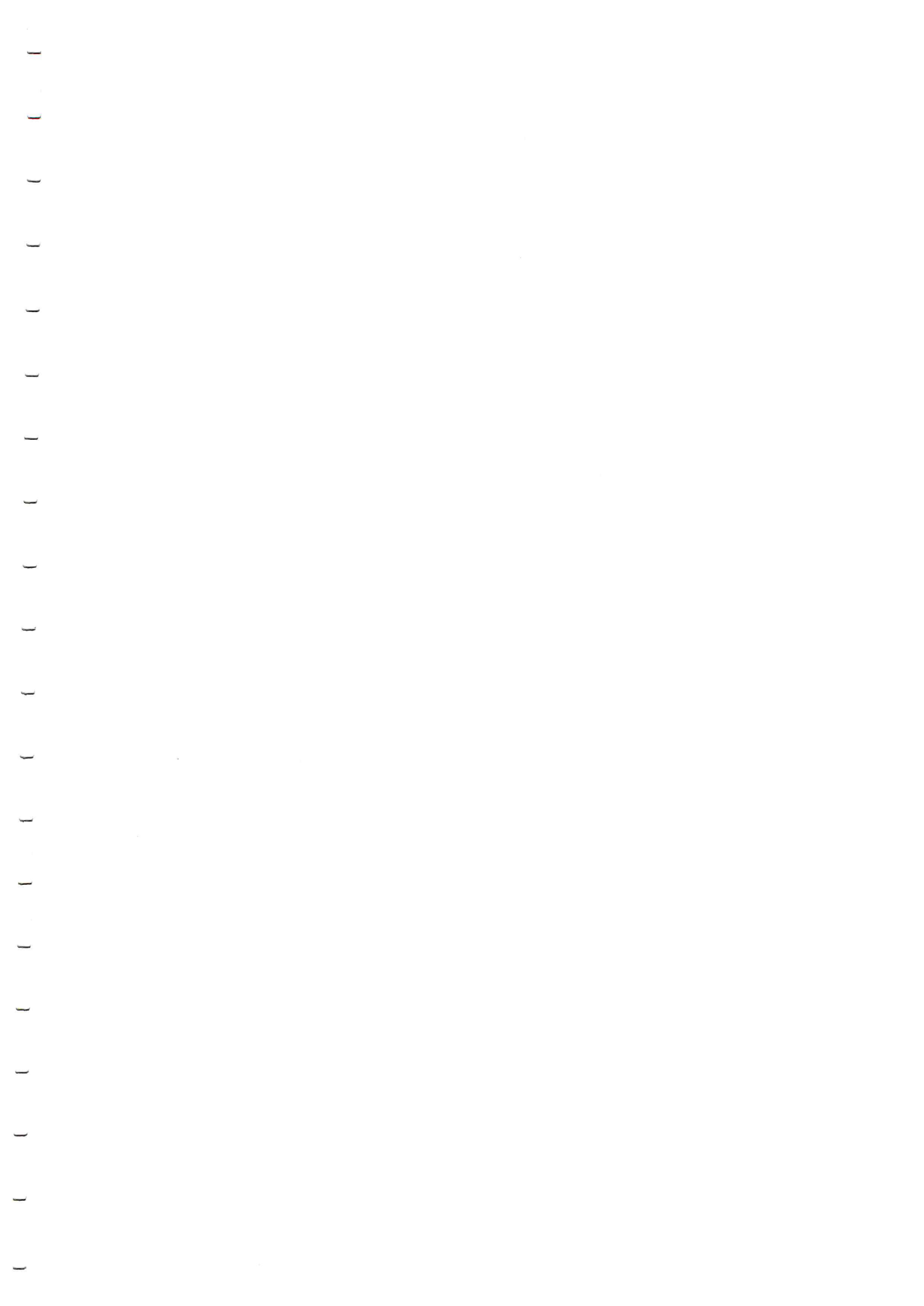
# ANNEXE3 : Quelques chiennes utilisées en expérimentation

(Spears : 3ans - Wini :8ans)



Nom des chiennes???





## ANNEXE 4 : FICHE ANALYTIQUE POUR FROTTIS VAGINAL

<b>Numéro du frotti</b>	<b>Date de prélèvement</b> ...../...../.....	<b>Nom de la chienne</b>		
<b>COMMEMORATIFS</b>				
Etat de la vulve	Atrophié	Normale	tuméfié	
Nature de l'écoulement	Tarie	Séreux	Muqueux	sanguinolent
Signe d'amantea	Positif	Négatif		
Autres signes				
Date de saillie	...../...../.....	Suspicion	Gestation	
Couleur de l'écouvillon	Blanc	Rose	Rouge	Maron

### OBSERVATION AU MICROSCOPE GROSSISSEMENT X40 ET/OU X100

Fond du frottis	Claire	Granuleux	Muqueux	
Richesse en cellules	Très riche	Riche	Pauvre	Très pauvre
Répartition des cellules	Dispersés		En amas	Isolés
Tendance tinctoriale	Basophile		Acidophile	Mixte
Réussite de la coloration	Mauvaise		Bonne	
Nature des artefacts				

### OBSERVATION AU MICROSCOPE GROSSISSEMENT X400

Mucus	Absent	Peu abondant	Abondant
Cellules Superficielles entièrement Kératinisés			
Cellules Superficielles partiellement Kératinisés			
Cellules parabasales			
Cellules parabasales en colonne			
Cellules intermédiaires basophiles			
Cellules intermédiaires polychromatophiles			
Cellules de metoestrus			
Cellules lysées			
Hématies			
Polynucléaires			
Cellules de la fosse clitoridienne			
Cellules néoplasiques			
Spermatozoïdes			
Bactéries			

### LES INDICES CYTOLOGIQUES

Indice éosinophile  
Indice caryopicnotique  
Indice superficile

### DIAGNOSTIC CYTOLOGIQUE

.....  
.....  
.....