



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Docteur Vétérinaire

APPLICATION DES FROTTIS VAGINAUX ET DU DOSAGE DE LA PROGESTERONE AU SUIVI DES CHALEURS

Présenté par

Mehegueg Mohand-Arezki et Benelhadj Nacer

Devant le jury :

Président(e) :	ADEL D	M.A.A	ISV BLIDA
Examineur :	BELABDI I	M.A.A	ISV BLIDA
Promoteur :	DJOUDI M	M.A.A	ISV BLIDA

Année : 2016/2017



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

SUIVI DES CHLEURS CHES LA CHIENNE

Présenté par

Mehegueg Mohand-Arezki et Benelhadj Nacer

Devant le jury :

Président(e) :	ADEL D	M.A.A	ISV BLIDA
Examineur :	BELABDI I	M.A.A	ISV BLIDA
Promoteur :	DJOUDI M	M.A.A	ISV BLIDA

Année : 2016/2017

Remerciements

Au nom de Dieu clément et miséricordieux qui par sa grâce nous avons pu
achever ce travail.

A messieurs :

Dr DJOUDI MAUSTAFA:

Les mots ne seront jamais assez forts pour exprimer toute notre gratitude.

Il nous a initié à la recherche et a su nous accompagner tout au long de ce travail de fin d'études. Ses compétences, sa patience, ses qualités humaines nous ont permis de mener à bien ce travail.

Dr ADEL DEJELALI:

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

Hommages respectueux.

Dr BELABDI IBRAHIM :

D'avoir accepté examiner notre travail.

Sincères remerciements.

A monsieur **BELLALA R** qui nous avoir accepté de réaliser notre travail au sein de la clinique.

Des remerciements chaleureux à tous nos enseignants qui nous ont formé et nous ont enrichi par leur science et leur savoir depuis le primaire jusqu'à ce niveau. Hommages respectueux.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

-A mes très chers parents AREZKI et OUNISSA,
sans vous je ne serais pas où j'en suis, pour les valeurs que vous
m'avez transmises et pour avoir toujours cru en moi, j'espère
contribuer à votre fierté, je ne vous le dirai jamais assez : merci pour
tout, et surtout d'être vous !

A Mon frère, KACI et toute ma famille pour leur soutien durant tout
mon cursus d'études.

A mon binôme, NACER et toute sa famille BENELHADJ.

A mon promoteur Mr DJOUDI MAUSTAF
et tous mes amis de l'institut vétérinaire de Blida.

A toute la promotion vétérinaire 2012-2013.

MOHAND-AREZKI

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

-A mes très chers parents FATIHA et SAID,
sans vous je ne serais pas où j'en suis, pour les valeurs que vous
m'avez transmises et pour avoir toujours cru en moi, j'espère
contribuer à votre fierté, je ne vous le dirai jamais assez : merci pour
tout, et surtout d'être vous !

A mes aimables sœurs DJAWIDA et NACERA,
pour leurs soutien durant tout mon cursus d'études.

A mon binôme MOHAND-AREZKI
et toute sa famille MECHEGUEG.

A mon promoteur Mr DJOUDI MAUSTAFI
et tous mes amis de l'institut vétérinaire de Blida.

A toute la promotion vétérinaire 2012-2013.

NACER

ETUDE DU CYCLE ŒSTRAL CHEZ LA CHIENNE :

Application des frottis vaginaux et du dosage de la progestérone au suivi des chaleurs

Résumé :

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.

Cet étude du cycle œstral de la chienne, a caractère analytique, représente un essai comparatif de deux marqueurs de chaleurs. Elle a pour objectif d'évaluer la précision de chacun d'eux, et de rechercher les critères permettant d'améliorer leur utilisation pour déterminer la période de fécondabilité, tout en accommodant les facteurs temps et dépenses.

Dans un premier temps, on rappelle les principales particularités anatomiques et physiologiques de la reproduction chez la chienne. Ensuite, on décrit les différentes méthodes déjà mises en œuvre dans la littérature pour réaliser un suivi de chaleurs dans le but de déterminer la période optimale de fécondabilité.

Dans un second temps, on réalise un suivi de chaleur pour deux chiennes par application de la méthode de frottis vaginaux (coloration de HARRIS SHORR) associé à la mesure de la concentration de la progestérone plasmatique (dosage radio-immunologique).

Les résultats obtenus par le dosage de la progestérone plasmatique montre que :

- La chienne Diana Berger allemande a ovulé durant la période du J-1 au J-13 après qu'elle a manifesté ses chaleurs ; ce qui a conduit par la suite à une insémination artificielle
- par contre la chienne Lisa issue d'un croisement entre un berger allemand et un rottweiler n'a montré aucun signe d'ovulation.

Mots Clés : Reproduction, Cycle œstral, Chaleurs, ovulation, Période fertile, Période de fécondité, frottis vaginaux, progestérone, chienne, carnivores domestiques.

Abstract:

Canine reproduction is distinguished from the reproduction of other domestic species by the physiological characteristics of ovulation, oocyte maturation and embryonic development.

This study of the estrous cycle of the dog has an analytical character and represents a comparative test of two markers of heat (vaginal smears, and measurement of plasma progesterone). Its objective is to assess the precision of each of them, and to seek criteria for improving their use in determining the fertility period, while accommodating time and expense factors.

First, the main anatomical and physiological features of reproduction in the dog are recalled. Then, we describe the different methods already implemented in the literature to carry out a monitoring of heats in order to determine the optimal period of fertility.

In a second step, heat monitoring is carried out for two bitches by applying the vaginal smear method (HARRIS SHORR staining) associated with the measurement of plasma progesterone concentration (radioimmunoassay).

The result obtained by the determination of plasma progesterone shows that:

- German bitch Diana Berger ovulated during the period from D-1 to D-13 after she manifested her heat; which subsequently led to artificial insemination
- On the other hand, the dog Lisa from a cross between a German shepherd and a Rottweiler showed no signs of ovulation.

Keywords: Reproduction, Estral cycle, Heat, ovulation, fertile period, Fertility period, vaginal smears, progesterone, bitch, domestic carnivores.

ملخص

كتابة النص الخاص بك هنا المستخلص: استنساخ الكلاب يختلف عن الاستنساخ في الأنواع المحلية الأخرى التي خصوصيات الفسيولوجية الإباضة، نضوج البويضة وتطور الجنين. هذه الدراسة لدورة داقية من الكلبة لديها الطابع التحليلي، هي محاكمة المقارنة اثنين من علامات الإهتياج (فحص عنق الرحم وجرعة من هرمون البروجسترون). وهو يهدف إلى تقييم دقة كل منها، والبحث معايير لتحسين استخدامها لتحديد فترة الخصوبة، في حين استيعاب الوقت وعوامل النفقات. أولاً، فإنه يشير إلى الخصائص التشريحية والفسيولوجية الرئيسية للاستنساخ في الكلب. ثم نحن نصف أساليب مختلفة نفذت بالفعل في الأدب لإجراء تصفيات متابعة من أجل تحديد الفترة المثلى للخصوبة. في الخطوة الثانية، وتقدم هناك التتبع الإهتياجي لاثنتين من الكلاب التي كتبها تنفيذ طريقة مسحات مهبلية (هاريس شور وصمة عار) المرتبطة قياس تركيز هرمون البروجسترون في البلازما (المقايضة المناعية). النتائج التي تم الحصول عليها عن طريق فحص هرمون البروجسترون البلازما تبين ما يلي: - الراعي الكلبة الراعي الألماني وفصيلة J-1 إلى J-1 الألمانية ديانا تبيض بعد الفترة من روتويلر ظهور عوامل الإهتياج. مما أدى في نهاية المطاف إلى التلقيح الاصطناعي - ليزا الكلبة من خليط بين الراعي الألماني وفصيلة روتويلر التي لم تظهر أي علامات لم تظهري من علامات الإهتياج.

مفاتيح: الاستنساخ، ودورة داقية، الإباضة، الإهتياج، وفترة الخصوبة، وفحص عنق الرحم والبروجسترون، الكلبة.

Sommaire

Introduction générale

Partie bibliographique

CHAPITRE 1 : RAPPELS ANATOMIQUES

1- 1. L'anatomie de l'appareil génital de la chienne	3
1-1-1. Les ovaires.....	3
1-1-2. La trompe utérine	4
1-1-3. L'utérus (Uteri).....	5
1-1-4. Le vagin	6
1-1-5. Le vestibule du vagin	7
1-1-6. La vulve	7
1-1-7. Le clitori.....	8
1-1-8. Les mamelles	9

CHAPITRE 2: RAPPELS PHYSIOLOGIQUES

2-1. Cycle sexuel de la chienne	10
2-1-1. La puberté	10
2-1-2. Les différentes phases du cycle sexuel	10
2-1-2-1. Le pro-oestrus.....	11
2-1-2-2. L'oestrus	12
2-1-2-3. Le métoestrus ou dioestrus	12
2-1-2-4. L'anoestrus	12
2-1-3. Détermination de la phase du cycle sexuel.....	12
2-2- Cycle endocrinien de la chienne	13
2-2-1. L'axe hypothalamus-hypophyse-ovaires et sa régulation	13

2-2-2. Présentation de l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	13
2-2-3. L'hypothalamus et la sécrétion de GnRH	14
2-2-4. L'hypophyse et la sécrétion des hormones hypophysaires FSH, LH et prolactine	15
2-3- Physiologie de l'ovaire	16
2-3-1. Structure de l'ovaire.....	16
2-3-2. Fonction endocrine de l'ovaire	18
2-3-2-1. Régulation de la GnRH et des hormones gonadotropes	18
A-Régulation de la GnRH.....	18
B- Régulation de FSH et LH	18
2-3-2-2. Profils hormonaux durant le cycle ovarien	19
2-3-3. Evènements conduisant à l'ovulation	19
2-3-3-1. L'ovogenèse	19
2-3-3-2. La folliculogenèse	20
2-3-3-3. L'ovulation	20

CHAPITRE 3 : FROTTIS VAGINAUX ET PROGESTERONEMIE

3-1.le suivi des chaleurs.....	21
3-1-1.L'examen cytologique vaginal (Frottis vaginal).....	21
3-1-1-1.Principe de l'examen cytologique vaginal.....	21
3-1-1-2. La technique de réalisation d'un frottis vaginal.....	21
A-Le prélèvement	21
B -L'étalement	22
C -La fixation	23
d-La coloration.....	23
d-1 -La coloration au bleu de méthylène	24
d-2 -La coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG)	24

d-3 -La coloration de Harris-Shorr.....	25
d-4 -La coloration de Papanicolaou.....	27
3-1-1-3. Interprétation d'un frottis vaginal	28
a -Lecture des lames.....	28
b -Les types cellulaires retrouvés sur un frottis vaginal	29
c -Les variations de la cytologie vaginale au cours du cycle œstral	31
c-1 -proœstrus	31
c-2 -œstrus	33
c-3 -métœstrus.....	34
c-4 -anœstrus	34
d -Les indices cytologiques	35
3-1-2. Dosage de la progestérone sérique	36
3-1-2-1. Généralités sur l'évolution de la progestéronémie	36
3-1-2-2. Techniques de dosage de la progestérone	36
3-1-2-2. A. Méthodes quantitatives.....	37
A-1 -Méthodes radio-immunologique.....	37
A-2 -Méthodes immuno-enzymatiques.....	37
3-1-2-2.B. Méthodes semi quantitatives	38
3-1-2-3. Progestéronémie et suivi des chaleurs	38
3-1-2-4. Conclusion	40

Partie expérimentale :

1-Objectif de l'étude :.....	41
2-Matériels :.....	41
2-1. Zone d'étude :.....	41
2-2. Animaux :.....	41

3-3. Matériel utilisé	42
3-3-1. Ecouvillon	42
3-3-2. tubes pour prélèvements de sang	42
3-3-3. Seringues	42
3-3-4. lames porte objet	42
3-3-5. Coloration Harris Shorr et MGG	43
3- Méthodes :.....	43
3-1. les frottis vaginaux	43
3-2. dosage de la progestéronémie	43
4- Résultats et Discussion :.....	44
Conclusion :.....	50
Références Bibliographiques :.....	51
Annexes :.....	55

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Technique de coloration de Harris-Shorr [SCHUTTE AP;1967].....	27
Tableau 2: Technique de coloration de Papanicolaou. *mélange de vert lumière et de brun bismarck (Papanicolaou – en ligne).....	28

LISTE DES FIGURES

Fig 1 : Schéma de l'appareil génital de la chienne d'après FONTBONNE et al, 2005	3
Fig 2 : ovaires de chienne (ANONYME).....	4
Fig 3 : les trompes utérines de la chienne (vétopsy mai 2017).....	5
Fig 4 : Représentation schématique de l'appareil génital chez la chienne (Conformation intérieure en vue dorsale). [BARONE R; 1978]	6
Fig 5 : Représentation schématique du col et du vagin chez la chienne [PINEDA et al;1973] .	7
Fig 6 : Régions topographiques du Pelvis et des organes génitaux externes. (Vue caudale de la région périnéale d'une chienne au repos sexuel) [DONE SH, GOODY PC, EVANS SA, STICKLAND NC.; 1996]	8
Fig 7 : structure du Clitoris (vétopsy mai 2017)	8
Fig 8 : les mamelles de la chienne (vétopsy mai 2017)	9
Fig 9 : Répartition des différentes phases du cycle sexuel d'après FONTBONNE et al., 2005	11
Fig 10 : Le système porte hypothalamo-hypophysaire d'après Vie, site ressource en Sciences de la Vie [http://www.snv.jussieu.fr/vie/index.html].....	13
Fig 11 : Représentation schématique fonctionnelle de l'axe hypothalamo-hypophysaire, d'après Vie, site ressource en Sciences de la Vie [http://www.snv.jussieu.fr/vie/index.html].....	14
Fig 12 : Représentation schématique d'un ovaire d'après THIBault et LEVASSEUR, 2001	17
Fig 13 : Représentation d'un follicule pré-ovulatoire d'après DRIANCOURT et al. 2001	17
Fig 14 : Changements hormonaux et physiologiques durant le cycle ovarien chez la chienne d'après CONCANNON, cité par JOHNSTON et al., 2001	19
Fig 15 : Technique d'écouvillonnage chez la chienne [EILTS BE; 2007]	22
Fig 16: Techniques d'étalement d'un frottis vaginal [EILTS BE; 2007]	23
Fig 17 : Matériel pour coloration de May-Grünwald-Giemsa modifiée : Diff-Quick®	25

ENGLAND G, CONCANNON PW.; 2002]	
Fig 18 : Frottis vaginaux de chienne aux différentes phases du cycle œstral, colorés avec la méthode May-Grünwald-Giemsa modifiée [ENGLAND G, CONCANNON PW.; 2002]	25
Fig 19 : Matériel pour coloration d'Harris-Schorr. [PIERSON P et al.; 1999]	26
Fig20 : Frottis vaginaux de chienne aux différentes phases du cycle œstral, colorés avec la méthode du trichrome d'Harris-Schorr [PIERSON P et al.; 2002]	27
Fig21 : Frottis vaginaux pratiqués chez une femme et colorés avec la technique de Papanicolaou. [HERON JF; 2006]	28
Fig 22 : Les cellules d'un frottis vaginal [NEVEUX M;1999]	30
Fig 23 : Microphotographies de lames de frottis vaginaux aux différents stades du cycle œstral de la chienne (colorés au trichrome d'Harris- Shorr) [FONTBONNE A; GUERIN C; 2003]	32
Fig 24 : Microphotographies de frottis vaginaux aux différents stades du cycle chez la chienne (colorés au Diff Quick®) [BOWEN 2003]	33
Fig 25 : Photo Berger Allemand.....	41
Fig 26 : Photo Croisement Berger Allemand X Rottweiler	41
Fig 27 : Écouvillons.....	42
Fig 28 : Tubes secs (sérum)	42
Fig 29 : Tubes héparines (plasma).....	42
Fig 30 : Seringue de 5cc	42
Fig 31 : Lame porte –objet pour les frottis vaginaux	42
Fig 32: Harris Shorr	43
Fig 33: MGG	43

Fig 34: Cinétique de la progesterone chez la chienne	43
Fig 35 : Photo : la chienne Diana en consultation (photo personnelle)	44
Fig 36 : Photo : perte de sang (photo personnelle)	44
Fig 37 : frottis vaginaux	45
Fig 38 : lame après coloration(photo personnelle)	45
Fig 39 : Photo : Lame du frottis vaginal (Phase de proestrus) (photo personnelle)	46
Fig 40 : Photo : Proestrus Gr 100 (Alain Fontbonne)	46
Fig 41 : Photo : Proestrus (Vetopsy)	46
Fig 42 : Photo : prélèvement sanguin (photo personnelle)	47
Fig 43 : Photo: récolte de sérum après centrifugation(3000 trs pdt 10 min)(photo personnelle).....	47
Fig 44 : résultats d'analyses de la progesteronémie, Diana (BA)	48
Fig 45 : résultats d'analyses de la progesteronémie, Lisa (x)	49

LISTE DES ABREVIATIONS

LH: Luteinizing hormone

FSH: Follicule-stimulation Hormone

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Fig : Figure

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormon

Introduction

Introduction

Les études sur la reproduction chez la chienne ont débuté dès le début du XX^{ème} 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 thèse expérimentale vise à étudier les rapports entre deux « marqueurs » du cycle oestral de la chienne : les frottis vaginaux et la progestéronémie. Les frottis vaginaux sont une technique cytologique simple, et peu coûteuse pouvant être employée au sein des cliniques vétérinaires, mais manquant de précision. La mesure de la progestéronémie est uniquement un indicateur de la période de fécondité. Les dosages sont onéreux (15 euros), et l'obtention des résultats est longue (au minimum 24 heures). Il convient de s'intéresser à la période précédant l'ovulation. En effet au tout début des chaleurs, la progestéronémie est basale.

Le but de notre étude est de voir s'il est possible de revaloriser les frottis vaginaux lors de cette phase, en trouvant des critères cytologiques simples indiquant avec une marge d'erreur minimale que la progestéronémie est basale et donc qu'il n'est pas encore nécessaire d'effectuer des dosages. Notre étude est axée sur la recherche du moment optimal de l'ovulation en s'appuyant sur le dosage de la progestéronémie et la réalisation des frottis vaginaux. Dans le cadre de cette étude, nous intéressons uniquement aux corrélations éventuelles entre ces outils diagnostics en début des chaleurs.

L'intérêt de notre recherche est de permettre au praticien de choisir de façon raisonnée le ou les examens complémentaires fiables, les moins onéreux possible, afin de réaliser au mieux le suivi des chaleurs.

Nous aborderons d'abord, dans une première partie bibliographique l'anatomie de l'appareil génitale de la chienne ainsi que la physiologie et l'endocrinologie du cycle sexuel. Une seconde partie sera consacrée à notre étude expérimentale.

Partie bibliographique

CHAPITRE 1 : RAPPELS ANATOMIQUES**1-1. L'anatomie de l'appareil génital de la chienne :**

La connaissance de l'appareil génital de la chienne est indispensable à la réalisation de certains examens courants dans le domaine de la reproduction, comme les frottis vaginaux, l'échographie ovarienne ou encore l'endoscopie vaginale.

(FONTBONNE et al, 2007) (DEGUEURCE, 2003)

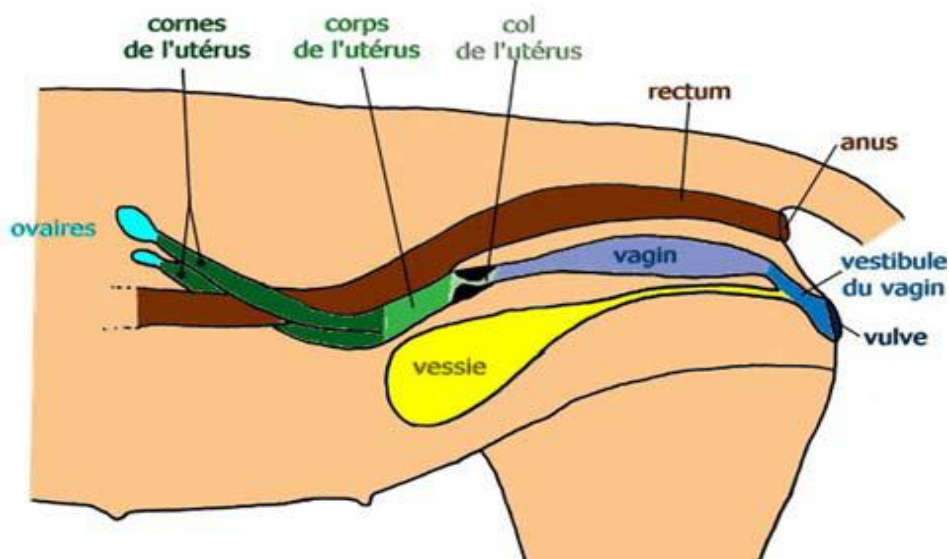


Fig 1 : Schéma de l'appareil génital de la chienne d'après FONTBONNE et al, 2005

1-1-1. Les ovaires:

Les ovaires sont allongés et aplatis chez la chienne. Ils mesurent 15 à 20 millimètres. Ils sont cachés dans une bourse ovarique presque complètement close et chargée de graisse. L'oviducte, situé également dans la bourse ovarique, est déporté à la face médiale et dorsale de l'ovaire.

Chaque ovaire est situé à petite distance du pôle caudal du rein correspondant, généralement latéralement, en regard des troisième et quatrième vertèbres lombaires, soit à six à huit centimètres de la dernière côte. Ils sont plus

ventraux chez une femelle ayant déjà porté. (FONTBONNE et al, 2007) (DEGUEURCE, 2003)

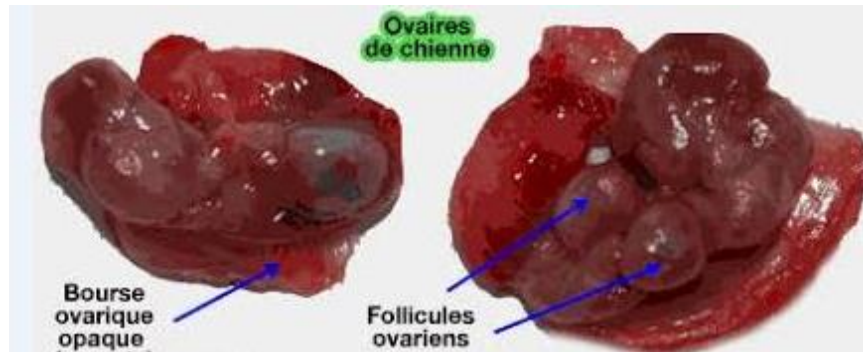


Fig 2 : ovaires de chienne (ANONYME)

1-1-2. La trompe utérine :

Les oviductes, appelés également *trompe utérine*, *trompe de Fallope* ou *salpinx*, sont deux conduits tubulaires, de calibre très restreint, s'étendant de l'utérus à l'ovaire en décrivant un trajet relativement flexueux entre les deux lames du ligament large. Ils sont très étroits chez la chienne, à peine sinueux, mesurant de quatre jusqu'à sept et demi centimètre (4 à 7.5 cm).

Chacun de ces deux conduits (oviductes) comprend deux portions : une portion interstitielle dite également (*intra-utérine* ou *intra-murale*) qui correspond à l'épaisseur de la paroi utérine et prend naissance à la partie antérieure de la corne utérine par un orifice utérin dit: *l'ostium uterinum* ; et une portion intra-abdominale se divisant en trois parties :

- un segment étroit, appelé l'isthme,
- une partie plus longue et s'élargissant de plus en plus, dite l'ampoule,
- une portion évasée en forme d'entonnoir, nommé pavillon ou *infundibulum*. (Drion et al, 2003).

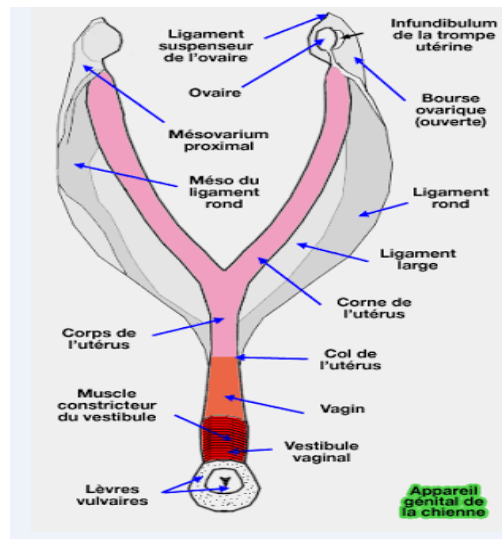


Fig 3 : les trompes utérines de la chienne (vétopsy mai 2017)

1-1-3. L'utérus (Uteri) :

L'utérus est composé d'un corps et de deux cornes étroites et longues dans lesquelles se répartissent les embryons durant la gestation : il est bifide. Chez une chienne de taille moyenne, les cornes mesurent 12 à 15 centimètres de long, le corps trois à quatre centimètres et le col un à deux centimètres de long.

Le col est oblique ventro-caudalement, de sorte que l'ostium externe de l'utérus est tourné vers le plancher du vagin. La portion vaginale du col est bordée par un fornix profond ventralement. Le corps est dorsal à la vessie. Les cornes sont cylindriques, de calibre uniforme. Elles sont habituellement appliquées contre la paroi du flanc. Leur apex est voisin de la région lombaire, en regard des quatrième et cinquième vertèbres lombaires. (FONTBONNE et al, 2007) (DEGUEURCE, 2003)

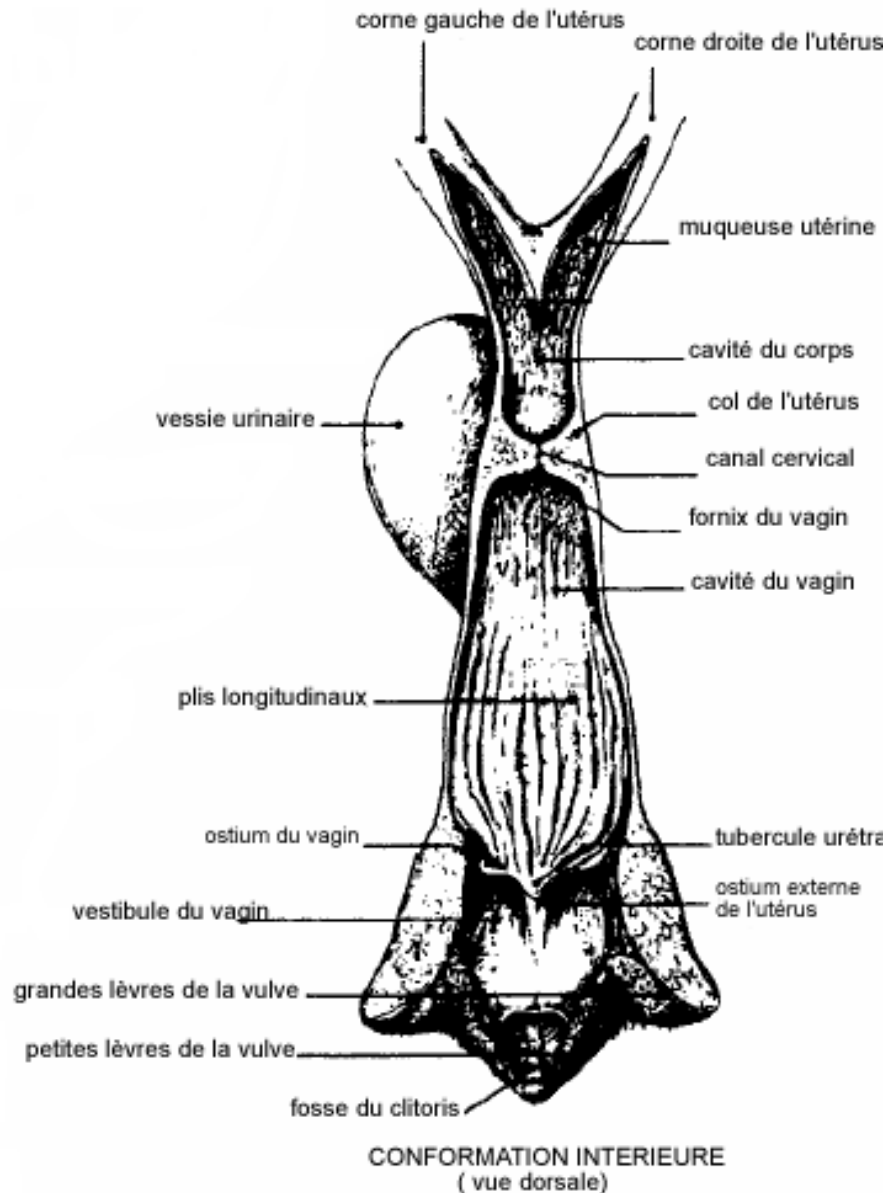


Fig 4 : Représentation schématique de l'appareil génital chez la chienne
(Conformation intérieure en vue dorsale).

[BARONE, 1978]

1-1-4. Le vagin :

Le vagin est très long chez la chienne ; il mesure 15 à 30 centimètres. Il est beaucoup plus large en partie caudale qu'en partie crâniale du fait de l'existence d'un pli médian dorsal en partie antérieure.

Du fait de la longueur du vagin, il est impossible de visualiser le col de l'utérus par simple examen gynécologique au spéculum. (FONTBONNE et al, 2007)
(DEGUEURCE, 2003)

1-1-5. Le vestibule du vagin :

Le vestibule du vagin est long de cinq à six centimètres. Comme le montre la figure 1, il est coudé : d'abord orienté crânio-dorsalement, il prend une orientation horizontale à sa jonction avec le vagin.

Ainsi, lors de l'examen au spéculum ou de la réalisation d'un frottis vaginal, l'opérateur doit diriger dorsalement l'ustensile avant de le basculer horizontalement pour pouvoir le diriger dans le vagin.

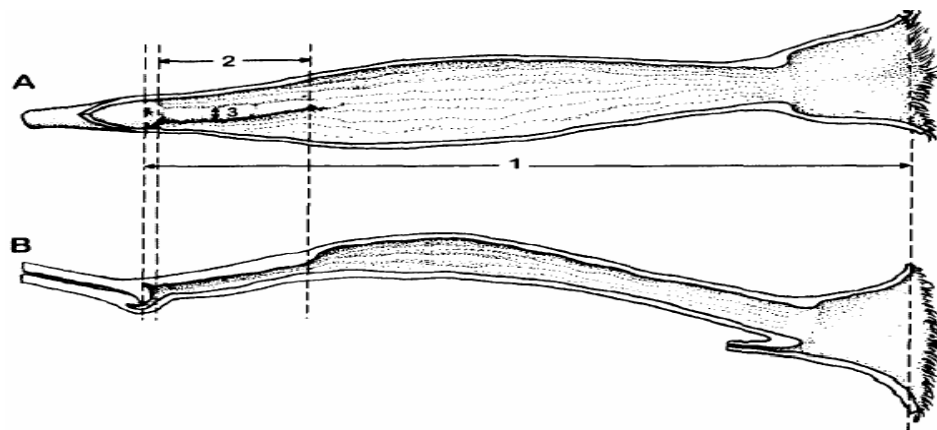


Fig 5 : Représentation schématique du col et du vagin chez la chienne (**A** : Conformation intérieure en vue dorsale, **B** : Conformation intérieure en vue latérale « *Coupe sagittale* ») Légendes : (1) : longueur du vagin et de la vulve; (2) : longueur du pli moyen dorsal ; (3) : Largeur du pli moyendorsal.

[PINEDA et al, 1973]

1-1-6. La vulve :

Cet organe génital copulateur se divise chez la chienne en un orifice extérieur ou ouverture vulvaire (vulve proprement dite) et un vestibule vaginal formé par le conduit vulvaire qui est l'équivalent de l'urètre pelvien du mâle.

La vulve proprement dite se compose des lèvres vulvaires (*puddental labia*) d'une fente vulvaire (*Rima pudenda*) et d'un clitoris (Orlandi, 2000)

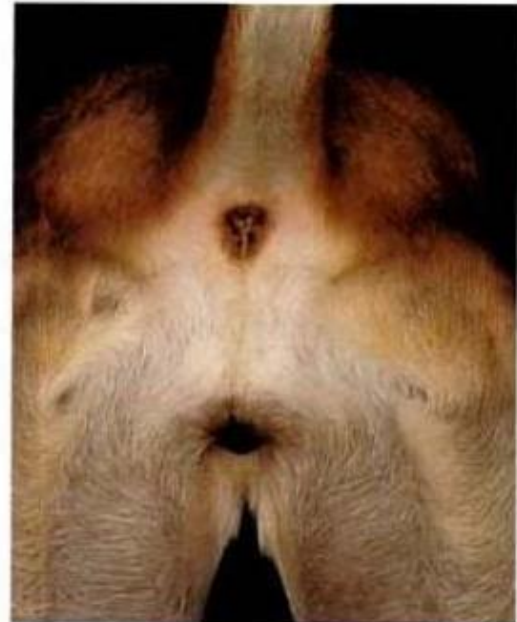
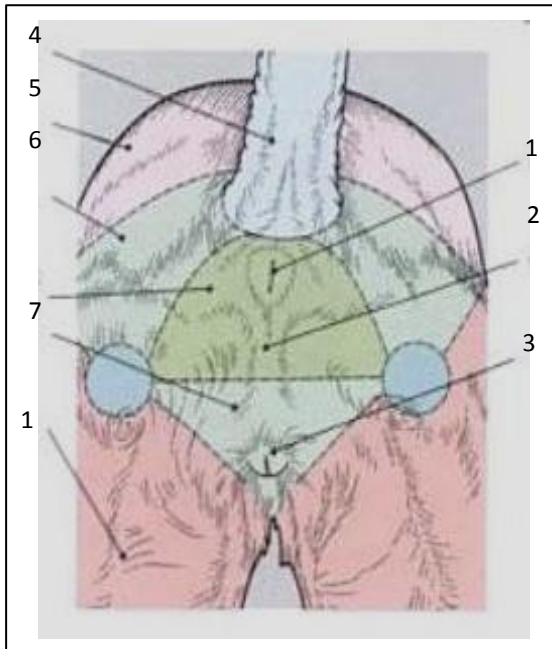


Fig 6 : Régions topographiques du Pelvis et des organes génitaux externes. (Vue caudale de la région périnéale d'une chienne au repos sexuel)

[DONE et al, 1996]

LEGENDE:

(1):Anus (2): Vestibule (3):Vulve (4) Région caudale (5): Région glutéale (6):Fosse ischiorectale (7):Région périnéale: Région anale et Région urogénitale.

1-1-7. Le clitoris :

Le clitoris, relativement petit chez la chienne, est situé dans la fosse clitoridienne localisée sur le plancher du vestibule du vagin. Lors de la réalisation d'un frottis vaginal, il faut veiller à ne pas pénétrer par erreur dans cette fosse, ce qui rendrait le frottis ininterprétable car constitué de cellules clitoridiennes au lieu de cellules vaginales que l'on cherche à observer. (FONTBONNE et al, 2007) (DEGUEURCE, 2003).

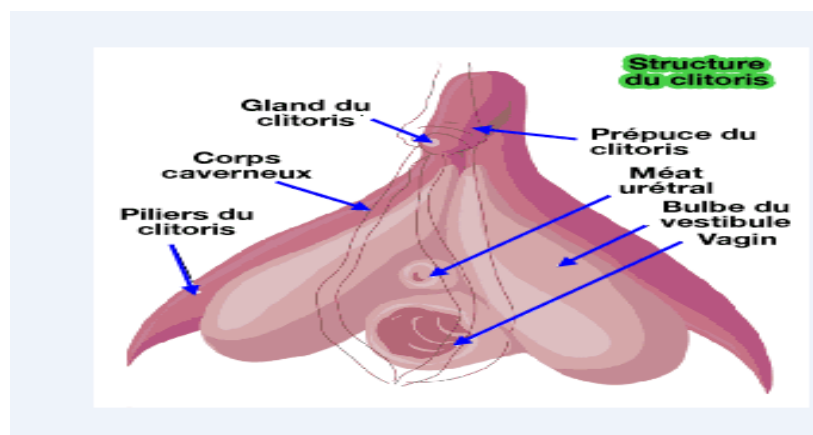


Fig 7 : structure du Clitoris(vétopsy mai 2017)

1-1-8. Les mamelles :

Les mamelles sont réparties du pubis au thorax sur deux chaînes parallèles, séparées par un large sillon médian. En moyenne une chienne possède 5 paires de mamelles dont deux (02) pectorales, deux (02) abdominales et une (01) inguinale. Chaque glande mammaire a la forme d'un cône court et obtus, avec en général la paire inguinale plus développée que les autres. Les mamelles sont identifiables de l'extérieur par la présence de tétines dont chacune est perforée de huit (08) à vingt (20) orifices microscopiques. (Derivaux et Ectors, 1980).

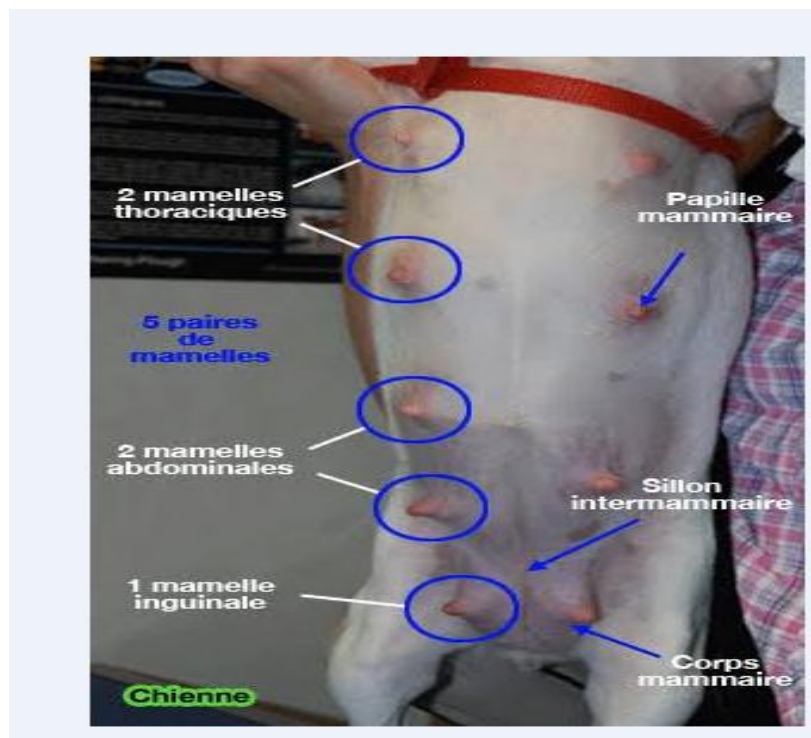


Fig 8 : les mamelles de la chienne (vétopsy mai 2017)

CHAPITRE 2: RAPPELS PHYSIOLOGIQUES

2-1. Cycle sexuel de la chienne :

Le cycle sexuel de la chienne est qualifié de mono-oestrien, c'est-à-dire que la chienne n'a qu'une seule période de chaleurs par cycle (**JOHNSTON *et al*, 2001**).

L'intervalle entre deux périodes de chaleurs est variable selon la chienne et selon la race. En moyenne elle a des chaleurs 1 à 2 fois par an, avec un intervalle allant de quatre à douze mois (cinq à sept mois en moyenne) (**JOHNSTON *et al*, 2001**).

2-1-1. La puberté :

La puberté est définie comme la période au cours de laquelle la capacité de reproduction est atteinte. Chez la chienne, elle est identifiée par la mise en évidence des premières chaleurs. Elle survient lorsque la chienne a atteint 80% de son poids adulte, soit généralement entre quatre et dix-huit mois.

Il existe une très grande variabilité individuelle et interraciale. Ainsi, les chiennes de petites races sont généralement pubères avant neuf mois alors que les chiennes de grandes races peuvent présenter les premiers signes de chaleurs vers quinze mois. La plupart des chiennes n'atteignent pas leurs pleines facultés de reproduction avant les troisième ou quatrième chaleurs.

C'est avant tout la régularité des chaleurs qui optimise la fonction de reproduction. En effet, les chiennes qui ont des chaleurs irrégulières souffrent le plus souvent de troubles de la reproduction. (**FONTBONNE *et al*, 2007**)

2-1-2. Les différentes phases du cycle sexuel :

Le cycle oestral, c'est-à-dire le cycle sexuel comportemental de la chienne, se divise en quatre phases : le pro-oestrus, l'oestrus, le métoestrus ou dioestrus et l'anoestrus. Chacune est caractérisée par des manifestations anatomiques, cliniques et comportementales, un profil hormonal et une cytologie vaginale particulière.

La répartition de ces différentes phases est présentée sur la figure 9 :

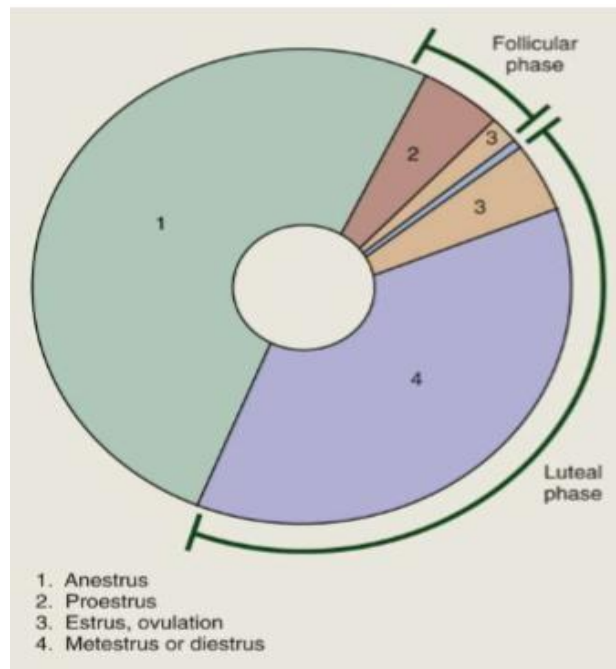


Fig 9 : Répartition des différentes phases du cycle sexuel d'après FONTBONNE *et al*, 2005

Le cycle ovarien de la chienne est composé d'une phase folliculaire et d'une phase lutéale qui sont séparées par l'ovulation.

Le pro-oestrus constitue avec l'oestrus les chaleurs de la chienne. Ces deux phases se distinguent par une modification comportementale. L'oestrus est en effet défini par la période d'acceptation du chevauchement du mâle. (FONTBONNE *et al*, 2007)

2-1-2-1. Le pro-oestrus :

C'est le début des chaleurs. Il dure trois à vingt jours et correspond à la période de croissance folliculaire et d'imprégnation oestrogénique. La chienne attire les mâles mais refuse l'accouplement.

Sous l'effet des oestrogènes, sécrétés à des concentrations sériques de plus en plus élevées par les follicules, des modifications physiques sont observées :

- des pertes séro-sanguinolentes à la commissure de la vulve, dues à un développement de l'utérus accompagné d'une congestion de sa muqueuse. Néanmoins, certaines chiennes présentent des pertes très discrètes (voire inapparentes) ;
- une vulve œdémateuse : gonflée et turgescence accompagnée d'une dilatation du vagin, nécessaire pour permettre le futur accouplement (la muqueuse du vagin épaisse et œdémateuse).

2-1-2-2. L'oestrus :

Lorsque la concentration sérique en oestrogènes arrive à son maximum, le comportement de la chienne se modifie. Elle commence à devenir réceptive aux mâles et accepte l'accouplement. En pratique, la chienne n'accepte toujours d'être saillie par le partenaire qui lui a été choisi.

Généralement, les pertes vulvaires s'éclaircissent et deviennent rosées à transparentes. La vulve est toujours gonflée mais moins turgescente. C'est pendant l'oestrus que se déroule l'ovulation.

À l'inverse des autres femelles domestiques, les ovocytes de la chienne libérés lors de l'ovulation ne sont pas immédiatement fécondables. Ils sont en prophase I de méiose et doivent poursuivre leur maturation pendant encore environ deux jours avant de pouvoir être pénétrés par les spermatozoïdes. Ainsi, le moment optimal de fécondation se situe deux jours après l'ovulation (**FONTBONNE et al, 2007**).

De plus, la survie des ovocytes est courte. En effet, on a estimé que la plupart des chiennes restent fécondables environ 48 heures voire trois jours après les deux jours de maturation, ce qui est peu comparé à la période de chaleurs qui s'étend sur trois semaines environ.

2-1-2-3. Le métoestrus ou dioestrus :

Lors du métoestrus ou dioestrus, il n'y a plus de pertes vulvaires et la vulve reprend une taille normale même si elles ne sont pas saillies, les chiennes ont après les chaleurs un fonctionnement quasiment identique à celui qu'elles auraient en cas de gestation. C'est ce qu'on appelle la pseudo-gestation, période pendant laquelle les corps jaunes ovariens sécrètent de la progestérone. Cette phase dure en moyenne 60 jours (**FONTBONNE et al, 2007**).

2-1-2-4. L'anoestrus :

C'est une phase de repos sexuel, d'une durée moyenne de quatre à cinq mois mais pouvant varier de deux à dix mois sans conséquence pathologique (**CONCANNON, 1993**).

2-1-3. Détermination de la phase du cycle sexuel :

La distinction entre les différentes phases du cycle sexuel se fait selon les observations anatomiques et comportementales, mais aussi sur la cytologie vaginale propre à chaque phase, ou encore le profil hormonal.

2-2- Cycle endocrinien de la chienne :

La fonction endocrine correspond à la production par les ovaires des hormones sexuelles femelles.

2-2-1. L'axe hypothalamus-hypophyse-ovaires et sa régulation :

La régulation des fonctions gonadiques peut être, en première analyse, interprétée comme résultant d'un contrôle exercé par l'hypophyse sur les gonades. En réalité, elle résulte de mécanismes beaucoup plus complexes, faisant intervenir l'hypothalamus d'une part, des rétrocontrôles s'exerçant sur l'hypothalamus et l'hypophyse d'autre part, ainsi que les hormones gonadiques (**THIBAUT et LEVASSEUR, 2001**).

2-2-2. Présentation de l'axe hypothalamo-hypophysaire :

Le complexe ou axe hypothalamo-hypophysaire est constitué de l'hypothalamus et de l'hypophyse tous deux en relation par voie nerveuse et sanguine par le système porte hypothalamo-hypophysaire, qui est présenté sur la figure 10 (**THIBAUT et LEVASSEUR, 2001**).

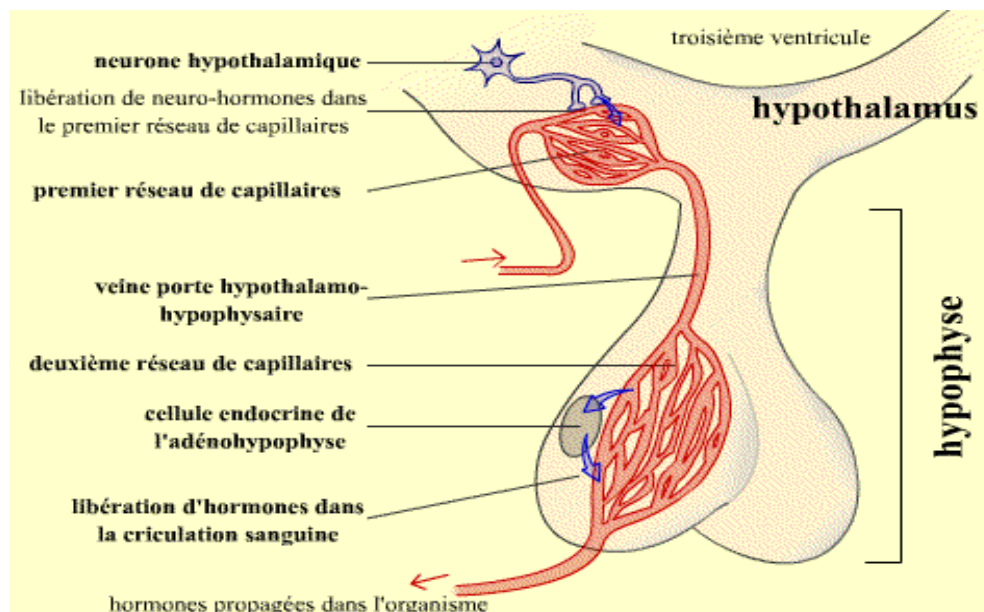


Fig 10 : Le système porte hypothalamo-hypophysaire d'après Vie, **site ressource en Sciences de la Vie** [<http://www.snv.jussieu.fr/vie/index.html>].

Le système porte hypothalamo-hypophysaire permet la transmission d'informations de l'hypothalamus à l'hypophyse. Les neurones hypothalamiques sécrètent des neuro-hormones qui sont ensuite captées par les cellules de l'hypophyse antérieure.

Une rétroaction inhibitrice est exercée par les hormones de la glande endocrine périphérique sur les neurones hypothalamique et les cellules de l'hypophyse antérieure, comme le montre la figure 11.

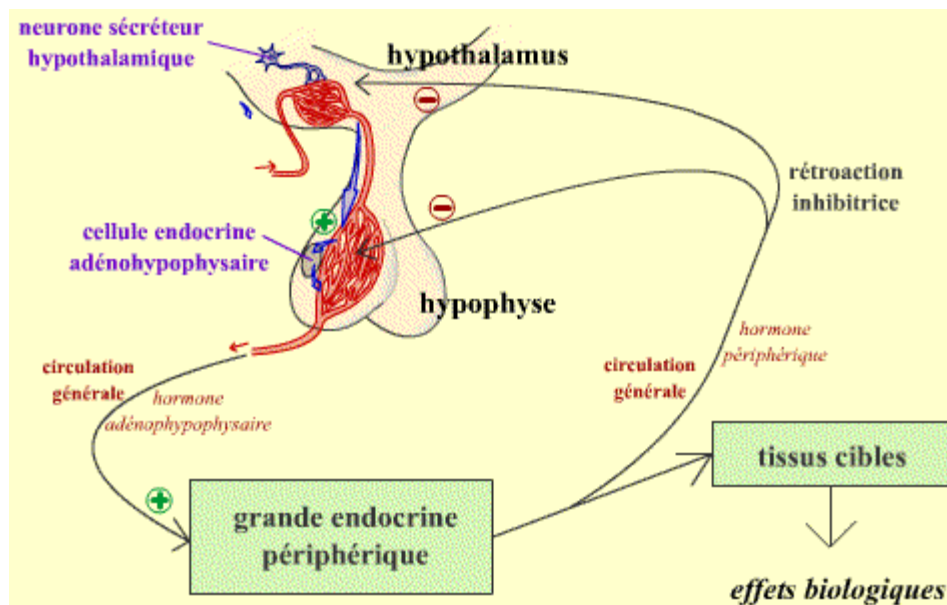


Fig 11 : Représentation schématique fonctionnelle de l'axe hypothalamo-hypophysaire , d'après Vie, **site ressource en Sciences de la Vie** [<http://www.snv.jussieu.fr/vie/index.html>]

2-2-3. L'hypothalamus et la sécrétion de GnRH :

La GnRH (Gonadotrophin releasing hormone ou gonadolibérine) est un décapeptide dont la structure est identique chez tous les mammifères.

Elle est synthétisée par l'hypothalamus et directement libérée dans les capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire. Elle exerce son action stimulatrice sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure suite à une fixation sur les récepteurs à la GnRH. La GnRH a un rôle dans la sécrétion de la FSH et de LH. **(CALDANI *et al*, 1991)**

En phase de repos, la GnRH est libérée de façon pulsatile (phénomène complexe qui se traduit par des changements rapides des concentrations plasmatiques à intervalles plus ou moins réguliers). Il en résulte une libération progressive et soutenue de FSH et une libération pulsatile de LH dans l'heure qui suit la décharge de GnRH. Dans la majorité des cas, il y a coïncidence presque parfaite entre le signal hypothalamique (pulse de GnRH) et la réponse de l'hypophyse (pulse de LH).

La fréquence et l'amplitude des pulses de GnRH sont des éléments déterminants dans l'intensité et la qualité de la réponse gonadotrope. Chez la femelle, la fréquence de décharge augmente au cours de la phase folliculaire pour atteindre une valeur maximale en phase ovulatoire.

Le mode de sécrétion pulsatile joue un rôle protecteur vis-à-vis d'une stimulation trop intense susceptible d'aboutir à une mise au repos de l'axe hypothalamo-hypophysaire. **(COUNIS *et al*, 2001).**

2-2-4. L'hypophyse et la sécrétion des hormones hypophysaires FSH, LH et prolactine :

La FSH et la LH sont des glycoprotéines synthétisées par les cellules gonadotropes. Celles-ci sont situées dans le lobe antérieur de l'hypophyse et irriguées exclusivement par le sang du système porte hypothalamo-hypophysaire, véhiculant notamment la GnRH. Elles sécrètent la FSH et la LH dans la circulation systémique. **(COUNIS *et al*, 2001) (DRIANCOURT *et al*, 2001)**

Elles confèrent à l'hypophyse une fonction de relais amplificateur dans le contrôle de la fonction de reproduction :

- par le système nerveux central, principalement sous l'impulsion de la GnRH ;
- par des hormones périphériques, notamment les stéroïdes, via la circulation générale

La FSH et la LH jouent un rôle primordial dans le développement et la régulation de la fonction endocrine des gonades.

La FSH est une hormone qui agit à tous les stades du développement folliculaire. L'augmentation de la FSH circulante est un évènement-clé dans la folliculogénèse (croissance et maturation des follicules entre la réserve constituée par l'ovogénèse et l'ovulation par rupture des follicules) chez la chienne. **(KOOISTRA *et al*, 1999).**

Elle déclenche et stimule la croissance folliculaire. En synergie avec la LH, elle induit également la synthèse d'oestrogènes par les cellules folliculaires en stimulant dans les cellules de la Granulosa l'activité de l'aromatase, enzyme qui transforme les androgènes en œstradiol.

La LH est l'hormone de la stéroïdogenèse et de la lutéinisation. Elle stimule la synthèse des stéroïdes sexuels en favorisant la conversion du cholestérol en progestérone (elle-même précurseur des androgènes et des oestrogènes). Sa durée de vie est plus courte que celle de la FSH. Son action complète celle de la FSH : elle active la maturation folliculaire et provoque l'ovulation puis la formation du corps jaune sur les follicules préalablement sensibilisés par la FSH.

La prolactine est élaborée par les cellules lactotropes et mammosomatotropes de l'hypophyse antérieure. Elle joue certes un rôle dans le développement de la mamelle, mais pas seulement. Chez la chienne, elle joue également le rôle de facteur lutéotrope, permettant ainsi le maintien du corps jaune pendant la gestation, en association avec la LH. Elle joue aussi un rôle dans la maturation des follicules, en inhibant la sécrétion d'œstradiol et en régulant l'activité de l'aromatase stimulée par la FSH.

2-3- Physiologie de l'ovaire :

2-3-1. Structure de l'ovaire :

L'ovaire est constitué d'une corticale et d'une médullaire. La corticale contient les follicules ovariens, qui sont des édifices cellulaires sphériques de taille variable. Il s'y déroule l'ovogenèse et ils assurent une part importante de la fonction endocrine de l'ovaire. (**DRIANCOURT *et al*, 2001**) (**FONTBONNE *et al*, 2007**)

Au cours du cycle sexuel, les follicules passent par différentes formes comme le montre la figure 12 : les follicules primordiaux deviennent primaires puis secondaires puis tertiaires (ou cavitaires) et enfin mûrs ou de De Graaf. Ces derniers sont dits follicules pré-ovulatoires (présentés sur la figure 13) et leur contenu est expulsé lors de l'ovulation dans le pavillon de l'oviducte, appelé infundibulum. Après l'expulsion de l'ovocyte, les follicules se transforment en corps jaunes, constitués d'une couche thécale et d'une couche lutéinique issue respectivement des cellules de la thèque interne et des cellules de la Granulosa de l'ancien follicule.

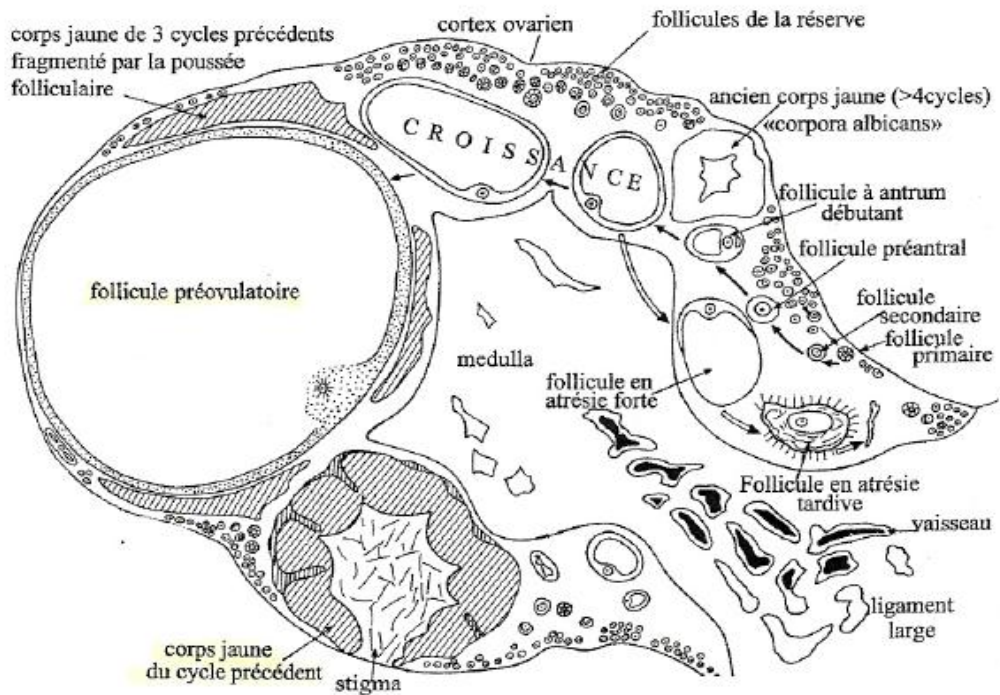


Fig 12 : Représentation schématique d'un ovaire d'après **THIBAUT et LEVASSEUR, 2001**

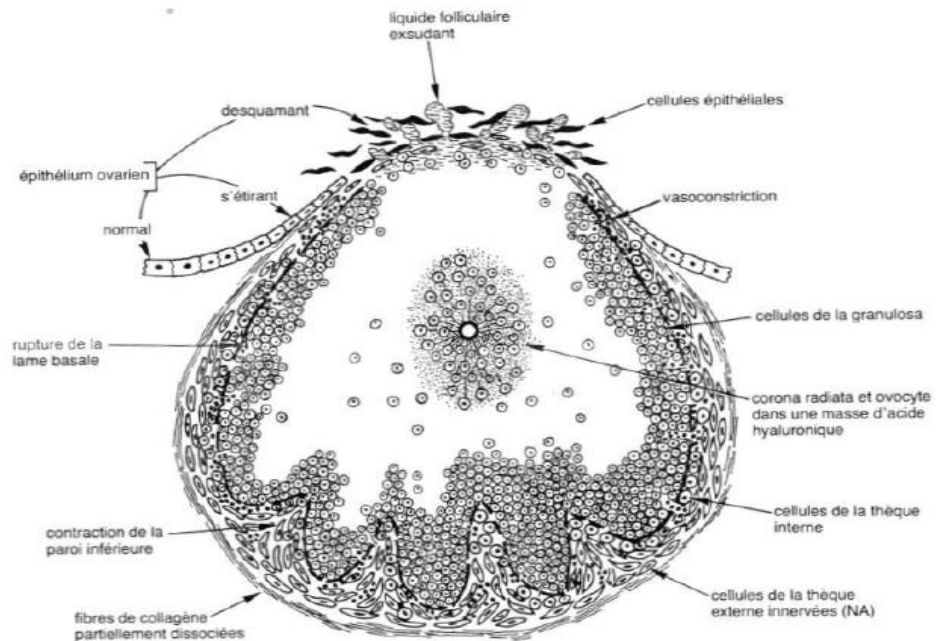


Fig 13 : Représentation schématique d'un follicule pré-ovulatoire d'après **DRIANCOURT et al, 2001**

2-3-2. Fonction endocrine de l'ovaire :

Le follicule tertiaire a une fonction endocrine : les cellules de la Granulosa synthétisent des androgènes, qui sont ensuite transformés en oestrogènes (action de l'aromatase). Elles ont aussi des récepteurs à la FSH, permettant la stimulation de l'activité de l'aromatase. Les grandes cellules thécales du corps jaune, issues de la Granulosa, synthétisent également des oestrogènes.

Les oestrogènes sont présents essentiellement sous la forme d'oestrone et de 17- β oestradiol. Ils régissent notamment les modifications histologiques et comportementales observées lors du pro-oestrus.

La progestérone est principalement sécrétée par le corps jaune, mais également par la paroi des follicules ovariens matures en faible quantité avant l'ovulation. C'est une des particularités de la chienne : sous l'effet du pic pré-ovulatoire de LH, les cellules de la Granulosa se lutéinisent. Elle est responsable des manifestations comportementales de l'oestrus, après imprégnation oestrogénique de l'organisme.

(DRIANCOURT *et al*, 2001) (FONTBONNE *et al*, 2007)

2-3-2-1. Régulation de la GnRH et des hormones gonadotropes :

A-Régulation de la GnRH :

Les androgènes et les oestrogènes à faible dose en association avec la progestérone à faible dose (situation retrouvée en début de phase folliculaire) exercent un rétrocontrôle négatif sur la synthèse de GnRH qui est alors délivrée à un niveau basal et continu.

À forte dose d'oestrogènes (situation retrouvée pendant la période pré-ovulatoire), la synthèse est au contraire accrue et la libération de GnRH devient pulsatile et plus fréquente. **(SCHNEIDER *et al*, 2006)**

B- Régulation de FSH et LH :

L'essentiel de la régulation est assurée par le rétrocontrôle des hormones gonadiques.

Les androgènes exercent un rétrocontrôle spécifique sur la LH, tandis que les œstrogènes ont un rétrocontrôle élargi à la FSH et à la LH. Il faut ajouter le rôle majeur de l'inhibine, synthétisée par les cellules de la Granulosa, sur la baisse de synthèse de la FSH. **(SCHNEIDER *et al*, 2006)**

2-3-2-2. Profils hormonaux durant le cycle ovarien :

Le cycle endocrinien s'intéresse aux variations hormonales. Il concerne la GnRH, les hormones gonadotropes FSH, LH, la prolactine, les hormones ovariennes : œstrogènes, progestérone, mais aussi l'inhibine. Il est globalement caractérisé par une domination des œstrogènes et de l'inhibine dans sa première partie et une domination de la progestérone après l'ovulation.

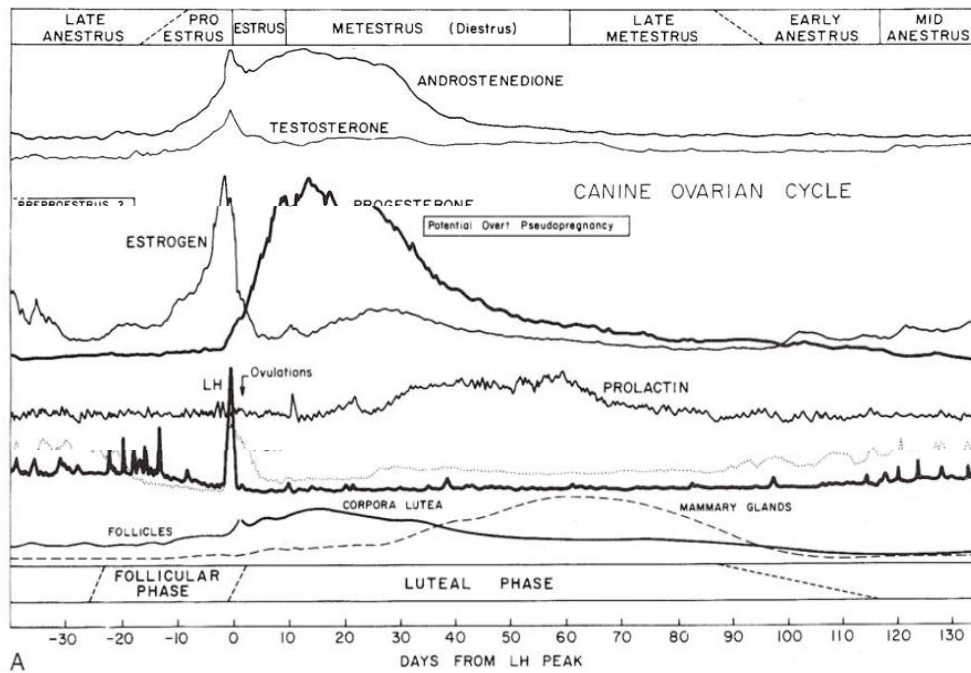


Fig 14 : Changements hormonaux et physiologiques durant le cycle ovarien chez la chienne d'après **CONCANNON, cité par JOHNSTON et al, 2001**

2-3-3. Evènements conduisant à l'ovulation :

L'ovulation est un phénomène ponctuel qui résulte de deux processus plus longs : l'ovogenèse et la folliculogénèse.

2-3-3-1. L'ovogenèse :

L'ovogenèse se déroule pendant la vie embryonnaire. Le stock d'ovocytes est à peu près constitué à la naissance. Les follicules de réserve sont des follicules dits primordiaux ; ils sont constitués d'un ovocyte primaire et d'une couche de cellules aplaties. **(TIRET, 2007)**

2-3-3-2. La folliculogenèse :

Pendant l'anoestrus, une croissance folliculaire a lieu, mais la différenciation terminale n'a pas lieu, et la taille des follicules ne dépasse pas 0,5 à 1mm de diamètre **(REYNAUD et FONTBONNE, 2005 d'après ANDERSEN, 1973)**. Lors du pro-oestrus, des follicules de 1 à 1,5 mm de diamètre sont présents sur l'ovaire et commencent leur maturation terminale, atteignant une taille de 1,5 à 5 mm de diamètre. Lors de l'oestrus, ils atteignent une taille de 5 à 7 mm de diamètre **(FONTBONNE, 2005)**. Il existe des follicules poly-ovocytaires, mais le taux d'ovulation de ceux-ci est inconnu.

Les facteurs impliqués dans la croissance, et le début de la maturation ne sont pas tous connus. Une étude de HEWITT (1997) indique que les oestrogènes et la progestérone ne semblent pas être les facteurs déterminants dans la maturation.

2-3-3-3. L'ovulation :

Ainsi, le facteur déclenchant de l'ovulation est une augmentation très significative de la concentration sérique en LH sécrétée par l'hypophyse. L'ovulation survient 48 à 60 heures après le pic de LH. La progestéronémie est entre 4 et 10 ng/ml au moment de l'ovulation **(FONTBONNE *et al*, 2007)**.

CHAPITRE 3 : FROTTIS VAGINAUX ET PROGESTERONEMIE

3-1. le suivi des chaleurs :

3-1-1. L'examen cytologique vaginal (Frottis vaginal) :

Les cellules de l'épithélium vaginal, sous l'influence des œstrogènes, se modifient de façon périodique au cours du cycle œstral (**Drion et al, 2003**). Le frottis vaginal est l'examen qui permet de recueillir un échantillon représentatif de ces cellules.

3-1-1-1. Principe de l'examen cytologique vaginal :

La muqueuse vaginale se renouvelle à chaque cycle œstrien. En début de phase folliculaire, la muqueuse ne comporte que quelques assises cellulaires. Par suite des divisions des cellules de la couche basale sous l'action de l'œstradiol Cette muqueuse s'épaissit. Puis les assises superficielles se kératinisent. Sous l'influence de la progestérone, les divisions cessent, les cellules kératinisées desquament, les polynucléaires envahissent la lumière vaginale et les détruisent (**Baker et Lumsden, 2001**).

L'examen cytologique vaginal permet de recueillir les cellules épithéliales de surface ainsi que les cellules présentes dans la lumière du vagin.

3-1-1-2. La technique de réalisation d'un frottis vaginal:

a- Le prélèvement :

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 représentatif. Le recueil de cellules exfoliées de la muqueuse vaginale peut se faire avec une spatule, une baguette de verre, une pipette ou un écouvillon. (**Baker et Lumsden, 2001**).

L'écouvillonnage est simple à réaliser; néanmoins certaines précautions doivent être respectées pour éviter de biaiser l'interprétation du frottis. Les deux lèvres vulvaires sont écartées avec le pouce et l'index, et un écouvillon est introduit dans le vagin à travers la commissure dorsale de la vulve. Il est souhaitable d'utiliser un écouvillon en coton stérile à usage unique, d'une longueur d'une quinzaine de centimètres. Il est nécessaire de l'humidifier avec une ou deux gouttes de sérum

physiologique, mais jamais avec de l'eau distillée ou de l'eau du robinet qui pourrait altérer les cellules. L'intérêt est d'éviter que le coton non humidifié ne collecte du mucus, ce qui peut gêner l'étalement du prélèvement (**Baker et Lumsden, 2001**), (**England et Concannon, 2002**).

Le tiers postérieur du vagin est presque vertical chez la chienne. Au départ, l'écouvillon est donc introduit presque verticalement sur la partie dorsale du vestibule afin d'éviter tout traumatisme du méat urinaire. Il est ensuite basculé horizontalement et introduit délicatement le plus profondément possible (Fig 15). Quelques rotations sont réalisées en appliquant une certaine pression afin de prélever les cellules de l'épithélium vaginal puis l'écouvillon est retiré doucement des voies génitales (**Neveux, 1999**), (**England et Concannon 2002**).

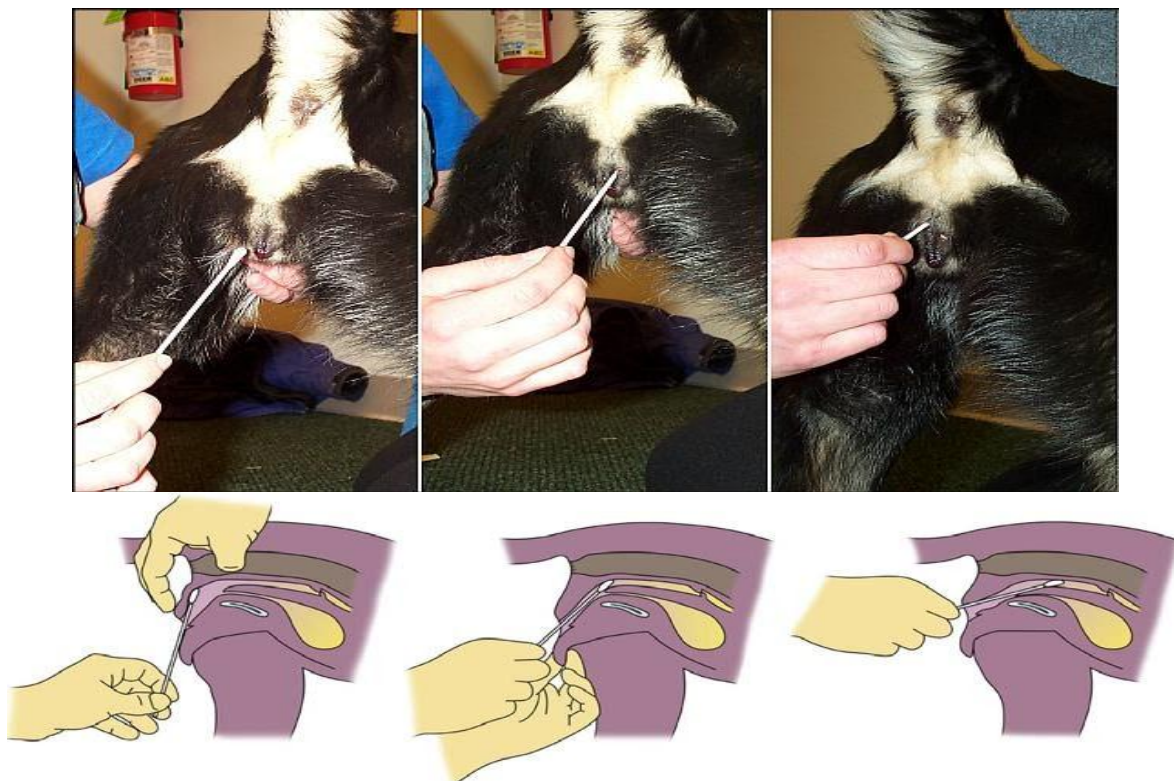


Fig 15 : Technique d'écouvillonnage chez la chienne

[EILTS, 2007]

B- L'étalement :

L'étalement sur une lame de microscope a pour but de transférer un matériel

représentatif du prélèvement et non l'ensemble de ce dernier. Il doit être effectué immédiatement pour ne pas se dessécher et l'écouvillon doit être roulé sur une lame propre sans frottement pour ne pas détériorer les cellules, **(Neveux, 1999)**.

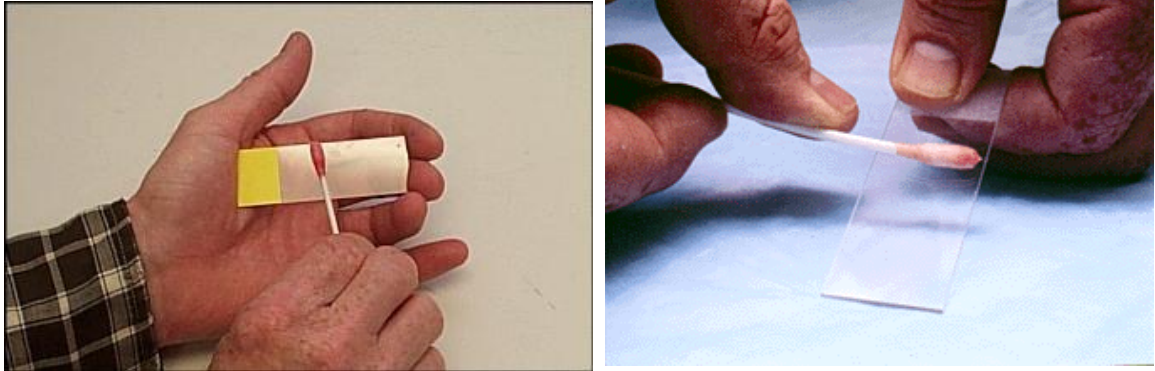


Fig 16: Techniques d'étalement d'un frottis vaginal

[EILTS, 2007]

c- La fixation :

Pour conserver durablement le prélèvement, il faut toujours procéder à une fixation qui empêche l'autolyse des cellules séparées de l'organisme vivant. Elle doit être réalisée immédiatement après l'étalement, alors que l'écouvillon est encore humide. L'assèchement peut provoquer une distorsion des cellules, **(Neveux, 1999)**.

Une fixation simple consiste également à plonger la lame dans un bain de fixateur, qui peut être une solution de méthanol à 95%, ou un mélange d'alcool-éther à 50 volumes pendant cinq minutes **(Neveux, 1999)**.

d- La coloration:

Le choix de la coloration prend en compte sa facilité d'exécution et l'obtention de résultats constants. Dans certains cas, la stabilité au stockage des colorants peut être un critère supplémentaire.

d-1. La coloration au bleu de méthylène :

Le bleu de méthylène extemporané n'est presque plus utilisé à l'heure actuelle. Il permet une coloration unichrome rapide et facile. Le frottis peut être lu immédiatement après qu'on ait déposé une goutte de bleu de méthylène et une lamelle sur une lame. Cependant, il ne colore pas les érythrocytes et ne permet pas la conservation des lames. En outre il ne met pas en évidence les affinités tinctoriales, et colore toutes les cellules uniformément bleues, ce qui rend parfois l'interprétation difficile **(Neveux, 1999)**.

d-2. La coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) :

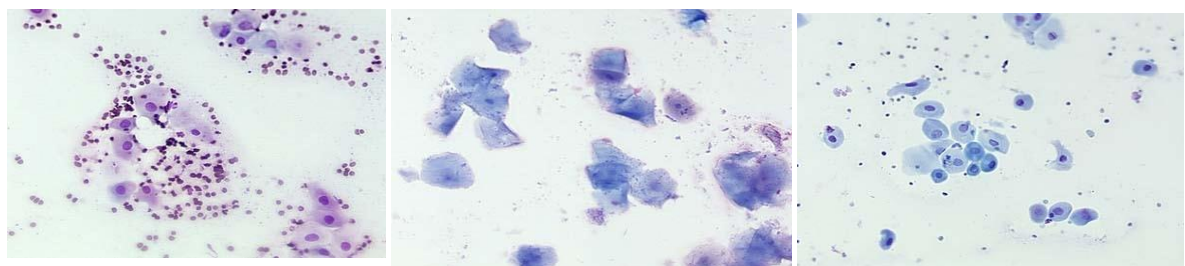
La coloration de MGG ou encore de Wright est une technique unichrome, largement utilisée en clientèle vétérinaire, car les réactifs sont les mêmes pour colorer les frottis sanguins. Le MGG colore toutes les cellules vaginales quel que soit leur degré de kératinisation en bleu-violet et leur appréciation se fait par les critères morphologiques.

Il s'agit d'une méthode rapide, qui met en valeur surtout les noyaux et les cellules sanguines et met en évidence les polynucléaires plus que les autres types cellulaires, d'où son utilisation lors de suspicion d'infection génitale, **(Neveux, 1999)**.

Des kits de coloration MGG modifiés, tel que le kit Diff-Quick®, ont été conçus pour un usage clinique courant. Bien que de qualité moindre par rapport aux recettes de référence, les résultats obtenus constituent en clientèle un outil diagnostique simple et rapide **(Oettle et Weldhagen, 1982)**.



Fig 17 : Matériel pour coloration de May-Grünwald-Giemsa modifiée : **Diff-Quick®** [ENGLAND et CONCANNON, 2002]



Frottis de pro-œstrus

Frottis d'œstrus

Frottis de metoestrus

Fig 18 : Frottis vaginaux de chienne aux différentes phases du cycle œstral, colorés avec la méthode May-Grünwald-Giemsa modifiée : Diff-Quick®. Les cellules se colorent uniformément bleu- violet, elles ne sont différenciées que par leurs seuls critères morphologiques [ENGLAND et CONCANNON, 2002]

d-3. La coloration de Harris-Shorr:

Cette coloration trichrome a été mise au point par Ephraïm Shorr en 1940. Plusieurs de ses dérivés sont disponibles sous forme de kits. C'est une coloration intéressante, car elle permet une bonne visualisation des cellules. La lecture est aisée car les cellules sont différenciées selon leurs affinités tinctoriales. Les cellules basophiles apparaissent bleues, les cellules acidophiles, rouges (**Oettle et Weldhagen, 1982**).

Dans le suivi du cycle œstral de la chienne, la coloration de Harris-Shorr est la coloration de choix. La kératinisation des cellules épithéliales est mise en évidence par cette coloration : les cellules acidophiles deviennent rouge orange alors que la kératinisation progresse **(Neveux, 1999)**.

En effet, cette coloration permet d'identifier les précurseurs intra cellulaires de la kératine qui sont abondants dans les cellules épithéliales pendant la phase folliculaire de l'œstrus et qui se colorent en orange. Aussi, tous les types de cellules épithéliales vont se colorer en orange si on les laisse sécher avant de les fixer **(Oettle et Weldhagen, 1982)**.

Cette méthode demande plusieurs solutions, et sa mise en œuvre est plus longue que les autres (environ 15 minutes), ce qui la rend moins pratique en clientèle.

De nos jours, des kits de coloration Harris-Shorr simplifiés, tel que le kit Diagnœstrus®, sont disponibles dans le commerce. Leur usage pratique et économique favorise leur utilisation en cabinet vétérinaire. En effet, ils permettent l'obtention de résultats, moins précis mais proche des résultats obtenus par le protocole de référence.



Fig 19 : Matériel pour coloration d'Harris-Schorr. **[PIERSON et al, 1999]**

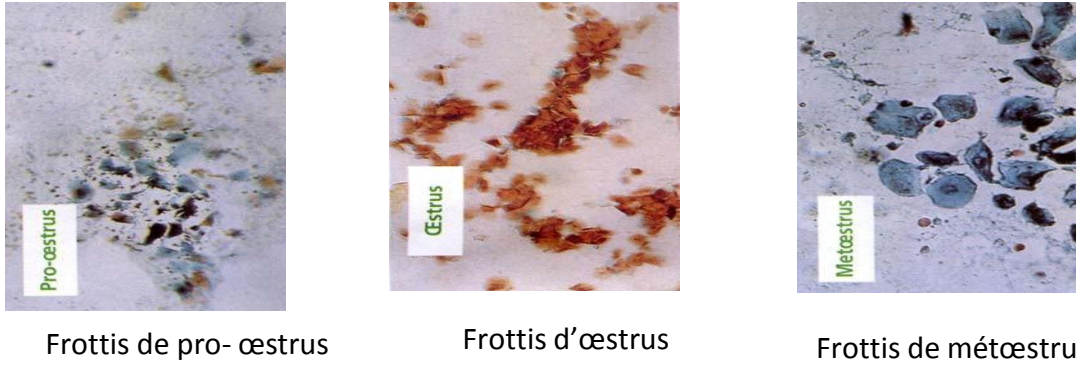


Fig20 : Frottis vaginaux de chienne aux différentes phases du cycle œstral, colorés avec la méthode du trichrome d'Harris-Schorr [PIERSON et al, 2002]

Tableau 1 : Technique de coloration de Harris-Shorr [SCHUTTE, 1967].

Ordre de	Produits à utiliser	Temps
1	Mélange alcool-	5 minutes
2	Alcool à 70°	Plonger 10
3	Alcool à 50°	Plonger 10
4	Eau distillée	Plonger 10
5	Hématoxyline de	2 minutes
6	Eau distillée	Passage
7	Eau distillée	Passage
8	Alcool ammoniacal	1 minute
9	Eau distillée	Passage
10	Alcool 70°	Passage
11	Alcool 95°	Passage
12	Colorant de Shorr	2 minutes
13	Alcool 95°	Passage
14	Alcool absolu	Passage

d-4. La coloration de Papanicolaou:

Cette coloration pentachrome a été décrite par George Papanicolaou en 1942. Il s'agit de la coloration standard des frottis vaginaux chez la femme (Papanicolaou , 1942). Les noyaux apparaissent bleu-violet, les cellules superficielles rose orangé, les cellules intermédiaires bleu-vert et les cellules plus profondes vert plus franc. Son intérêt est surtout pour le diagnostic cytologique des néoplasies du tractus génital chez la chienne. Cependant, le trichrome de Harris-Shorr lui est largement préférée pour la lecture tinctoriale des lames.



Fig21 : Frottis vaginaux pratiqués chez une femme et colorés avec la technique de Papanicolaou. 1 : cytoplasme coloré en vert (cellule parabasale), 2 : noyau coloré en bleu [HERON, 2006]

Tableau 2: Technique de coloration de Papanicolaou. *mélange de vert lumière et de brun bismarck (**Papanicolaou – en ligne**).

Ordre de	Produits à utiliser	Temps
1	Alcool à 70°	Plonger 10
2	Alcool à 50°	Plonger 10
3	Eau distillée	Plonger 10
4	Hématoxyline de	5 minutes
5	Eau distillée	Plonger 10
6	Alcool à 95°	Passage
7	Alcool à 80°	Passage
8	Alcool à 70°	Passage
9	Alcool à 70°	Passage
10	Eosine	5 minutes
11	Alcool à 95°	30
12	Alcool à 95°	30
13	E A 50*	5 minutes
14	Alcool à 95°	30
15	Alcool à 95°	30
16	Alcool absolu	30
17	Xylène	1 passages

3-1-1-3. Interprétation d'un frottis vaginal :

a- Lecture des lames :

La lecture des lames de frottis se fait à l'aide d'un microscope optique. Elle doit se faire d'abord à faible grossissement (x40), puis à fort grossissement (x100 ou x400).

Le faible grossissement permet d'apprécier globalement la richesse en cellules, la présence ou non de mucus, la présence ou non de leucocytes, la

présence ou non de spermatozoïdes, la répartition des cellules (dispersés, isolées ou en amas), et l'affinité tinctoriale générale de la lame.

Le fort grossissement permet d'apprécier l'aspect des cellules et de déterminer plus précisément tel ou tel type cellulaire. On note attentivement la couleur, la forme, la taille, la place et le volume du noyau par rapport au cytoplasme. Il est fondamental de réunir l'ensemble de ces caractéristiques pour identifier un type cellulaire donné.

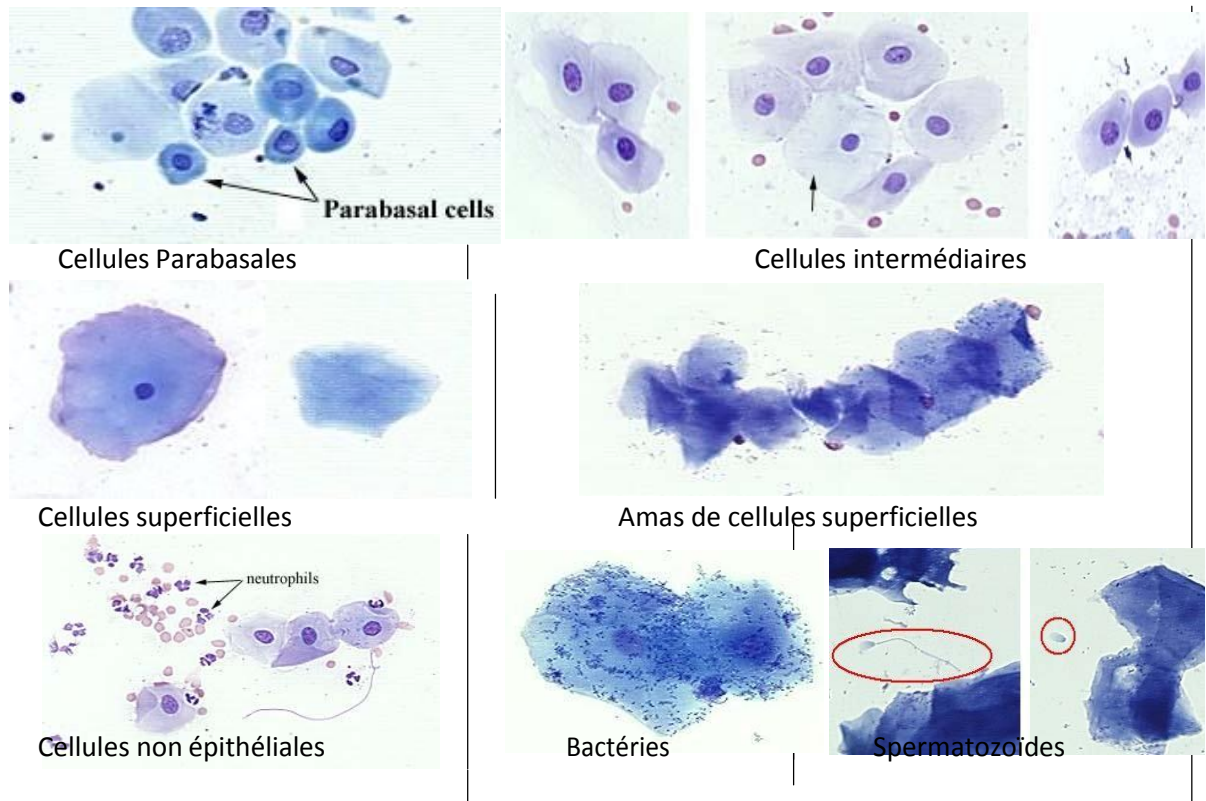
La lecture se fait en balayant toute la lame, l'observation d'un maximum de champs sur différents points est indispensable (**Neveux, 1999**).

b- Les types cellulaires retrouvés sur un frottis vaginal :

L'épithélium vaginal se constitue pendant l'œstrus, de seulement deux à trois couches de cellules, à savoir les cellules basales et parabasales. Au cours du cycle ovarien, cet épithélium s'accroît au fur et à mesure en épaisseur et forme plusieurs stratifications de cellules offrant à l'examen cytologique une diversité de types cellulaires. La connaissance de ces différents types de cellules et leur identification sont utiles pour caractériser le stade du cycle œstral.

Sur un frottis vaginal, on peut observer les différents types cellulaires de l'épithélium vaginal ainsi que des cellules présentes dans la lumière vaginale mais n'émanant pas de l'épithélium du vagin.

Les cellules épithéliales sont représentés par les cellules parabasales, intermédiaires (petites et grandes) et superficielles. Les cellules qui peuvent être présentes dans la lumière vaginale sont les cellules du sang (érythrocytes et leucocytes), les spermatozoïdes, les cellules de la fosse clitoridienne et les cellules de l'endomètre (**Baker et Lumsden, 2001**).



	cellules de la fosse clitoridienne	
	cellule superficielle sans noyau	les cellules superficielles sont les plus grandes cellules épithéliales. Les bords des cellules sont plats ou pliés.
	cellule superficielle à noyau pycnotique	
	cellule superficielle avec silhouette nucléaire	
	grande cellule intermédiaire : - plus grande que les cellules parabasales et intermédiaires, - noyau d'aspect semblable, - contours anguleux, - cytoplasme acidophile ou basophile selon le stade des chaleurs de la chienne.	
	petite cellule intermédiaire : - noyau rond, - taille variable, (en général deux fois plus grande que les cellules parabasales), - formes ronde, ovale ou angulaire.	
	cellule parabasale : - forme ronde, - ratio, - noyau large, - noyau cytoplasme plus élevé que les cellules intermédiaires, cytoplasme basophile (bleu). - les plus petites cellules épithéliales présentes sur le frottis vaginal.	
	cellule parabasale en colonne (cellules longues à noyaux excentrés)	
	cellules caractéristiques du métœstrus	
	cellules lysées	
	globules rouges	
	polynucléaires	

Fig 22 : Les cellules d'un frottis vaginal [NEVEUX, 1999].

c- Les variations de la cytologie vaginale au cours du cycle œstral :

Chaque période du cycle est définie par un style de distribution des cellules qui lui est propre. Toutefois, un frottis isolé n'a que peu d'intérêt dans le suivi des chaleurs d'une chienne. En effet, d'une chienne à l'autre, l'évolution des cellules peut être variable et nécessite d'observer les caractéristiques du frottis pendant plusieurs jours (**Neveux, 1999**).

Dans les sections suivantes, nous tâcherons de présenter l'essentiel de ces modifications rapportées aux microphotographies correspondantes de la figure 23

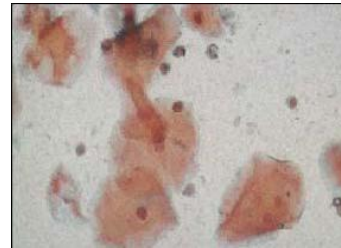
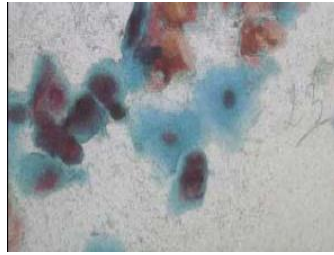
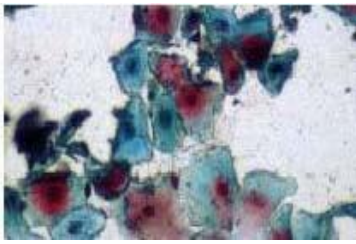
c-1. proœstrus :

Au cours du proœstrus, les taux sanguins d'œstradiol augmentent pendant la maturation des follicules ovariens, ce qui provoque la prolifération de l'épithélium vaginal et la diapédèse des hématies à travers les capillaires utérins. Ces deux processus expliquent la présence des cellules épithéliales en voie de kératinisation et des érythrocytes dans les frottis vaginaux (**Baker et Lumsden, 2001, Concannon, 2002**).

Le frottis du début proœstrus (Fig 23 : photo 1) apparaît d'un fond « sale » à cause des débris cellulaires et du mucus qui fixe bien le colorant. Le nombre de cellules augmente mais le frottis reste pauvre. Les cellules parabasales disparaissent au profit des cellules intermédiaires basophiles et une coloration acidophile commence à apparaître signant un début de kératinisation. Cependant, les parabasales peuvent persister nombreuses les deux premiers jours pour disparaître ensuite (**Malandain et Fontbonne, 2006**). Le nombre des hématies s'élève, et on peut le voir sur le frottis avant le début des écoulements (**Malandain et Fontbonne, 2006**).

Vers la moitié du proœstrus (Fig 23: photo 2), on note une richesse cellulaire sur le frottis. Le nombre des intermédiaires non acidophiles chute au profit des superficielles à noyau pycnotique qui sont dispersées (**Malandain et Fontbonne, 2006**).

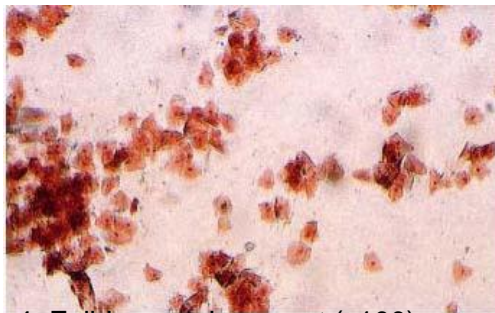
En fin de proœstrus (Fig 23 : photo 3), le frottis devient de moins en moins sale et riche en cellules. On n'observe pratiquement que des cellules superficielles acidophiles, à contours anguleux et à noyaux pycnotiques ou même anucléés qui ne sont pas encore bien groupées en amas. Les hématies sont nombreuses, les leucocytes rares et les bactéries abondantes (**Eilts, 2007**).



Proœstrus précoce (x 400) Proœstrus moyen (x400)

Proœstrus tardif(x400)

OESTRUS

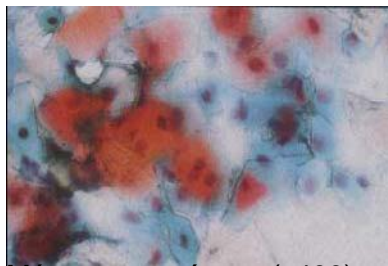


4. Faible grossissement (x100)



5. Fort grossissement (x400)

METOESTRUS



6. Métoœstrus précoce (x400)



7. Métoœstrus tardif (x400)

ANOESTRUS



8. Faible grossissement (x100)



9. Fort grossissement (x400)

Fig 23 : Microphotographies de lames de frottis vaginaux aux différents stades du cycle œstral de la chienne (colorés au trichrome d'Harris- Shorr)

[FONTBONNE ET GUERIN, 2003]

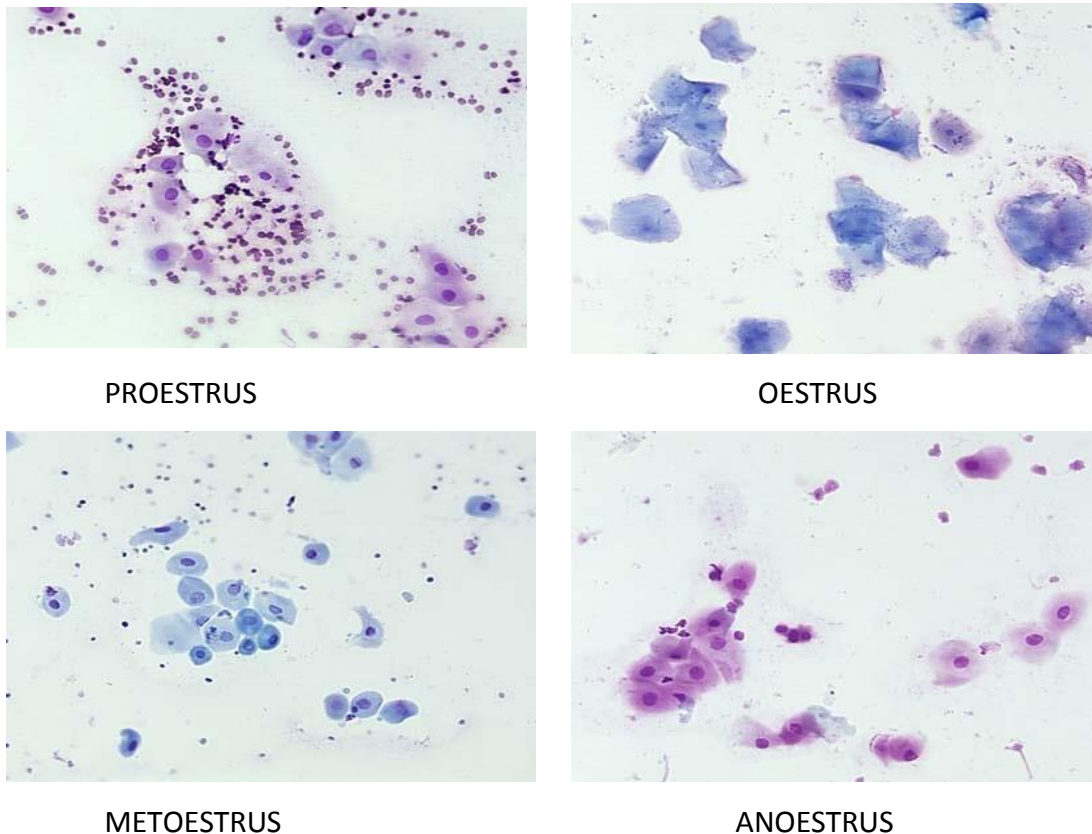


Fig 24 : Microphotographies de frottis vaginaux aux différents stades du cycle chez la chienne (colorés au Diff Quick®) [BOWEN, 2003]

c-2. œstrus :

Pendant l'œstrus (Fig 24 : photos 4&5), le frottis vaginal est très riche en cellules et montre un fond propre. Les cellules sont essentiellement des superficielles entièrement kératinisées, anucléées et groupées en amas. L'acidophilie est supérieure à 60 % voire même supérieure à 80 ou 90 %. Les hématies sont généralement absentes, sauf pour quelques chiennes. Beaucoup de bactéries sont présentes, mais sans réaction leucocytaires et les leucocytes sont naturellement absents (Baker et Lumsden, 2001),(Malandain et Fontbonne, 2006).

Beaucoup d'aspects atypiques sont rapportés (Fontbonne, 1996). Pour des raisons non encore élucidées, les cellules superficielles peuvent demeurer nucléées tout au long de l'œstrus, non regroupées en amas et à moins de 60% même en période optimale; avec de nombreuses cellules intermédiaires encore visibles. Ceci ne semble pas être associé à une baisse de fertilité (Baker et Lumsden, 2001), (Fontbonne, 1996).

c-3. métœstrus :

Environ six jours après l'ovulation, et huit jours après le pic de LH, la majorité des chiennes présentent un frottis de métœstrus.

Le passage au métœstrus est caractérisé par un changement brutal des rapports quantitatifs des types de cellules épithéliales signalés, accompagné de l'apparition de polynucléaires neutrophiles (**Baker et Lumsden, 2001**). Le début de métœstrus correspond à la transition œstrus-métœstrus. Le frottis montre (Cf. figure 19 : photos 6) des cellules kératinisées éparpillées, des cellules intermédiaires qui réapparaissent, ainsi que des cellules parabasales souvent regroupées et des polynucléaires. Les érythrocytes peuvent réapparaître. Ce changement de l'aspect du frottis survient assez rapidement, et s'achève au bout de 12 à 24h (**Malandain et Fontbonne, 2006**).

En dépit des cas atypiques qui peuvent exister, Il semble être constant qu'aucune chienne n'est encore fécondable lorsque les polynucléaires apparaissent sur le frottis de métœstrus (**Eilts, 2017**).

Vers la fin du métœstrus, le frottis (figure 24 : photos 7) est dominé par les cellules parabasales et intermédiaires basophiles. Les leucocytes sont visibles, et lorsqu'ils sont accolés à des cellules vaginales ou qu'ils se projettent comme à l'emporte-pièce sur le cytoplasme de celles-ci, on est en présence d'une forme cellulaire typique du métœstrus (métœstrus cells). Les érythrocytes sont absents.

c-4. anœstrus :

Le frottis d'anœstrus (FIG 24 : photos 8 & 9) est classiquement pauvre en cellules. La tendance tinctoriale est basophile. On note la présence de quelques rares cellules parabasales, parfois accolées par un de leurs côtés, donnant l'aspect de cellules en colonne. Les polynucléaires sont rares et les hématies absentes (**Baker et Lumsden, 2001**), (**Malandain et Fontbonne, 2006**).

Le frottis d'anœstrus peut aussi perdre son aspect classique et donner des formes atypiques sans causes particulières. Les parabasales sont parfois très nombreuses, les hématies peuvent être rencontrées et des cellules acidophiles peuvent parfois exister (**Neveux, 1999**).

d. Les indices cytologiques :

La lecture des frottis vaginaux est un caractère subjectif, qui relève de l'appréciation de l'examineur. Des indices (ou indexes) ont été établis pour décrire quantitativement les images cellulaires visualisées sur les frottis et suivre plus précisément, et de façon objective, l'évolution du frottis au cours du cycle œstral. La littérature rapporte surtout l'indice éosinophile, l'indice caryopycnotique et l'indice superficiel.

Parmi ces trois, l'indice éosinophile est le plus important et le plus largement utilisé dans le cadre du suivi du cycle. Il représente le pourcentage de cellules réellement kératinisées par rapport à celles qui pourraient l'être mais ne le sont pas (les grandes intermédiaires polychromatophiles et basophiles) **(Taradach, 1980)**.

SCHUTTE AP avait montré en dés 1967, que plus de 90% des chiennes saillies le jour du pic de l'indice éosinophile étaient gestantes. Ainsi ce pic permet la détermination de l'œstrus proprement dit, mais ne peut prévoir la période optimale de fécondabilité. En effet les courbes obtenues présentent un caractère individuel, difficilement généralisable **(Taradach, 1980)**.

En conclusion; le frottis vaginal reste un examen de choix dans le suivi des chaleurs chez la chienne, car simple à réaliser, peu onéreux, directement accessible en clinique et offre des résultats immédiats, En effet, cette technique permet de localiser l'œstrus proprement dit. De plus, elle représente le meilleur marqueur de la transition œstrus-metœstrus, ce qui revêt un grand intérêt pratique **(Tammer et al, 1994)**. Cependant, même si la cytologie vaginale reflète l'évolution du profil hormonal chez la chienne, sa seule observation ne permet qu'une analyse succincte des différentes phases du cycle et n'offre pas de précisions quant au moment de l'ovulation, du pic de LH ou de la période de fécondabilité. Les variations individuelles ne sont en outre pas rares et nécessitent d'observer les caractéristiques du frottis pendant plusieurs jours.

La cytologie vaginale à elle seule ne suffit pas à réaliser un suivi de chaleurs convenable. Elle nécessite toujours d'être associée à d'autres marqueurs du cycle de la chienne **(Fontbonne, 1996), (Neveux, 1999), (Eilts, 2007), (Malandain et Fontbonne, 2006)**.

3-1-2. Dosage de la progestérone sérique :

3-1-2-1. Généralités sur l'évolution de la progestéronémie :

Chez la femelle des carnivores; l'activité lutéale du corps jaune cyclique a une durée pouvant atteindre la durée de la gestation. Donc le metoestrus, couvre parfaitement la gestation et de ce fait, le dosage de la progestéronémie perd tout intérêt pour le diagnostic de la gestation (**Prelaud et al, 2002**), (**Drion et al, 2003**).

La progestéronémie présente un niveau basal constant en anœstrus. En proœstrus, les follicules pré ovulatoires commencent à sécréter de la progestérone et le taux augmente ainsi relativement. Cette particularité permet la détermination de la date de l'ovulation chez la chienne dans le cadre du suivi des chaleurs (**Hoffmann et al, 1996**).

En effet, l'observation de l'évolution de la progestéronémie permet de définir une courbe type dont l'aspect est relativement constant, malgré quelques variations individuelles. La concentration plasmatique de progestérone commence à augmenter depuis des valeurs basales en concomitance avec la chute du taux sérique d'œstrogènes et du pic de LH, suite à la lutéinisation pré ovulatoire des follicules ovariens (**Concannon, 2002**).

Le jour du pic de la LH, c'est-à-dire deux jours environ avant l'ovulation, on estime la concentration plasmatique de la progestérone entre 2.0 à 2.9ng/ml. Elle atteint le jour de l'ovulation des valeurs comprises entre 4 et 10ng/ml. La période féconde se situe environ deux jours après, le taux de progestérone dépasse alors 15ng/ml (**Root-Kustritz, 2001**). Aussi, la progestéronémie présente des fluctuations synchrones au rythme nyctéméral, il sera donc souhaitable d'effectuer les prélèvements de sang à la même heure de la journée (**Borden et Kennaway, 2006**).

3-1-2-2. Techniques de dosage de la progestérone :

La progestérone est une hormone stéroïde assez stable, mesurée généralement sur un matériel sanguin prélevé à un volume supérieur à 0.2ml, sur tube sec ou hépariné. Comme les échantillons de recherche sont toujours dosés à postériori, il est heureux de savoir que ces échantillons se conservent bien au froid pendant 2 semaines à +4°C, et environ 1 an à -20°C (**Volkman et al, 2004**).

Quelle que soit la méthode employée, le principe général du dosage reste le

même; il s'agit d'une compétition entre la progestérone de l'échantillon et une progestérone marquée. Le support et le système de révélation peuvent changer d'une méthode à une autre (**Prelaud et al, 2002**).

3-1-2-2. A. Méthodes quantitatives :

Les dosages quantitatifs sont réalisés par des laboratoires spécialisés, ils ont l'avantage d'être très précis.

A-1. Méthodes radio-immunologiques:

Les techniques radio-immunologiques (RIA) demeurent les techniques de référence pour de nombreuses hormones, notamment la progestérone. L'élément radioactif, le plus souvent l'iode 125 ou le tritium, émet des rayonnements quantifiés par un compteur. Le principal avantage de ces techniques est l'absence d'interférence avec le milieu du prélèvement (anticoagulants, par exemple). Le nombre d'hormones pouvant être dosées par RIA est beaucoup plus important que par les techniques froides (**Prelaud et al 2002**).

Si les techniques radio-immunologiques font toujours figure de techniques de référence, leur utilisation semble peu justifiée lorsque des techniques froides fiables, sans risque pour le personnel et l'environnement, peuvent être utilisées. Dans ce contexte, de nombreux laboratoires équipés d'automates de chimiluminescence abandonnent progressivement les techniques radio-immunologiques (**Fontbonne et al, 1996**).

A-2. Méthodes immuno-enzymatiques:

Les techniques immuno-enzymatiques (EIA), principalement l'ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) et la chimiluminescence, présentent l'avantage d'éviter la manipulation de produits radio-actifs. Diverses enzymes sont utilisées couplées à un anticorps ou une haptène. Par conséquent, ces techniques ne sont pas utilisables avec tous les milieux de prélèvement.

A l'heure actuelle, les techniques d'immuno-chimiluminescence sont les plus répandues sur les automates de dosages hormonaux. Elles font appel à des substrats qui, transformés, émettent durant un court laps de temps de la lumière. La spécificité de ces techniques est importante parce qu'il n'existe ni parasite ni diffusion.

3-1-2-2. B. Méthodes semi quantitatives :

Le dosage semi quantitatif par méthode ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) repose le principe de la compétition entre la progestérone plasmatique et la progestérone liée à une enzyme qui est souvent *la peroxydase* formant ainsi un complexe progestérone-enzyme.

La lecture du résultat se fait par appréciation visuelle colorimétrique des variations de concentration de l'échantillon par rapport à un ou deux témoins. La valeur exacte n'est pas connue, mais ces kits sont pratiques, ils permettent généralement la réalisation de suivi des chaleurs dans de bonnes conditions (**Buff, 2001**).

Ce test comprend en général 4 classes. La classe 1 correspond au taux basal entre 0 et 1ng/ml et à la couleur la plus foncée, les classes 2 et 3 respectivement à des taux de 1 à 2.5ng/ml et de 2.5 à 8ng/ml. A l'inverse, la classe 4 correspond à un taux élevé supérieur à 8ng/ml et est révélée par une couleur blanche (**Prelaud et al, 2002**).

3-1-2-3. Progestéronémie et suivi des chaleurs :

L'utilisation du dosage de la progestérone pour évaluer les dates du pic de LH et de l'ovulation est justifiée car, actuellement, il n'existe aucun témoin réel de l'ovulation ou de l'état de la maturation ovocytaire. De plus la progestérone est la seule hormone facilement dosable (**Concannon, 2002**).

Donc, la mesure de la progestéronémie est un témoin fiable de détection de l'ovulation chez la chienne, cependant, il n'est pas envisageable de réaliser une quantité exagérée de dosages au cours d'un même suivi de chaleurs, pour des raisons de coût. Les dosages de la progestérone sont en général utilisés conjointement avec d'autres méthodes d'appréciation du stade du cycle moins onéreuses, telles que l'examen de la vulve et de l'aspect des écoulements, la réalisation de frottis vaginaux.

En général, un suivi de chaleurs nécessite la réalisation de deux à cinq dosages de progestérone. Il n'est pas nécessaire de débiter les dosages avant le 6^e jour des chaleurs. Si le premier prélèvement relève un taux faible de Progestérone, un

examen de contrôle est réalisé trois jours plus tard. Dès qu'il dépasse la valeur de 3ng/ml, il est systématiquement renouvelé dans un délai de 24 à 48h. L'ovulation est confirmée chez les seules chiennes pour lesquelles la progesteronémie dépasse les 5 à 10ng/ml (**Davidson, 2006**).

Les dosages de la progestérone plasmatique, s'ils sont incontournables, peuvent induire le praticien en erreur s'ils sont mal pratiqués ou évalués. Se contenter de repérer une augmentation modérée du taux de progestérone sans attendre qu'ils atteignent la valeur de 5 à 10ng/ml (selon la méthode de dosage), c'est prendre le risque de faire réaliser des accouplements trop précoces et d'augmenter les risques d'échec (**Eilts, 2007**).

Ainsi, on estime en général qu'un taux compris entre 5 et 10ng/ml indique que la chienne a ovulé. Cependant, la période optimale de fécondabilité qui se situe environ deux jours après l'ovulation, se produit à un taux variable de progestérone, c'est pourquoi il est impossible de fixer un taux de référence valable universellement, la fourchette est en effet très large (**Hoffmann et al, 1996**).

Il est utile de signaler ici que malgré le fait que la mesure de la progesteronémie soit pratiquée conjointement avec le frottis vaginal dans le suivi des chaleurs chez la chienne et la détection de la période de fertilité, peu d'auteurs se sont intéressés à étudier la corrélation entre les différents marqueurs cellulaires du cycle et la progesteronémie. La compilation la plus large de la littérature disponible ne rapporte pour cet objectif bien précis que l'étude de LINDE et KARLSSON en 1984 et plus récemment l'étude effectuée en 2005 sous la direction scientifique du Professeur FONTBONNE A au CERCA-ENV Alfort. En réponse à cette lacune, la deuxième partie de notre travail expérimental s'inscrit dans le cadre d'une application de quelques critères cytologiques pour tenter d'évaluer la progesteronémie en début de pro-œstrus.

3-1-2-4. Conclusion :

Les différents protocoles d'induction des chaleurs et leurs résultats qui demeurent variables, d'où l'intérêt capital d'un suivi rigoureux des chaleurs qui seul permettra de confirmer leur aboutissement, car l'apparition des chaleurs peut être accompagné ou non d'ovulations (on parle alors de chaleurs fertiles ou non fertiles). D'autant plus que les protocoles de synchronisation des chaleurs sont utilisés dans le cadre du transfert embryonnaire. Là, il s'avère impératif, non seulement de confirmer l'ovulation, mais également de saillir (ou inséminer) au meilleur moment afin d'obtenir un maximum d'embryons transférables (**Kutzler, 2005**).

Ainsi, que la reproduction soit naturelle (avec chaleurs spontanées et saillie naturelle), ou menée par des techniques de reproduction assistée (avec induction et/ou synchronisation des chaleurs, insémination artificielle ou transfert embryonnaire). La confirmation des ovulations et l'aboutissement à des fécondations nécessitent un suivi médicalisé des chaleurs.

La recherche scientifique s'intéresse toujours à parfaire les méthodes de détection des chaleurs chez l'espèce canine, mais aussi à rendre ces méthodes pratiques et moins coûteuses. Dans cette optique, nous consacrerons la deuxième partie du travail expérimental à un essai de réévaluation de la cytologie vaginale en début de proœstrus, en étudiant la corrélation statistique entre ces indicateurs cytologiques et la progestéronémie. Cette étude recherche de nouveaux outils ou critères cytologiques qui dans le cadre du suivi des chaleurs permettent d'orienter le dosage de la progestérone sérique et ainsi de prévenir des dosages inutiles.

Partie expérimentale

1 Objectif de l'étude :

Notre travail a pour but :

- de présenter la technique des frottis vaginaux lors du suivi des chaleurs chez la chienne.
- d'essayer de corroborer cette technique avec le dosage de la progestérone sérique chez cette espèce

2 Matériels :

2.1 Zone d'étude :

L'étude entreprise pour ce mémoire a été effectuée au sein de la clinique vétérinaire de l'institut vétérinaire de l'université Saad Dahleb Blida -1 et ceci dans le cadre des consultations au sein du service de pathologie de la reproduction des animaux de compagnie dirigé par le Dr BELALA .R .

2.2 Animaux :

Les femelles ayant fait l'objet de l'étude étaient au nombre de deux (2), l'une de race Berger Allemand, l'autre issue de croisement Berger Allemand X Rottweiler



Fig 25 : Photo Berger Allemand

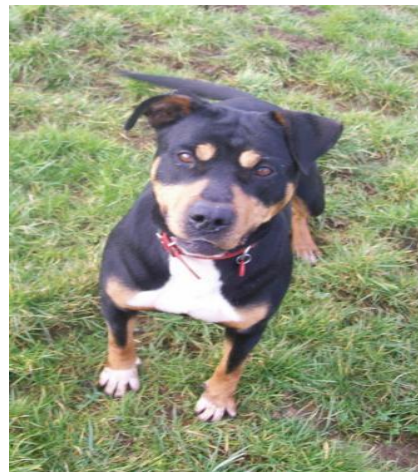


Fig 26 : Photo Croisement Berger Allemand X Rottweiler

3.3 Matériel utilisé

3.3.1 Ecouvillon



Fig 27 : Écouvillons

3.3.2 tubes pour prélèvements de sang



Fig 28 : Tubes secs (sérum)



Fig 29 : Tubes héparines (plasma)

3.3.3 Seringues



Fig 30 : Seringue de 5cc

3.3.4 lames porte objet

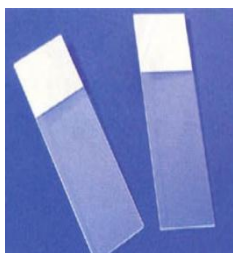


Fig 31 : Lame porte –objet pour les frottis vaginaux

3.3.5 Coloration Harris Shorr et MGG



Fig 32: Harris Shorr



Fig 33: MGG

3. Méthodes

3.1 les frottis vaginaux

C'est un outil qui est passé dans la pratique quotidienne des vétérinaires en consultation des animaux de compagnie notamment pour le suivi des chaleurs chez l'espèce canine. Dans le service du Dr Belala les lames de frottis sont colorées au Harris Shorr et parfois au MGG, la coloration Harris Shorr permet une meilleure visualisation des cellules vaginales et un meilleur contraste des couleurs.

3.2 dosage de la progestéronémie

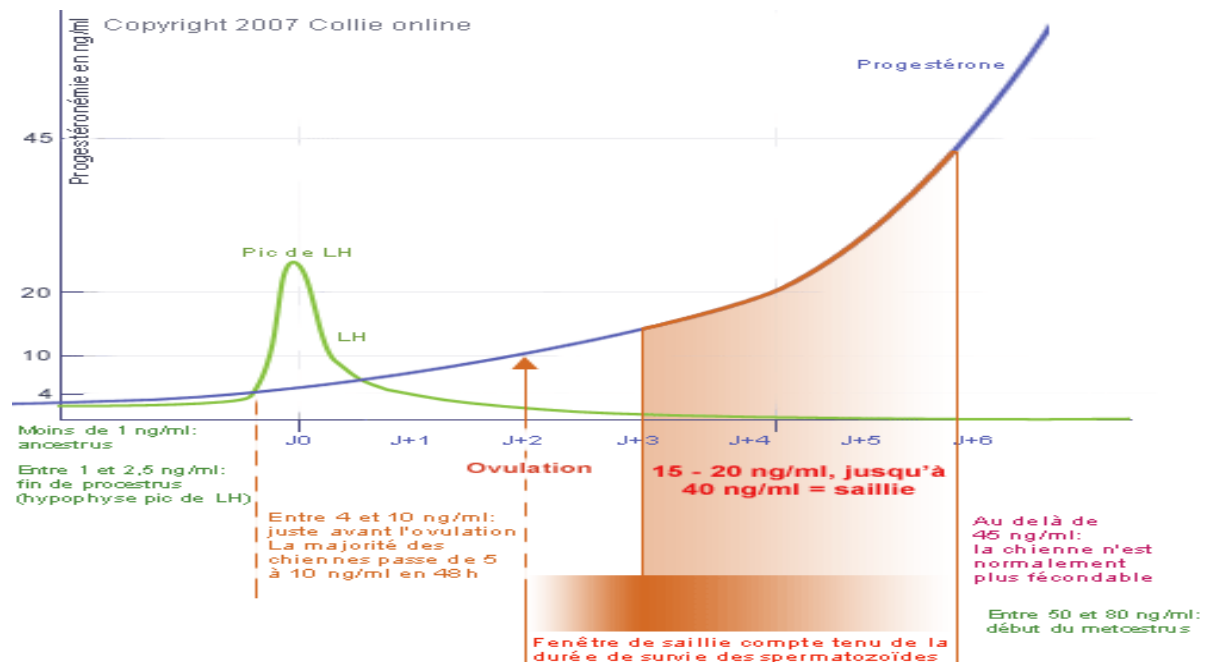


FIG 34 : Cinétique de la progestérone chez la chienne

4- Résultats et Discussion

Cas N°1

Chienne Diana de race Berger Allemand âgée de trois (3) ans, présentée pour diagnostic de chaleurs.



Fig 35 : Photo : la chienne Diana en consultation (photo personnelle)

L'examen clinique n'a rien montré de particulier, l'examen gynécologique révèle :

- Des saignements bien visibles sur la commissure inférieure de la vulve

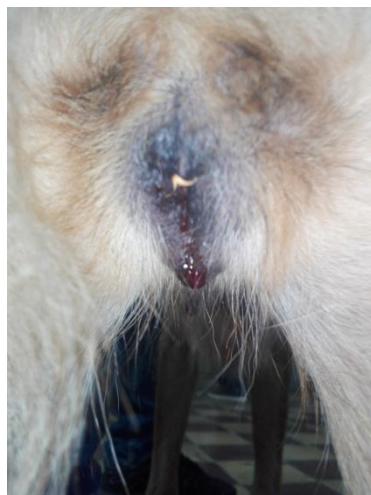


Fig 36 : Photo : perte de sang (photo personnelle)

L'anamnèse révèle que ces saignements sont apparus la veille au matin, ce qui nous pousse à conclure que la femelle en question est à son deuxième jour du cycle, cette période dans le jargon gynécologique vétérinaire est notée J1.

Un frottis vaginal est effectué sur la femelle pour déterminer la phase du cycle
Etapas du frottis vaginal



Fig 37 : frottis vaginaux



Fig 38 : lame après coloration(photo personnelle)

+

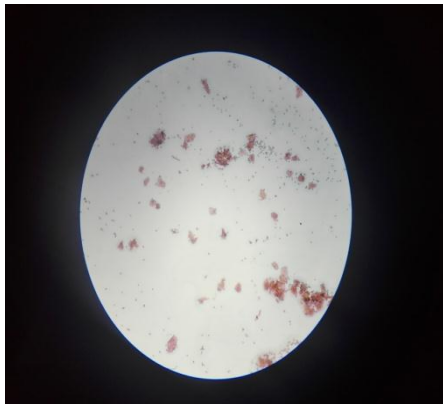


Fig 39 : Photo : Lame du frottis vaginal (Phase de proestrus) (photo personnelle)

Le frottis effectué sur la chienne Diana montre un proestrus, ceci est à rapporter aux travaux de (Fontbonne et al 2007, Englandg Concannon PW2002, Pierson P. et al 2002, Boker Rand Lumsden JH 2001, Malandaine and Fontbonne, Eilts Be 2007, Fontbonne A., Guering C. 2003, Bowen 2003) qui ont effectué des frottis sur des chiennes à J1, la lame montre des cellules éparpillées qui ont tendance à se regrouper et en phase de kératinisation

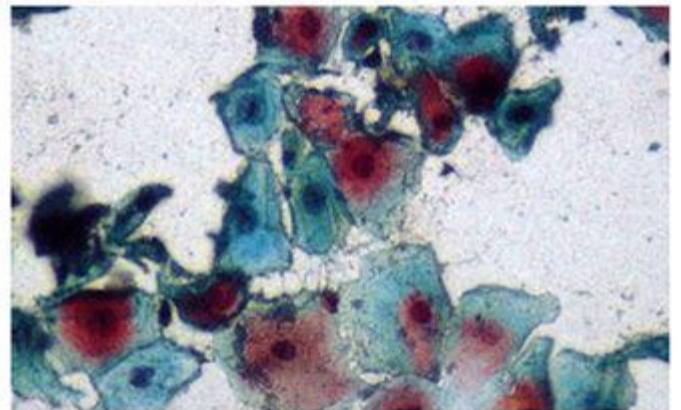


fig 40 :Photo: Proestrus Gr 100 (Alain Fontbonne)

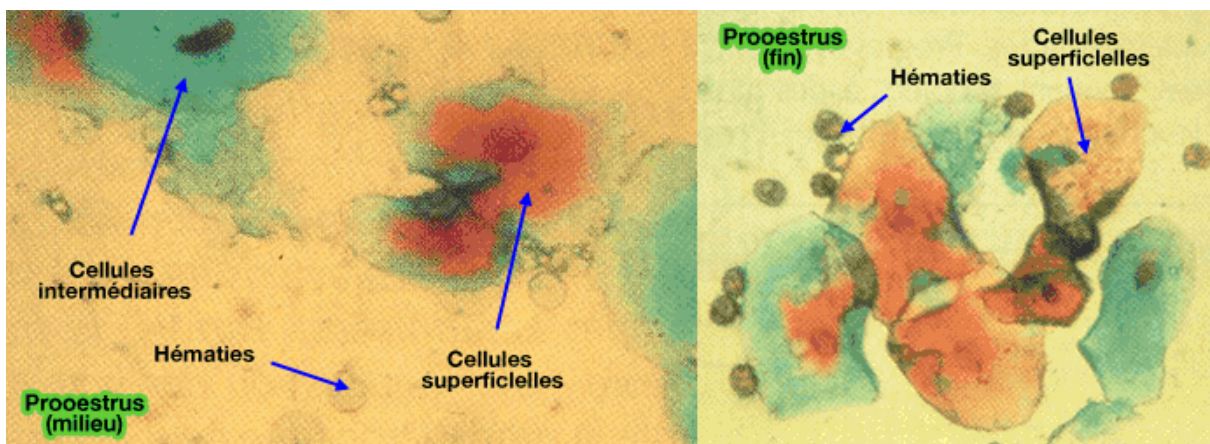


Fig 41 : Photo : Proestrus (Vetopsy)

La seconde étape pour cette chienne a consisté à effectuer un prélèvement sanguin sur tube sec afin de récupérer du sérum dans le but de doser la progestérone.




Fig 42 : Photo : prélèvement sanguin (photo personnelle)



Fig 43 : Photo: récolte de sérum après centrifugation (3000 trs pdt 10 min) (photo personnelle)

Un second prélèvement sanguin a été effectué au treizième jour (J13) des chaleurs et du sérum récolté.

Les sérums ainsi récoltés ont été congelés durant deux semaines avant d'être acheminés au laboratoire pour le dosage de la progestérone ; les résultats ont été les suivants :


 Laboratoire d'Analyses Médicales
 Dr. GUERMI ALI
 110 lgts Centre ville Cité El boustene
 BLIDA
 Tel 025 39 10 64
 Fax 025 39 14 33

06/06/2017

RESULTATS D'ANALYSES

PATIENT

Nom: Diana (BA)	Docteur:
Prénom: 3 ans	Date de Reception 06/06/2017
Age:	Code: 1

RESULTATS

Examens	Résultats	Unités	Normes
PROGESTERONE	J1 : 0.99 J 13 : 14.33	nmol/l	
Femme			
Phase folliculaire			0.31 - 1.52
Phase lutéale			5.16 - 18.56
Post ménopause			0.08 - 0.7
Hommes			0.14 - 2.06

Observation Dr. GUERMI ALI





Fig 44 : résultats d'analyses de la progestéronémie, Diana (BA)


 Laboratoire d'Analyses Médicales
 Dr GUERMI ALI
 110 lgts Centre ville Cité El boustene
 BLIDA
 Tel 025 39 10 64
 Fax 025 39 14 33

06/06/2017

RESULTATS D'ANALYSES

PATIENT

Nom: Lisa (X)	Docteur:
Prénom: 3 ans	Date de Reception 06/06/2017
Age:	Code: 1

RESULTATS

Examens	Résultats	Unités	Normes
PROGESTERONE		nmol/l	
	J1 : 0.55		
	J 15 : 3.2		
Femme			
Phase folliculaire			0.31 - 1.52
Phase lutéale			5.16 - 18.56
Post ménopause			0.08 - 0.7
Hommes			0.14 - 2.06

Observation Dr GUERMI ALI




Fig 45 : résultats d'analyses de la progestéronémie, Lisa (x)

Les résultats ainsi obtenus concordent avec un état d'ovulation à J13, nos résultats sont en adéquation avec ceux de [(Concannon PW 2002), (Davidson A 2006), (Eilts BE 2007), (Hoffmann B, Riesenbeck R and Klein R 1996), (Prelaud P, Rosenberg D and Fornel P De 2002), (Drion PV, Beckers JP, Derivaux J et EctorsF 2003), (Root-Kustritz MV 2001), (Borden MJ and Kennaway DJ 2006)] qui prouvent que l'ovulation chez les canidés est sous la dépendance d'un pic de progestérone.

Cas N° 2

Femelle issu d'un croisement entre un Rottweiler et un Berger Allemand, de 3 ans présentée en cabinet privé pour légère pertes vulvaires

J1 : 0,55

J2 : 3,2

Le frottis a révélé des globules rouges surtout et frottis « sale » qui ne met pas en évidence les cellules vaginales. Manifestation de chaleurs frustrées

A J15 : aucune manifestation de chaleur.

Progestérone très basse, chienne qui a un cycle irrégulier, sachant que 25% des chiennes ont ce type de cycle

Conclusion

Au terme de ce travail, il apparait que pour le suivi du cycle œstral de la chienne des outils tels que les frottis vaginaux et le dosage de la progestérone s'avèrent indispensable. En, effet, ils permettent une meilleure gestion de la reproduction en élevage canine, car ils sont performants et permettent des gains de temps et d'argent. La progestérone couplée avec le frottis vaginal « fixe » le moment optimal de l'ovulation chez la chienne pour des saillies ou des inséminations artificielles.

Tout ceci a pu être confirmé lors de notre modeste travail. En effet, la chienne Diana a bénéficié d'un suivi qui a permis d'optimiser son moment d'insémination. Pour la chienne Lisa, celle-ci a eu un cycle irrégulier, ce qui a été mis en évidence par les méthodes que nous avons utilisé.

Conclusion

Conclusion

Au terme de ce travail, il apparait que pour le suivi du cycle œstral de la chienne des outils tels que les frottis vaginaux et le dosage de la progestérone s'avèrent indispensables. En, effet, ils permettent une meilleure gestion de la reproduction en élevage canine, car ils sont performants et permettent des gains de temps et d'argent. La progestérone couplée avec le frottis vaginal « fixe » le moment optimal de l'ovulation chez la chienne pour des saillies ou des inséminations artificielles.

Tout ceci a pu être confirmé lors de notre modeste travail. En effet, la chienne Diana a bénéficié d'un suivi qui a permis d'optimiser son moment d'insémination. Pour la chienne Lisa, celle-ci a eu un cycle irrégulier, ce qui a été mis en évidence par les méthodes que nous avons utilisé.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Baker R and Lumsden JH. (2001) « Atlas de cytologie canine et féline » Masson, Paris (2001) 235-252

Barone R., (1978). « Anatomie comparée des mammifères domestiques » Splanchnologie, Vigot, Paris.

Borden MJ and Kennaway DJ. (2006), «Circadian rythms and reproduction» Reproduction, n° 132, 379-392.

Buff S. 2001 «Protocoles d'induction de l'oestrus chez la chienne» Le Point Vétérinaire N° 212 (Janvier-Fevrier).

CALDANI M, CARATY A, PELLETIER J, THIÉRY JC, TILLET Y (1991). La libération pulsatile de LH et son contrôle. In : Thibaut C, Lavasseur MC. La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA : Paris, 71-88.

CONCANNON P.W. (1993) Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs. J Reprod Fertil, 47 (Suppl), 3-27.

COUNIS R, COMBARNOUS Y, CHABOT V, TARAGNAT C (2001). Régulation de la synthèse et de la libération des gonadotropines hypophysaires. In : Thibaut C, Lavasseur MC. La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA : Paris, 65-84.

Davidson A. (2006), « Current concepts on infertility in the bitch » WALTHAM Focus, V. 16, n° 6, 13-21.

Vie, site ressource en Sciences de la Vie - ENS / DGESCO / UPMC 1999-2011.
[<http://www.snv.jussieu.fr/vie/index.html>] (page consultée le 5 juin 2011).

DEGUEURCE C (2003). Dissection de l'abdomen et du bassin des carnivores. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique d'Anatomie des animaux domestiques, 71p.

Done SH, Goody PC, Evans SA and Stickland NC. (1996), «Color Atlas of Veterinary Anatomy Volume 3 The Dog & Cat » Mosby, London, 401p.

DRIANCOURT MA, GOUGEON A, MONNIAUX D, ROYÈRE D, THIBAUT C (2001). Folliculogenèse et ovulation. In : Thibault C, Levasseur MC. La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA : Paris, 316-347.

Drion PV, Beckers JP, Derivaux J et Ectors F , (Août 2003) « Physiologie de la Reproduction Tome I, II et III » Polycopié de l'Université de Liège, Belgique. Faculté de Médecine Vétérinaire. IIIe Candidature.

Eilts BE. 2007 "Induction of Estrous" In: Polycopié de Louisiana State University. Department of Veterinary Clinical Sciences. VMED 5361. Comparative Theriogenology (Index). Edit 2007b pp 637-638 Disponible en ligne à l'URL [www.vetmed.lsu.edu/Default.htm] (Consulté le 05 juillet 2008) (Dernière mise à jour le : 13 October).

England GCW, Concannon PW. 2002 « Determination of the optimal breeding time in the bitch : Basic considerations » (8 Jun 2002) In : CONCANNON PW, ENGLAND GCW, VERSTEGEN J, LINDE-FORSBERG C. (Eds.) « Recent Advances in Small Animal Reproduction » International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA ; Disponible en ligne à l'adresse : [http://www.ivis.org], (Consulté le 21/03/2009).

FONTBONNE A, ARUS MARTÍ J, ENGLAD G et al. (2005). Manuel de la Reproduction Canine. Aimargues, Royal Canin SAS, 143p.

FONTBONNE A, LÉVY X, FONTAINE E et al. (2007). Guide pratique de reproduction clinique canine et féline. Paris, Med'Com, 272p.

Hoffmann B, Riesenbeck R and Klein R. (1996), « Reproductive endocrinology of bitches » Animal Reproduction Science, n° 42, (1996), 275-288.

JOHNSTON SD, KUSTRITZ MVR, OLSON PNS (2001). Canine and feline theriogenology. Philadelphia, WB Saunders, 592p.

KOOISTRA HS, OKKENS AC, BEVERS MM, POPP-SNIJDERS C, VAN HAAFTEN B, DIELEMAN SJ et al. (1999). Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in beagle bitches. *Biol Reprod.*; 60 (1), 65-71.

Kutzler MA. (2005) « Estrous induction and synchronization in canids and felids » *Theriogenology* Article in Press, doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.04.014.

Malandain E and Fontbonne A. , (2006) « Vagial smears in the bitch – The Royal Canin Cut-out and Keep guide » *WALTHAM Focus*, V. 16, n° 2, 39-40.

Neveux M. 1999 « Les frottis vaginaux chez la chienne » *Le Point Vétérinaire*, V. 30, n° 202, (Septembre-octobre), 557-564.

Oettle EE and Weldhagen AA. 1982. “A modified Shorr's stain: a practical rapid stain for canine vaginal cytology” *J S Afr Vet Assoc*, V. 53, n° 4, (December), pp 267-268.

Orlandi C. (2000).« Anatomy of the bitch and stud » In: *Proceeding of Canine Theriogenology Conference*. Columbus OH. Ohio State. December 10, 2000. The Ohio State University

Papanicolaou GN. "A new procedure for staining vaginal smears" *Science*; n°95 (1942), 438-439.

PINEDA MH, FAITH MR, FAULKNER LC, LUEBEN DC (1973). Cross reaction of antiovine luteinizing hormone serum. *Am. J. vet. Res.*, 33, 45-50.

Prelaud P, Rosenberg D and Fornel P, (2002) De « Tests hormonaux : Explorations fonctionnelles en endocrinologie des carnivores domestiques » *Masson- AFVAC*, Paris, p 276.

Root-Kustritz MV. (2001) « Use of Commercial Luteinizing Hormone and Progesterone Assay Kits in Canine Breeding Management » (24-May-2001) In :

Concannon. P.W. ; England. G. ; Verstegen. J. and Linde-Forsberg. C. (Eds.) « Recent Advances in Small Animal Reproduction » International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA. Disponible en ligne à l'adresse : [http:// www.ivis.org], (Consulté le 21/03/2009).

SCHNEIDER F, TOMEK W, GRÜNDER C (2006). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues : a review. *Theriogenology*, 66, 691-709.

Schutte AP. « Canine Vaginal Cytology » *J. Small Anim. Pract.* N° 08, (1967), 301–318. Bell ET, Bailley JB, Christie DW. "Studies on vaginal cytology during the canine estrous cycle" *Journal of Endocrinology*, n° 51, (1970), 225-226.

Tammer I, Blendinger K, Sobiraj A and Bostedt H. (1994) “The use of exfoliative vaginal cytology for the gynecological evaluation of the bitch” *Tierarztl Prax.* V. 22, n° 3, (Jun), pp 199-207.

Taradach C. (1980), « Frottis vaginaux chez la chienne Beagle : détermination de la période d'ovulation à l'aide de l'indice éosinophile » *Med. Vet.* V. 131, n° 11, 775–782.

THIBAUT C, LEVASSEUR MC (2001). La reproduction chez les mammifères et l'homme. Paris : INRA éditions, Ellipses éditions, 316-347, 479-503.

TIRET L (2006-2007). Physiologie de l'appareil reproducteur. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique, 104p.

vétopsy mai 2017

Volkman DH, Lamb SV, Schanbacher BJ, Salerno VS, Kretz CM, Hansen BS and Vincent SE. 2004 “The effects of storage time and temperature and anticoagulant on canine blood progesterone concentrations” In: *Proceeding of the 5th International Symposium of Canine and Feline Reproduction.* Sao Paulo, Bresil, 4-6 (August), 78-80.

ANNEXES

Annexe 1



Laboratoire d'Analyses Médicales
Dr GUERMI ALI
110 lgts Centre ville Cité El boustene
BLIDA
Tel 025 39 10 64
Fax 025 39 14 33

06/06/2017

RESULTATS D'ANALYSES

PATIENT

Nom: Diana (BA)
Prénom: 3 ans
Age:

Docteur:
Date de Reception: 06/06/2017
Code: 1

RESULTATS

Examens	Résultats	Unités	Normes
PROGESTERONE	J1 : 0.99 J 13 : 14.33	nmol/l	
Femme			
Phase folliculaire			0.31 - 1.52
Phase lutéale			5.16 - 18.56
Post ménopause			0.08 - 0.7
Hommes			0.14 - 2.06

Observation

Dr GUERMI ALI



Annexe 2



Laboratoire d'Analyses Médicales
Dr GUERMI ALI
110 lgts Centre ville Cité El boustene
BLIDA
Tel 025 39 10 64
Fax 025 39 14 33

06/06/2017

RESULTATS D'ANALYSES

PATIENT

Nom: Lisa (X)	Docteur:
Prénom: 3 ans	Date de Reception: 06/06/2017
Age:	Code: 1

RESULTATS

Examens	Résultats	Unités	Normes
PROGESTERONE	J1 : 0.55 J 15 : 3.2	nmol/l	
Femme			
Phase folliculaire			0.31 - 1.52
Phase lutéale			5.16 - 18.56
Post ménopause			0.08 - 0.7
Hommes			0.14 - 2.06

Observation

Dr GUERMI ALI



Annexe 3

Annexe3 FICHE ANALYTIQUE POUR FROTTIS VAGINAL

Numéro du frotti	Date de prélèvement <u>09/05/2017</u>	Nom de la chienne <u>Diana</u>
COMMEMORATIFS		
Etat de la vulve	Atrophie	Normale
Nature de l'écoulement	Tarié	Séreux Muqueux
Signe d'amantea	Positif	Négatif
Autres signes		
Date de saillie/...../.....	Suspicion
Couleur de l'écouvillon	Blanc	Rose
		<u>Rouge</u>
		<u>Gestation</u>
		Maron

OBSERVATION AU MICROSCOPE GROSSISSEMENT X40 ET/OU X100

Fond du frotti	• Claire	Granuleux	Muqueux
Richesse en cellules	Très riche	• Riche	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

Femelle en pro oestrus; Couleur rouge; Hares chers

ANNEXES

Annexe 1

FICHE ANALYTIQUE POUR FROTTIS VAGINAL

Numéro du frotti	Date de prélèvement <i>09/10/2017</i>	Nom de la chienne <i>Diana</i>
COMMEMORATIFS		
Etat de la vulve	Atrophié	Normale <input checked="" type="checkbox"/> tuméfié
Nature de l'écoulement	Tarié	Séreux Muqueux <input checked="" type="checkbox"/> sanguinolent
Signe d'amantea	Positif	Négatif
Autres signes		
Date de saillie/...../.....	Suspicion <input checked="" type="checkbox"/> Gestation
Couleur de l'écouvillon	Blanc	Rose <input checked="" type="checkbox"/> Rouge Maron

OBSERVATION AU MICROSCOPE GROSSISSEMENT X40 ET/OU X100

Fond du frottis	<input checked="" type="checkbox"/> Claire	Granuleux	Muqueux
Richesse en cellules	Très riche	<input checked="" type="checkbox"/> Riche	Pauvre Très pauvre
Répartition des cellules	<input checked="" type="checkbox"/> Dispersés	En amas	Isolés
Tendance tinctoriale	Basophile	<input checked="" type="checkbox"/> Acidophile	Mixte
Réussite de la coloration	Mauvaise		<input checked="" type="checkbox"/> Bonne
Nature des artefacts			

OBSERVATION AU MICROSCOPE GROSSISSEMENT X400

Mucus	<input checked="" type="checkbox"/> 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	<input checked="" type="checkbox"/>		
Cellules lysées	<input checked="" type="checkbox"/>		
Hématies	<input checked="" type="checkbox"/>		
Polynucléaires	<input checked="" type="checkbox"/>		
Cellules de la fosse clitoridienne	<input checked="" type="checkbox"/>		
Cellules néoplasiques	<input checked="" type="checkbox"/>		
Spermatozoïdes	<input checked="" type="checkbox"/>		
Bactéries	<input checked="" type="checkbox"/>		

LES INDICES CYTOLOGIQUES

Indice éosinophile
 Indice caryopicnotique
 Indice superficile

DIAGNOSTIC CYTOLOGIQUE

Femelle en pro-oestrus, Couleur rouge, Hémis chori