

UNIVERSITE DE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agronomiques

Biologiques et Vétérinaires

Département des Sciences Vétérinaires

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Physiologie de la gestation et de la lactation

ETUDE DE LA CYCLICITE ET SUIVI DE LA REPRODUCTION CHEZ LA CHIENNE DOMESTIQUE (*Canis familiaris*)

Par

BELALA Rédha

Devant le jury composé de

A. BERBER	MC, U. de Blida	Président
M. LAFRI	Professeur, U de Blida	Examineur
D. KHELAF	MC, ENSV EI-Harrach	Examineur
R. KAIDI	Professeur, U. de Blida	Promoteur

Blida, Avril 2010

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

D'abord à l'âme de mon cher papa qui est parti avant de vivre dans ce monde d'ici bas la joie de me voir présenter ce travail. Qu'Allah lui réserve le meilleur accueil dans son paradis.

A maman:

Cette grande Femme, qui a toujours cru en moi et a su m'inspirer sa pure et profonde foi. A mon adorée qui m'a tant soutenu avec ses prières les plus pieuses.

A mon épouse Hadjer,

Qui s'est tant sacrifiée pour que ce mémoire ait enfin pu voir le jour. Qu'elle puisse trouver ici un témoignage d'amour et de reconnaissance. Aux fruits de notre couple, nos adorables « Mohamed-Abderrahmane et Youssef ».

A Faiza; Bahia, Houria et Amina, mes quatre adorables sœurs pour leurs amours et encouragements. Je vous aime tant mes adorées.

Enfin à mon très cher oncle BELALA **Ahmed**, qui a cru en moi et qui a toujours été à mes yeux symbole de sérieux et d'intransigeance, d'abnégation et de persévérance dans l'accomplissement du devoir.

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, il me tient à cœur de me prosterner en toute humilité devant **Allah**, le tout puissant pour dire tout ému mes louanges : merci mon Dieu d'avoir répondu si gracieusement à mes prières et m'avoir mené jusqu'au bout de ce travail, merci Allah de m'avoir inspiré la force de surmonter toutes les difficultés que j'ai rudement encourues sur le chemin de ce projet. Louange à Dieu Souverain de l'univers.

Je remercie vivement Monsieur le Général Major **BOUSTILA Ahmed** Commandant de la Gendarmerie Nationale qui a permis à ce travail de se concrétiser en m'autorisant à faire ma post-graduation. Je salue en sa grande personne la tendance scientifique qui s'est traduite durant cette dernière décennie par beaucoup d'avancées et d'exploits techniques et scientifiques au sein de la Gendarmerie Nationale. Que notre chère institution puisse trouver dans ce modeste travail un plus dans ses projets et une réponse à ses attentes en matière de réalisation de la ressource canine.

Je remercie mon directeur de recherche, Professeur **KAIDI Rachid** d'avoir accepté d'être mon promoteur malgré son programme très chargé. Je lui réitère ici mes remerciements d'avoir été disponible par ses corrections et ses orientations, par ses encouragements et même par ses reproches et critiques dont le fruit n'est autre que ce travail.

Je remercie aussi Monsieur **BERBER A** d'avoir accepté de présider le Jury, et également Professeur **LAFRI Mohamed** et Docteur **KHELAF D** d'avoir bien voulu examiner ce mémoire.

Je remercie, toute entière, la fabuleuse équipe du Laboratoire de Zootechnie du Centre de Recherche Nucléaire de Draria et tout particulièrement Mr **KHELLILI Rachid** pour son aide précieuse et sa disponibilité dans la prise en charge de mes échantillons sanguins pour le dosage Radio Immunologique de la progestérone.

Je remercie enfin vivement mes très chers le Lieutenant **CHAROUANA Kaissar** et le Lieutenant Docteur Vétérinaire **BOUMAAZA Messaoud** du CFC/GN de Bainem pour leur soutien continu et aide indispensable à la réalisation de ce document.

RESUME

Le présent travail représente un essai clinique d'induction de l'œstrus conduit sur seize (16) chiennes domestiques en comparant deux traitements à base de deux molécules anti-prolactines, agonistes de la dopamine (*Bromocriptine* & *Cabergoline*).

Le cheptel expérimental soumis préalablement à un suivi médicalisé du cycle œstral pendant 4.5 mois, a été réparti en deux lots d'étude à savoir le lot "A" d'induction à la Bromocriptine (n=8) et le lot "B" d'induction à la *Cabergoline* (n=8). Les chiennes du premier lot ont reçu par voie orale 0.05 mg/kg/j de *Bromocriptine* (Parlodel© cp sec 2.5 mg) jusqu'à apparition du pro-œstrus ou pendant une durée maximale de 40 jours; et les femelles du deuxième lot ont reçu par voie orale 0.005 mg/kg/j de Cabergoline (Galastop© Solution Orale de 15 ml) jusqu'à apparition du pro-œstrus ou pendant une durée maximale de 40 jours.

L'objectif étant d'évaluer comparativement ces deux protocoles en fonction de divers critères d'efficacité, à savoir le taux d'induction, le taux de gestation, le taux de natalité, la taille de la portée (prolificité), la durée du traitement, le raccourcissement de l'intervalle interœstral (raccourcissement de l'anœstrus) et l'effet sur la durée de l'interœstrus du cycle suivant le cycle induit (retour en chaleur après cycle induit). La différence significative entre les résultats obtenus pour les deux lots d'étude a été vérifiée par l'application d'un test statistique de signification adéquat à la situation (Test des probabilités exactes de Fisher).

Dans un second temps et une seconde approche, nous avons exploité statistiquement les données cytologiques (ECV) et hormonales (Progestéronémie) recueillies pendant toute la période d'étude afin d'évaluer un sens de corrélation entre la progestéronémie et les taux cellulaires (taux d'éosinophilie taux de basophilie), puis d'affiner cette corrélation par l'application de certains critères à ces paramètres hormonaux et cellulaires. L'objectif ici est de trouver un critère cellulaire fiable comme indicateur d'un seuil bas de progestéronémie. Cette approche s'insère dans le cadre général de la réévaluation de la cytologie vaginale en début du pro-œstrus.

Le traitement à la Cabergoline s'est montré plus efficace que le traitement à la Bromocriptine avec des taux d'induction de gestation et de natalité de **87.5%** versus **25%**; et une différence statistiquement significative ($P < 0.05$). La probabilité pour que le hasard puisse expliquer cette différence est ($P = 0.020279721$) de loin en dessous du seuil de signification de 5%. La durée du traitement à la *Cabergoline* a été de 24.43 ± 7.77 jours (Moy \pm SEM) avec une plage de confiance de 16.66 à 32.20 contre une durée de traitement de 34.50 ± 6.86 jours et un intervalle de 27.64 à 41.36 pour le traitement à la *Bromocriptine*. De plus, le traitement à la Cabergoline a permis de raccourcir l'intervalle interœstral chez les femelles d'étude à cyclicité normale d'une moyenne de 43.40 ± 14.30 jours [29.10j – 57.70j] par contre aucun raccourcissement de cet intervalle n'a été obtenu avec le traitement à la *Bromocriptine* sur les deux chiennes répondant à l'induction. Quand à la taille moyenne de la portée, aucune différence significative n'a pu être enregistrée entre les mises-bas précédentes et la mise-bas du cycle induit. L'intervalle interœstral du cycle suivant le cycle induit n'a été affecté par aucun des deux protocoles d'induction de notre étude.

Il en résulte que, dans les conditions de cette étude, le traitement à la *Cabergoline* est cliniquement plus efficace et plus sûr que le traitement à la *Bromocriptine*, dans l'induction d'un œstrus fertile suivi de gestation qui aboutit à la naissance d'une portée de taille normale (inchangée) et un retour en chaleur dans un délai normal après cycle induit. Les résultats de cette étude suggèrent par ailleurs que la *Cabergoline* est plus efficace que la *Bromocriptine* dans le rétablissement de la cyclicité chez les chiennes souffrant d'un interœstrus anormalement prolongé ou d'ancœstrus primaire et secondaire en l'absence de causes extra-gonadiques.

Pour la deuxième partie du travail, l'exploitation statistique des données cytologiques et hormonales de l'étude a montré qu'au début du pro-œstrus, la progestéronémie est en corrélation nette et hautement significative ($p < 0.001$) avec les pourcentages en cellules basophiles et éosinophiles. Parmi les critères cytologiques évalués pour les deux pourcentages cellulaires, celui d'avoir plus de 40% de cellules basophiles sur le frottis vaginal (>40% de basophilie) s'est montré le plus fiable avec une marge d'erreur nulle. Son application signifie que lorsque le pourcentage des cellules basophiles est strictement supérieur à 40%, nous avons

une très forte certitude que la progestéronémie soit inférieure à 2ng/ml (il est donc inutile de doser cette hormone), et qu'une fois ce pourcentage de basophilie devient inférieur à 40%, les dosages prendront alors toute leur valeur. Ainsi, dans le cadre du suivi du cycle, cet indicateur cellulaire aurait un intérêt particulier à prévenir des dosages coûteux et inutiles de la progestérone et réduire leurs nombre au début du pro-œstrus.

ABSTRACT

The present work is a clinical trial of estrus induction in sixteen (16) domestic bitches (*Canis familiaris*) using two different anti-prolactin molecules, both Dopaminergic Agonists (*Bromocriptine* & *Cabergoline*).

The experimental animals previously followed for a period of 4.5 months, have been allotted to two (2) study's Groups: "Group A" called *Bromocriptine* induction group (n=8) counting 8 bitches and "Group B" called *Cabergoline* induction group counting 8 bitches (n=8). Bitches of "Group A" received orally 0.05 mg/kg/day of *Bromocriptine* ((Parlodel© cp sec 2.5 mg) until onset of pro-estrus or for a maximum of 40 days; while bitches of the second group "Group B" received orally 0.005 mg/kg/day of *Cabergoline* (Galastop © Sol Buv 15 ml) until onset of pro-estrus or for a maximum of 40 days.

The aim is to evaluate comparatively these two molecules according to several efficacy criteria which are induction, pregnancy, and whelping rates, litter mean size, treatment duration, shortening of inter-estral interval and effect on duration of inter-estral interval following the induced cycle. A significant difference between results of both treatment groups has been established by bean of Fisher's test of exact probabilities.

In a second time and another approach, we have exploited the cytological and hormonal data collected through the entire period of study in order to evaluate a sense of correlation between progesteronemia and cellular rates (eosinophilic and basophilic rates), then to refine this correlation by applying some criteria to these hormonal and cellular parameters. The aim here was to find a cellular criterion which is reliable and good indicator of a low progesteronemia's threshold. This approach is to be integrated within a global context of reevaluation of vaginal cytology in early pro-estrus.

Cabergoline's treatment has been more efficient than *Bromocriptine's* one with induction, pregnancy and whelping's rates of 87.5% for versus 25% and a significant statistical difference ($p < 0.05$). The mean duration of *Cabergoline's* treatment was 24.43 ± 7.77 days (Moy \pm SEM) with a range from 16.66 to 32.20 against a duration of 34.50 ± 6.86 days and a range from 27.64 to 41.36 days for *Bromocriptine's* treatment. Besides, *Cabergoline* reduced the inter-estral interval in normal cycled bitches by a mean duration of 43.40 ± 14.30 days and a range from

29.10 to 57.70 days while no significant reduction of this interval could be observed with *Bromocriptine*. For the litter mean size, no significant difference could be noted between values before and after induction treatments. Both compared treatment in this study did not affect significantly the inter-estral interval of the cycle following induced one.

It results that, in this study's conditions, *Cabergoline* protocol used is more efficient and safer than *Bromocriptine's* protocol to induce in domestic bitches a fertile estrus followed by normal pregnancy, whelping and litter size and also a normal post induction inter-estrus interval. Our results suggest also that *Cabergoline* is more efficient than *Bromocriptine* in inducing estrus in bitches suffering long inter-estrus and also those presenting primary and secondary anoestrus if extra gonadal causes are eliminated.

For the second part of the study, the statistical exploitation of cytological and hormonal data collected all over the whole study period, has showed a marked and a highly significant correlation ($p < 0.001$) between progesteronemia and basophilic and eosinophilic vaginal cell rates at early pro-estrus. Among the studied cellular criteria, the criterion to find over 40% of basophilic cells on a vaginal smear appeared the most reliable of all with a null error margin. Its application means that when a vaginal smear shows more than 40% of basophilic cells we have a strong certainty that the progesteronemia is under the threshold of 2ng/ml, it's thus useless to measure this hormone, and when the basophilic cell percent falls under 40%, it's then useful to perform the dosage. Thus, in the context of estrus detection, the basophilic index shows a particular interest by enabling us to avoid costly and useless progesterone dosages at early pr-estrus.

ملخص

يمثل هذا العمل تجربة سريرية لتحريض الشبق اصطناعيا لدى ست عشرة أنثى من نوع الكلب الأليف و ذلك باستعمال مادتين اثنتين من مضادات "البرولاكتين" و المساعدة لمادة "الدوبامين" و هما (البروموكريبتين و الكابارقولين).

لقد أخضع القطيع التجريبي قبل بداية الدراسة لفترة متابعة دامت 4.5 شهرا حيث تم إثرها تقسيمه إلى فوجين اخياريين و هما "الفوج أ" أو فوج التحريض بمادة "البروموكريبتين" المتكون من ثمانية إناث و "الفوج ب" أو فوج التحريض بمادة الكابرجولين و المتكون من 8 إناث. تلقى "الفوج أ" جرعة 0.05 مع/كغ/يوم عن طريق الفم من مادة "البروموكريبتين" إلى غاية ظهور علامات الشبق أو لمدة أقصاها 40 يوما كما تلقى "الفوج ب" جرعة 0.005 مع/كغ/يوم عن طريق الفم من مادة "الكابرقولين" إلى غاية ظهور علامات الشبق أو لمدة أقصاها 40 يوما.

يهدف هذا البحث إلى تقييم و مقارنة فعالية العلاجين القائمين على أساس المادتين السالفتي الذكر (البروموكريبتين و الكابرقولين)، و ذلك تبعا لعدة معايير تقييمية و هي نسبة التحريض، نسبة الحمل، نسبة الوضع، معدل عدد المواليد، طول مدة العلاج، تقصير مجال ما بين الشبقين، و أخيرا مدى التأثير على مدة مجال ما بين الشبقين. تم التأكد من وجود فرق معتبر إحصائيا ما بين نتائج العلاج في كلا الفوجين التجريبيين و ذلك عن طريق تطبيق إختبار إحصائي (إختبار فيشر).

عمد الباحث، في مرحلة ثانية، إلى استغلال جميع المعطيات المستخلصة خلال فترة البحث، سواء الهرمونية منها (نسب البروجستيرون في الدم) أو الخلوية (المؤشرات الخلوية الناتجة عن عمليات الحك المهبلي) بهدف تقييم مدى الارتباط المتبادل، في اتجاه معين، ما بين نسب هرمون البروجستيرون في الدم من جهة و النسب الخلوية (نسبة الخلايا المحبة للحمض و نسبة الخلايا المحبة للقاعدة) ثم تمحيص هذا الارتباط المتبادل بتطبيق جملة من المقاييس على المتغيرات الهرمونية و الخلوية. الهدف هنا هو إيجاد مقياس خلوي موثوق صالح لأن يكون مأسرا جيدا لعتبة دنيا لنسبة البروجستيرون في الدم.

تبين أن العلاج بمادة "الكابرجولين" أكثر فعالية من العلاج بمادة "البروموكريبتين" و ذلك بسبب تحريض و حمل و ولادة ترتفع إلى 87.5 بالمئة بالنسبة لمادة "الكابرقولين" مقابل نسبة 25 بالمئة بخصوص مادة "البروموكريبتين" و تبين أن فارق الفعالية ما بين العلاجين كان معتبرا إحصائيا لصالح مادة "الكابرقولين" بمجال خطأ مقدر ب 2.02 بالمئة ($p = 0.020$) أقل من

مجال الأمان المقدر بنسبة 5 بالمئة في مثل هذه الدراسات ($p < 0.05$). كانت مدة العلاج بالكابرقولين بمعدل 24.432 ± 7.77 يوما و مجال (16.66 – 32.20) مقابل زمدة 34.50 ± 6.86 يوما و مجال (27.64 – 41.36) بالنيبة لعلاج البروموكريبتين. كذلك مكن العلاج بمادة "الكابرقولين" بتقليص مجال ما بين الطمئين بمعدل 43.40 ± 14.30 يوما بمجال (29.10 – 57.70) يوما في حين لم يتم تسجيل أي تقليص معتبر إحصائيا لهذا المجال بمادة البروموكريبتين. بالنسبة لعدد المواليد فلم يسجل أي فرق معتبر بين ما قبل و ما بعد تطبيق علاج التحليض، كما لم يأت أي من العلاجين المدروسين على مجال ما بين الطمئين في الدورة التابعة لدورة التحريض.

لقد أفادت نتائج هذا البحث من جهة أن علاج التحريض بمادة "الكابرقولين" هو أكثر فعالية و أمانا من العلاج بمادة "البروموكريبتين" في تحريض الشبق لدى الكليات الأليفة بحيث يكون متبوعا بفترات حمل و ولادة عادية و عدد مواليد اعتيادي و كذلك بعودة إلى الشبق في أجل عادي بعد العلاج.

أسفر البحث من جهة أخرى عن كون مادة "الكابرقولين" أكثر فعالية من مادة "البروموكريبتين" في تحريض الشبق لدى الإناث اللواتي يعانين من امتداد مجال ما بين الطمئين و كذلك تلك اللواتي يعانين من حالات غياب الشبق سواء كانت ذات منشأ أولي أو ثانوي.

بالنسبة للشطر الثاني من هذا البحث، فإن الاستغلال الإحصائي للمعطيات الهرمونية و الخلوية المجمعة خلال فترة البحث، قد أسفر عن وجود ارتباط متبادل راجح ما بين نسبة البروجسترون في الدم و نسبة الخلايا المهبلية المحبة للقاعدة و المحبة للحمض و ذلك خلال أول فترة ما قبل الشبق. من بين جميع المقاييس الخاوية المدروسة، فإن مقياس وجود أكثر من 40 بالمئة من الخلايا المحبة للقاعدة كان الأوثق بنسبة خطأ منعدمة. إن تطبيق هذا المقياس يعني عمليا أنه إذا وجدنا في اختبار خلوي مهبلي أكثر من 40 بالمئة من الخلايا المحبة للقاعدة، فإننا على ثقة كبيرة بأن نسبة البروجسترون في الدم دون عتبة 2 نانوغرام في المليلتر، و من ثم فلا داعي أبدا للكشف عن هذا الهرمون. و عندما تنزل نسبة الخلايا المحبة للقاعدة إلى أسفل من 40 بالمئة فإن الكشف عن نسبة البروجسترون يكون مفيدا. على أساس ذلك، و في إطار متابعة الدورة الشبقية، فإن مقياس الخلايا المحبة للقاعدة يكتسي أهمية خاصة لكونه يمكننا من تفادي إجراء كشوف مكلفة و عقيمة عن نسبة البروجسترون في الدم خلال أول فترة ما قبل الشبق.

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	2
REMERCIEMENTS	3
RESUME	4
ABSTRACT	7
ملخص	9
TABLE DES MATIERES	11
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	14
INTRODUCTION	17
RAPPELS ANATOMO-PHYSIOLOGIQUES	21
1.1. L'ANATOMIE DE L'APPAREIL GENITAL DE LA CHIENNE	21
1.1.1. <i>Les ovaires</i>	21
1.1.2. <i>La trompe utérine</i>	24
1.1.3. <i>L'utérus (Uteri)</i>	25
1.1.3.1. Les cornes utérines	28
1.1.3.2. Le corps utérin.....	28
1.1.3.3. Le col utérin	30
1.1.4. <i>Le vagin</i>	31
1.1.5. <i>La vulve</i>	34
1.1.6. <i>Les mamelles</i>	36
1.2. RAPPELS ET PARTICULARITES DE LA CYCLICITE CHEZ LA CHIENNE.....	36
ETUDE ET SUIVI DU CYCLE ŒSTRAL	38
2.1. INTRODUCTION	38
2.2. ETUDE DU CYCLE ŒSTRAL	38
2.2.1. <i>Classification du cycle œstral</i>	38
2.2.2. <i>Description des différentes phases du cycle œstral</i>	39
2.2.2.1. Prœstrus.....	39
2.2.2.2. Œstrus	40
2.2.2.3. Métœstrus (Di-œstrus).....	40
2.2.2.4. Anœstrus.....	40
2.2.3. <i>Modifications observées au cours du cycle</i>	41
2.2.3.1. Modifications comportementales	41
2.2.3.1.1. Prœstrus	41
2.2.3.1.2. Modifications cliniques	42
2.2.3.1.3. Modifications histo-physiologiques	44
2.2.3.1.4. Modifications hormonales	48
2.3. SUIVI DU CYCLE ŒSTRAL	55
2.3.1. <i>Critères subjectifs de suivi</i>	55
2.3.1.1. Nombre de jours de chaleur :	55
2.3.1.2. Acceptation du mâle par la chienne :	56
2.3.1.3. Acceptation de la chienne par le mâle :	56
2.3.1.4. Aspect des écoulements vulvaires :	56
2.3.2. <i>Marqueurs objectifs de suivi</i>	57
2.3.2.1. Résistivité du mucus.....	57
2.3.2.2. Endoscopie	57
2.3.2.3. L'examen cytologique vaginal (Frottis vaginal).....	58
2.3.2.3.1. Principe de l'examen cytologique vaginal	58
2.3.2.3.2. La technique de réalisation d'un frottis vaginal:	59
La coloration au bleu de méthylène :.....	61
La coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) :	61
La coloration de Harris-Shorr:	62
La coloration de Papanicolaou:	64

2.3.2.3.3. Interprétation d'un frottis vaginal	65
2.3.2.4. Dosage de la progestérone sérique	73
2.3.2.4.1. Généralités sur l'évolution de la progestéronémie.....	73
2.3.2.4.2. Techniques de dosage de la progestérone	73
2.3.2.4.3. Progestéronémie et suivi des chaleurs	75
2.3.2.5. Echographie ovarienne	76
2.4. CONCLUSION	77
ETUDE DES METHODES D'INDUCTION DE L'ŒSTRUS.....	79
3.1. INTRODUCTION	79
3.2. LES TECHNIQUES DE MAITRISE DE LA REPRODUCTION CHEZ LA CHIENNE	81
3.2.1. <i>Synchronisation des chaleurs</i>	82
3.2.2. <i>Insémination artificielle</i>	82
3.2.3. <i>Super ovulation</i>	83
3.2.4. <i>Récolte d'ovocytes</i>	83
3.2.5. <i>Transfert embryonnaire</i>	83
3.2.6. <i>Maturation in vitro</i>	83
3.2.7. <i>Fécondation in vitro</i>	84
3.2.8. <i>Clonage</i>	85
3.3. METHODES D'INDUCTION DES CHALEURS	85
3.3.1. <i>Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) et Analogues</i>	86
3.3.2. <i>Œstrogènes de synthèse (DES: Diéthylestilbœstrol)</i>	89
3.3.3. <i>Gonadotrophines pituitaires (FSH et LH)</i>	91
3.3.4. <i>PMSG et hCG</i>	92
3.3.5. <i>Les anti prolactines</i>	94
3.3.5.1. <i>Agonistes de la dopamine (Bromocriptine & Cabergoline)</i>	95
3.3.5.2. <i>Antagoniste de la sérotonine (Métergoline)</i>	98
3.4. CONCLUSION	99
ETUDE DES MOLECULES ANTI PROLACTINES	101
4.1. INTRODUCTION	101
4.2. RAPPEL SUR LA PHYSIOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET PERIPHERIQUE	102
4.3. ETUDE DES ANTI-PROLACTINES AGONISTES DE LA DOPAMINE	105
4.3.1. <i>Pharmacie chimique des anti-prolactines agonistes de la dopamine</i>	105
4.3.2. <i>Pharmacocinétique des anti-prolactines agonistes de la dopamine</i>	106
4.3.3. <i>Pharmacologie des anti-prolactines agonistes de la dopamine</i>	108
4.3.4. <i>Mode d'action de déclenchement des chaleurs des agonistes dopaminergiques</i>	110
4.4. CONCLUSION	111
PARTIE EXPERIMENTALE.....	113
5.1. INTRODUCTION ET OBJECTIFS	113
5.2. MATERIELS ET METHODES	115
5.2.1. <i>Lieu de l'expérimentation (CFC/GN de Baïnem)</i>	115
5.2.2. <i>Cheptel canin expérimental</i>	115
5.2.3. <i>Période expérimentale</i>	116
5.2.4. <i>Protocole expérimental</i>	117
5.2.4.1. <i>Sélection des femelles de l'expérimentation</i>	117
5.2.4.2. <i>Suivi préliminaire des femelles de l'expérimentation</i>	118
5.2.4.2.1. <i>Objectif du suivi préliminaire</i>	118
5.2.4.2.2. <i>Modalité du suivi</i>	119
5.2.4.3. <i>Traitements d'induction</i>	120
5.2.4.3.1. <i>Constitution des lots de traitement</i>	120
5.2.4.3.2. <i>Moment du début de traitement (Détermination du J₁)</i>	123
5.2.4.3.3. <i>Protocole de traitement</i>	123
Protocole d'induction à la Bromocriptine	123
Protocole d'induction à la Cabergoline.....	123
5.2.4.3.4. <i>Critère de positivité du traitement</i>	124
5.2.4.4. <i>Suivi du cycle pendant et après le traitement d'induction</i>	124
5.2.4.4.1. <i>Examen clinique gynécologique</i>	125

5.2.4.4.2. Examen Cytologique Vaginal «ECV»	126
5.2.4.4.3. Prise d'échantillon sanguin et dosage de la progestérone «RIA»	128
5.2.5. <i>Analyses statistiques</i>	128
5.2.5.1. Test des probabilités exactes de Fisher	130
5.2.5.2. Test de khi-deux.....	131
5.3. RESULTATS.....	132
5.3.1. <i>Recueil des renseignements reproductifs sur les femelles d'étude</i>	132
5.3.2. <i>Résultats du traitement d'induction des chaleurs</i>	136
5.3.2.1. Traitement d'induction à la Bromocriptine (Parlodel®).....	137
5.3.2.2. Traitement d'induction à la Cabergoline (Galastop®).....	139
5.3.2.3. Comparaison des deux traitements d'induction précédents	142
5.3.2.3.1. Comparaison des pourcentages de succès.....	144
5.3.2.3.2. Comparaison des moyennes	147
5.3.3. <i>Résultats de l'étude de corrélation des données hormonales et cytologiques</i>	149
5.3.3.1. Elaboration des classes cellulaires et des intervalles de progestéronémie.....	150
5.3.3.2. Evolution des trois classes cellulaires en fonction de la progestéronémie.....	151
5.3.3.2.1. Les pourcentages des classes cellulaires en fonction de la progestéronémie.....	153
5.3.3.2.2. Corrélation entre le taux de progestérone et les taux d'éosinophilie et de basophilie...159	
5.3.3.2.3. Les taux de progestérone en fonction des critères cytologiques.....	160
5.4. DISCUSSION.....	162
5.4.1. <i>Discussion des résultats des traitements d'induction à la Bromocriptine et à la Cabergoline</i>	162
5.4.1.1. Etude comparative des Taux d'Induction de gestation et de natalité.	162
5.4.1.2. Etude comparative du paramètre taille moyenne de la portée.	165
5.4.1.3. Etude comparative du paramètre raccourcissement de l'intervalle interœstral.	166
5.4.1.4. Etude comparative du paramètre durée du traitement.	166
5.4.1.5. Etude comparative du paramètre intervalle interœstral suivant le cycle induit.	168
5.4.1.6. Etude comparative de l'efficacité des traitements sur les interœstrus longs.....	170
5.4.1.7. Etude comparative de l'efficacité des traitements sur les anœstrus primaire et secondaire.170	
5.4.1.8. Evaluation du facteur "Effets secondaires" des traitements.	171
5.4.2. <i>Discussion des résultats de l'étude de corrélation des données hormonales et cytologiques</i>	172
CONCLUSION	175
RECOMMANDATIONS	177
REFERENCES	179
APPENDICE	193
APPENDICE A - LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS.....	193
APPENDICE B - DEPLIANT DE PRESENTATION DU CFC/GN DE BAINEM.....	194
APPENDICE C - ETAT NOMINATIF DES FEMELLES DE L'EXPERIMENTATION	195
APPENDICE D - FICHE INDIVIDUELLE DE FEMELLE REPRODUCTRICE.....	196
APPENDICE E - FICHE INDIVIDUELLE DE RENSEIGNEMENT	198
APPENDICE F - TIMING ET CODIFICATION DES ECHANTILLONS SANGUINS POUR LE DOSAGE DE LA P4	200
APPENDICE G - CONSIGNES POUR LES FROTTIS VAGINAUX.....	201
APPENDICE H - TECHNIQUE DE COLORATION DE HARRIS-SCHORR	202
APPENDICE I - NOTICE D'UTILISATION DU COLORANT HEMATOXYLINE D'HARRIS UTILISE.....	203
APPENDICE J - NOTICE D'UTILISATION DU KIT RIA-PROGESTERONE UTILISE	205
APPENDICE K - PHOTOGRAPHIES PRISES PENDANT LE TRAVAIL EXPERIMENTAL	207
APPENDICE L – MANUEL D'UTILISATION DU MOTICAM 350	208
APPENDICE M1 – FROTTIS VAGINAUX DE LA FEMELLE "IRA 1" EN PROESTRUS	210
APPENDICE M2 - FROTTIS VAGINAUX DE LA FEMELLE "IRA 1" EN OESTRUS	211
APPENDICE M3 - FROTTIS VAGINAUX DE LA FEMELLE "IRA 1" EN METOESTRUS.....	212
APPENDICE M4 - FROTTIS VAGINAUX DE LA FEMELLE "IRA 1" EN METOESTRUS.....	213
APPENDICE M5 - FROTTIS VAGINAUX DE LA FEMELLE "MITCHA"	214
APPENDICE N - EXECUTION DU TEST DES PROBABILITES EXACTES DE FICHER.....	215
APPENDICE O - TABLEAU DE CONTINGENCE POUR LE CALCUL DE χ^2	216
APPENDICE P - TABLEAU DE CONTINGENCE POUR LE CALCUL DE χ^2	217

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Fig 1.1	Représentation schématique de l'appareil génital chez la chienne (Conformation extérieure en vue ventrale).	22
Fig 1.2a	Vue Latérale Gauche - Ovaire, Bourse Ovarique et Trompe Utérine.	23
Fig 1.2b	Vue Latérale Gauche - Ovaire, et Utérus.	23
Fig 1.3	Relation du Mésosalpinx et Oviducte chez la chienne.	25
Fig 1.4	Représentation schématique de l'appareil génital chez la chienne (Conformation intérieure en vue dorsale).	26
Fig 1.5	Vue Dorsale du Tractus Génital chez la chienne (Avant et Après excision)	27
Fig 1.6	Vue Latérale Gauche de la Corne Utérine et du Ligament large	28
Fig 1.7	Le tissu utérin excisé chez la chienne.	29
Fig 1.8	Représentation schématique de l'appareil génital femelle chez la chienne (Conformation intérieure en vue latérale « Coupe sagittale »)	30
Fig 1.9	Le Col Utérin (Cervix) excisé chez la chienne.	31
Fig 1.10	Représentation schématique du col et du vagin chez la chienne (A : Conformation intérieure en vue dorsale, B : Conformation intérieure en vue latérale « Coupe sagittale »)	32
Fig 1.11	Représentation schématique d'une coupe longitudinale médiane du canal cervical (A : Chez de nombreuses espèces ; B : chez la chienne).	32
Fig 1.12a	Régions topographiques du Pelvis et des organes génitaux externes. (Vue caudale de la région périnéale d'une chienne en oestrus)	35
Fig 1.12b	Régions topographiques du Pelvis et des organes génitaux externes. (Vue caudale de la région périnéale d'une chienne au repos sexuel)	35
Fig 2.1	Représentation schématique des quatre phases du cycle œstral chez la chienne.	41
Fig 2.2	Epithélium pavimenteux non kératinisé pluristratifié [d'après la division d'histologie du département de médecine de l'université de Fribourg]	44
Fig2.3	Représentation schématique de l'action hormonale et feed-back dans le contrôle de la reproduction chez la chienne	49
Fig2.4	Représentation schématique des modifications endocriniennes au cours du cycle ovarien de la chienne non gestante	51
Fig2.5	Correspondance Entre taux de LH et début d'augmentation de la Progesterone	52
Fig 2.6	Aspects endoscopiques de la muqueuse vaginale au cours des différentes phases du cycle œstral.	58

Fig 2.7	Technique d'écouvillonnage chez la chienne	60
Fig 2.8	Techniques d'étalement d'un frottis vaginal	61
Fig 2.9	Matériel pour coloration de May-Grünwald-Giemsa modifiée : Diff-Quick®	62
Fig 2.10	Frottis vaginaux de chienne aux différentes phases du cycle oestral, colorés avec la méthode May-Grünwald-Giemsa modifiée : Diff-Quick®.	62
Fig 2.11	Matériel pour fixation et coloration d'Harris Schorr.	64
Fig 2.12	Frottis vaginaux de chienne aux différentes phases du cycle oestral, colorés avec la méthode du trichrome d'Harris-Schorr	64
Fig 2.13	Frottis vaginaux pratiqués chez une femme et colorés avec la technique de Papanicolaou	65
Fig 2.14	Les cellules d'un frottis vaginal	67
Fig 2.15	Microphotographies de lames de frottis vaginaux aux différents stades du cycle oestral de la chienne (colorés au Harris-Schorr).	69
Fig 2.16	Microphotographies de lames de frottis vaginaux aux différents stades du cycle oestral de la chienne (colorés au Diff Quick).	70
Fig 4.1	Représentation du système porte hypothalamo-hypophysaire.	104
Fig 4.2	Structure chimique de la Cabergoline comparée à celle de la bromocriptine et de la dopamine.	107
Fig II.1	Répartition des effectifs relatifs aux huit intervalles de progestéronémie élaborés.	151
Fig II.2	Evolution des % de classes cellulaires en fonction de la progestérone pour les 282 lames étudiées.	152
Fig II.3	Evolution du % des cellulaires basophiles en fonction de la progestérone pour les 282 lames étudiées.	153
Fig II.4	Evolution du % des cellulaires polychromatophiles en fonction de la progestérone pour les 282 lames étudiées.	154
Fig II.5	Evolution du % des cellulaires éosinophiles en fonction de la progestérone pour les 282 lames étudiées.	155
Fig II.6	Evolution comparative des pourcentages des trois classes cellulaires en fonction de la progestéronémie (282 frottis étudiés).	156
Fig II.7	Histogramme d'évolution comparative des pourcentages des trois classes cellulaires en fonction de la progestéronémie (217 frottis P4<10ng/ml).	157
Fig II.8	Courbe d'évolution comparative des pourcentages des trois classes cellulaires en fonction de la progestéronémie (217 frottis P4<10ng/ml).	157

TABLEAUX

Tableau 2.1	Progestéronémie et ovulation chez la chienne	50
-------------	--	----

Tableau 2.2	Variation de la progestéronémie et de l'oestradiolémie pendant le cycle sexuel de la chienne	55
Tableau 2.3	Technique de coloration de Harris-Shorr	64
Tableau 2.4	Technique de coloration de Papanicolaou	65
Tableau 3.1	Les Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) et ses Analogues utilisés dans l'induction de l'œstrus chez la chienne	96
Tableau 3.2	Les Gonadotropines et les œstrogènes de synthèse utilisés dans l'induction de l'œstrus chez la chienne	97
Tableau 3.3	La PMSG dans l'induction de l'œstrus chez la chienne.	98
Tableau 3.4	Les Agonistes Dopaminergiques dans l'induction de l'œstrus chez la chienne.	99
Tableau 4.1	Médicaments antagonistes de PLT commercialisés et utilisables pour la maîtrise de la reproduction chez la chienne.	100
Tableau 4.2	Principales classes des récepteurs et des transmetteurs du SNC.	102
Tableau II.1a	Constitution des lots de chiennes à cycle régulier	121
Tableau II.1b	Constitution des lots de chiennes à cycle non régulier	122
Tableau II.2a	Renseignement reproductifs et Constitution des lots de traitement	132
Tableau II.2b	Renseignement reproductifs des deux groupes d'induction	133
Tableau II.3	Résultats du traitement d'induction à la Bromocriptine	134
Tableau II.4	Résultats du traitement d'induction à la Cabergoline	135
Tableau II.5	Comparaison des résultats des traitements d'induction des 16 chiennes à la Bromocriptine et la Cabergoline	136
Tableau II.6	Données construite relatives à la comparaison des deux traitements (Pourcentage et Effectif)	145
Tableau II.7	Données construite relatives à la comparaison des deux traitements (Effectif seulement)	145
Tableau II.8	Tableau des effectifs des intervalles de progestéronémie	150
Tableau II.9	Pourcentages des classes cellulaires en fonction de la progestérone pour les 282 lames étudiées.	151
Tableau II.10	Critères cytologiques et valeurs seuil de progestéronémie.	171
Tableau II.11	Taux d'induction, gestation et natalité relatifs au traitement à la Bromocriptine	159
Tableau II.12	Taux d'induction, gestation et natalité relatifs au traitement à la Cabergoline	161

INTRODUCTION

En Algérie, le chien commence manifestement à revêtir beaucoup d'importance ces dernières années en suscitant un intérêt indéniable. Cette importance va du simple loisir et confort psychologique que représente le chien de compagnie jusqu'à la **valorisation utilitaire** du chien de travail employé dans différents domaines d'activité. La valeur utilitaire du chien peut même atteindre le degré d'**utilité publique** tel le chien de recherche et d'investigation policière et le chien de secours et de décombres [01].

Les techniques d'emploi utilitaire du chien est un domaine qui est de nos jours en pleine expansion et professionnalisation suscitant ainsi un intérêt capital chez les personnes physiques ou morales potentiellement utilisatrices du chien (Armée Nationale Populaire, Direction Générale de Sûreté Nationale, Direction Générale des Douanes, Protection Civile, Sociétés de Gardiennage et d'autres corps constitués).

Il en découle une forte demande en matière de ressource canine qui impose actuellement aux demandeurs d'opter essentiellement pour l'achat du chien à l'étranger. Une enveloppe budgétaire colossale est ainsi injectée dans l'importation.

La situation actuelle de l'élevage canin dans notre pays ne permet pas de répondre à cette demande, car souffrant de multiples problèmes. Pour se limiter à l'aspect scientifique, il y a lieu de dire que pour la plupart des éleveurs canins officiellement inscrits, l'élevage se pratique dans un cadre plutôt amateur que professionnel où l'on note malheureusement l'absence de toute conduite ou maîtrise de la reproduction.

Pour aider scientifiquement à la promotion de l'élevage canin en Algérie, il s'impose de se pencher entre autres sur l'étude des techniques de maîtrise de la reproduction canine qui offrent aujourd'hui des outils efficaces à intégrer dans une bonne conduite d'élevage pour atteindre ainsi une meilleure production canine.

Parmi les techniques de maîtrise du cycle, l'**induction volontaire de l'œstrus** représente un intérêt actuellement indéniable en reproduction canine en

s'intégrant dans une optique de meilleure gestion de l'œstrus ainsi qu'une « planification optimale » de l'élevage canin. Ceci dit que les éleveurs pourront ainsi par le biais des **protocoles d'induction volontaire des chaleurs** atteindre les profits et avantages suivants :

- ✓ Planifier les saillies et par conséquent les naissances selon les convenances de l'éleveur et en fonction de ses contraintes et ses objectifs de production [02].
- ✓ Raccourcir l'intervalle interœstral de la chienne reproductrice et réduire ainsi le cycle de production ce qui traduit un gain en production [03].
- ✓ Luter contre un phénomène naturel observé chez les femelles vivant en groupe à savoir leur tendance à avoir des chaleurs synchronisées. Ce phénomène naturel appelé aussi "effet dortoir" survenant de façon spontanée pose un sérieux problème en élevage canin, car il concentre la production de chiots en une courte période de l'année, et marque le reste de l'année d'une indisponibilité de chiots [04].

Pour en conclure, l'objectif pour les éleveurs serait le déclenchement volontaire des chaleurs dans le but d'une planification optimale de la période de gestation ou de mise bas, l'accroissement du nombre annuel de portées, ou plus simplement, la compensation des conséquences financières d'un cycle non gestant [02].

Même en dehors du cadre de l'élevage canin, la technique d'induction des chaleurs chez la chienne trouve son utilité en clinique et dans divers domaines d'application de la recherche scientifique.

En clinique, l'induction de l'œstrus est conçue comme un moyen thérapeutique qui s'intègre dans le cadre de la prise en charge des cas d'infertilité et d'hypofertilité par œstrus pathologique primaire ou secondaire [02]. Dans ce cas, l'objectif d'induction est de restaurer la fonction de reproduction dès lors qu'un intervalle inter-œstral anormalement prolongé est observé.

Plusieurs domaines de la recherche scientifiques tirent leur bénéfice de l'induction volontaire des chaleurs chez la chienne qui est une femelle mono estrienne à cycle très long pouvant aller jusqu'à douze mois [05] [06]. Cette induction permet donc aux chercheurs de provoquer un cycle chez une femelle au repos au lieu d'attendre son retour en chaleur qui risque de durer longtemps. Les indications de cette technique dans le monde de la recherche sont:

- ✓ Induire volontairement pour l'étude de la cyclicité chez la chienne
- ✓ Induire et raccourcir l'interœstrus pour la recherche génétique [03] [07].
- ✓ Induire et synchroniser pour le transfert d'embryon » [07].
- ✓ Induire pour la préservation des canidés sauvages.

Devant toute cette importance accordée à l'induction de l'œstrus chez la chienne, beaucoup d'études ont été conduites dans le sens de mettre au point des protocoles d'induction. Ainsi, depuis 1939, plus de quarante protocoles hormonaux ont été évalués dans le cadre d'investigations pharmacologiques de l'induction de l'œstrus chez la chienne. Ces protocoles impliquant les œstrogènes, les hormones gonadotropes pituitaires (FSH & LH) et extra-pituitaires (PMSG & hCG) et les agonistes de la GnRH, se sont tous avérés peu satisfaisants [07].

Les protocoles utilisant la PMSG et l'hCG dépassent rarement les 50% de taux de fertilité et 20-30% de taux de gestation [07]. La FSH seule donne des résultats moins satisfaisants, son association au di-éthylstilboestrol (DES) améliore relativement les résultats avec 70% de taux d'induction, 46% d'ovulation mais seulement 20% de gestation [02]. L'administration de GnRH et ses analogues ne peut être utilisée que si le fonctionnement de l'axe hypophyso-ovarien est conservé. Les dispositifs à libération prolongée et les pompes à infusion pulsatile d'un super agoniste de la GnRH ont donné des premiers résultats encourageants mais non répétables donc non validés demeurant ainsi à l'échelle expérimentale et souffrant par ailleurs de plusieurs problèmes techniques de fabrication et de coût de revient [07].

L'utilisation des inhibiteurs de la prolactine à effet dopaminergiques (Agonistes de la dopamine) a ouvert une nouvelle possibilité d'induction de l'œstrus chez la chienne, ces protocoles se fondent sur les propriétés particulières de la prolactine sur le mécanisme de régulation du cycle chez cette espèce [02], [08].

Ainsi, les agonistes dopaminergiques représentent actuellement le meilleur outil pour instaurer un protocole d'induction de l'œstrus chez la chienne sur le plan efficacité, sécurité, simplicité et coût aussi [08], [02]. Beaucoup d'études comparatives dans la littérature évaluent l'efficacité des différents protocoles d'induction chez la chienne par des essais cliniques ou dans des

conditions expérimentales. La *Cabergoline* a été évaluée comparativement à la *Busereline* (Agoniste de la GnRH) par des essais cliniques et s'est avérée pratiquement plus efficace [09]. Cependant, aucune évaluation comparative n'a été faite jusque là entre les deux anti-prolactines agonistes dopaminergiques disponibles qui sont la *Bromocriptine* et la *Cabergoline*.

L'objectif de notre travail est d'évaluer comparativement l'efficacité clinique de deux protocoles de traitement à base de ces deux molécules (*Bromocriptine* versus *Cabergoline*) dans l'induction de l'œstrus chez la chienne domestique en Algérie. Cette évaluation a été faite au vue de plusieurs critères à savoir le taux d'induction, le taux de gestation, le taux de natalité, la taille de la portée (prolificité), la durée du traitement, le raccourcissement de l'intervalle interœstral (raccourcissement de l'anœstrus) et l'effet sur la durée de l'interœstrus du cycle suivant le cycle induit (retour en chaleur après cycle induit).

Vers la fin de cet essai clinique et dans une deuxième approche qui diffère de la première, les données cytologiques (frottis vaginaux) et hormonales (dosages de la progestérone) recueillies à travers la période d'étude ont été exploitées statistiquement en vue d'évaluer un sens de corrélation entre la progestéronémie et les taux cellulaires (taux d'éosinophilie taux de basophilie), puis d'affiner cette corrélation par l'application de certains critères à ces paramètres hormonaux et cellulaires. L'objectif de cette étude statistique était de trouver un ou plusieurs critères cytologiques déterminant un seuil bas de progestéronémie c'est à dire permettant d'affirmer que le taux de progestérone est inférieur à 2ng/ml. Ceci éviterait donc de faire des mesures coûteuses et inutiles de cette hormone en début de pro-œstrus. Cette deuxième approche s'inscrit dans le cadre de la revalorisation de l'examen cytologique vaginal (Frottis vaginal) en début de pro-œstrus par le biais d'un nouveau critère cytologique (Pourcentage de Basophilie).

CHAPITRE 1

RAPPELS ANATOMO-PHYSIOLOGIQUES

1.1. L'anatomie de l'appareil génital de la chienne

A l'exception de l'orifice d'entrée (la vulve), les organes de l'appareil génital femelle sont disposés dans une position pelvi-abdominale. Cet appareil génital se localise en région pelvienne et se prolonge largement dans la cavité abdominale. Il comprend les ovaires, la trompe utérine, l'utérus, le col, le vagin, la vulve et les mamelles [10], [11], [12].

1.1.1. Les ovaires

Les ovaires sont des organes pairs, situés dans la cavité abdominale et dotés, d'une double fonction: la fonction exocrine gamétogénèse (ovogénèse) et la fonction endocrine, hormonogène, qui commande la vie génitale.

La chienne possède deux ovaires de petite taille, mesurant deux centimètre de long ainsi que de large et un centimètre d'épaisseur (2x2 cm et 1 cm respectivement), de forme ellipsoïde et de couleur grisâtre [11].

Ces gonades flottent dans la cavité abdominale, se reportent très en avant pour arriver au niveau des reins. Elles sont bien logées dans une bourse ovarique recouverte d'un tissu adipeux dont l'abondance varie avec la race et l'âge de la femelle, rendant ainsi difficile la visualisation des ovaires lors d'une laparotomie, et imposant des précautions particulières dans la réalisation des nœuds chirurgicaux de ligature lors d'une ovariectomie. La bourse ovarique a une ouverture très étroite qui empêche l'énucléation de l'ovaire [12].

Le *ligament large* qui suspend les ovaires, présente la particularité d'envoyer à leur niveau une duplicature le *ligament rond* - qui rejoint le canal inguinal et s'y prolonge. Cette particularité anatomique de la chienne constitue malheureusement un facteur de risque qui prédispose cette femelle à une éventuelle hernie inguinale de la corne utérine, mortelle en cas de gestation et de non-intervention [10].

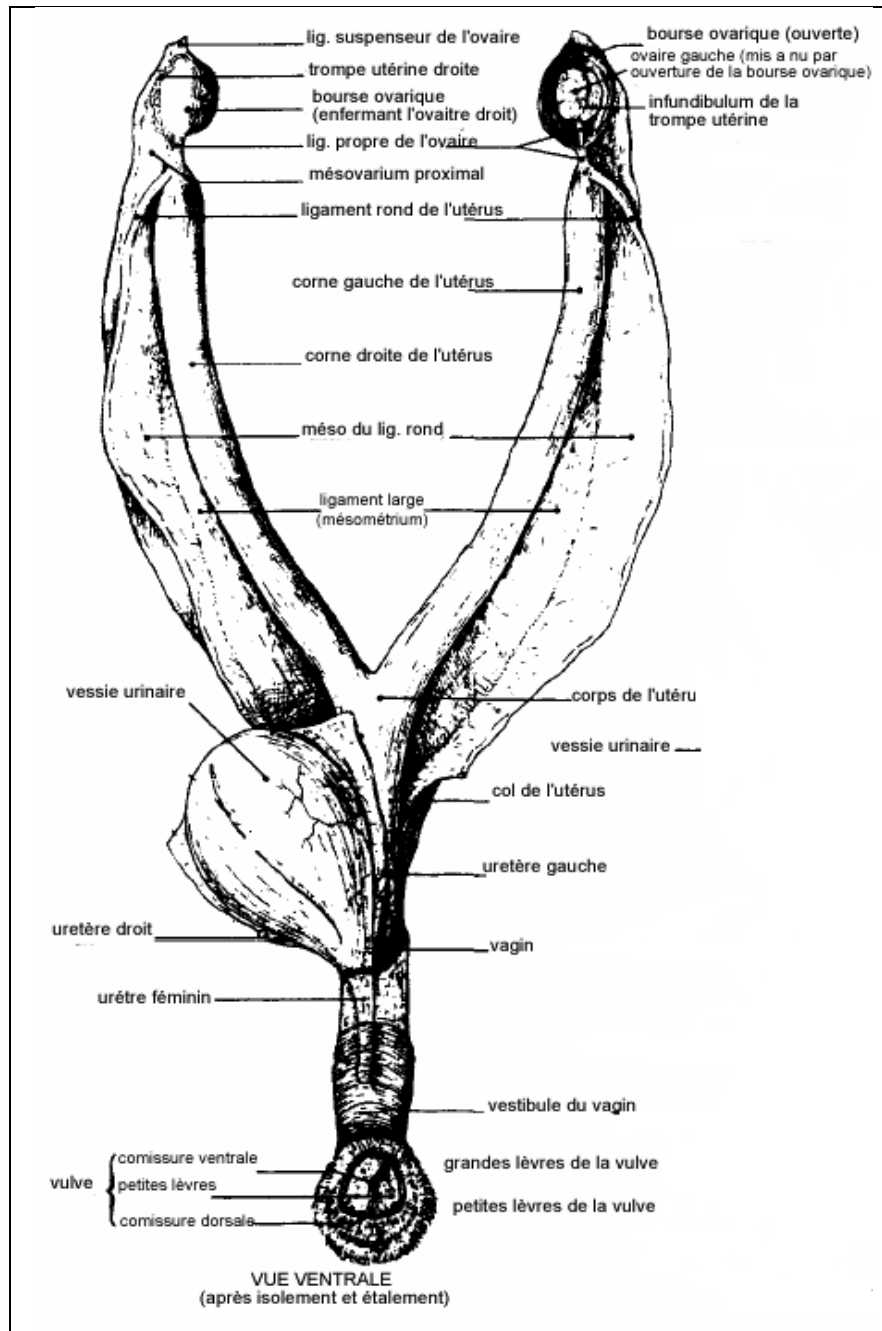


Fig 1.1 : Représentation schématique de l'appareil génital chez la chienne (Conformation extérieure en vue ventrale).

[BARONE R. ; 1978]

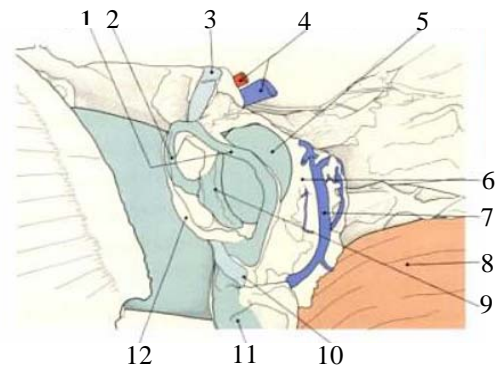


Fig 1.2_a: Vue Latérale Gauche - Ovaire, Bourse Ovarique et Trompe Utérine.
[DONE SH, GOODY PC, EVANS SA, STICKLAND NC.; 1996]

INTERPRETATION:

La paroi de la bourse ovarique (mésosalpinx) a été retirée sauf une petite partie qui relie la portion ascendante de la trompe utérine au ligament propre de l'ovaire. La trompe utérine est ainsi exposée et l'ovaire complètement découvert.

Une partie du mésovarium est laissée intacte, reliée à l'ovaire avec des éléments de la veine ovarique.

LEGENDE:

(1): Trompe utérine: Branche ascendante (2): Branche descendante (3): Ligament suspenseur de l'ovaire (4): A V abdominales craniales (5): Ovaire (6): Mesovarium (7): Veine ovarique (8): Côlon descendant (9): Infundibulum (10): Ligament propre de l'ovaire (11): Corne utérine (12): Mésosalpinx "coupé et replié"

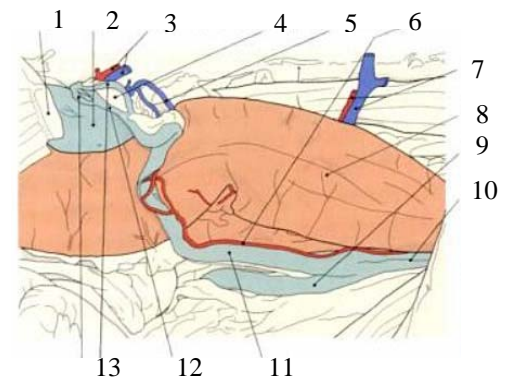


Fig 1.2_b : Vue Latérale Gauche - Ovaire, et Utérus.
[DONE SH, GOODY PC, EVANS SA, STICKLAND NC.; 1996]

INTERPRETATION:

La partie restante du ligament large a été retirée, ainsi apparaissent Ovaire et Trompe Utérine.

La veine ovarique est laissée sur place après retrait du mésovarium. Les deux cornes utérines sont ainsi visibles et le corps utérin apparaît ventralement au colon descendant.

LEGENDE:

(1): 13^{ème} côte (2): Rein (3): A et V abdominales crâniales (4): Ovaire (5): Veine ovarique (6): artère utérine (7): A V circonflexes (8): Côlon descendant (9): Corne utérine droite (10): Corps utérin (11): Corne utérine (12): Infundibulum (13): Trompe utérine: branches ascendante et descendante.

1.1.2. La trompe utérine

Les oviductes, appelés également *trompe utérine*, *trompe de Fallope* et *salpynx*, 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) [10].

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, et
- une portion évasée en forme d'entonnoir, nommée pavillon ou *infundibulum*

L'ampoule représente environ la moitié de la longueur de l'oviducte ; elle est flexueuse et peu rigide à la différence de l'isthme dont la paroi est épaisse, dure et non extensible.

Le pavillon de la chienne est particulièrement étroit, frangé et plissé, s'ouvrant en regard de l'ouverture interne de la bourse ovarique. Sa face externe est lisse et couverte par la séreuse péritonéale tandis que sa face interne est tapissée d'une muqueuse. Il y a donc au niveau de cet orifice une continuité de la séreuse péritonéale avec la muqueuse de la trompe.

La paroi de la trompe utérine comporte une muqueuse, une musculuse et une séreuse. La muqueuse est plissée, principalement au niveau de l'ampoule, et elle comporte un épithélium cylindrique simple, fait de cellules ciliées et non ciliées et repose sur un chorion de tissu conjonctif vascularisé et sans glandes. La musculuse comporte une couche interne circulaire et une couche externe longitudinale, constituées de fibres musculaires lisses.

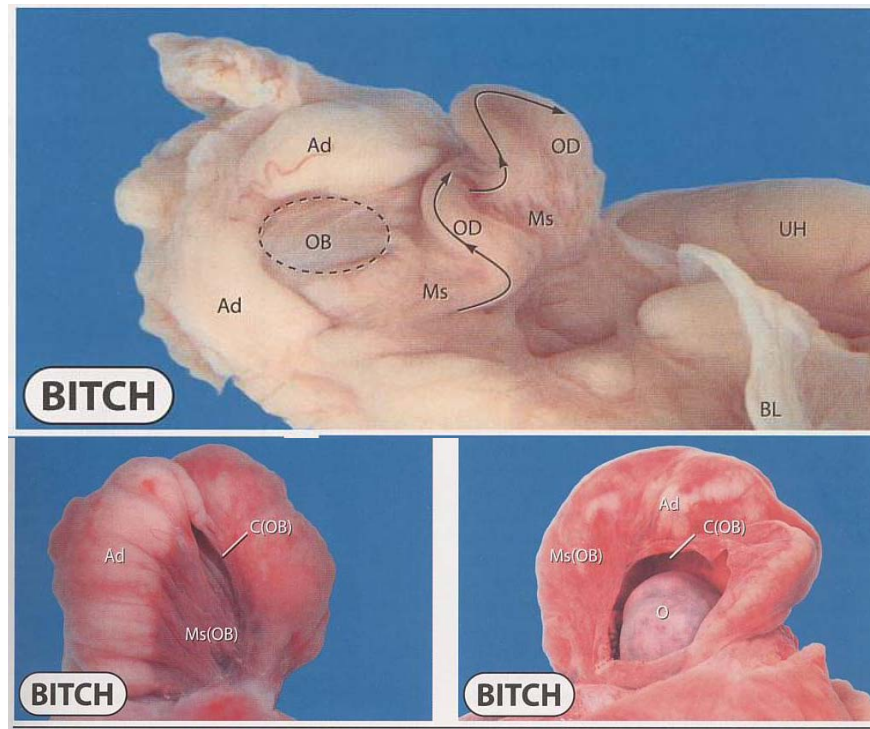


Fig 1.3: Relation du Mésosalpinx et Oviducte chez la chienne.

[SENGER PL.; 2005]

INTERPRETATION:

L'infundibulum est une partie membraneuse de l'oviducte qui est intimement apposée contre l'ovaire.

Les fleches indiquent le sens de progression (deplacement) de l'ovocyte/embryon au sein de l'oviducte vers l'uterus.

LEGENDE:

Ad: Tissu adipeux – **BL:** Ligament large – **C(OB):** Cavité/Bourse Ovarique – **If:** Infundibulum – **Ms:** Mésosalpinx – **Ms(OB):** Mésosalpinx-Bourse Ovarique – **O:** Ovaire – **OB:** Bourse Ovarique – **OD:** Oviducte – **UH:** Corne Utérine.

NB/ L'aspect rougeatre des organes sur les photographies ci-dessus est du à une rétention sanguine. La prise de photo a été effectuée immédiatement après ovariéctomie.

1.1.3. L'utérus (Uteri)

L'utérus est un organe creux où l'ovule fécondé vient se fixer pour donner lieu au développement embryonnaire, c'est l'organe de la gestation.

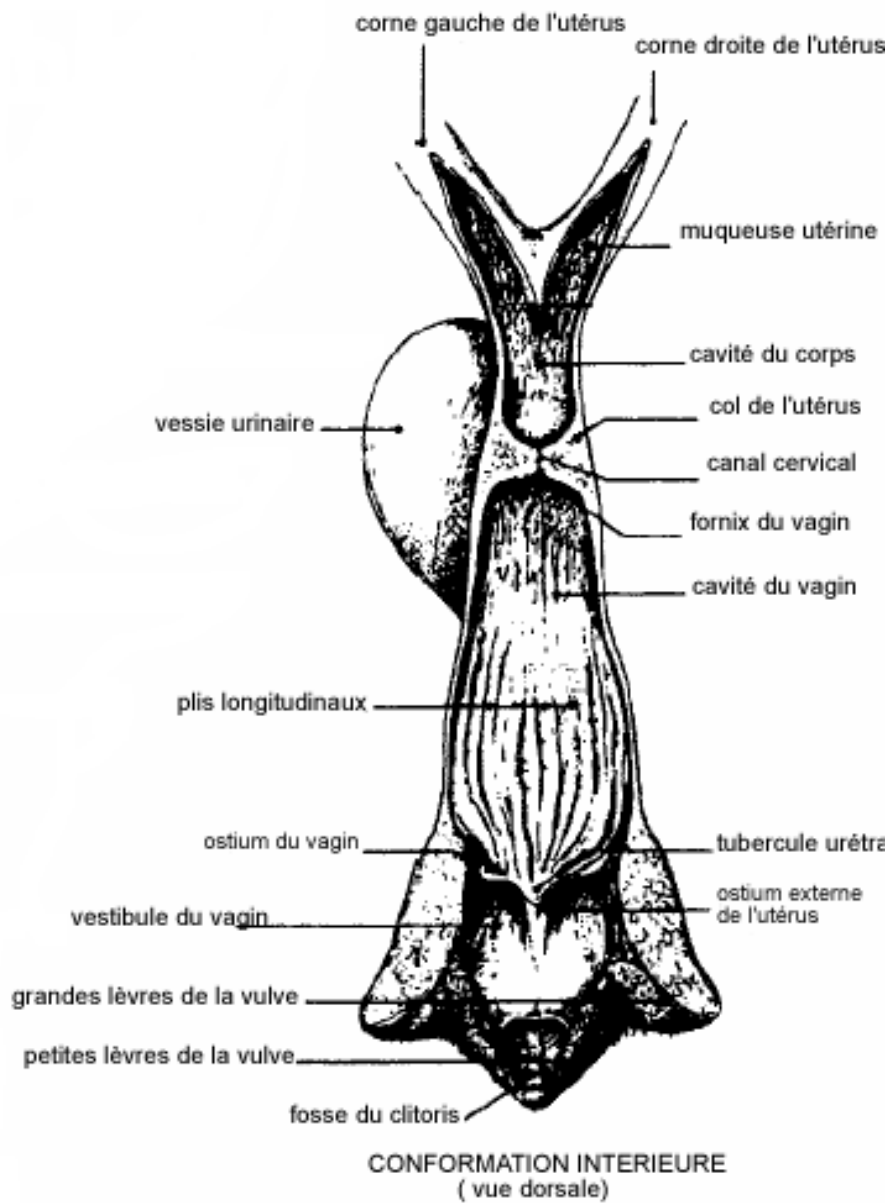


Fig 1.4 : Représentation schématique de l'appareil génital chez la chienne (Conformation intérieure en vue dorsale).
[BARONE R; 1978]

Comme chez toutes les espèces domestiques, l'utérus de la chienne comporte deux cornes utérines, un corps et un col, représentant une barrière entre l'utérus et le vagin.



LEGENDES: ANGLAIS (FRANÇAIS)

Ad: Adipose tissue (Tissu adipeux) - **BL:** Broad Ligament (Mésometrium) - **CF:** Clitoral Fossa (Fosse clitoridienne) - **CV:** Cranial Vagina (Vagin cranial) - **Cx :** Cervix - **EUB:** External Uterine Bifurcation (Bifurcation Utérine Externe) - **L:** Labia (Levre) - **O:** Ovary (Ovaire) - **PS:** Placental Scars (Cicatrices Placentaires) - **UB:** Urinary Bladder (Véssie Urinaire) - **UtB:** Uterine Body (Corps Utérin) - **UH:** Uterine Horn (Corne Utérine) - **UT:** Urethral Tubercle (Tubercule Urethral) - **UO:** Urethral Orifice (Orifice Urethral) - **Ve:** Vestibule (Vestibule) - **Vu:** Vulva (Vulve).

Fig 1.5: Vue Dorsale du Tractus Génital chez la chienne (Avant et Après excision).
[SENGER PL.; 2005]

1.1.3.1. Les cornes utérines

Les cornes utérines sont la partie la plus développée de l'utérus de la chienne, donnant une forme de "V" à cet organe. Elles sont longues et grêles, mesurant chacune dix à quinze centimètre (10 à 15cm) de long pour un peu moins d'un centimètre de large, de calibre uniforme sur toute leur longueur et effilées à leurs extrémités antérieures. Le ligament large présente une duplication séreuse, *le ligament rond*, qui se prolonge à travers l'anneau inguinal et le canal inguinal jusqu'à la partie inférieure de la région périnéale.

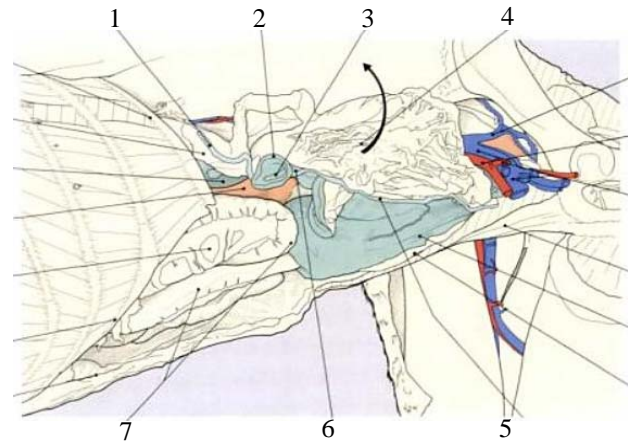


Fig 1.6: Vue Latérale Gauche de la Corne Utérine et du Ligament large.
[DONE SH, GOODY PC, EVANS SA, STICKLAND NC.; 1996]

INTERPRETATION:

La paroi abdominale du côté gauche a été retirée exposant ainsi le contenu abdominal sur une vue latérale gauche.

Le ligament large (mésométrium) infiltré de graisse a été réfléchi dorsalement pour exposer l'ovaire dans sa bourse et faire apparaître le ligament rond de l'utérus au bord de son propre pli du mésométrium.

LEGENDE:

(1): Ligament suspenseur de l'ovaire (2): Trompe utérine (3): Ovaire dans sa bourse (4): Ligament large infiltré de graisse (5): Ligament rond de l'utérus (6): Ligament propre de l'ovaire (7): Jejunum

1.1.3.2. Le corps utérin

Le corps de l'utérus est beaucoup plus petit par rapport aux cornes, il est étroit et très court mesurant de trois à quatre centimètre de long (3 à 4 cm). Il est avec les cornes étiré suivant l'axe longitudinal de l'organisme. Il relie entre elles les deux cornes en avant et le col de l'utérus en arrière. Il a un rôle principalement au moment de la mise bas, il est marqué extérieurement par un rétrécissement, est traversé par un canal cervical étroit et rectiligne.

L'aspect histologique de l'utérus revêt une importance indéniable et mérite d'être décrit assez succinctement. Tout au long des cornes et du corps de l'utérus, la paroi de cet organe se constitue, de l'intérieur vers l'extérieur, de trois différentes couches qui sont : une muqueuse appelée *endomètre*, une musculuse nommée *myomètre* et finalement une *séreuse*.

L'endomètre se constitue d'un épithélium cylindrique simple, fait de cellules ciliées et cellules sécrétrices, ainsi que d'un chorion de tissu conjonctif riche en *glandes endométriales*. Il s'agit de glandes tubulaires plus ou moins ramifiées et plus ou moins nombreuses qui s'enfoncent dans le stroma conjonctif. Leur fonctionnement est indispensable pendant la gestation, mais elles peuvent être le siège de troubles sérieux (hyperplasie glandulo-kystique) lorsqu'elles sécrètent en excès.

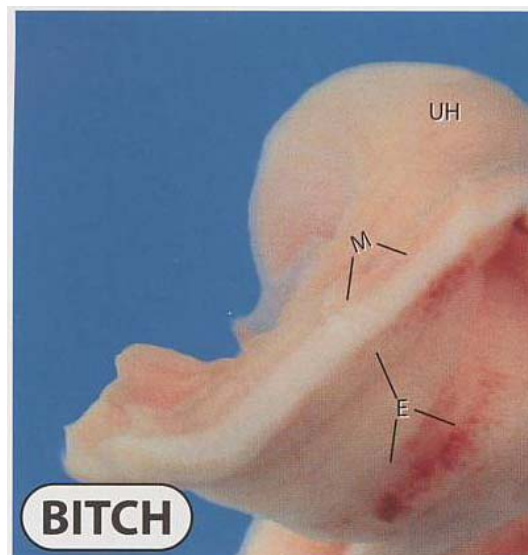


Fig 1.7: Le tissu utérin excisé chez la chienne.
[SENGER PL.; 2005]

INTERPRETATION:

L'utérus a été incisé pour permettre la visualisation de la surface endométriale.

LEGENDE:

E: Endométrium – M: Myomètre – PS: Cicatrices Placentaires – UH: Corne Utérine.

Le myomètre entoure l'endomètre, son rôle essentiel est de permettre l'expulsion des chiots au moment de la mise bas grâce à des contractions rythmiques et coordonnées. Elle se constitue d'une couche circulaire interne, une couche longitudinale externe de fibres musculaires lisses et d'une couche moyenne, vasculo-nerveuse et élastique.

La séreuse est une membrane qui enveloppe l'utérus ainsi que la portion antérieure du vagin. Elle est l'expansion des *ligaments larges* suspendant l'utérus. Elle parcourt le vagin antérieur puis se fléchit en haut sur le rectum pour donner le *cul de sac recto-utérin* et en bas, sur la vessie pour donner le *cul de sac recto-vésical*.

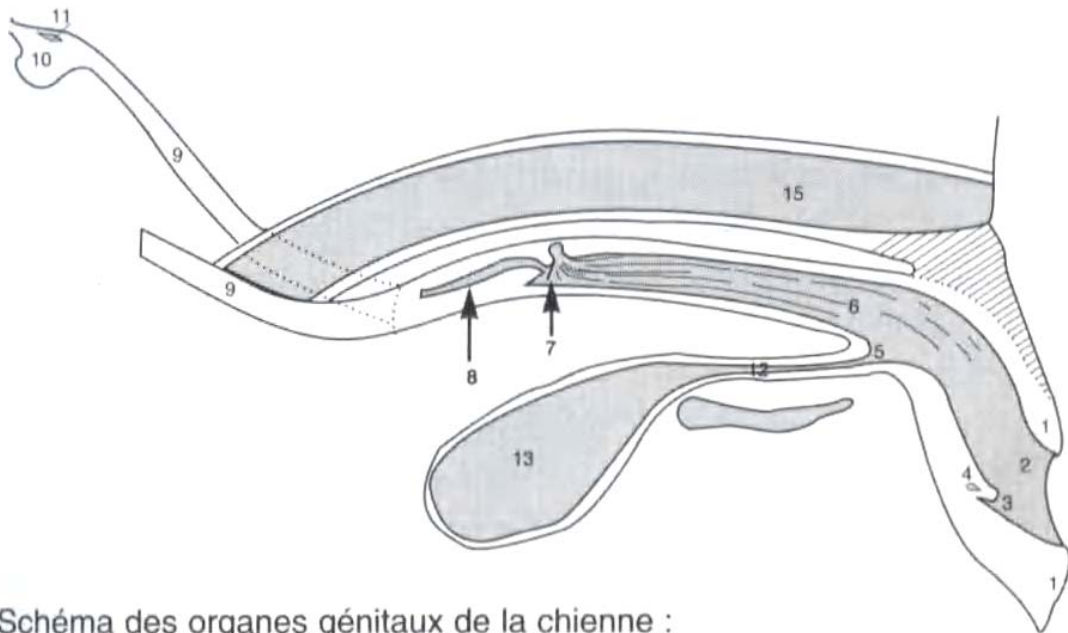


Schéma des organes génitaux de la chienne :

Fig 1.8: Représentation schématique de l'appareil génital femelle chez la chienne (Conformation intérieure en vue latérale « Coupe sagittale »)

Légende :

(1) commissure de la vulve ; (2) vestibule ; (3) fosse clitoridienne ; (4) clitoris ; (5) méat urinaire
(6) vagin ; (7) col de l'utérus; (8) corps de l'utérus; (9) cornes utérines ; (10) ovaire dans la bourse; (11) ouverture de la bourse; (12) urètre; (13) vessie; (14) symphyse pubienne; (15) rectum

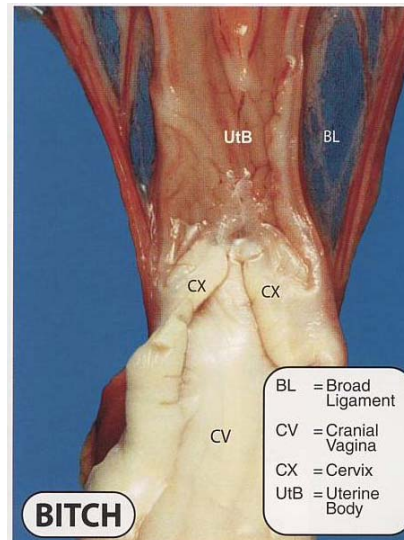
[(FONTBONNE A ; 1996)]

1.1.3.3. Le col utérin

Le col utérin est un cylindre très court, d'environ deux centimètre (2 cm) de long, séparant le vagin et le corps utérin. Il a une consistance caoutchouteuse, tout en restant ferme et épais grâce à la forte musculature lisse circulaire présente dans sa paroi [16].

Le col est percé d'un canal rectiligne de faible diamètre dit « canal cervical » disposé en position oblique d'avant en arrière et du haut vers le bas.

Ceci rend très difficile le cathétérisme cervical avec un instrument introduit par le vagin [17]. Cette difficulté relative à la particularité anatomique du col chez la chienne, a été heureusement surmontée par la mise au point de nouvelles techniques [12].



LEGENDE:

BL: Ligament Large – CV: Vagin Crânial – CX: Cervix (Col Utérin) – UtB: Corps Utérin.

Fig 1.9: Le Col Utérin (Cervix) excisé chez la chienne.
[SENGER PL.; 2005]

1.1.4. Le vagin

Le vagin est un conduit musculo-membraneux, cylindroïde, qui s'étend du col de l'utérus à la vulve ou sinus uro-génital. Il est en rapport en haut avec le rectum, en bas avec la vessie et le canal de l'urètre et latéralement avec les coxaux.

Le vagin représente, avec la vulve, l'organe copulateur de la femelle qui reçoit l'organe mâle en érection pendant le coït et livre également passage au fœtus au moment de la mise-bas. De ce fait, il est très profond chez la chienne, mesurant de douze à quinze centimètres (12 – 15 cm), et sa paroi dispose à son extrémité postérieure d'un sphincter qui se resserre très fortement en arrière du pénis permettant ainsi le maintien de l'érection plus longtemps et le déclenchement de fortes contractions vaginales pour favoriser la remontée des spermatozoïdes à travers le col.

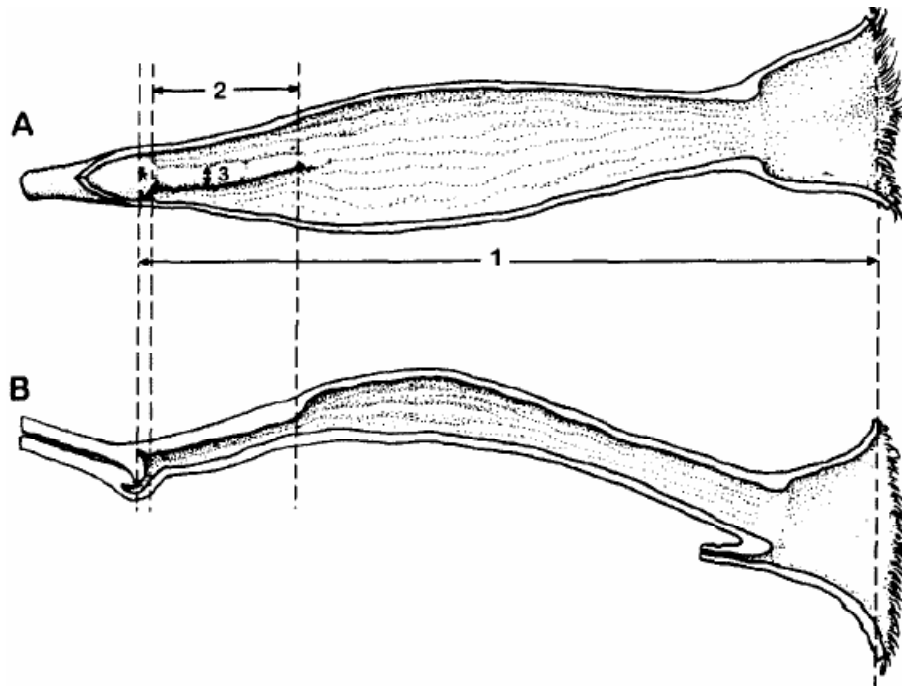


Fig 1.10: Représentation schématique du col et du vagin chez la chienne (**A** : Conformation intérieure en vue dorsale, **B** : Conformation intérieure en vue latérale « *Coupe sagittale* »)
Légendes : (1) : longueur du vagin et de la vulve; (2) : longueur du pli moyen dorsal ; (3) : Largeur du pli moyen dorsal.

[PINEDA et al; 1973]

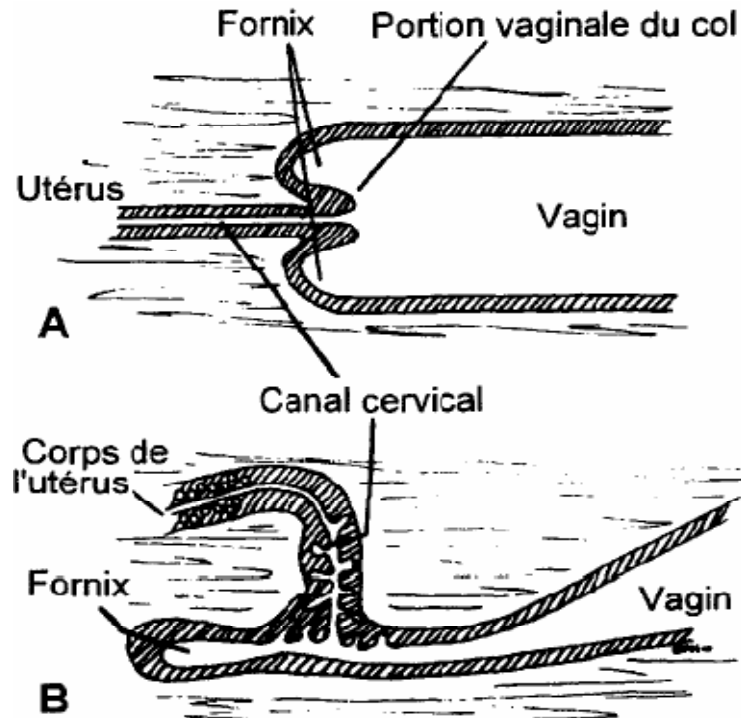


Fig. 1.11: Représentation schématique d'une coupe longitudinale médiane du canal cervical (**A** : Chez de nombreuses espèces ; **B** : chez la chienne).

[FELDMAN et NELSON 1996].

Le vagin offre chez la chienne une orientation particulière consistant dans le fait que sa portion terminale (du côté de la vulve) est pratiquement verticale sur le tiers environ de sa longueur. Puis il fait une sorte de coude pour devenir horizontal sur ses deux tiers antérieurs. La conséquence de cette particularité est que pour l'introduction d'un instrument (écouvillon vaginal ou sonde d'insémination) il faut d'abord rentrer celui-ci verticalement puis après un certain temps le faire basculer en position horizontale.

Au même titre que la particularité d'orientation du vagin, il est aussi important de noter l'existence sur son plancher (près de la vulve) d'orifice urinaire dit « *méat urinaire* » et également d'une poche plus ou moins profonde suivant les chiennes qui loge le clitoris appelée « *fosse clitoridienne* ». Ces éléments d'anatomie sont importants à prendre en compte lorsque l'on veut introduire un objet dans le vagin. En effet, si l'opérateur fait rentrer cet objet trop horizontalement, il bute fréquemment dans la fosse clitoridienne, et l'objet ne peut plus progresser. Plus rarement, il risque, lorsque l'instrument introduit est fin, de pénétrer dans le méat urinaire et donc dans la vessie au lieu de suivre le vagin.

Aspect histologique du vagin

La paroi vaginale se compose histologiquement de trois couches, à savoir

- Une muqueuse : composée d'un épithélium pavimenteux stratifié qui se kératinise et se desquame au cours du cycle ; et d'un chorion de tissu conjonctif dépourvu de glandes.
- Une musculuse: composée de fibres musculaires lisses circulaires et longitudinales jointes à un tissu conjonctif et des fibres élastiques.
- Un adventice : Constitué d'un tissu conjonctif dense joint à des fibres élastiques.

Le phénomène de kératinisation concernant l'épithélium de la muqueuse vaginale est le reflet du profil ostrogénique sérique, à telle enseigne qu'un examen cytologique vaginal (ECV) pratiqué par le biais de frottis vaginaux (dans le cadre d'un suivi du cycle), renseigne assez bien sur le moment du cycle sexuel et l'état hormonal de l'animal.

1.1.5. La vulve

La vulve de la chienne est un canal membraneux de forme triangulaire disposée en position caudo-ventrale par rapport à l'arcade ischiale. Il s'agit d'une partie commune des deux appareils urinaire et génital les faisant communiquer avec l'extérieur.

La vulve petite de taille lors de la période de repos sexuel devient turgescence et volumineuse pendant les chaleurs. Chez certaines chiennes, particulièrement les femelles reproductrices qui ont déjà fait plusieurs cycles gestants, la vulve reste volumineuse tout au long de l'année mais reste molle en dehors des chaleurs.

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 [16].

La vulve proprement dite se compose des lèvres vulvaires (*pudendal labia*) d'une fente vulvaire (*Rima pudenda*) et d'un clitoris.

Les deux lèvres vulvaires, (droite et gauche), sont plus ou moins épaisses. Elles sont constituées de tissu conjonctif et adipeux, d'un muscle lisse et d'un muscle strié constricteur de la vulve (*Constrictor vulvae*) et recouvertes d'une peau riche en glandes sébacées. Les deux lignes de fusion de ces lèvres vulvaires sont représentées par les deux commissures labiales, ventrale et dorsale. La commissure dorsale (supérieure) est séparée de l'anus par le périnée et la commissure ventrale (inférieure) loge le clitoris.

Le clitoris est organe sensitif et érectile qui représente le pénis du mâle et comporte une partie fixe et une partie libre. La partie fixe est attachée sur l'arcade ischiale par le biais de deux racines « piliers » constituées chacune d'un noyau de tissu érectile enroulé de tissu fibreux et recouvert ventralement d'un petit muscle ischiocaverneux. La partie libre du clitoris est étroitement encapuchonnée dans une petite cavité muqueuse au niveau de la commissure inférieure.

La fosse clitoridienne est une extension caudale du clitoris, localisée à la commissure labiale ventrale et visible à l'écartement de la fente vulvaire.

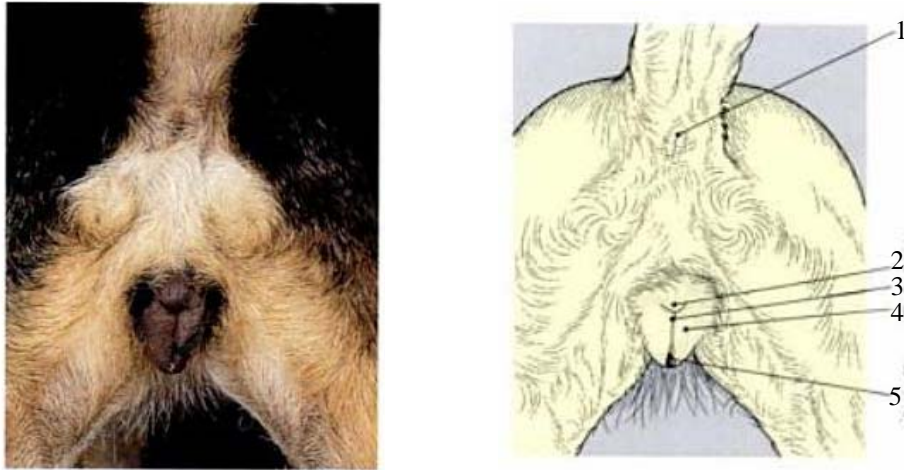


Fig 1.12_a: Régions topographiques du Pelvis et des organes génitaux externes. (Vue caudale de la région périnéale d'une chienne en oestrus)
[DONE SH, GOODY PC, EVANS SA, STICKLAND NC.; 1996]

LEGENDE:

(1):Anus (2): Vulve : Commissure dorsale (3):Rima pudendi (4) Levre (œdème vulvaire) (5): Ecoulement sanguinolent dans la commissure labiale ventrale.

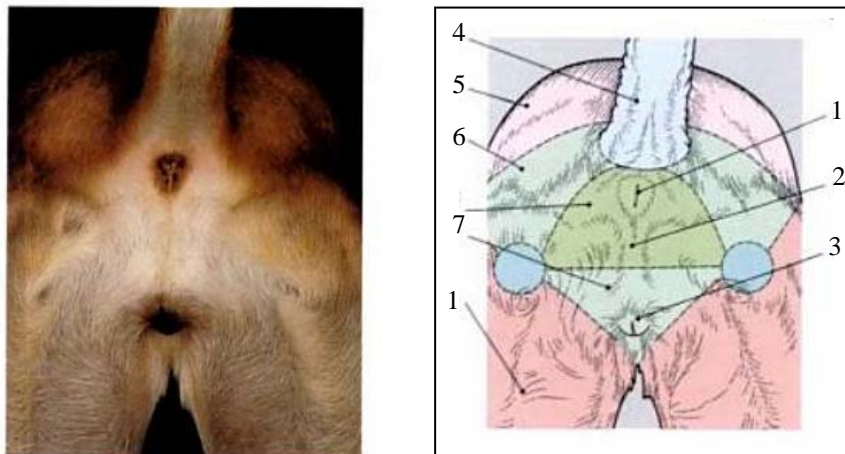


Fig 1.12_b : Régions topographiques du Pelvis et des organes génitaux externes. (Vue caudale de la région périnéale d'une chienne au repos sexuel)

[DONE SH, GOODY PC, EVANS SA, STICKLAND NC.; 1996]

LEGENDE:

(1):Anus (2): Vestibule (3):Vulve (4) Région caudale (5): Région glutéale (6):Fosse ischio-rectale (7):Région périnéale: Région anale et Région urogénitale (8):Région fémorale.

Dans la vulve débouche le canal de l'urètre. Ce dernier est coiffé d'une valvule implantée sur la paroi postérieure du canal et à bord libre dirigé en haut et en arrière que l'on doit éviter lors du cathétérisme de la vessie.

Le vestibule est une chambre urogénitale commune, s'étendant de la fente vulvaire au vagin. Il se constitue des éléments suivants :

- une paroi vestibulaire constituée d'un muscle strié constricteur du vestibule dit (*Constrictor vestibuli*) ;
- des glandes vestibulaires mineures ;
- et des bulbes vestibulaires bilatéraux reliés par un isthme ventral. Ces bulbes sont des masses de tissu érectile qui représentent les bulbes érectiles du pénis chez le mâle.

Les muscles constricteur du vestibule (*Constrictor vestibuli*) et constricteur de la vulve (*Constrictor vulvae*) sont deux muscles striés qui encerclent bien le vestibule et la vulve et assurent pendant la copulation, la constriction des veines péniennes renforçant ainsi l'érection de l'organe mâle. Ces structures érectiles et musculaires agissent en sphincter de la partie terminale du canal génital.

1.1.6. 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 [19].

1.2. Rappels et particularités de la cyclicité chez la chienne

La chienne se range parmi les femelles à fonctionnement sexuel intermittent. La plupart des races canines manifestent des chaleurs deux fois l'an et chacune de ces deux périodes ne comprend qu'un seul cycle sexuel, la chienne est de ce fait dite **mono-œstrienne**.

La maturité sexuelle varie considérablement suivant les races et à l'intérieur d'une race suivant les individus et les méthodes d'entretien ; elle se situe normalement entre six (06) et douze (12) mois et plus généralement deux (02) à trois (03) mois après que l'animal ait atteint l'âge adulte. Comme les petites races atteignent ce poids plus rapidement que les grandes races, leur puberté est plus précoce [10].

Le cycle sexuel ou œstral de la chienne se divise comme toute femelle mammifère en quatre phases correspondant aux différentes phases d'activité de l'ovaire (Heape W ; 1900) à savoir le *pro-œstrus*, l'*œstrus*, le *métoœstrus* et le *di-œstrus*. Ces deux dernières phases sont souvent confondues chez la chienne sous le même nom de ***métoœstrus***. La période anœstrale ou l'*anœstrus* correspond au repos de l'appareil génital, elle est particulièrement longue chez la chienne et s'étend depuis la récession du corps jaune jusqu'à l'apparition du cycle suivant.

La chienne se différencie surtout des autres femelles domestiques par le fait que les diverses phases de son cycle œstral sont de beaucoup plus longue durée, que le cycle peut être coupé par une période de gestation ou de pseudo-gestation de deux mois et qu'il ne paraît pas intervenir de facteur lutéolytique pour mettre fin à l'activité du corps jaune quand il n'y a pas de fécondation.

Ces diverses périodes du cycle sexuel sont concomitantes des variations hormonales plasmatiques hypophyso-ovariennes dont le déroulement est superposable à celui observé dans les autres espèces : teneur élevée des œstrogènes lors du pro-œstrus et de l'œstrus, suivie des pics de FSH et de LH de plus longue durée que dans les autres espèces et finalement de l'élévation du taux progestéronique déjà au cours de la phase œstrale puis au cours de la phase lutéale. Cependant, un fait remarquable est à souligner chez la chienne, la production de progestérone par le follicule commence déjà au cours de la phase œstrale, il semble en effet que des cellules folliculaires commencent à se lutéiniser bien avant que les follicules ne se soient rompus. Il s'agit du phénomène de ***lutéinisation pré-ovulatoire***.

A ce climat hormonal correspondent diverses modifications morphologiques et histologiques des organes génitaux dont certaines peuvent être mises à profit pour préciser l'état fonctionnel de l'appareil génital et sa période (Cf § 2.2.3). Tous ces aspects et ces modifications cités succinctement ci-haut, seront étudiés de manière plus élaborée dans le prochain chapitre de cette revue de la littérature.

CHAPITRE 2

ETUDE ET SUIVI DU CYCLE ŒSTRAL

2.1. Introduction

Chez la chienne comme chez tous les mammifères, l'appareil génital femelle présente, au cours et pendant toute la période d'activité génitale des modifications morphologiques et physiologiques se produisant toujours dans le même ordre et revenant à intervalles périodiques suivant un rythme bien défini [10].

Ainsi, chez la chienne pubère, les follicules ovariens préformés à la naissance, croissent, subissent une maturation et se rompent périodiquement pour être remplacés par le corps jaune, organe à sécrétion interne. Entre la maturation folliculaire et la phase lutéale se situe l'ovulation qui est de type spontané chez la chienne.

Ces modifications décrites très brièvement ci-haut sont connues sous le nom de *cycle œstral* ou *estrien* et commencent de la puberté pour se poursuivre tout au long de la vie génitale.

Dans ce grand chapitre, nous allons d'abord étudier, d'une manière assez élaborée, les différentes modifications du cycle œstral puis les différentes méthodes de suivi des chaleurs à commencer par celles qui se basent conventionnellement sur des critères subjectifs et parfois erronés jusqu'à arriver aux méthodes fondées sur les marqueurs objectifs du cycle.

2.2. Etude du cycle œstral

2.2.1. Classification du cycle œstral

Dés 1900, le Professeur en médecine **W. HEAPE** de l'Université de Cambridge décrit le cycle œstral chez les femelles mammifères et le divisa en quatre périodes à savoir le *pro-œstrus*, l'*œstrus*, le *métœstrus* et le *di-œstrus* [20]. Cette subdivision devint depuis une coutume en physiologie comparée, et est parfois désignée sous le nom de classification de *HEAPE*.

HEAPE avait défini le *di-œstrus* d'autres espèces animales comme étant la phase du cycle œstral qui est immédiatement suivie par le *pro-œstrus*. D'après cette définition, le *di-œstrus* ne se manifeste pas chez la chienne dont la phase lutéale était suivie de l'*anœstrus* et non du *pro-œstrus* [20].

Ainsi, chez la chienne, il est de coutume dans la littérature, de confondre le *métoœstrus* et le *di-œstrus* en une seule phase du cycle pour ne parler que de ***métoœstrus***. Cependant, il est dans la littérature, des auteurs qui dénomment cette période lutéale du cycle chez la chienne : ***di-œstrus*** [22].

L'*anœstrus* étant une période de repos sexuel qui s'étend depuis la récession du corps jaune jusqu'au cycle prochain.

Selon l'ancienne classification, le cycle œstral de la chienne se subdivise donc en quatre phases à savoir ***pro-œstrus***, ***œstrus***, ***métoœstrus (di-œstrus)*** et ***anœstrus***; pour la suite de notre travail, nous adopterons cette classification.

Cependant, un nouveau système de classification du cycle œstral a été introduit qui est dit beaucoup plus approprié que l'ancien système car ayant pour critère la fonction ovarienne contrairement au premier basé beaucoup plus sur un critère de comportement [06].

Cette nouvelle classification divise le cycle en quatre phases à savoir : ***phase folliculaire***, ***phase de lutéinisation pré-ovulatoire et ovulation***, ***phase lutéale*** et finalement ***phase anœstrale*** [06].

2.2.2. Description des différentes phases du cycle œstral

2.2.2.1. Prœstrus

Période de maturation folliculaire (phase folliculinique), sa durée moyenne chez la chienne est de 09 jours. Les intervalles de variation de cette durée rapportés dans la littérature sont divers selon les auteurs, les plus récentes publications de synthèse rapportent un intervalle de 3 à 17 jours [23], [22], [06] et de 4 à 14 jours [10].

2.2.2.2. Œstrus

Période de maturité folliculaire suivie de l'ovulation. Sa durée moyenne chez la chienne est également de 09 jours. Elle varie de 3 à 21 jours [23], [22], [05], [06] et [24].

L'ensemble des deux premières phases (**pro-œstrus + œstrus**) définit la période communément appelée **période de chaleurs**. Sa durée est d'environ 18 à 21 jours, bien que les durées du pro-œstrus et de l'œstrus varient généralement en sens inverse de sorte que si l'un est court l'autre est allongé [10].

2.2.2.3. Métœstrus (Di-œstrus)

Phase lutéale du cycle, correspondant à la formation et au fonctionnement du corps jaune. La durée moyenne de cette phase est environ 70 jours [05], [06] et de 60 jours que la chienne soit ou pas gestante [23]. En dehors du cas de gestation, le métœstrus peut varier de 50 à 80 jours [10].

2.2.2.4. Anœstrus

Période de repos sexuel qui s'étend depuis la récession du corps jaune jusqu'au cycle prochain. Cette phase est particulièrement longue chez la chienne, elle varie de 90 à 150 jours, soit de 3 à 5 mois [23] et de 2 à 5 mois avec en moyenne 3 mois [10] et de 2 à 6 mois sans aucune conséquence sur la fertilité [12]. Cet intervalle peut aller de 2 à 10 mois avec une moyenne de 5 mois [05].

L'ensemble des deux dernières phases (**métœstrus + anœstrus**) définit une période communément appelée **interœstrus (intervalle interœstral)**.

L'*interœstrus* a une durée allant de 150 à 210 jours, soit de 5 à 7 mois [23]. Une moyenne de 7 mois pour un intervalle de variation allant de 4 à 12 mois a été rapportée par BUTINAR J. MUJAGIC E, GALAC S. [06], et de 3 à 12 mois par FONTBONNE A [12].

Si la durée de l'*interœstrus* admet une grande variabilité physiologique tenant à divers facteur d'influence dans l'espèce canine, sa régularité individuelle n'en admet pas autant. Un *interœstrus* très variable d'un cycle à un autre chez la même femelle traduit souvent un trouble de reproduction [12].

Canine Estrous “Cycle”

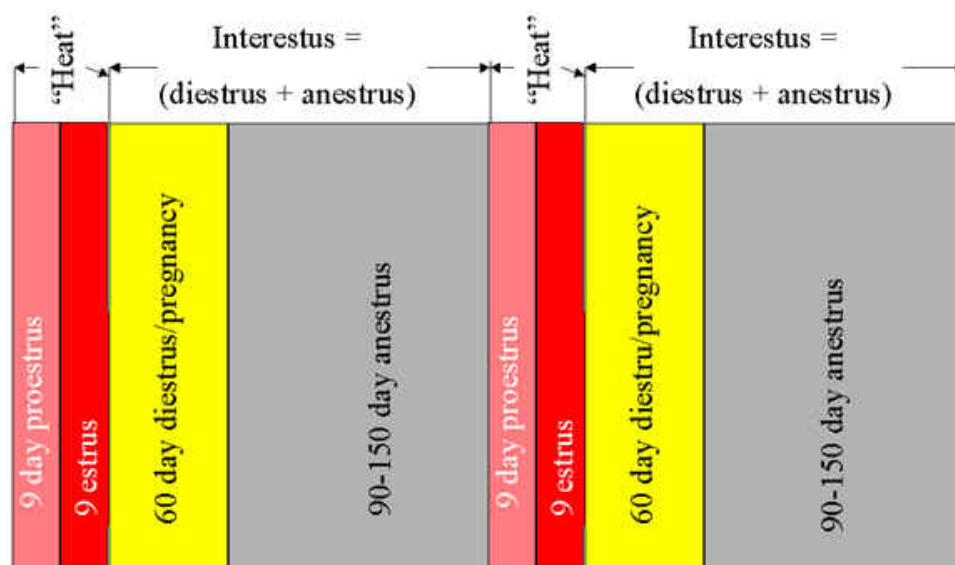


Fig 2.1 : Représentation schématique des quatre phases du cycle œstral chez la chienne (Pro-œstrus, œstrus, metoestrus (dioestrus) et anœstrus). [EILTS BE; 2007a]

2.2.3. Modifications observées au cours du cycle

Dans notre revue de la littérature relative à l'étude du cycle œstral chez la chienne, nous avons opté pour l'approche qui divise les phénomènes observés au cours du cycle en quatre catégories en l'occurrence, les modifications comportementales, cliniques, histo-physiologiques et finalement hormonales. Chaque catégorie de phénomènes sera étudiée à travers les quatre phases du cycle suivant la classification de W. HEAPE.

2.2.3.1. Modifications comportementales

2.2.3.1.1. Proœstrus

Pendant cette première phase du cycle œstral, le comportement sexuel est caractérisé par l'**attrait** et le **refus** du mâle. La chienne attire les mâles grâce aux phéromones secrétés dans ses urines et ses sécrétions utéro-vaginales sous l'effet des œstrogènes qui dominent le climat hormonal de cette phase du cycle. Cependant, en dépit de cet attrait actif, le comportement de la chienne demeure marqué par un refus de l'accouplement, elle manifeste même de l'hostilité à l'égard des mâles qui la poursuivent [10].

2.2.3.1.2. Œstrus

Pendant la phase d'œstrus, le comportement sexuel est caractérisé par l'**attrait** et l'**acceptation** du mâle. La chienne s'approche du mâle, dévie latéralement la queue et lui présente la région vulvaire. Elle accepte le coït en s'immobilisant pendant la saillie [10]. Ce changement de comportement en faveur d'une acceptation de l'accouplement est le reflet d'un changement du profil hormonal en faveur d'une chute des œstrogènes et une montée de la progestérone.

2.2.3.1.3. Métœstrus

Le métœstrus comportemental, débute le jour où la chienne cesse subitement d'accepter le mâle après l'œstrus. Certaines femelles peuvent demeurer réceptives aux mâles pendant le début du métœstrus [22].

En plus de ce refus, la femelle peut manifester un excès d'agressivité, mais elle revient généralement peu à peu à son calme [12].

2.2.3.1.4. Anœstrus

Pendant l'*anœstrus*, la chienne ne manifeste plus de comportement sexuel. Elle ne montre ni suscite aucun intérêt sexuel à l'égard du mâle. Elle retrouve son comportement de nature sociale loin de l'influence des hormones sexuelles [22].

2.2.3.2. Modifications cliniques

2.2.3.2.1. Proœstrus

Les signes cliniques du proœstrus sont dominés par une tuméfaction œdémateuse de la vulve et du périnée « **œdème vulvaire** » qui va en s'intensifiant jusqu'à l'œstrus. A ce signe s'ajoute des émissions de sang à la commissure inférieure de la vulve provenant de la diapédèse des érythrocytes à travers les vaisseaux utérins sous l'effet des œstrogènes « **écoulement vulvaire séro-sanguinolent** ». Le vagin est fortement congestionné et montre à l'inspection de profonds replis [10].

En plus de ces signes majeurs, la chienne perd de son appétit, devient inquiète, excitable et facilement désobéissante. Elle boit d'avantage et urine fréquemment.

2.2.3.2.2. Œstrus

Pendant l'œstrus, l'œdème vulvaire atteint son maximum, la muqueuse vaginale devient rose pâle et ses replis s'affaissent.

L'écoulement sanguin diminue puis cesse, il sera remplacé par un écoulement peu abondant, jaunâtre et un peu muqueux. Toutefois, chez certaines chiennes ou dans certaines races principalement, l'écoulement de sang se prolonge tout au long des chaleurs « pro-œstrus et œstrus » [12].

L'attouchement de la région périnéale provoque l'extension du rachis, la déviation de la queue vers le côté opposé au stimulus et l'ouverture des lèvres vulvaires. On dit que le « **reflexe d'Amantéa** » ou le signe d'Amantéa est positif. La chienne adopte également une attitude réflexe dite de Lordose « **attitude de lordose** » qui lui permet de se maintenir pendant le chevauchement [22].

2.2.3.2.3. Métœstrus

Pendant le métœstrus, l'œdème vulvaire disparaît et la muqueuse vaginale reprend son aspect lisse et sa coloration pâle. Les écoulements vulvaires sont en général taris, cependant, certaines chiennes, peuvent présenter après les chaleurs et pendant quatre à cinq jours, une réapparition de pertes sanguines à la vulve. Celles-ci sont en général foncées et plus ou moins glaireuses, filantes et nauséabondes. Elles correspondent à la période de menstruation chez les Primates.

2.2.3.2.4. Anœstrus

Pendant cette période de repos, l'appareil génital externe de la chienne ne montre aucun signe cliniquement décelable. La vulve redevient petite et peu dilatée et les mamelles retrouvent leurs dimensions initiales.

2.2.3.3. Modifications histo-physiologiques

Les modifications histo-physiologiques pendant les différentes phases du cycle concerneront dans cet ordre les ovaires, l'oviducte, l'utérus, l'épithélium vaginal et finalement les mamelles.

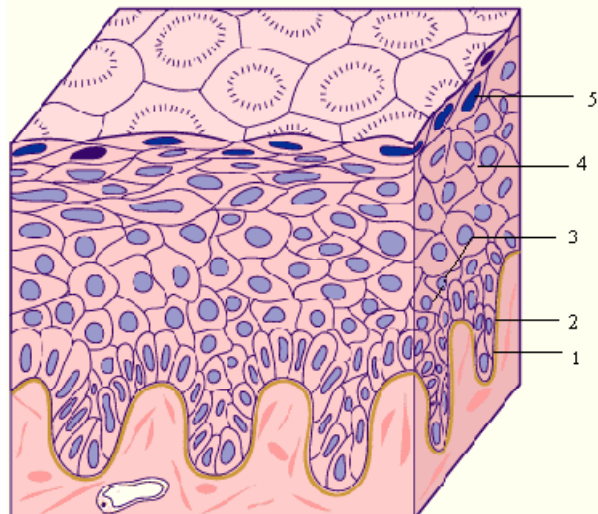


Fig 2.2: Epithélium pavimenteux non kératinisé pluristratifié [d'après la division d'histologie du département de médecine de l'université de Fribourg]

LEGENDE:

1: lame basale, 2: cellule germinative, 3: cellule parabasale, 4: cellule intermédiaire, 5: cellule superficielle.

2.2.3.3.1. Proœstrus

Pendant le proœstrus, les ovaires se tuméfient et deviennent œdémateux, on note le mûrissement d'un nombre de follicules en surface. Ces derniers mesurant alors entre 1 et 1.5 mm de diamètre commencent leur croissance terminale pour atteindre à la fin du pro-œstrus un diamètre de 1.5 à 5 mm alors que la progestéronémie demeure inférieure à 1ng/ml.

Les femelles des canidés, à la différence des autres femelles domestiques présentent une particularité spécifique, il s'agit d'un phénomène que l'on appelle « **lutéinisation pré-ovulatoire du follicule cavitaire** ». Cette réorganisation complexe des cellules folliculaires en cellules lutéales s'effectue dès la phase de pro-œstrus et se traduit par une synthèse précoce de la progestérone [25], [26].

L'oviducte est turgescent, très congestionné, et son épithélium présente des cellules hautes. Le pavillon des trompes devient plus volumineux [26].

L'utérus est volumineux, turgescent et dur. Sa muqueuse, devenue congestionnée et hémorragique, laisse s'échapper des hématies à travers l'endomètre à l'origine de l'écoulement sanguin révélateur du pro-œstrus [26], [15].

En début de pro-œstrus, la sécrétion d'œstrogènes par les follicules en maturation induit une multiplication intense des cellules de l'épithélium vaginal, ainsi que leur différenciation. Macroscopiquement, la muqueuse vaginale apparaît plus épaisse et œdémateuse.

A l'examen microscopique de l'épithélium vaginal apparaissent les cellules intermédiaires. Elles recouvrent rapidement les cellules parabasales. Plus le pro-œstrus avance, plus les cellules vaginales se différencient. Elles se chargent en kératine, deviennent anguleuses, en aspect de « pétale de maïs » ou de « feuille morte ». Le noyau devient petit et dense (pycnotique). On parle alors de « cellules superficielles » [27], [28].

Pendant cette première phase du cycle, on assiste au niveau des mamelles à un développement du système excréteur de lait.

2.2.3.3.2. Œstrus

Pendant la période d'œstrus, plusieurs follicules ovariens atteignent la maturité. Leur diamètre augmente pour atteindre la taille pré-ovulatoire, soit en moyenne 5 à 7mm [15], [27].

L'ovulation de tous les follicules n'est pas un processus synchrone et ce phénomène peut durer pendant 36h [27]. En plus, malgré l'existence d'un pic de LH déclenchant l'ovulation, l'ovocyte est expulsé de son follicule à un stade diploïde encore immature, le stade vésicule germinative (VG); il complète sa maturation dans l'oviducte, durant 48 à 72h [29].

Les oviductes sont tuméfiés et l'hypertrophie est à son maximum. L'épithélium présente des cellules cylindriques ciliées et des cellules glandulaires, dont la pleine activité est observée dès le début des ovulations [26], [15].

La muqueuse utérine s'épaissit et le myomètre devient ferme, turgide et présente des contractions spontanées. Le col est ouvert, il laisse s'échapper les écoulements utérins devenus de couleur jaune paille [26], [15].

En fin de proœstrus, moment où la sécrétion d'œstrogènes par les follicules est maximale, la muqueuse vaginale apparaît anguleuse, plissée, et n'est plus du tout œdématiée. Sur un plan microscopique, cela s'explique par une kératinisation maximale des cellules vaginales. L'épithélium est recouvert par 12 à 20 couches de cellules dont les plus superficielles sont complètement cornifiées et anucléées (cf. figure 2.2). On parle alors de cellules kératinisées ou de « squames », qui sont en fait un stade ultime de différenciation des cellules superficielles.

2.2.3.3.3. Metoestrus

Chez la chienne, il n'y a pas de formation de corps jaune hémorragique en association avec l'ovulation, peut être du fait de la lutéinisation importante qui se produit avant l'ovulation. Par ailleurs, du fait que les cellules de la thèque interne pénètrent dans la granulosa, le tissu lutéal, composé de différents types cellulaires, est hétérogène [27].

La phase lutéale de la chienne gestante est similaire à celle de la chienne non fécondée car le corps jaune a une durée de vie particulièrement longue, qui est indépendante du devenir de l'ovocyte [25]

Le corps jaune représente la source unique de progestérone pendant toute la gestation (absence de relais placentaire), et curieusement il reste fonctionnel, malgré de très légères différences, chez la chienne non gestante [25] [28].

Contrairement aux ruminants, porcs et chevaux, chez la chienne les facteurs lutéotropes (la prolactine et indirectement la LH) sont uniquement des hormones antéhypophysaires d'origine maternelle. Le placenta ne secrète pas

d'hormone gonadotrope et la présence de l'embryon dans l'utérus ne modifie pas la sécrétion progestéronique ovarienne [26], [15].

La trompe utérine subit une involution tubaire progressive et une diminution de l'activité ciliaire, glandulaire et musculaire. [15].

L'utérus présente un endomètre épais car la prolifération épithéliale se maintient, avec apparition de nombreux plis et développement des glandes. Le col se referme, et le myomètre retourne à une phase de repos [26].

Pendant la phase métoestrale du cycle et après vingt quatre heures du dernier jour d'acceptation du coït, l'épithélium vaginal se différencie et son épaisseur diminue. L'activité de régénération de l'épithélium est marquée par la présence de nombreuses cellules inflammatoires, au premier rang desquelles figurent des polynucléaires neutrophiles, caractéristiques de cette phase [12], [26].

Chez les femelles gestantes et pseudo gestantes, le développement mammaire, intéresse essentiellement le système sécréteur des acini.

2.2.3.3.4. Anœstrus

Les follicules primordiaux qui sont restés longtemps quiescents entament leur croissance pendant l'anœstrus. Ils se transforment en follicules primaires, puis en follicules secondaires et en follicules tertiaires, mais la différenciation folliculaire terminale n'a pas lieu et la taille maximale des petits follicules à antrum est de 0.5 à 1mm [30], [15].

La trompe utérine retrouve ses dimensions initiales, son épithélium est plat non cilié et non pourvu de glandes sécrétoires [15].

L'involution utérine dure deux mois, au bout desquels la paroi utérine s'amincit et devient flasque. Le chorion ne contient que très peu d'invaginations glandiformes [31], [30], [15].

L'épithélium vaginal au repos est constitué de deux ou trois couches de petites cellules basales et parabasales [15].

2.2.3.4. Modifications hormonales

2.2.3.4.1. Proœstrus

A la fin de l'ancœstrus, on assiste à une reprise de l'activité sexuelle en raison d'une augmentation de la fréquence des pulses de libération de l'hormone hypothalamique GnRH (*Gonadotrophin Releasing Hormone*), responsable de l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire et de la synthèse des gonadotrophines hypophysaires, en particulier l'hormone folliculo-stimulante (FSH) qui induit la croissance des follicules ovariens et le retour en chaleurs de la femelle [32], [33].

On connaît depuis longtemps que la croissance des follicules ovariens s'accompagne d'une sécrétion accrue d'œstrogènes, notamment de 17 β -œstradiol, pour aboutir à un pic de sécrétion en fin de pro-œstrus [34]. La valeur qui correspond au pic d'œstradiol oscille entre 30 et 70pg/ml, mais la montée de son taux circulant dans les jours qui précèdent ce pic n'est pas linéaire et s'effectue en dents de scie donnant lieu à des pics et des creux de sécrétion au cours d'une même journée. Il est de ce fait difficile d'apprécier la qualité de la maturation folliculaire grâce à un seul dosage d'œstradiol [35].

Les taux sanguins de LH (*Luteinising Hormone*) restent à un niveau basal pendant la plus grande partie du pro-œstrus, pour atteindre un taux maximal entre 10 et 22ng/ml environ 12 à 24 heures après le pic d'œstradiol. Ce pic pré ovulatoire de LH s'étale sur une période relativement longue de 24 à 96 heures [22]; il est souvent considéré comme un repère temporel pour la datation des événements du cycle, en raison de son rôle dans le déclenchement de l'ovulation et de sa concomitance avec l'augmentation du taux de progestérone. En effet, l'imminence de ce pic est pratiquement estimable grâce à des mesures répétées de la progestéronémie [23].

La progestéronémie reste basse avant et au début du pro-œstrus. Son taux sérique s'élève après le pic de sécrétion d'œstradiol, concomitant ainsi avec la chute rapide du taux d'œstradiol, pour atteindre une concentration de 3ng/ml au moment du pic de LH [36].

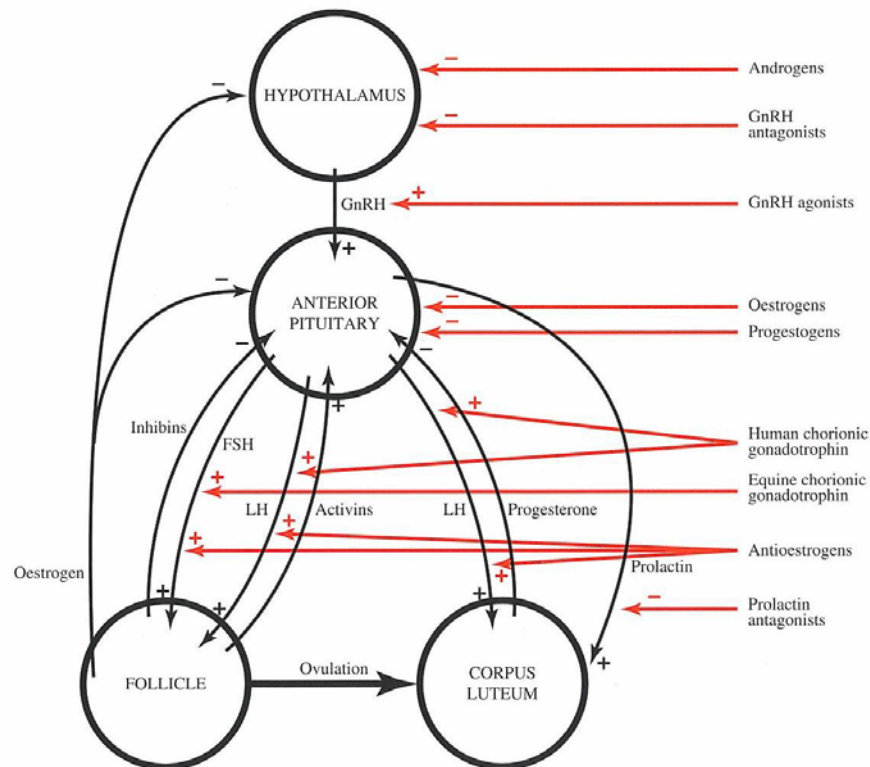


Fig 2.3: Représentation schématique de l'action hormonale et feed-back dans le contrôle de la reproduction chez la chienne [ENGLAND G; 2004]
 Les flèches rouges indiquent l'action des molécules exogènes chez la chienne.
 (+): stimulation
 (-): inhibition

Les taux sanguins de l'hormone folliculostimulante (FSH) sont au plus bas à la fin du pro-œstrus. Le pic de sécrétion de la FSH se produit en même temps que celui de la LH [23].

2.2.3.4.2. Œstrus

Le comportement réceptif caractéristique de l'œstrus apparaît en général dès le pic de LH, c'est-à-dire après que le taux sanguin du 17β -œstradiol diminue et que la progestéronémie augmente suite au phénomène particulier de lutéinisation pré ovulatoire des follicules ovariens [22].

Ainsi, on considère que la poussée pré ovulatoire de la LH se produit le premier jour de l'œstrus, elle est due au rétrocontrôle positif exercé par l'œstradiol

sur l'hypophyse. L'ovulation survient environ 30 à 48h plus tard. La fin de l'œstrus comportemental survient 6 à 10 jours après le pic de LH [06]

Chez toutes les chiennes, quelle que soit leur race, on considère que l'ovulation s'est produite lorsque le taux circulant de progestérone dépasse 4 à 10ng/ml (Cf Tableau 3.1). Les variations raciales ou individuelles du taux de progestérone au moment de l'ovulation restent toutefois mal connues [22].

Tableau2.1: Progestéronémie et ovulation chez la chienne [PRELAUD P, ROSENBERG D, FORNEL P DE.; 2002].

Jour de la période ovulatoire	Progestéronémie (nmol/L)	Progestéronémie (ng/ml)
Pic de LH	3 - 6	1 - 2
Pic de LH + 1 j	6 - 12	2 - 4
Pic de LH + 2 j = Ovulation	12 - 30	4 - 10

Pendant la période optimale de fécondabilité, le niveau de sécrétion de la progestérone varie assez largement. Il oscille entre 14ng/ml et 40ng/ml [25].

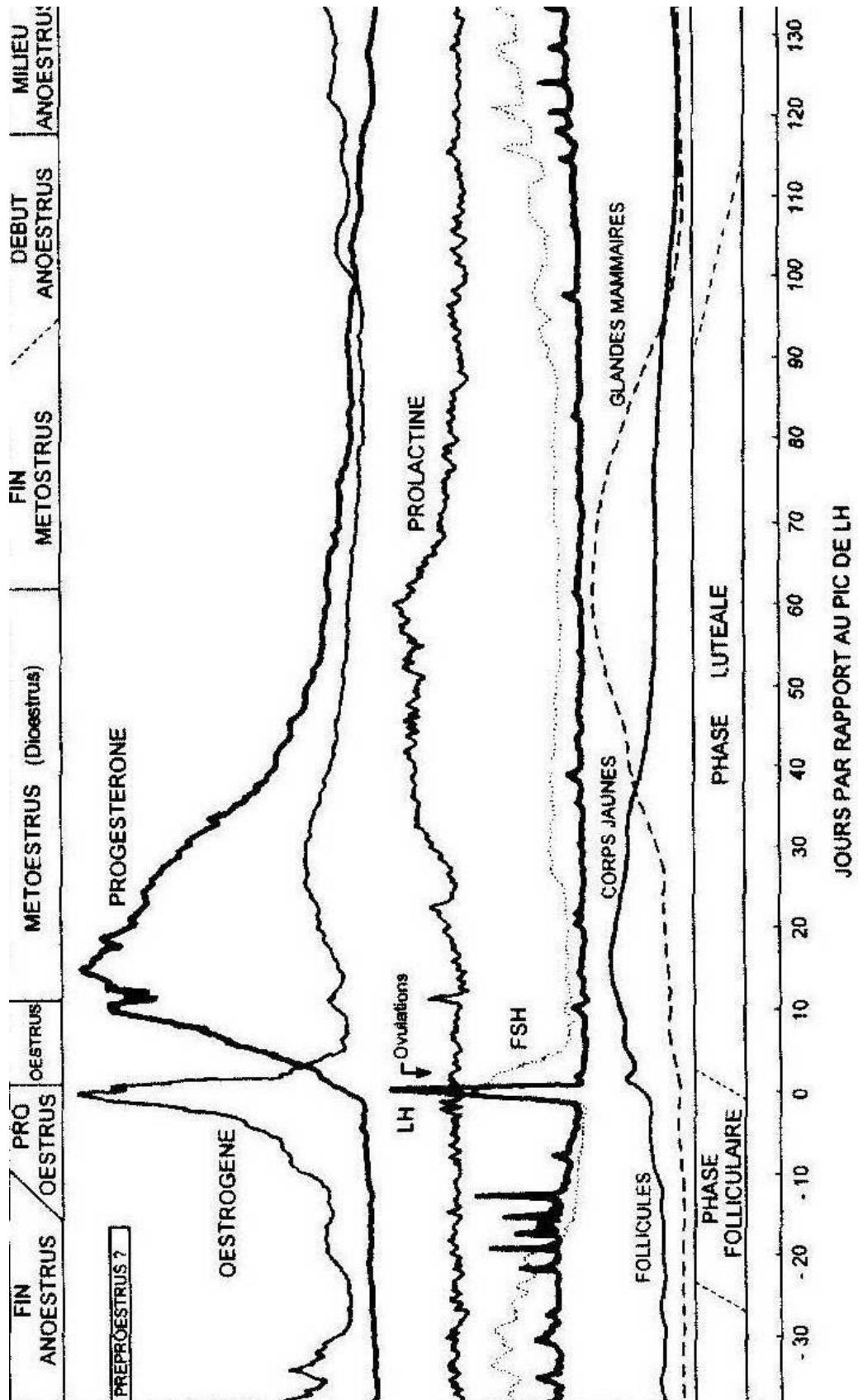


Fig 2.4: Représentation schématique des modifications endocriniennes au cours du cycle ovarien de la chienne non gestante [CONCANNON PW; 1986]

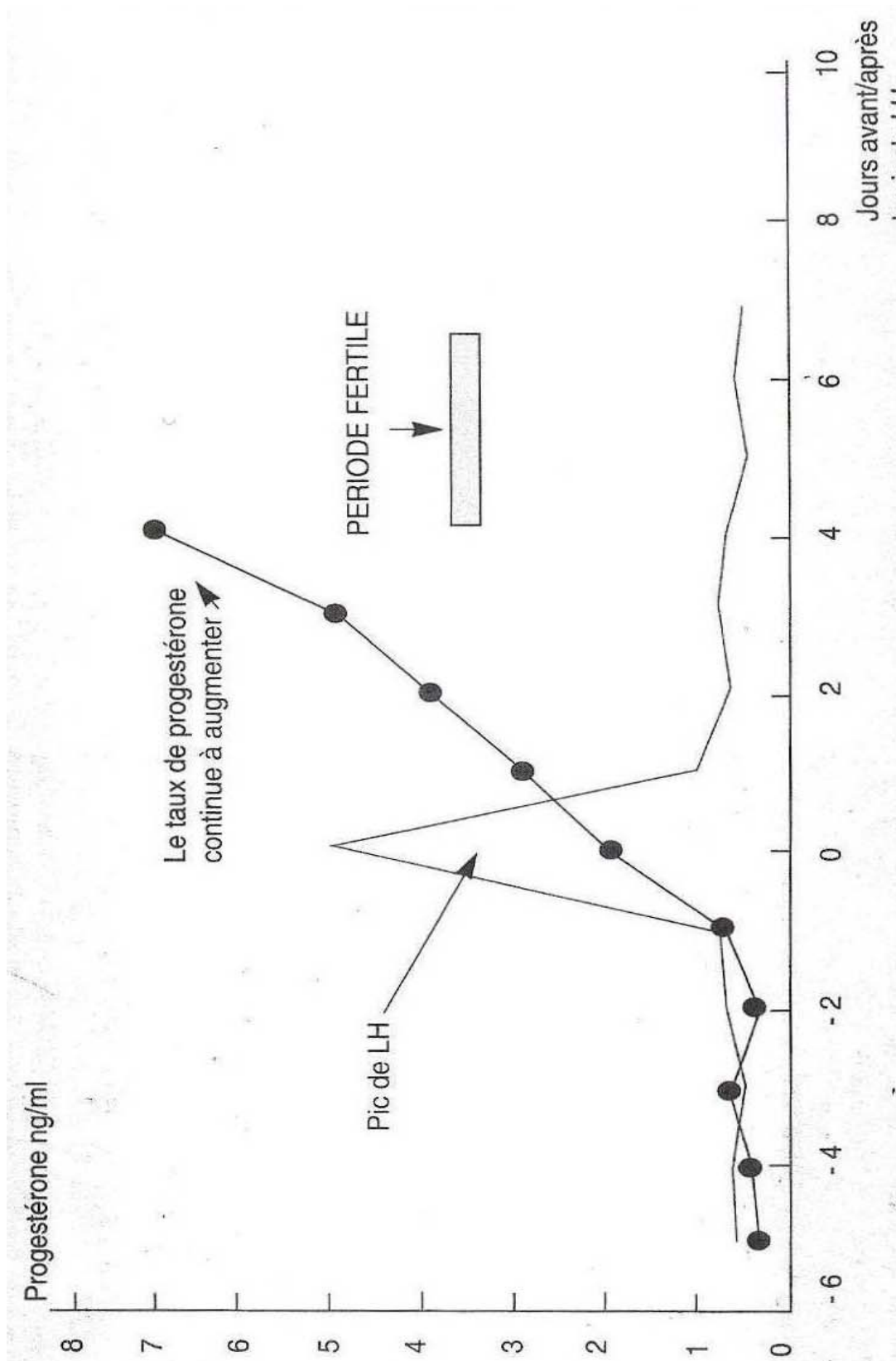


Fig 2.5: Correspondance Entre taux de LH et début d'augmentation de la Progesterone [FONTBONNE A; 1992]

2.2.3.4.3. Metoestrus

La progestéronémie continue à augmenter pour atteindre un taux maximal de 15 à 80ng/ml entre 15 à 25 jours après le pic de LH. Elle amorce ensuite une décroissance progressive qui se poursuit pendant 5 à 6 semaines. Les profils de la progestérone sont très rapprochés pour les chiennes gravides et pour les chiennes non accouplées [37], ainsi que pour celles qui ont été hystérectomisées. Il est donc peu probable que l'utérus joue un rôle essentiel dans le maintien ou la régression du corps jaune. La LH et la prolactine semblent, par contre, nécessaires à un fonctionnement lutéal normal puisque la progestéronémie décroît chez les chiennes hypophyséctomisées [10]

Chez la chienne gestante :

Le taux de progestérone qui avait atteint son maximum de sécrétion entre 15 et 25 jours après le pic de LH tend, par la suite, légèrement à diminuer, pour chuter à un taux inférieur à 2ng/ml dans les 24 heures qui précèdent la mise bas. Cet effondrement du taux de progestérone est indispensable au déclenchement du part car il concourt à augmenter le nombre de récepteurs à l'ocytocine dans le myometre [38], [39].

Il n'existe pas de relais placentaire à la sécrétion de progestérone au cours de la gestation, l'ovariectomie de la chienne gestante est de ce fait abortive quel que soit le stade où elle est pratiquée. Toutefois, le placenta de la chienne produit une hormone spécifique « **la relaxine** » dont le taux devient détectable 19 à 28 jours après le pic de LH, ce qui permet désormais d'établir en routine un diagnostic de gestation [12], [40].

Sous l'effet de facteurs de stimulation encore peu connus, le taux de prolactine d'origine hypophysaire augmente dès le deuxième tiers de la gestation et s'élève significativement chez la chienne gestante (par rapport à la non gestante) entre le 30^e et le 35^e jour après le pic de LH. L'antagonisme de sa sécrétion par l'administration de médicaments anti-prolactinémians induit un avortement. La prolactinémie présente un pic au moment du part et reste élevée pendant toute la période de lactation [40].

Chez la chienne non gestante :

Malgré de très légères différences, la courbe de sécrétion de la progestérone en métœstrus chez la chienne non gestante est similaire à celle de la chienne gestante, et se prolonge même un peu plus longtemps car le corps jaune demeure fonctionnel. La chute est alors plus progressive et l'hormone peut être dosée dans la circulation sanguine jusqu'à plus de 70 jours après le pic de LH [23].

Aucune modification évidente dans les profils de sécrétion des principales hormones chez la chienne pseudo gestante par rapport à la femelle gravide n'a encore été démontrée, et si le taux de prolactine est similaire dans les deux cas, la relaxine n'est en revanche sécrétée que lors de gestation avérée [41].

2.2.3.4.4. Anœstrus

Bien que depuis de nombreuses années on parle de l'anœstrus comme de la phase de quiescence du cycle reproducteur de la chienne, des travaux donnent à penser que ni les ovaires ni l'hypophyse ne sont inactifs pendant cette période. [40], [06].

En effet, l'hypophyse continue à sécréter une quantité non négligeable de FSH et, dans une moindre mesure, de LH. La pulsativité de cette sécrétion est toutefois faible [40].

Le taux sanguin du 17 β -œstradiol reste souvent élevé pendant plusieurs jours durant l'anœstrus, mais décroît généralement quelques jours avant le début du pro-œstrus. Cette décroissance semble coïncider avec l'augmentation de taux de la LH (de 10 à 15 jours avant son pic pré ovulatoire) [40].

Pendant la phase lutéale, la progestéronémie élevée inhibe toute sécrétion importante de GnRH. Lorsque la progestéronémie baisse en fin de métœstrus, l'inhibition est levée et une reprise folliculaire peut démarrer [42].

La prolactinémie évolue suivant un rythme circannuel, elle semble être l'une des hormones qui intervient dans la durée de l'anœstrus. L'utilisation de médicaments anti-prolactinémisants permet ainsi d'induire des chaleurs lors d'anœstrus prolongé [25], [43].

Tableau 2.2: Variations qualitatives de la progestéronémie et de l'œstradiolémie pendant le cycle sexuel de la chienne [PRELAUD P, ROSENBERG D, FORNEL P DE.; 2002].

PHASE DU CYCLE	PRO-ŒSTRUS	ŒSTRUS	METOESTRUS	ANŒSTRUS
Durée moyenne	6 – 11 j	5 – 10 j	50 – 60 j	Variable
Progestéronémie	Légère augmentation	Augmentation	Plateau puis décroissance lente	Basse
Oestradiolémie	Augmentation puis pic	Diminution	Basse	± légère augmentation

2.3. SUIVI DU CYCLE ŒSTRAL

L'objet du suivi de cycle est la détermination de la période de fécondabilité optimale, pendant laquelle la saillie ou l'insémination sera fécondante.

Des critères plus ou moins subjectifs ont toujours servi pour repérer la période optimale de fécondabilité. Ces critères peu fiables, induisaient très souvent l'éleveur ou le propriétaire en erreur, pour cette raison d'autres méthodes ou techniques plus objectives ont été développées.

2.3.1. Critères subjectifs de suivi

Divers critères servent de repère pour la détermination de la période optimale de fécondabilité, mais comme ces critères étaient retenus subjectivement, les résultats obtenus étaient aléatoires, car ils n'étaient pas conduits de manière scientifique.

2.3.1.1. Nombre de jours de chaleur :

Les éleveurs canins n'appliquant aucun suivi médicalisé des chaleurs, programment communément leurs saillies en comptant le nombre de jours depuis le début de l'écoulement vulvaire sanguinolent. Ils croient que leurs chiennes sont prêtes après un nombre de jours bien déterminé. En moyenne le 12^e jour des chaleurs, ce qui conduit à saillir entre le 14^e et le 16^e jour. Ce critère, bien que largement utilisé est en fait très imparfait.

Beaucoup d'études ont démontré qu'au moins un tiers des chiennes sont en période optimale de fécondabilité en dehors de ce créneau classiquement cité. Ainsi, certaines chiennes ovulent précocement, vers le 5^e jour des chaleurs, et d'autres plus tardives ovulent vers le 30^e jour des chaleurs [12].

L'ovulation peut se produire physiologiquement jusqu'au 30^e jour depuis le début du pro-œstrus. Cela est bien connu dans certaines races de chiennes (les Lévrier) et doit être pris en considération.

En plus, il a été démontré que l'ovulation se produit à un moment très variable non seulement d'une chienne à l'autre, mais également d'un cycle à l'autre chez la même chienne. Ainsi une chienne qui ovule le 10^e jour des chaleurs pour un cycle, n'ovule que très rarement au même jour le cycle suivant.

Donc saillir entre le 14^e et le 16^e jour depuis le début de l'écoulement sanguin est une pratique peu fiable, basée sur un critère subjectif qui induit très souvent en erreur, et qui ne peut se traduire que par l'échec [12], [22], [23].

2.3.1.2. Acceptation du mâle par la chienne :

Ce critère est de loin, parmi les critères subjectifs, le moins fiable. En effet, si pour certaines espèces domestiques, le début du comportement d'œstrus peut servir pour la détermination de la période optimale de fécondabilité, il n'en est pas de même pour la chienne, car il y a une faible corrélation entre le comportement d'œstrus et les modifications hormonales. Donc, le fait que la chienne accepte l'accouplement ne signifie pas forcément qu'elle est en période optimale de fécondabilité. Ce critère souffre d'une grande variabilité le rendant très subjectif [12].

2.3.1.3. Acceptation de la chienne par le mâle :

Il s'agit de tester la chienne en la plaçant en présence d'un mâle expérimenté, qui n'accepte de chevaucher que les chiennes prêtes. Ce critère bien que relativement fiable pour les mâles expérimentés, ne peut constituer un critère stable pour tous les chiens de l'élevage et demeure de ce fait subjectif. De plus, l'utilisation de ce mâle pour tester une chienne peut conduire à des mésalliances avec le mauvais étalon [12].

2.3.1.4. Aspect des écoulements vulvaires :

Pendant la période de l'œstrus les pertes vulvaires s'éclaircissent et se raréfient en général. Donc, l'aspect des écoulements vulvaire peut être utilisé chez

certaines chiennes à titre indicatif, comme il peut n'être d'aucune utilité pour d'autres chiennes dont les écoulements restent inchangés durant toute la période des chaleurs [15].

2.3.2. Marqueurs objectifs de suivi

Afin d'assurer un suivi plus objectif des chaleurs, différentes méthodes sont apparues, comme la mesure de la résistivité du mucus vaginal, l'examen par endoscopie des parois du vagin, la cytologie vaginale, le dosage hormonal et plus récemment l'échographie ovarienne.

2.3.2.1. Résistivité du mucus

Cette technique consiste en la mesure de la conductance électrique du mucus vaginal, qui se modifie au cours des chaleurs sensiblement en parallèle à la kératinisation de l'épithélium vaginal. Une sonde reliée à un dispositif d'affichage électronique des résultats est introduite au fond du vagin de la chienne en chaleurs. La mesure obtenue va augmenter au cours du pro-œstrus, jusqu'à un maximum atteint à peu près au moment du pic de LH, et diminue par la suite.

Cette technique, largement utilisée par les pays nordiques pour déterminer la période optimale de fertilité chez la renarde, a été utilisée à titre expérimental sur un nombre restreint de chiennes. Et bien qu'elle soit simple d'utilisation, c'est une technique peu précise (ne permet pas de détecter le pic de LH, et encore moins l'ovulation) qui nécessite un matériel approprié, et qui peut jouer le rôle de vecteur pour certaines maladies vénériennes [12], [15].

2.3.2.2. Endoscopie

L'endoscopie vaginale (ou vaginoscopie) est l'examen de surface de la muqueuse vaginale. Il est effectué à l'aide d'une sonde rigide formé par un tube creux muni d'une source de lumière et d'un dispositif d'insufflation (endoscope), il renferme à l'intérieur des fibres optiques qui permettent de transmettre les images de l'organe sur un écran. La visualisation directe de la muqueuse vaginale sans agrandissement, en utilisant un rectoscope pédiatrique est également possible. L'examen dure en moyenne 2mn. Il s'effectue sur animal en position debout et sans sédation.

La muqueuse vaginale change d'aspect en fonction du climat hormonal. L'endoscopie vaginale permet de mettre en évidence ces changements par l'observation des plis et de la couleur de la muqueuse vaginale, ainsi que l'aspect et la couleur des fluides retenus dans le vagin, elle représente alors un moyen fiable pour définir chaque phase du cycle. La période fécondable est estimée en moyenne 4 jours après le début d'amincissement de la muqueuse vaginale [44], [30].



Fig 2.6 : Aspects endoscopiques de la muqueuse vaginale au cours des différentes phases du cycle œstral.
[JEFFCOATE I; 2004]

LEGENDE:

- (a): Prœstrus: Noter le liquide rosâtre et les plis brillants et œdématisés
 (b): Début d'œstrus: Couleur pâle et début de froncement de la muqueuse. Ce stade précède tout juste le pic de LH.
 (c): Mi-œstrus: couleur pâle crèmeuse et un profil plissé et anguleux de la muqueuse. Cet aspect correspond au milieu de la période fertile.
 (d): Metoestrus précoce: Les plis muqueux sont arrondis avec des plaques pâles. Cet aspect rappelle parfois une rosette comme dans la dernière photographie (e).

2.3.2.3. 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 [10]. Le frottis vaginal est l'examen qui permet de recueillir un échantillon représentatif de ces cellules.

2.3.2.3.1. 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 [45].

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

2.3.2.3.2. La technique de réalisation d'un frottis vaginal:

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. [45], [46].

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 [45], [44].

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 (Cf Fig 2.7). 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 [47], [44].

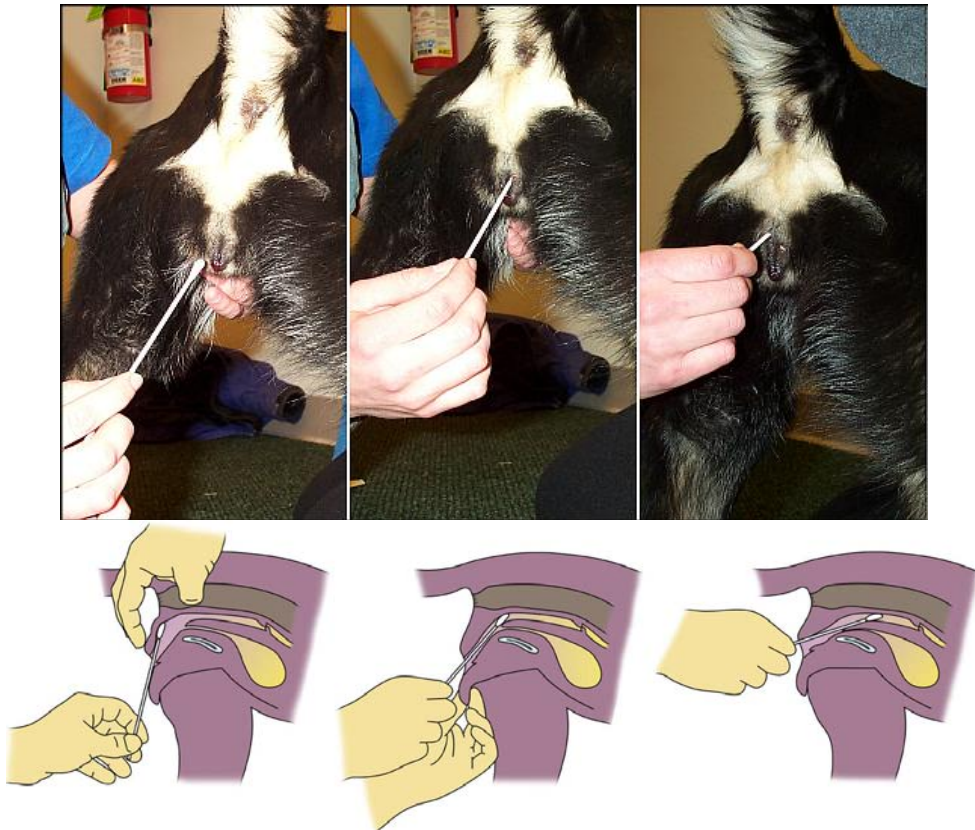


Fig 2.7 : Technique d'écouvillonnage chez la chienne
[EILTS BE; 2007] [BOWEN; 2000]

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 [47], [48].

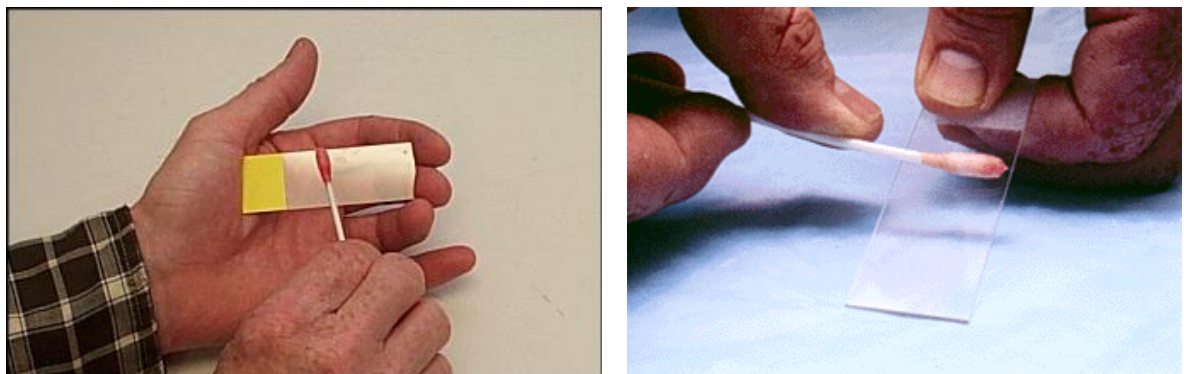


Fig 2.8 : Techniques d'étalement d'un frottis vaginal
[EILTS BE; 2007] [BOWEN; 2000]

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 [47], [48].

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 volume pendant cinq minutes [47]

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.

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 [47].

La coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) :

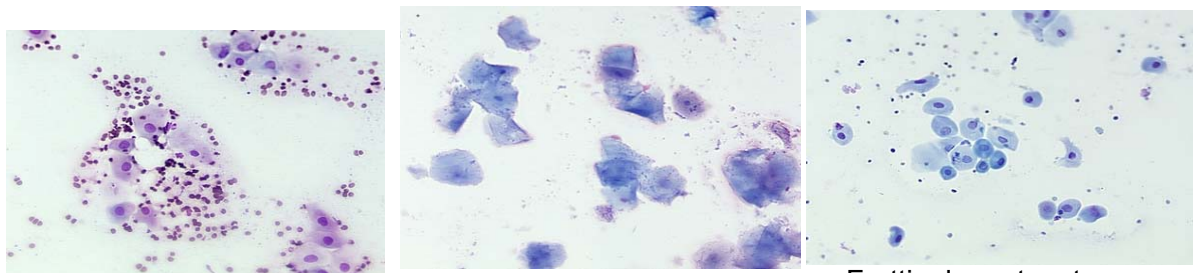
La coloration de MGG ou encore de Wright est une technique unichrome, largement utilisée en clientèle vétérinaire, car les réactifs sont les mêmes pour colorer les frottis sanguins. Le MGG colore toutes les cellules vaginales quel que soit leur degré de kératinisation en bleu-violet et leur appréciation 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 [49], [47].

Des kits de coloration MGG modifiés, tel que le kit Diff-Quick®, ont été conçu 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 [49].



Fig 2.9 : Matériel pour coloration de May-Grünwald-Giemsa modifiée : Diff-Quick® [ENGLAND G, CONCANNON PW.; 2002]



Frottis de pro-œstrus

Frottis d'œstrus

Frottis de metoestrus

Fig. 2.10 : 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 G, CONCANNON PW.; 2002]

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 [49].

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 [47].

En effet, cette coloration permet d'identifier les précurseurs intracellulaires 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 [49].

Cette méthode demande plusieurs solutions, et sa mise en œuvre est plus longue que les autres (environ 15 minute), 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 2.11 : Matériel pour coloration d'Harris-Schorr. [PIERSON P et al.; 1999]



Frottis de pro- œstrus Frottis d'œstrus Frottis de métœstrus
Fig. 2.12 : Frottis vaginaux de chienne aux différentes phases du cycle œstral, colorés avec la méthode du trichrome d'Harris-Schorr [PIERSON P et al.; 2002]

Tableau 2.3 : Technique de coloration de Harris-Shorr [SCHUTTE AP; 1967].

Ordre de passage	Produits à utiliser	Temps
1	Mélange alcool- éther ½	5 minutes
2	Alcool à 70°	Plonger 10 fois
3	Alcool à 50°	Plonger 10 fois
4	Eau distillée	Plonger 10 fois
5	Hématoxyline de Harris	2 minutes
6	Eau distillée	Passage
7	Eau distillée	Passage
8	Alcool ammoniacal	1 minute
9	Eau distillée	Passage
10	Alcool 70°	Passage
11	Alcool 95°	Passage
12	Colorant de Shorr	2 minutes
13	Alcool 95°	Passage
14	Alcool absolu	Passage

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 [50]. 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.



Fig. 2.13 : 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 JF; 2006]

Tableau 2.4 : Technique de coloration de Papanicolaou. *mélange de vert lumière et de brun bismarck (Papanicolaou – en ligne).

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

2.3.2.3.3. Interprétation d'un frottis vaginal

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.

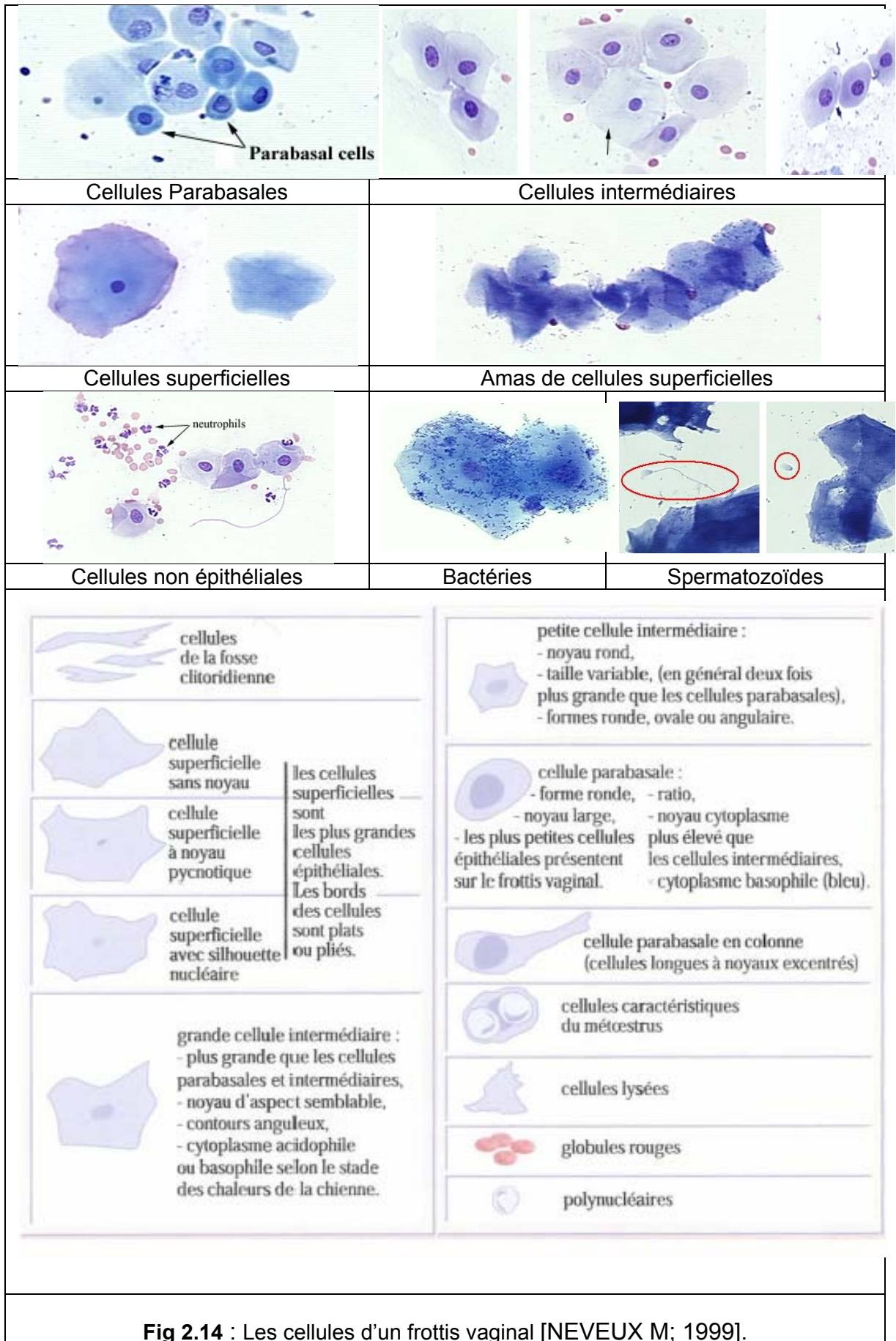
La lecture se fait en balayant toute la lame, l'observation d'un maximum de champs sur différents points est indispensable [47], [48].

Les types cellulaires retrouvés sur un frottis vaginal

L'épithélium vaginal se constitue pendant l'anœstrus, 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 [45], [51].



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 [52], [47], [48].

Dans les sections suivantes, nous tâcherons de présenter l'essentiel de ces modifications rapportées aux microphotographies correspondantes de la figure 2.15.

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 [45], [44].

Le frottis du début d'œstrus (Cf Fig 2.15 : 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 [51]. Le nombre des hématies s'élève, et on peut le voir sur le frottis avant le début des écoulements [51].

Vers la moitié du proœstrus (Cf Fig 2.15: 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 [51].

En fin de proœstrus (Cf Fig 2.15 : 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 [53].

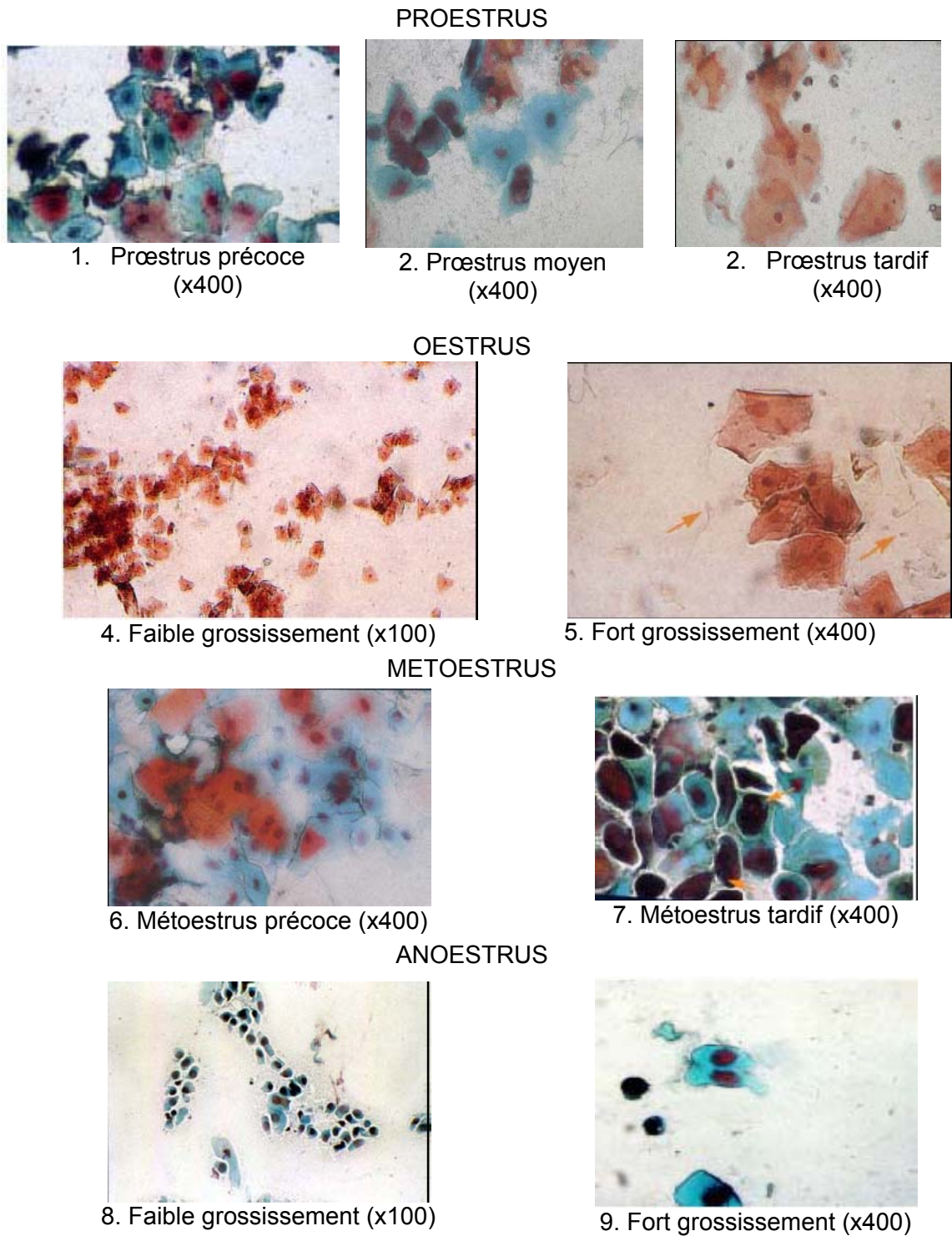


Fig. 2.15 : Microphotographies de lames de frottis vaginaux aux différents stades du cycle œstral de la chienne (colorés au trichrome d'Harris- Shorr)

[FONTBONNE A; GUERIN C; 2003]

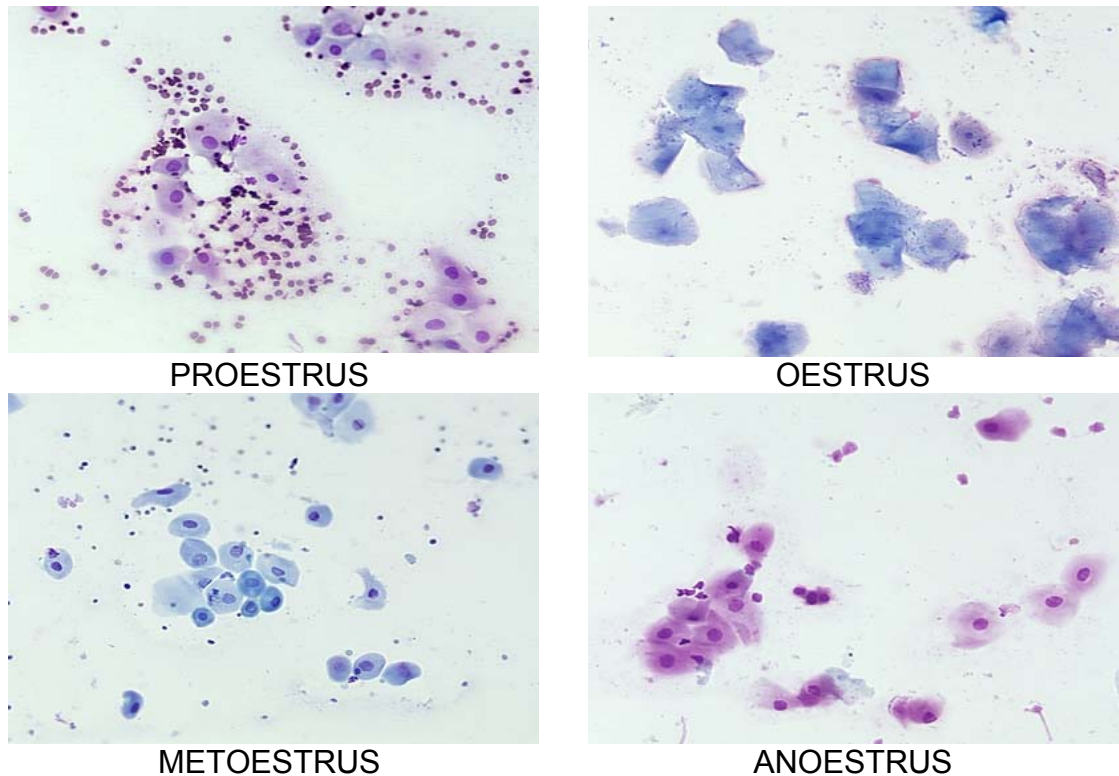


Fig. 2.16 : Microphotographies de frottis vaginaux aux différents stades du cycle chez la chienne (colorés au Diff Quick®) [BOWEN 2003]

Pendant l'œstrus (Cf Fig 2.15 : 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 [45], [51].

Beaucoup d'aspects atypiques sont rapportés [12]. 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 [43], [45], [12].

Environ six jours après l'ovulation, et huit jours après le pic de LH, la majorité des chiennes présentent un frottis de métoœstrus. Le passage au métoœstrus est caractérisé par un changement brutal des rapports quantitatifs des

types de cellules épithéliales signalés, accompagné de l'apparition de polynucléaires neutrophiles [45].

Le début d'œstrus correspond à la transition œstrus-métoœstrus. Le frottis montre (Cf. figure 2.15 : 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 [51].

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 métoœstrus [53].

Vers la fin du métoœstrus, le frottis (Cf. figure 2.15 : 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 métoœstrus (métoœstrus cells). Les érythrocytes sont absents.

Le frottis d'anœstrus (Cf. figure 2.15 : 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 cotés, donnant l'aspect de cellules en colonne. Les polynucléaires sont rares et les hématies absentes [45], [51].

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 [47], [48].

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) [54].

SCHUTTE AP avait montré en dès 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 [54].

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 [55].

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 [12], [47], [48], [53], [51].

2.3.2.4. Dosage de la progestérone sérique

2.3.2.4.1. 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 [41], [10].

La progestéronémie présente un niveau basal constant en anœstrus. En pro-œstrus, 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 [40].

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 [44].

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 [56]. 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 [57].

2.3.2.4.2. 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 [58].

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 [41].

2.3.2.4.2.1. Méthodes quantitatives

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

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 [41].

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 [12].

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 un 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.

2.3.2.4.2. 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 [59].

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 [41].

2.3.2.4.3. 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 [44], [56].

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 progestéronémie dépasse les 5 à 10ng/ml [22].

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 [53].

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 [40].

Il est utile de signaler ici que malgré le fait que la mesure de la progestéronémie 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 progestéronémie. 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 [60] et plus récemment l'étude effectuée en 2005 sous la direction scientifique du Professeur FONTBONNE A au CERCA-ENV Alfort [61].

En réponse à cette lacune, la deuxième partie de notre travail expérimental (étude statistique) s'inscrira dans le cadre d'une application de quelques critères cytologiques pour tenter d'évaluer la progestéronémie en début de pro-œstrus.

2.3.2.5. Echographie ovarienne

L'échographie ovarienne a longtemps été controversée comme méthode de détection de l'ovulation chez la chienne. Les études tentées autrefois, décrivaient les ovaires comme rarement ou non détectables par cette méthode. Sa

seule indication valable était le diagnostic des tumeurs et des kystes de l'ovaire [12].

Il a fallu attendre l'avènement des nouvelles technologies et l'arrivée des appareils de haute performance pour démontrer que les ovaires de la chienne peuvent être visualisés par examen échographique. [62]. Ainsi, à l'aide d'un appareillage adéquat, l'échographie ovarienne permettrait le suivi en temps réel du développement folliculaire et l'identification précise du moment de l'ovulation [63] [64] [51].

Cette technique est actuellement très utilisée dans le cadre de la recherche car avec d'autres techniques d'imagerie, elle offre un outil intéressant aux chercheurs travaillant à la mise au point des nouvelles biotechnologies de la reproduction canine. Cependant, elle reste très limitée en pratique à cause éventuellement des contraintes du coût et de la technicité requise [65], [66].

2.4. Conclusion

Nous verrons plus loin 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 [07].

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 (étude statistique) à un essai de réévaluation de la

cytologie vaginale en début de præstrus, 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.

CHAPITRE 3

ETUDE DES METHODES D'INDUCTION DE L'ŒSTRUS

3.1. Introduction

En raison d'un manque de compréhension des événements hormonaux nécessaires pour la folliculogénèse chez la chienne, il a été difficile d'arrêter des protocoles fiables pour l'induction d'un œstrus fertile dans cette espèce. La cause naturelle de la terminaison de l'anœstrus long et obligatoire et le commencement d'un nouveau cycle n'est pas encore clairement expliquée chez la chienne [36], [03], [67]. Ni l'ovaire ni l'hypophyse ne sont quiescents pendant l'anœstrus canin; la sécrétion des gonadotrophines pendant la transition du début vers la fin d'anœstrus est controversée, car on ne sait pas encore laquelle des deux hormones (LH et FSH) est prépondérante dans l'initiation de la folliculogénèse chez la chienne [04].

La transition naturelle de l'anœstrus vers le pro-œstrus implique l'accroissement des sécrétions pulsatiles de la GnRH et de la LH pendant plusieurs jours, l'élévation de la concentration moyenne en LH qui en résulte avec ou sans davantage d'augmentation de la concentration déjà élevée de la FSH [36]. La régulation endogène de cette transition n'est pas encore bien élucidée, cependant elle peut être influencée par l'exposition aux phéromones de l'œstrus et d'autres stimuli externes. Elle requiert apparemment une chute prolongée de la progestérone représentée par les deux (02) mois d'anœstrus obligatoire qui suivent les deux (02) mois de phase lutéale. Cette transition implique aussi éventuellement la prolactine et d'autres changements de l'activité dopaminergique au niveau de l'hypothalamus, car un raccourcissement de l'anœstrus est obtenu par des doses hypo-prolatinémiantes d'agonistes dopaminergiques. Le rôle de la LH est probablement plus important que celui de la FSH dans l'initiation de cette transition, car l'induction de l'œstrus et/ou le pro-œstrus est obtenue par administration de LH hautement purifiée seule et non par de la FSH seule [68].

Il existe plusieurs indications pour l'induction d'œstrus chez la chienne. Les applications cliniques des protocoles d'induction de l'œstrus comprennent le traitement de l'infertilité due à l'anœstrus primaire et secondaire. L'induction d'œstrus est aussi utile pour les éleveurs canins qui souffrent souvent de la

synchronisation naturelle et excessive des cycles œstraux de leurs femelles reproductrices (appelée "effet dortoir") qui se traduit par un manque de disponibilité de chiots de vente dans certaines périodes de l'année. Aussi les propriétaires des chiennes de pure race ayant des intervalles interœstraux normalement long réclament souvent le raccourcissement de ces intervalles dans le but d'augmenter le nombre de portées par an. De plus, un protocole d'induction pourrait permettre la planification d'une saillie ou d'une gestation particulière selon la convenance du propriétaire. Il faut signaler qu'avant l'utilisation d'un protocole d'induction, l'étiologie de l'infertilité doit être déterminée, car tous ces protocoles d'induction ont été appliqués et testés sur des chiennes à reproduction normale [04].

La puberté débute typiquement entre 6 et 12 mois d'âge chez la chienne. L'absence de cycle œstraux jusqu'à 24 mois d'âge serait indicative d'un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien et requiert une évaluation reproductive détaillée qui peut inclure entre autre mesures l'induction de l'œstrus. L'intervalle interœstral moyen chez la chienne est de 7 mois, mais varie chez les femelles fertiles de 4 à 14 mois [69]. L'induction d'œstrus pourrait également être utilisée comme un traitement de l'anoœstrus secondaire (intervalle interœstral > 12 mois). Une induction synchrone et fiable de l'œstrus est aussi une nécessité pour les programmes de transfert embryonnaire chez le chien [07], [67].

En outre, certaines de ces méthodes actuelles, semblent avoir un intérêt significatif pour l'application dans le cas d'anoœstrus prolongé et pour accroître la fertilité des chiennes de recherche appartenant aux colonies de chiens maintenus comme modèle animal pour étudier les maladies héritables ou à base génétique qui représentent un intérêt en médecine humaine ou vétérinaire [03].

Il est actuellement évident que "l'effet dortoir" existe bel et bien chez les canidés, de façon que les chiennes co-habitées arrivées dans leurs cycles à la moitié et à la fin d'anoœstrus et qui vivent avec des chiennes entrées en pro-œstrus et œstrus, vont connaître un raccourcissement de leur anoœstrus de 30 jours ou plus [36]. Il est admis que ce phénomène naturel d'induction d'œstrus se fait par médiation des phéromones, mais le mécanisme par lequel l'augmentation de la sécrétion des gonadotrophines se produit demeure non encore connu. Néanmoins, depuis 1939, il y a eu plus de quarante protocoles investiguant

pharmacologiquement l'induction de l'œstrus chez la chienne [07]. Les protocoles et résultats de ces études sont résumés dans les Tableaux 3.1, 3.2, 3.3 et 3.4.

Les méthodes actuellement ou récemment en usage comme approche clinique ou de recherche pour l'induction de l'œstrus chez la chienne comprennent [03] l'administration de:

- ✓ œstrogènes exogènes pour amorcer l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien de manière à induire un faux pro-œstrus sensé être suivi d'un pro-œstrus normal ou induire un pro-œstrus qui va progresser vers un œstrus fertile une fois supplémente par une administration consécutive de gonadotrophine;
- ✓ hormones gonadotropes exogènes pour stimuler une réponse ovarienne entraînant un pro-œstrus suivi d'un œstrus fertile à ovulation spontanée ou induite par administration supplémentaire d'hormones (hCG ou GnRH) ;
- ✓ GnRH ou d'agoniste de la GnRH de manière à obtenir une libération hypophysaire de gonadotrophines endogènes (LH et FSH) suffisante pour provoquer une réponse ovarienne qui produit un pro-œstrus normal suivi d'un œstrus fertile et d'ovulations spontanées ;
- ✓ agoniste de la dopamine qui provoque des réponses hormonales hypothalamique et hypophysaire menant à temps vers un pro-œstrus précoce ou autrement d'aspect normal et un œstrus fertile.

Après un succinct rappel sur les différentes techniques de maîtrise de la reproduction chez la chienne, nous consacrerons les prochaines sections de ce chapitre à l'étude détaillée des méthodes d'induction des chaleurs.

3.2. Les techniques de maîtrise de la reproduction chez la chienne.

La maîtrise de la reproduction canine accuse un certain retard par rapport aux autres espèces d'animaux domestiques. En effet, contrairement à beaucoup de femelles domestiques, chez la chienne, les biotechnologies de la reproduction sont à leur première génération « l'insémination artificielle en semence congelée [70].

Peu d'équipes dans le monde travaillent à la mise au point de nouvelles biotechnologies de la reproduction dans l'espèce canine et ce pour plusieurs raisons. Nous citons les moindres implications économiques, les nombreux obstacles physiologiques relatifs d'une part à la longueur du cycle et d'autres part à ses multiples particularités et complexités physiologiques [71], ainsi que la rareté

du matériel biologique nécessaire aux expériences, récolté à l'abattoir pour les femelles de rente. [72].

Récemment, les chercheurs ont montré plus d'intérêt à ce domaine, à cause de l'importance sociétale et utilitaire croissante que commence à prendre le chien, la tendance générale à la préservation de l'environnement et la volonté de sauvegarde des canidés en voie de disparition (lycaon, loup rouge, loup mexicain, fennec, coyote, certains renards, certains ourses, etc.) pour lesquels le chien domestique représente un modèle d'étude [73], [74] et aussi l'utilité du chien comme modèle expérimental pour la recherche humaine et vétérinaire menée sur l'héritabilité et les maladies génétiques [75], [76].

Dans les sections suivantes, il sera fait succinctement un point de situation pour chaque technique de reproduction chez la chienne. L'induction de l'œstrus ne sera pas traitée dans ces sections, mais elle sera détaillée plus tard.

3.2.1 Synchronisation des chaleurs

L'indication majeure de la synchronisation des chaleurs chez la chienne, s'incère dans le cadre des programmes de transfert embryonnaire [03]. Plusieurs protocoles ont été établis à savoir la combinaison entre FSH et LH, l'utilisation conjointe de diéthylestilbœstrol [03] et les anti-prolactines mais toujours sans succès. Les anti-prolactines, qui sont efficaces en induction d'œstrus, s'avèrent inefficaces à synchroniser avec précision les chaleurs, car la réponse au traitement varie considérablement suivant le stade du cycle auquel le traitement débute [70]. Donc, chez la chienne, la synchronisation des chaleurs est un objectif plus avancé et plus difficile à atteindre que l'induction de l'œstrus. C'est pour cette raison que nous classons la synchronisation parmi les techniques de reproduction demeurant encore mal maîtrisées.

3.2.2. Insémination artificielle

La première chienne inséminée en semence fraîche fut en Italie en 1787 par l'abbé *Spallanzani* et la première en semence congelée en 1970 au Etats-Unis. Depuis cette date, l'insémination artificielle a connu beaucoup d'indications et a rendu de multiples service [73]. En effet, cette technique de reproduction

assistée s'avère très utile voire indispensable en cas d'hypofertilité du mâle, ou d'incompatibilité comportementale. Elle prévient contre la diffusion des infections vénériennes contagieuses et permet une meilleure exploitation des étalons à potentiel génétique élevé dans le cadre de la sélection et de l'amélioration génétique des races surtout celles à très faibles effectifs ou en voie d'extinction [77], [78], [79], [80], [81].

3.2.3 Super ovulation

Aucun succès des essais de traitement de super ovulation n'a été jusqu'à présent rapporté chez la chienne [70], [82].

3.2.4 Récolte d'ovocytes

La récolte d'ovocytes n'a jamais été décrite chez la chienne, car limitée par des considérations anatomiques et physiologiques particulières à cette femelle dont les follicules sont de petite taille (7mm de diamètre) et ne sont ponctionnables que pendant environ une semaine seulement sur toute la durée d'un cycle. Par ailleurs; le non succès de super ovulation, a contribué à limiter d'avantage la récolte d'ovocytes chez la chienne [70].

3.2.5. Transfert embryonnaire

Des chercheurs japonais s'intéressent au transfert embryonnaire chez la chienne, ils n'ont pu récupérer pour le moment que 30 à 40% seulement des embryons formés. Néanmoins, 90% des embryons collectés étaient viables [83]. La mise au point de la transplantation d'embryons produits *in vivo* permettrait d'augmenter le nombre de descendants par femelle et de faire reproduire des femelles incapables de mener à bien une gestation. Si les embryons canins s'avèrent congelables, la technique permettra les échanges et la conservation de matériel génétique [84]. Elle rendrait aussi possible le diagnostic de tares génétiques (diagnostic préimplantatoire ou DPI) [85].

3.2.6. Maturation in vitro

Les taux de réussite de la Maturation In Vitro chez la chienne ne dépassent pas les 10 à 20% en moyenne. Les ovocytes canins mis en culture

mettent 48 à 96 heures pour arriver à maturation, la plupart ne l'entament même pas, et environ 25% dégénèrent [86], [87], [88], [72], [82].

Les raisons de ce faible taux de maturation et du retard de la reprise méiotique sont encore mal connues [89]. La mise au point de la MIV chez la chienne permettrait d'accroître les connaissances fondamentales et d'approfondir les connaissances cliniques; car elle est le point de passage obligé pour le développement d'autres biotechnologies de la reproduction, telles que la production d'embryons *in vitro* [90]. Ses applications peuvent intéresser les éleveurs (diffusion du potentiel génétique des femelles d'élite, sexage des embryons, éradication de tares génétiques à l'aide du diagnostic préimplantatoire) et les généticiens (obtention d'embryons d'animaux de génotypes intéressants mais hypofertiles ou infertiles); elles possèdent également un intérêt zoologique (préservation des Canidés en voie de disparition) [74], [91].

3.2.7. Fécondation in vitro

Les taux de réussite de la fécondation in vitro sont très faibles chez la chienne, de l'ordre de 10 et 20%. Un fort taux de polyspermie est en outre constaté, ce qui est incompatible avec le développement embryonnaire [92] [93]. Une fois la fécondation obtenue, les embryons sont rincés, puis cultivés sous atmosphère contrôlée. Les embryons qui se développent normalement après quelques jours de culture sont ensuite transférés dans l'utérus de femelles receveuses. Le cycle de celle-ci doit être synchrone avec l'âge de l'embryon transféré [94]. Chez la chienne, cette technique demeure du domaine de la recherche et aucune de ses étapes n'est au point. Ainsi, *OTOI* et ses collaborateurs ont obtenu en 2000 un blastocyste (J9) à partir de 217 ovocytes en maturation [96]. Après la mise en maturation de 169 ovocytes, leur fécondation in vitro puis le transfert de 90 embryons chez une seule receveuse. *ENGLAND* et ses collaborateurs ont obtenu en 2001 une gestation de trois conceptus, qui sont morts après vingt et un jours [95].

La technique d'injection cytoplasmique de sperme (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*) a été décrite une seule fois dans l'espèce canine. Pourtant réalisée avec du sperme de bonne qualité, elle n'a permis d'obtenir la formation

d'embryons au stade une cellule que pour 8% des ovocytes micro-injectés [70], [85].

3.2.8. Clonage

Enfin, le clonage fait actuellement appel à la technique de transfert nucléaire à partir de cellules somatiques prélevées chez un individu adulte. Dans l'espèce canine, l'équipe du Pr. *Hwang* (Corée du sud) a été la première à faire naître deux chiots vivants issus du transfert de cellules cutanées de l'oreille. Pour obtenir ces animaux, plus de mille trois cents ovocytes ont été nécessaires, qui ont permis le transfert de 1095 embryons clonés dans 123 chiennes receveuses. Un chiot est mort à l'âge de 22 jours et le chiot survivant, *Snuppy* (un mâle lévrier afghan), a été présenté publiquement en août 2004, à l'âge de trois mois. Cet animal reste, pour le moment, une exception. En effet, le rendement de la technique de clonage utilisée, qui a mobilisé une équipe de quinze personnes pendant deux ans, est très faible (0.2%) [97].

3.3. Méthodes d'induction des chaleurs

De très nombreux protocoles peu satisfaisants ont été mis au point par différentes équipes de recherche dans le monde pour déclencher les chaleurs chez la chienne. Le taux de fertilité obtenu avec des protocoles utilisant la PMSG et la hCG dépasse rarement les 50%, et le pourcentage de gestations obtenues est généralement d'environ 20 à 30% [07]. L'utilisation de la FSH seule donne des résultats moins satisfaisants que la PMSG. L'association du di-éthylstilbestrol (DES) à la FSH semble améliorer les résultats, avec 70% d'inductions, 46% d'ovulations mais seulement 20% de gestations [59].

L'administration de GnRH ou d'agonistes de GnRH est possible lorsque le fonctionnement de l'axe hypophyso-ovarien est conservé. Certains auteurs ont rapporté des résultats encourageants allant de 35 à 85% de taux d'induction et de gestation [59], mais hélas ces résultats n'ont pu être reproduits [07].

Plus récemment, l'utilisation d'inhibiteurs de la prolactine à effet dopaminergique (*Bromocriptine*, *Méteergoline*, *Cabergoline*) a ouvert une nouvelle possibilité d'induction de l'œstrus chez la chienne [59].

3.3.1. Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) et Analogues

L'administration de GnRH ou d'agonistes de la GnRH est possible lorsque le fonctionnement de l'axe hypophysio-ovarien est conservé, car le GnRH stimule directement la sécrétion des hormones hypophysaires [59].

Les sécrétions pulsatiles de la GnRH qui est un décapeptide hypothalamique, sont libérées toutes les 70 – 90 minutes comme médiateurs de la synthèse et la libération de la LH et la FSH pituitaires [98]. L'administration pulsatile de GnRH à la dose de 0.2-0.4 µg/kg et à 90 minutes d'intervalle est suffisante à obtenir des augmentations en LH similaire aux pulses endogènes qui se déroulent normalement à la fin du pro-œstrus [36]. Néanmoins, les protocoles d'induction de l'œstrus utilisant de la GnRH originaire ou analogues à courte action ne sont pas applicables cliniquement à cause du coût élevé des pompes à infusion pulsatile ou de l'hospitalisation nécessaire pour une infusion intraveineuse continue.

La hausse de la fréquence des pulses de LH observée avant le pro-œstrus spontané a été mimée chez des chiennes en début et au milieu d'ancœstrus par l'administration intraveineuse de fortes doses de GnRH (0.2 – 0.5 µg/kg) toutes les 90 minutes [99].

Les pulses de LH et FSH initialement étendus deviennent progressivement plus petits pendant le pro-œstrus induit à la GnRH comme dans le cas du pro-œstrus naturel, et aboutissent à un pro-œstrus normal sur le plan d'œstradiolémie, de cytologie vaginale et des modifications des organes génitaux externes. Ce pro-œstrus est souvent suivi d'un pic spontané de LH et un déclenchement d'œstrus avant ou immédiatement après la fin des 10 à 14 jours d'administration de GnRH. Des injections moins fréquentes de GnRH se sont avérées efficaces.

TABLEAU 3.1: GnRH et ses Agonistes utilisés dans l'induction d'œstrus chez la chienne [KUTZLER MA, 2005]

REFERENCE	NB DE CHIENNES	PROTOCOLES	RESULTATS		
		Induction d'œstrus	Prœstrus%/Œstrus%	Ovulation%	Gestation%/Mise-bas%
(CONCANNON PW et al., 1997)	36	GnRH 0.00015-0.000500 mg/kg IV chaque 90mn pdt 7-9j	72(prœstrus en 5.1 ± 0.4j)/56	44	33(gestantes)
(CAIN JL et al., 1988)	8	GnRH 0.000096-0.000139 mg/kg IV chaque 90mn pdt 11-13j.	100(œstrus en 23j)	87.5	87.5(gestantes)
(VANDERLIP SL et al., 1987)	8	GnRH 0.000040-0.000430 mg/kg IV chaque 87 mn pdt 9j.	75(en 2-4j)/62.5	50	37.5(gestantes)
(ROTA A et al., 2003)	10	Buserelin 0.0015 mg/kg SQ TID pdt 11j + 0.00075 mg/kg/ SQ TID pdt 3j.	30(prœstrus en 18.6 ± 4.7j)	20	20(gestantes)
(CONCANNON PW; 1989)	24	Lutrelina 0.0017-0.0025 mg/kg/j pdt 14-28j via SQ mini pompe osmotique.	87.5(prœstrus en 5.1 ± 0.4j)	75	37.5
(INABA T et al., 1998)	18	Leuprolide 0.10 mg/kg SQ 1x.	100(œstrus en 7-15j)	83	78
(KUTZLER MA et al., 2001a) (KUTZLER MA et al., 2001b)	7	Desloreline 2.1 mg implant/Chien SQ 1x.	100(œstrus en 6-10j)	100	43 (gestantes)
(KUTZLER MA et al., 2002)	6	Desloreline 2.1 mg implant/Chien Subvuvlvar 1x.	100(œstrus en 5-6j)	100	67 (gestantes)
(KUTZLER MA et al., 2002)	5	Desloreline 2.1 mg implant/Chien Subvuvlvar 1x.	100(œstrus en 5-6j)	80	40 (gestantes)

Il est important de signaler que la hausse de la LH n'a pas besoin d'être pulsatile pour induire un œstrus [36]. Une infusion ou une libération constante d'un analogue de la GnRH (letrelone, desloreline et leuprolide) via une mini pompe osmotique ou un implant sous cutané aboutit à l'induction d'un œstrus et à des taux de gestation similaires à une infusion pulsatile de la GnRH, pourvu que la thérapie à l'agoniste de la GnRH soit discontinuée après l'ovulation [36], [100]. L'administration prolongée des agonistes de la GnRH aboutit à une sur stimulation pituitaire, suppression de la sécrétion de la LH, une réactivité lutéale élevée à la LH et une sécrétion élevée de la progestérone [101], [102].

En portant des changements moléculaires à la GnRH originale, on a pu synthétiser plus de 700 agonistes qui ont une grande affinité des récepteurs et une stabilité renforcée [102].

Desloreline est un D-Trp⁶-Pro⁹-des-Gly¹⁰-GnRH analogue avec la substitution de deux acides aminés. L'application clinique vétérinaire de la Desloreline chez les canidés a été introduite pour la première fois par TRIGG et ses collaborateurs à l'occasion d'une investigation pour un nouveau contraceptif (**Suprelorin**®), qui est actuellement disponible sur le marché en Australie (Peptech Animal Health, North Ryde, New South Wales). Les investigations préliminaires avec ce produit (Suprelorin®) ont démontré sa capacité à induire un œstrus chez toutes les femelles en anœstrus traitées initialement, ce qui se suit d'une suppression d'œstrus prolongée [103], [104].

Ovuplant® (Fort Dodge animal Health, Overland Park, KS, USA) est un implant sous dermique, à libération prolongée et biodégradable contenant 2.1 mg de desloreline, autorisé d'usage chez les chevaux. Selon les données de fabricant, Ovuplant® induit l'ovulation chez la jument en 48 heures. Des études précédentes sur ce produit chez le chien ont montré son efficacité et fiabilité à induire rapidement et synchroniser l'œstrus. Cependant, ce produit est de moins en moins disponible à cause de problèmes techniques de fabrication, ce qui impose de nouvelles investigations à la recherche de préparations alternatives à base de desloreline [07].

3.3.2. Œstrogènes de synthèse (DES: Diéthylestilbœstrol)

Des préparations à base d'œstrogènes ont été administrées pour initier la femelle à un traitement inducteur de pro-œstrus par une série d'administrations de gonadotrophines incluant la PMSG ou la FSH associées ou non à une hormone inductrice d'ovulation telle la hCG. L'efficacité des **prétraitements à base d'œstrogènes** précédant l'administration des gonadotrophines n'est pas parfaitement documentée, mais pourrait être le résultat de plusieurs effets connus de l'œstradiol [03].

Un protocole modifié apparemment utilisé avec succès par les éleveurs de Greyhound a été rapporté. Il consiste à administrer du di-ethylstilbestrol (DES) en forme orale (5 mg/j, PO) quotidiennement jusqu'à trois (03) jours après apparition des premiers signes évidents de pro-œstrus, et de la FSH (10mg, IM) le 5^{ème}, 9^{ème} et 11^{ème} jours du pro-œstrus induit [105]. Ce même protocole a donné sur treize (13) chiennes neuf (09) œstrus, six (06) ovulations et quatre (04) gestations, et l'ovulation a eu lieu huit (08) jours après la fin du traitement au DES. Plus récemment, l'administration du DES seule (7.4 +/- 1.1 jours) a donné un résultat positif sur chacune des cinq (05) femelles de l'étude lorsque le traitement est initié entre 95-129 jours après le part ou la lutéolyse induite à la prostaglandine [105]. Il est possible que les œstrogènes exogènes agissent dans ce cas grâce à leur feed-back négatif par suppression de la sécrétion des gonadotrophines, puis une libération accrue une fois les œstrogènes arrêtés. Cependant, l'utilisation du DES seul n'a pas donné suite à un œstrus fertile chez des chiennes Beagle non précédemment gestantes et non prétraitées par de la Prostaglandine [106].

L'administration individuelle des œstrogènes pourrait causer des suppressions transitoires de la sécrétion de LH et FSH via le feed-back négatif classique sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et sera suivie en tout cas d'un rebond de la libération de la LH et la FSH facilitée par l'effet déclenchant des œstrogènes préalables sur la sécrétion de la GnRH et/ou la sensibilité (réactivité) hypophysaire à la GnRH. De telles fluctuations stimulatrices de la LH et/ou la FSH, même non documentées, seraient capables d'altérer le statut folliculaire de l'ovaire au moment d'une administration ultérieure de gonadotrophines. Alternativement ou additionnellement, les œstrogènes peuvent agir directement au niveau des follicules ovariens en stimulant le développement du follicule antral vers des stades plus avancés [03].

TABLEAU 3.2: Gonadotrophines et Œstrogènes dans l'induction d'œstrus chez la chienne [KUTZLER MA, 2005]

REFERENCE	NB DE CHIENNES	PROTOCOLES		RESULTATS		
		Induction d'œstrus	Induction d'ovulation	Prœstrus%/Œstrus%	Ovulation%	Gestation%/Mise-bas%
(SHILLE VM et al.; 1984)	5	-FSH 0.77-1.1 mg/kg IM 1x.	aucune	60(en 5-12j)/20	40	20(gestantes)
(SHILLE VM et al.; 1984)	4	-FSH 0.077-0.11 à 1.23-1.78mg/kg IM SID pdt 10j (Doublé la dose d'FSH chaque 48h).	aucune	50(en 7j)/25	50	0(gestante)
(SHILLE VM et al.; 1984)	5	-FSH 0.077-0.11 à 1.23-1.78mg/kg IM chaque 48 h (répéter la dose 1 x puis doubler chaque 48h). -LH 0.077-0.11 à 0.38-0.55mg/kg IM chaque 48h (Répéter faible dose 4 x puis doubler la dose les 2 traitements restants). -FSH et LH injections les jours: 1, 3, 5, 7, 9 et 11.	aucune	0/0	0	0/0
(SHILLE VM et al.; 1989)	5	-DES 0.19-0.21mg/kg SID PO pdt 14j + FSH 0.38-0.42 mg/kg IM 9 ^{ème} et 11 ^{ème} jours.	hCG 37.9-42.4UI/kg IM le 5 ^{ème} j du prœstrus	80 (prœstrus)	20	ND
BOUCHARD GF, et al.; 1993)	5	-DES 5mg/chien PO SID pdt 6-9j jusqu'à prœstrus	aucune	100/100	100	100/100
(CONCANNON PW et al., 1997)	13	-DES 0.1-0.2mg/kg SID PO pdt 14j + FSH 0.2-0.4mg/kg IM le 5 ^{ème} , 9 ^{ème} et 11 ^{ème} j.	aucune	69 (œstrus)	46	31(gestantes)
(VERSTEGEN J EU et al., 1997)	16	-LH 0.1 UI/kg TID pdt 7j	aucune	100/44	44	37.5/37.5
(VERSTEGEN J EU et al., 1997)	10	-HMG 1-7 UI/kg SID IM pdt 9j	aucune	90/60	60	40/40

Il a été démontré par plusieurs études et essais clinique qu'un traitement individuel à base d'œstrogènes peut produire chez la chienne un pro-œstrus induit qui persiste et se suit immédiatement d'un œstrus fertile, sans aucune administration de gonadotrophines. Le taux de succès est variable et semble être plus grand chez les chiennes connues pour un problème d'anœstrus prolongé ou persistant ou des femelles traitées vers la fin d'anœstrus [03].

3.3.3. Gonadotrophines pituitaires (FSH et LH)

Les facteurs de régulation de la durée d'anœstrus chez les chiennes individuelles ne sont pas connus, mais la terminaison de l'anœstrus est associée à une augmentation de la concentration sérique ou la fréquence des pulses de la LH [36]. Les concentrations sériques de FSH sont élevées durant la plupart de l'anœstrus au moment où les concentrations de la LH sont basses excepté en fin d'anœstrus. Néanmoins, La LH et la FSH semblent être toutes les deux folliculotropes chez la chienne car l'administration de doses pharmacologiques de soit la LH ou la FSH seule induit l'œstrus [36], [100].

A la différence des espèces de rente, l'administration de la FSH seule chez la chienne ne produit apparemment pas d'œstrus fertile. Contrairement à la FSH, la LH porcine purifiée administrée chez des chiennes en anœstrus à la dose de 0.1 UI/kg, t.i.d, pendant 7 jours a permis d'avoir 100% de pro-œstrus, 70% d'œstrus et un taux de gestation de 35% [107]. L'interprétation de ces résultats suggère que la LH est le facteur endocrinien qui est déficient en anœstrus et est la plus importante gonadotrophine et la plus déterminante dans la transition de l'anœstrus au pro-œstrus [106].

Un protocole d'induction de l'œstrus a été établi avec des doses combinées de FSH et LH destinée à mimer l'élévation graduelle de la FSH endogène coïncidant avec l'augmentation de la LH pendant le pro-œstrus. Cependant, ce protocole n'a pas été efficace. Il est important de noter que une faible mais significative hausse en concentration sérique d'œstradiol a lieu avant le début du pro-œstrus, grossièrement 30 jours avant le début d'œstrus. La signification fonctionnelle de cette hausse en œstradiol n'est pas connue mais elle pourrait apprêter l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien et initier ainsi un taux

élevé de libération pulsatile de la LH. Ce mécanisme est supporté par l'induction réussie d'un œstrus fertile chez les chiennes suivant l'administration de diethylstilbestrol (DES) [105], [108].

3.3.4. PMSG et hCG

En plus des hormones pituitaires, des gonadotrophines exogènes "la Pregant Mare Serum Gonadotropin (PMSG), human Chorionic Gonadotropin (hCG) et human Menopausal Gonadotropin (hMG)" ont été utilisées en induction de l'œstrus chez la chienne [109], [110].

De nombreux protocoles utilisant de la PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) ont été évalués : la plupart repose sur l'utilisation de la PMSG pendant une période de 8-10 jours à raison d'une dose quotidienne de 20 à 500UI/kg par voie sous cutanée ou intramusculaire, suivie d'une injection unique de 500UI d'hCG (Human Chorionic Gonadotropin) par voie intramusculaire. Les premiers signes d'œstrus sont alors observés en moyenne dix à quinze jours après le début du traitement, mais le taux de fertilité dépasse rarement les 50 p. cent [59].

La PMSG est donc la gonadotrophine la plus largement étudiée pour l'induction de l'œstrus chez la chienne, avec des protocoles allant d'injections à fréquence hebdomadaires à une fréquence quotidienne utilisant soit la voie sous cutanée ou intramusculaire pour l'administration (Cf Tableau 5.2). Néanmoins, il a été rapporté à la suite d'utilisation de la PMSG un échec lutéal prématuré avec un raccourcissement ultérieur du metoestrus et une perte de gestation [07].

L'administration de la **PMSG** à la dose de 20 u.i/kg/j pendant 10 j cause souvent une hypersécrétion d'œstrogènes et pourrait provoquer un dysfonctionnement utérin et/ou une pathologie utérine. Des taux de gestation de 50% sont atteints par l'administration de la PMSG pendant 5 jours à la même dose suivie immédiatement de l'administration de hCG (500u.i/chien une fois au J50) La hCG pourrait assurer un stimulus similaire à celui assuré par l'augmentation des pulses de la LH endogène pendant le cycle naturel [03].

TABLEAU 3.3: PMSG dans l'induction d'œstrus chez la chienne [KUTZLER MA, 2005]

REFERENCE	NB DE CHIENNES	PROTOCOLES		RESULTATS		
		Induction d'œstrus	Induction d'ovulation	Prœstrus%/Œstrus%	Ovulation%	Gestation%/Mise-bas%
(SCROGIE NJ; 1939)	18	PMSG 187 MU*/Chien** IM 1x.	hCG 50 MU/Chien au moment de l'injection de PMSG.	78(œstrus en 2-6j)	ND	50(mise-bas)
(JONES GE, et al.; 1973)	6	PMSG 500UI/Chien SID SQ pdt 8-9j.	hCG 500UI/Chien SC le 10 ^{ème} j de traitement.	100(œstrus en 10-14j)	100	Pas de saillie
(THUN R et al., 1977)	6	PMSG 31.2-71.4 UI/kg SID SC pdt 10j.	hCG 31.2-71.4 UI/kg SQ le 10 ^{ème} j de traitement.	50(œstrus)	50	50/50
(THUN R et al., 1977)	7	PMSG 15.6-35.7 UI/kg SID SC pdt 10j.	hCG 31.2-71.4 UI/kg SQ le 10 ^{ème} j de traitement.	57(œstrus)	57	57/57
(THUN R et al., 1977)	12	PMSG 20 UI/kg SID SC pdt 10j.	hCG 31.2-71.4 UI/kg SQ le 10 ^{ème} j de traitement.	58(œstrus)	58	58/58
(ARCHBALD LF et al., 1980)	8	PMSG 44 UI/kg SID IM pdt 9j.	hCG 25-50 UI/kg IM le 10 ^{ème} j de traitement.	100(œstrus en 5-19j)	80	60(gestantes)
(ARCHBALD LF et al., 1980)	5	PMSG 44 UI/kg SID SQ pdt 9j.	hCG 25-50 UI/kg IM le 2 ^{ème} j d'œstrus.	80(œstrus en 9-11j)	80	60(gestantes)
(WRIGHT PJ; 1980)	8	PMSG 110 UI/kg IM jusqu'à 3x à 7j d'intervalle	Aucune	100(œstrus)	87.5	ND
(WRIGHT PJ; 1980)	3	PMSG 110 UI/kg IM jusqu'à 3x à 7j d'intervalle	hCG 37-62.5 UI/kg SC le 1 ^{er} j d'œstrus.	100(œstrus)	100	ND
(WRIGHT PJ; 1982)	8	PMSG 18.9-31.2 UI/kg SID SQ pdt 14-20j.	hCG 37-62.5 UI/kg SC le 1 ^{er} j d'œstrus ou le 21 ^{ème} j de traitement.	87.5/62.5	75	ND
(CHAKRABORTY PK et al., 1982)	ND	PMSG 20-50 UI/kg IM 2x à 6j d'intervalle	hCG 500-1000 UI/Chien IM le 1 ^{er} et 2 ^{ème} j d'œstrus.	100/60	ND	ND
(CHAFFAUX S et al., 1984)	15	PMSG 27.8-41.7 UI/kg SID IM pdt 10j	hCG 27.8-41.7 UI/kg IM le 10 ^{ème} j de traitement	100/87	100	20/20
(CHAFFAUX S et al., 1984)	5	PMSG 27.8-41.7 UI/kg SID IM pdt 10j	Gonadoliberine 0.003-0.004 mg/kg IM le 10 ^{ème} j de traitement.	100/60	100	0/0
(NAKAO T et al., 1985)	11	PMSG 44 UI/kg SID IM pdt 9j	hCG 25-100UI/kg IM le 10 ^{ème} j de traitement.	100/64	64	13/13
(ARNOLD S et al., 1989)	17	PMSG 20 UI/kg SID IM pdt 10j	hCG 500 UI/Chien IM le 10 ^{ème} j de traitement	100(pro-œstrus en 4- 6j)	ND	35/0
(ARNOLD S et al., 1989)	6	PMSG 20UI/kg SID IM pdt 5j	hCG 500 UI/Chien IM le 5 ^{ème} j de traitement	100(pro-œstrus en 4- 6j)	ND	50(Mise-bas)
(WEILENMANN R et al., 1993)	14	PMSG 20 UI/kg SID IM pdt 5j	hCG 500UI/Chien IM le 5 ^{ème} j de traitement	100(œstrus)	ND	43(Gestantes)

En outre, quel que soit la posologie de PMSG utilisée (500, 250 ou 20UI), et même en limitant la durée de son utilisation à une période de cinq jours, les concentrations d'œstradiol obtenues chez les chiennes traitées sont excessivement élevées : l'ovulation et la phase lutéale sont anormales, et les effets secondaires ne sont pas négligeables "thrombocytopénie, avortement et pyromètres" [59].

En clientèle vétérinaire, ces traitements faciles à mettre en œuvre ont le plus souvent des résultats décevants : l'induction des chaleurs est observée dans 50 à 60% des cas, mais le pourcentage des gestations obtenues est généralement insuffisant (20 à 30 p. cent de mise bas au plus), surtout en regard des risques de complications qui sont désormais bien documentés. La PMSG et l'hCG appartiennent à la famille des glycoprotéines : ces molécules sont susceptibles d'entraîner des réactions immunitaires immédiates (choc anaphylactique) ou à long terme (désensibilisation de l'animal d'où un effet diminué à plus ou moins court terme) [59].

Une autre approche utilise une préparation à base de HMG (**Human menopausal gonadotropin**) qui est une hormone LH-like. La HMG avec un ratio de 1:1 de LH:FSH biopotencies a donné un taux d'ovulation de 90% et de fertilité de 50% [106].

Cet usage de la **HMG** à la dose de 2-4 u.i/kg/j pendant 9 jours, avec son contenu LH relativement élevé, a été suggéré comme meilleur substitut de la hausse naturelle pré-pro-œstrale en LH pendant le cycle ovarien normal [110]

3.3.5. Les anti prolactines

Plus récemment, l'utilisation des inhibiteurs de la prolactine à effet dopaminergique (*Bromocriptine*, *Méteergoline*, *Cabergoline*) a ouvert une nouvelle possibilité d'induction de l'œstrus. Les protocoles utilisés sont tous fondés sur les propriétés particulières de la prolactine sur le mécanisme de régulation du cycle de la chienne [59].

La prolactine semble jouer un rôle important dans l'intervalle interœstral, probablement en affectant la sécrétion des gonadotrophines et/ou la réactivité

(sensibilité) ovarienne aux gonadotrophines. La suppression de la sécrétion de la prolactine par l'administration des agonistes dopaminergiques raccourcit la durée d'anœstrus [111], [112] ou induit l'œstrus en cas d'anœstrus prolongé [113], [114]. Néanmoins, l'inhibition de la prolactine seule n'est pas suffisante pour terminer l'anœstrus chez la chienne, car l'administration d'un antagoniste de la sérotonine (*Méteergoline*) entraîne la suppression des concentrations de prolactine de façon similaire aux concentrations observées avec les agonistes dopaminergiques (Bromocriptine et Cabergoline), mais n'induit pas d'œstrus [115]. Il est clair que l'inhibition de la prolactine est nécessaire pour l'induction de l'œstrus. Les chiennes qui ne répondent pas au traitement à base d'agonistes dopaminergiques (pro-œstrus n'est pas initié) ne montrent pas une diminution des concentrations en prolactine [36]. Ces observations suggèrent qu'une inhibition de la sécrétion de prolactine pourrait réguler l'initiation du proœstrus. KOOISTRA et al. ont rapporté que le développement folliculaire et l'induction d'œstrus résultante à la bromocriptine étaient associés à une augmentation des concentrations plasmatiques de la FSH sans augmentation concomitante des concentrations de la LH [116]. Il est important de noter que chez les chiennes à cyclicité normale, les concentrations de prolactine pendant la fin d'anœstrus ne changent pas avant le début de pro-œstrus [117].

Les agonistes dopaminergiques (AD) induisent avec succès un œstrus fertile chez la plupart des chiennes, mais peuvent être onéreux dans les pays où ces médicaments ne sont pas facilement disponibles à usage vétérinaire. En plus, cette méthode d'induction de l'œstrus peut requérir plus de 30 jours de traitement avant que le début du pro-œstrus ne se prononce, ce qui est dépendant du stade d'anœstrus (précoce versus tardif) [118]. En fin, les agonistes dopaminergiques à action centrale (bromocriptine) induisent fréquemment le vomissement. L'habituation à la bromocriptine, en commençant par de faibles doses initialement, a été rapportée comme un moyen pour éliminer complètement le vomissement comme un effet secondaire du traitement [119].

3.3.5.1. Agonistes de la dopamine (*Bromocriptine & Cabergoline*)

Sur la base des travaux d'OKKENS et al, VAN-HAAFTEN et al et JOCHLE et al en 1989 et les travaux de JEUKENNE et al en 1997, les agonistes

dopaminergiques tel que la *Bromocriptine* et la *Cabergoline* ont été récemment inclus dans les méthodes disponibles d'induction de l'œstrus avec succès dans quelques pays Européens.

Dans le premier rapport d'induction de l'œstrus et la réduction consécutive de l'intervalle interœstral, la bromocriptine a été administrée par voie orale chez quatre (04) chiennes à base de 20 mg/kg deux fois par jour de 1-5 jours après le pic de LH jusqu'au début du prochain pro-œstrus. L'intervalle interœstral a été réduit significativement chez les animaux traités comparés au groupe de contrôle [123 A° 23 vs. 245 A° 8 jours] [120]. Un taux de gestation de plus de 60% est obtenu en utilisant le même protocole de bromocriptine dans une étude qui compare la bromocriptine administrée depuis le début de la phase lutéale ou à partir de 21 jours après le début de cette période lutéale associée au traitement à la PMSG [111]. La phase lutéale a été réduite à 80% de sa durée normale après l'administration de la même dose de bromocriptine à huit (08) chiennes de race Beagle entre les jours 1-5 et 20-24 de la phase lutéale [121].

La *Cabergoline* (5mg/kg/j) a été administrée oralement pendant 5 à 18 jours chez 28 chiennes à anœstrus prolongé, et toutes les femelles ont exprimé leurs œstrus après traitement et sont devenues gestantes [122].

Dans une autre étude, la *Cabergoline* et un placebo ont été administrés pendant 14 jours 4.5 ou 6 mois après l'œstrus précédent. Il n'y avait pas de différence entre les deux groupes pour l'intervalle interœstral [114]. La *Cabergoline* a été utilisée à la même dose 30 jours après le pic de LH et a réduit l'intervalle interœstral de 216 à 66.5 jours [123]. Toutes les chiennes de l'étude ont été saillies mais aucune d'elles n'est devenue gestante. Le faible taux de gestation est du probablement à une involution utérine insuffisante du cycle précédent. Néanmoins, cette étude a démontré qu'il est possible d'induire l'œstrus non seulement pendant l'anœstrus, mais aussi pendant le di-œstrus [123].

TABLEAU 3.4: Agonistes Dopaminergiques utilisés dans l'induction d'œstrus chez la chienne [KUTZLER MA, 2007]

REFERENCE	NB DE CHIENNES	PROTOCOLES	RESULTATS	
		Induction d'œstrus	Prœstrus% / Œstrus%	Gestation%/Mise-bas%
(CONCANNON P; 1993)	5	Bromocriptine 0.05 mg/kg PO BI jusqu'à pro-œstrus.	80(pro-œstrus en 28j)	ND
(VAN-HAAFTEN B et al.; 1989)	6	Bromocriptine 0.02 mg/kg PO BID jusqu'à proœstrus.	100 (pro-œstrus en 47 ± 2j)	
(OKKENS AC et al.; 1996)	4	Bromocriptine 0.02 mg/kg PO BID	100 (pro-œstrus en 123 ± 46j)	ND
(BEIJERINK NJ et al.; 2003)	6	Bromocriptine 0.05 mg/kg PO BI jusqu'à pro-œstrus.	100 (pro-œstrus en 136 ± 16j)	Pas de saillie
(BEIJERINK NJ et al.; 2003)	6	Bromocriptine 0.02 mg/kg PO BI jusqu'à pro-œstrus.	100 (pro-œstrus en 96 ± 6j)	Pas de saillie
(BEIJERINK NJ et al.; 2003)	8	Bromocriptine 0.05 mg/kg PO BI jusqu'à pro-œstrus.	100 (pro-œstrus en 92 ± 11j)	Pas de saillie
(ZOLDAG L et al.; 2001)	48	Bromocriptine 0.3 mg/chienne pdt 3j puis 0.6-2.5 mg/chienne PO SID continuer 3-6 j après le début d'œstrus	100 (œstrus)	83 (gestantes)
(CONCANNON P; 1997)	Nd	Bromocriptine 0.10 mg/kg PO SID jusqu'à pro-œstrus	80 (pro-œstrus en 17-28j)	ND
(CIRIT U et al.; 2006)	10	Cabergoline 0.005 mg/kg PO SID jusqu'au 2 ^{ème} j du pro-œstrus ou pdt 42 j.	80 (pro-œstrus)	60 (gestantes)
(Cirit U et al.; 2006)	19	Cabergoline 0.0006 mg/kg PO SID jusqu'au 2 ^{ème} j du pro-œstrus ou pdt 42 j.	73.7 (pro-œstrus)	57.9 (gestantes)
(Cirit U et al.; 2006)	8	Cabergoline 0.0006 mg/kg PO SID jusqu'au 2 ^{ème} j du pro-œstrus ou pdt 42 j.	100 (pro-œstrus)	75 (gestantes)
(JOCHLE W ET AL.; 1989)	28	Cabergoline 0.005 mg/kg PO SID pdt 7-10j.	100 (pro-œstrus en 5-10g après dernier jour du traitement)	93.3 (gestantes)
(GOBELLO et al.; 2002)	5	Cabergoline 6mg/kg SID PO jusqu'au 2 ^{ème} j du pro-œstrus.	100 (pro-œstrus en 16.2 ± 12.7j)	100 (mise-bas)
(VERSTEGEN JP ET AL.; 1999)	5	Cabergoline 0.005 mg/kg PO SID jusqu'à 3-8g après début d'œstrus ou pdt 40j.	80 (pro-œstrus en 20 ± 3j)	60 (gestantes)
(VERSTEGEN JP ET AL.; 1999)	5	Cabergoline 0.005 mg/kg PO SID jusqu'à 3-8g après début d'œstrus ou pdt 40j.	100 (pro-œstrus en 14 ± 3j)	100 (gestantes)
(VERSTEGEN JP ET AL.; 1999)	5	Cabergoline 0.005 mg/kg PO SID jusqu'à 3-8g après début d'œstrus ou pdt 40j.	100 (pro-œstrus en 6 ± 1j)	80 (gestantes)
(ZOLDAG L et al.; 2001)	13	Cabergoline 6mg/kg SID PO jusqu'au début d'œstrus ou 14j.	84.6 (pro-œstrus en 6 -14j)/84.6	84.6
(ROTA A et al.; 2003)	12	Cabergoline 0.005 mg/kg PO SID jusqu'à transition proœstrus-oœstrus.	83 (pro- œstrus en 23.5 + 3.2j)	83 (mise-bas)
(JEUKENNE P et al.; 1997)	5	Cabergoline 0.005 mg/kg PO SID du 30 ^{ème} j après pic-LH jusqu'au début d'œstrus.	80 (pro-œstrus en 23.5 ± 5j)	0 (gestantes)
(OKKENS AC et al.; 1996)	7	Metergoline 0.1 mg/kg PO BID	Pas de raccourcissement de l'intervalle interœstral comparé au contrôle.	
(HANDAJA KUSUMA PS et al.; 1993)	12	Metergoline 0.56-1.2 mg/kg IM chaque 3j jusqu'au pro-œstrus ou 40 ^{ème} j de traitement.	83.3/83.3	75 (mise-bas)
(HANDAJA KUSUMA PS et al.; 1993)	8	Metergoline 0.56-1.2 mg/kg IM chaque 3j jusqu'au pro-œstrus ou 40 ^{ème} j de traitement.	100/100	50 (mise-bas)

Dans une autre étude, 14 chiennes ont été traitées à la même dose de *Cabergoline*, au début (jour 93-108), au milieu (jour 123 – 156) et à la fin (jour 161 – 192) d'œstrus [124]. Le traitement s'est traduit par des intervalles interœstraux plus courts et plus synchrones que dans le groupe de contrôle. L'effet du traitement a été plus rapide vers la fin qu'au début de l'œstrus (moyenne 6 vs. 20 jours respectivement). Les cycles induits ont eu des caractéristiques hormonales et une fertilité normales [124]. 12 de 14 femelles traitées sont devenues gestantes et ont donné naissance à des portées normales.

Dans une étude utilisant les agonistes dopaminergiques pour terminer la gestation, la *Cabergoline* orale à la même dose a été combinée à une administration quotidienne de cloprostenol (1mg/kg) à partir du jour 25 après le pic de LH, et un raccourcissement significatif de l'intervalle interœstral a été obtenu (98+/-51 vs. 200+/-26 jours) [124].

3.3.5.2. Antagoniste de la sérotonine (*Métergoline*)

Dans la première étude comparative qui a utilisé de la Métergoline intramusculaire à la dose de 12.5 mg par chienne chaque trois (03) jours commençant entre les jours 78 et 161 après pro-œstrus chez dix (10) chiennes de race Beagle ; l'intervalle interœstral a été significativement raccourci chez le groupe de traitement par rapport au groupe de contrôle [moyenne 144 jours vs. 207 jours respectivement] [125]. Toutes les chiennes de l'étude ont eu une ovulation confirmée par un accroissement du taux de la progestérone, et neuf (09) sont devenues gestantes. Par comparaison au traitement à la PMSG, la metergoline seule a donné le meilleur résultat par rapport à la metergoline associée à la hCG, malgré l'effet vomitif de la dose élevée (1mg/kg) utilisée [125]. Un protocole similaire a été appliqué chez 18 chiennes 113 et 236 jours après le début d'œstrus jusqu'au prochain pro-œstrus, ayant un intervalle interœstral moyen de 169 jours. La même dose de metergoline a été administrée chez 12 chiennes Beagle dans une autre étude [126]. Après 17 jours de traitement l'œstrus est induit, 9 chiennes de 12 sont devenues gestantes et la période interœstrale a été réduite de plus de 2 mois [126]. La dose élevée utilisée dans les études susmentionnées semble onéreuse pour le traitement des grands chiens. A présent, la metergoline est vendue sous forme orale. La metergoline orale (0.1

mg/kg deux fois par jour) administrée chez 7 chiennes Beagle 100 jours après ovulation a induit une diminution significative du taux de la prolactine, cependant, l'intervalle interœstral n'a pas été différent entre le groupe de traitement et le groupe de contrôle [127].

L'action de la *Méteergoline* sur la durée de l'interœstrus a également fait l'objet de plusieurs publications. Administrée à la dose de 1mg/kg par voie intramusculaire ou sous cutanée, tous les trois jours jusqu'à l'obtention des premiers signes cliniques d'œstrus (neuf à quinze jours de traitement), la *Méteergoline* a permis d'obtenir une anticipation rapide de l'œstrus suivant, lorsque le traitement est instauré entre le 90^e et 150^eme jours qui suivent les précédentes chaleurs : l'ovulation est confirmée chez 83% des chiennes traitées et la gestation a été menée à terme dans 60 à 75 % des cas.

Comme aucune forme commerciale de *Méteergoline* administrable par voie parentérale n'est disponible, une étude a été réalisée avec une préparation orale : administrée à raison de 0.1mg/kg par voie orale deux fois par jour (limité à la dose émétisante), la metergoline n'a induit aucune réduction de la durée de l'interœstrus. L'activité exclusivement anti-sérotoninergique de la *Méteergoline* à cette concentration pourrait expliquer l'insuccès de ce dernier protocole.

3.4. Conclusion

Le premier objectif des traitements d'induction artificielle de l'œstrus est aujourd'hui de restaurer la fonction de reproduction dès lors qu'un intervalle interœstral anormalement prolongé est observé, non seulement en provoquant l'œstrus, mais surtout en induisant une ovulation, suivie d'une fécondation et d'une gestation qui aboutisse à la naissance de chiots en bonne santé. Un second objectif pour les éleveurs serait celui du déclenchement volontaire des chaleurs dans le but d'une planification optimale de la période de gestation ou de mise bas, l'accroissement du nombre annuel de portées, ou plus simplement la compensation des conséquences financières d'un cycle non gestant [59].

Malgré les progrès considérables réalisés ces dernières années dans les domaines de la physiologie de la reproduction canine, l'endocrinologie de l'anœstrus demeure encore imparfaitement connue. Toute fois il est aujourd'hui

admis que l'anœstrus ne constitue pas une période de repos sexuel complet : il s'accompagne d'une folliculogénèse partielle pendant laquelle les follicules formés subissent une atrophie, et que la maturation ne poursuit son évolution qu'à la fin de l'anœstrus. L'initiation d'un nouveau cycle correspondrait ainsi à une transition programmée entre l'anœstrus et le pro-œstrus suivant, une transition qui serait déterminée comme pour chaque phase du cycle par des variations endocriniennes spécifiques.

De nombreux protocoles d'induction des chaleurs ont été expérimentés chez des chiennes saines avec des résultats parfois encourageants, mais souvent peu répétables. Donc, à l'exception de la *Cabergoline* (Galastop®, Boehringer) qui possède une licence pour l'induction d'œstrus chez la chienne, les éleveurs canins et propriétaires doivent rester prudents et conscients que la plupart de ces traitements demeurent toujours expérimentaux [07].

L'utilisation des agonistes dopaminergiques pour mettre un terme précoce à l'anœstrus permet l'obtention d'un œstrus physiologique et d'une ovulation spontanée. Cependant, la durée du traitement peut beaucoup varier en fonction du stade du cycle œstral [107].

Désormais le praticien dispose de protocoles utilisant des molécules à activité anti-prolactine (*Cabergoline* en particulier) dont l'efficacité a été démontrée, tant en laboratoire qu'en clientèle vétérinaire, surtout lors d'anœstrus pathologique [04].

Il est enfin important de signaler qu'en présence d'une infertilité, l'instauration d'un traitement efficace n'est possible qu'après une démarche rigoureuse fondée sur l'anamnèse, un examen clinique complet et des examens complémentaires judicieusement choisis (dosages hormonaux), qui permettent le plus souvent de préciser l'étiologie. Il convient également de se souvenir que la détermination de la période optimale de la fécondabilité et le recours éventuel à l'insémination artificielle si nécessaire sont deux éléments quasi-incontournables de la démarche [59].

CHAPITRE 4

ETUDE DES MOLECULES ANTI PROLACTINES

4.1. Introduction

Les dérivés synthétiques de l'ergoline (ergot de seigle), agonistes des récepteurs dopaminergiques (*Bromocriptine* et *Cabergoline*) ont été utilisés depuis longtemps en pharmacie humaine dans le traitement des hyper-prolactinémies et le traitement de la maladie de *Parkinson* (Parlodel® et Dostinex®). En pharmacie vétérinaire, la *Cabergoline* a été utilisée dans le traitement des lactations nerveuses chez la chienne (Galastop®) pour son effet antagoniste de la *prolactine*, qui jusqu'alors, était considérée chez les femelles carnivores comme hormone de lactation à l'instar des autres femelles mammifères.

Tableau 4.1: Médicaments antagoniste de la prolactine commercialisés et utilisables pour la maîtrise de la reproduction chez la chienne [ENGLAND G; 2004].

Médicament	Nom Commercial	Formulation	Laboratoire
CABERGOLINE	GALASTOP	Sol Buv 5µg/ml	Boehringer Ingelheim Ltd CEVA Santé Animale
	DOSTINEX*	Cp de 0.5 mg	Pharmacia
BROMOCRIPTINE	PARLODEL*	Cp de 1mg et 2.5 mg	Novartis Pharmaceutical UK Ltd

(*): Spécialité de la pharmacie humaine.

L'intérêt porté à l'étude de ces molécules a grandi considérablement avec la découverte de l'importance capitale que revêt la *prolactine* dans le contrôle du système de reproduction chez les femelles carnivores domestiques et sauvages [128].

Il est évident aujourd'hui que la prolactine est le facteur lutéotrope primaire de la phase lutéale gestante et non gestante. Le corps jaune apparaît initialement comme autonome, puis à partir du 20^{ème} jour, les concentrations sériques de la prolactine s'élèvent pour se maintenir à un plateau pendant le reste de la phase lutéale [128], [03], [129].

Depuis, beaucoup d'essais cliniques randomisés se sont succédés à la recherche d'une meilleure compréhension des rôles de ses substances dans le contrôle de la reproduction des petites espèces animales et également à la recherches de nouvelles applications utiles dans la maîtrise de leur reproduction [36], [04].

La recherche pratique nous a démontré par le biais de ces séries d'essais cliniques randomisé que l'utilisation des anti-prolactines provoque la chute de la prolactinémie et par conséquent la chute de la progestéronémie plasmatique. Il a été ainsi démontré qu'une suppression prolongée de la prolactine aboutit à la terminaison de la phase lutéale et la femelle entre en anœstrus. L'administration continue des anti-prolactines pendant l'anœstrus provoque un retour en œstrus anticipé. Cependant, le mécanisme par lequel ces anti-prolactines induisent l'œstrus demeure imparfaitement élucidé incitant les chercheurs à pousser plus loin leurs investigations. [106], [03], [130], [131], [128], [07].

4.2. Rappel sur la physiologie du Système Nerveux Central et Périphérique

Le Système Nerveux intervient dans le contrôle conscient et inconscient de la motricité de base et de l'activité sensorielle. Le Système Nerveux comprend une hiérarchie à savoir: les fibres afférents partant des tissus périphériques vers la moelle épinière et constituent la perception des sensations externes et des fonctions de l'organisme; les fibres efférentes provenant de la moelle épinière et régulent l'activité des tissus périphériques et finalement le Système Nerveux Central qui débute par la moelle épinière et connecte les neurones afférents et efférents au Système Nerveux Périphérique avec le cerveau qui réalise le traitement supérieur de l'information et le contrôle exécutif [133].

Le neurone est donc l'élément de base du Système Nerveux Central et Périphérique. Les neurones se connectent les uns aux autres par le biais des synapses. Ces dernières sont alors à la base de la communication neurochimique.

Il existe des synapses dites électriques, ou jonctions communicantes; où les ions sont les transmetteurs et des synapses conjointes où les transmetteurs sont ioniques et chimiques.

La libération du neurotransmetteur et son effet dépendent du potentiel membranaire de repos du neurone et du potentiel d'action. Certains neurotransmetteurs inhibent le déclenchement des potentiels d'action en hyperpolarisant le neurone. Il existe des récepteurs pour plus de 300 molécules endogènes; actives sur le système nerveux.

Tableau: 4.2: Principales classes des récepteurs et des transmetteurs du SNC [PAGE CP et al.; 1999]

PRINCIPALES CLASSES DES RECEPTEURS ET DES TRANSMETTEURS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	
TRANSMETTEURS	RECEPTEURS
GLUTAMATE	NMDA, Non-NMDA
GABA	GABA _A GABA _B
GLYCINE	GLYCINE (sensible à la strychnine)
ACETYLCHOLINE	NICOTINIQUE MUSCARINIQUE
5-HT	5-HT _{1a-d'} 5-HT ₂₋₇
NORADRENALINE	α 1, α 2; β ₁₋₃
DOPAMINE	D ₁₋₅
CHOLECYCTOKININE	CCK _A CCK _B

Légende: CCK: Cholécystokinine; GABA: Acide gamaaminobutyrique; 5-HT: 5-hydroxytryptamine; NMDA: N-méthyl D-aspartate.

Un neurotransmetteur est une molécule synthétisée dans un neurone et libérée dans des quantités physiologiquement significatives, en réponse à un potentiel d'action. Il est alors enlevé ou désactivé dans le neurone ou l'espace synaptique. Une telle molécule administrée comme un médicament exogène reproduit les effets du neurotransmetteur. Une molécule remplissant certains de ces critères est désignée sous le nom de neurotransmetteur possible.

Les neuromodulateurs sont des molécules qui modulent la réponse d'un neurotransmetteur, alors que les neuro-hormones sont de substances libérées dans le sang et agissant sur les neurones.

Cinq types de récepteurs de la dopamine (D1-D5) ont été, jusqu'à présent, isolés dans le système nerveux. Ces récepteurs D1-D5 stimulent la formation de l'AMPc en activant une protéine G stimulante, alors que les récepteurs D2; D3 et

D4 inhibent la formation de l'AMPC en activant une protéine G inhibitrice. On trouve beaucoup plus des récepteurs D2 que de D3 et D4. Les récepteurs D3 sont surtout localisés dans le *nucleus accumbens* (un noyau du septum du système limbique) et les récepteurs D4 sont particulièrement concentrés dans le cortex frontal médian [133].

Chez l'homme par exemple, il existe une variété de voies ou de faisceaux dopaminergiques à savoir: le faisceau nigrostrial, le faisceau mésolimbique/mésocortical et le faisceau tubéro-infundibulaire. Les corps cellulaires se trouvent dans le noyau arqué et la zone périventriculaire de l'hypothalamus et donne des projections dans l'infundibulum et l'hypophyse antérieure. La dopamine inhibe la libération de la prolactine dans ce faisceau.

La dopamine est synthétisée par la voie commune des catécholamines et est métabolisée par deux enzymes à savoir la MAO-B qui est intra neurale et la catéchol-o-méthyl transférase (COMT) qui est extraneuronale. Le métabolite principal est l'acide homovanillique (HVA).

On estime que les récepteurs D2 des cellules lactotropes de l'antéhypophyse sont les récepteurs dopaminergiques les plus importants dans l'action des anti-prolactines agonistes de la dopamine. La puissance et l'efficacité de ces produits sont corrélées avec leur affinité pour les récepteurs D2 (Voir Figure 4.1).

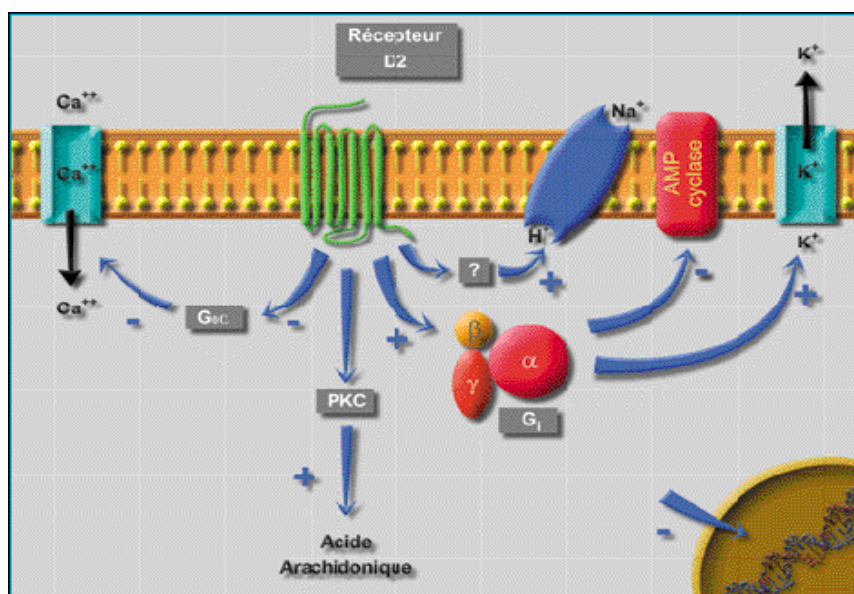


Figure 4.1: Voies de signalisation présumée du récepteur dopaminergique D2 dans la cellule lactotrope. Réalisé en collaboration avec Graphmed, Liège, Belgique. [BECKERS A, SOCIN HV., 2000]

4.3. Etude des anti-prolactines agonistes de la dopamine

Les agonistes dopaminergiques, comme leur nom l'indique, sont des substances qui stimulent les récepteurs dopaminergiques précédemment cités. On peut distinguer les agonistes à effet périphériques dominant qui pénètrent mal dans le cerveau, et les agonistes à effet central dominant qui pénètrent bien dans le cerveau. Le principal agoniste de ce type est la dopamine

Les agonistes dopaminergiques à effets centraux traversent la barrière hémato-encéphalique et possèdent des effets centraux de type neurologique et endocrinien. Ils sont utilisés dans le traitement de l'hyper-prolactinémie et le *Parkinson* particulièrement chez l'homme.

Ce sont des dérivés de l'ergot de Seigle comme la *bromocriptine*, le *lisuride*, le *pergolide* et la *Cabergoline* et des molécules non dérivées de l'ergot de Seigle comme l'*apomorphine*, le *piribedil*, le *quinagolide*, le *robiniole* et le *pramipexole*.

Les agonistes dopaminergiques à effets centraux ont des effets indésirables mais dont la fréquence et l'importance diffèrent selon les produits et dépendent de la durée d'utilisation.

En cas d'effet indésirable grave ou de surdosage, l'arrêt transitoire ou définitive du médicament en cause est nécessaire, il est de plus possible de recourir à un antagoniste des récepteurs dopaminergique, soit à effet périphérique comme la dompéridone, soit à effet central comme un neuroleptique.

4.3.1. Pharmacie chimique des anti-prolactines agonistes de la dopamine

Chimiquement, la *Cabergoline* est la 1,6 dimethyl-8 β carbobenzyloxyaminométhylergoline, comme la bromocriptine (ParlodelND) et la metergoline (ContralacND), elle appartient à la classe pharmacologique des inhibiteurs de la prolactine. Sa formule développée est représentée par la Figure 6.3.

La Cabergoline est un agoniste dopaminergique. Elle stimule directement les récepteurs à dopamine de l'antéhypophyse et entraîne ainsi l'inhibition de la

synthèse de la prolactine. Il en découle un arrêt de la production lactée lors des phénomènes de pseudo gestation [134].

La structure chimique de la *Cabergoline* (Cf Figure 6.3) très proche de celle de la *Méteergoline* permet de comprendre des propriétés pharmacologiques analogues à cette dernière.

La principale différence se situe au niveau des effets secondaires dans la mesure où la composante comportementale prépondérante dans la *Méteergoline* est beaucoup moins marquée avec la *Cabergoline*. Cependant, les études montrent que la tolérance à la *Cabergoline* est bonne chez l'animal de laboratoire autant que chez l'espèce ciblée. Les doses létales orales sont de l'ordre de plus de 200 mg/kg pour la toxicité aigüe [134].

4.3.2. Pharmacocinétique des anti-prolactines agonistes de la dopamine

L'absorption digestive de la *Cabergoline* est importante. Elle se concentre de façon conséquente dans le foie, les glandes surrénales, la rate, les reins et les poumons, et de façon moindre dans les ovaires, l'utérus et le cœur [135].

Après administration orale du produit marqué, le produit est absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal avec une concentration plasmatique maximale de radioactivité entre 0.5 et 4 heures. La molécule mère subit vraisemblablement une forte dégradation.

Dix jours après l'administration, environ 18 et 72% de la dose radioactive sont respectivement éliminés dans les urines et les fèces. Le produit inchangé éliminé dans les urines représente 2 à 3 % de la dose. 7 à 9 % de la dose sont retrouvés sous forme de métabolites dans les urines.

La demi-vie d'élimination de la *Cabergoline*, estimée indirectement à partir des taux d'excrétion urinaires, est longue (de 63 et 68 heures chez les volontaires sains, de 79 et 115 heure chez les patients hyper-prolactinémiques). La variabilité inter-individuelle est très grande (et les valeurs des concentrations plasmatiques sont fréquemment inférieures aux limites de quantification des méthodes de dosages utilisées).

L'état d'équilibre serait atteint après 4 semaines. La liaison aux protéines plasmatiques est de 41 à 42% dans une gamme des concentrations de 0.1 à 10 ng/ml.

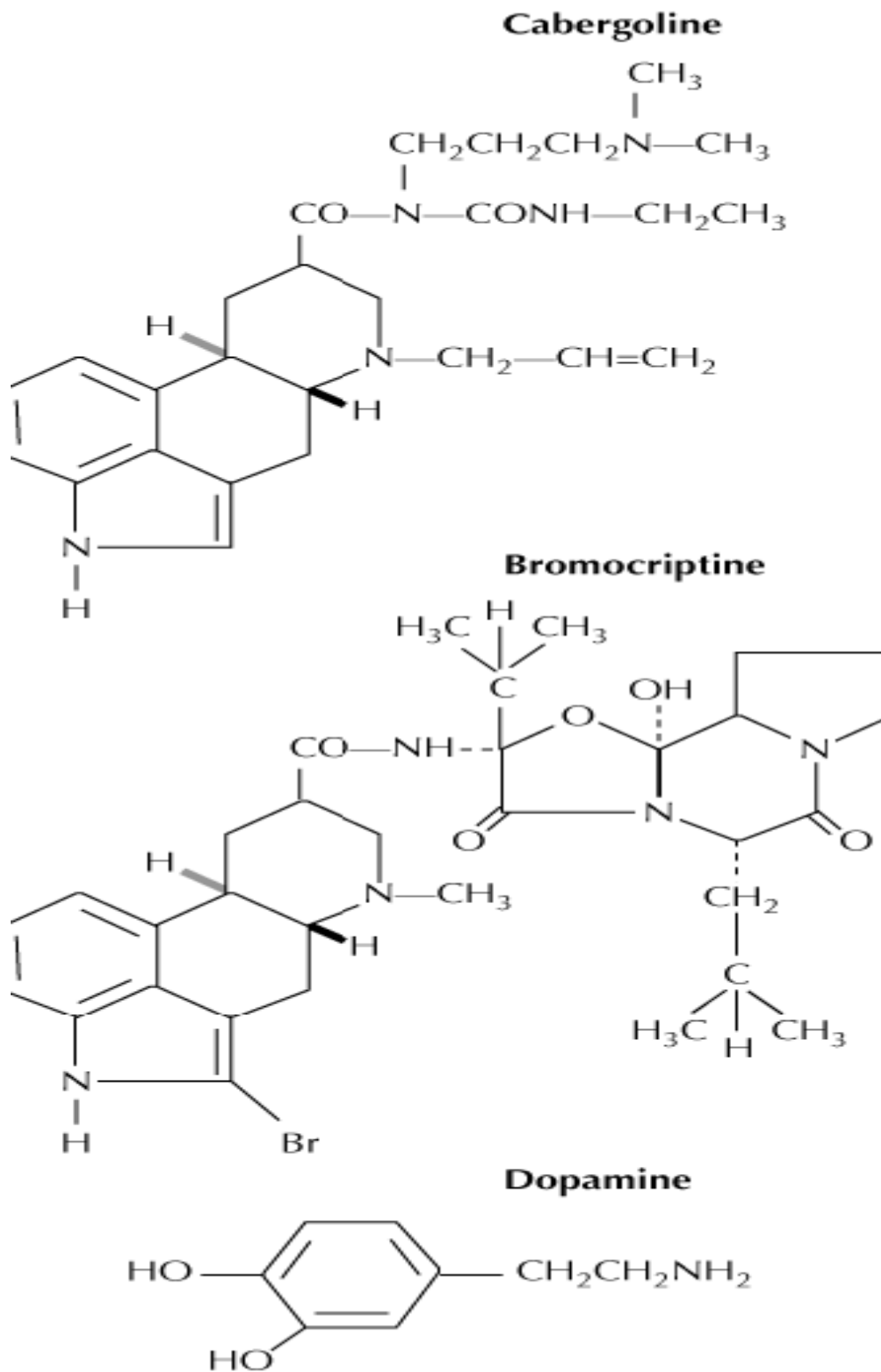


Figure 4.2: Structure chimique de la Cabergoline comparée à celle de la bromocriptine et de la dopamine.
[BECKERS A, SOCIN HV., 2000]

La Cabergoline présente une élimination plasmatique lente. Sa demi-vie est de 17 à 24 heures, et la demi-vie minimale de sa fixation hypophysaire est de 60 heures. En conséquence, après l'interruption de son administration, l'action de la Cabergoline se prolonge au-delà de 48 heures [136], [137]. Son élimination est essentiellement urinaire, elle est représentée par une courbe bi phasique avec un premier pic à 7 h 30mn après son administration et un second pic 65 heures après [137].

Chez l'insuffisant rénal, il semble que les modifications d'excrétion soient mineures; chez l'insuffisant hépatique sévère, une diminution du métabolisme de la molécule est constatée, entraînant une augmentation de concentrations plasmatiques de la *Cabergoline* et de ses dérivés.

4.3.3. Pharmacologie des anti-prolactines agonistes de la dopamine

La Cabergoline est un dérivé de l'*ergoline* caractérisé par un effet inhibiteur de la prolactine. La *Bromocriptine* appartient à cette famille des dérivés de l'ergot de seigle. Un agoniste de la dopamine, elle-même un Prolactin Inhibiting Factor (PIF) [135].

La Cabergoline a une action centrale positive sur les voies dopaminergiques (molécule agoniste dopaminergique de type D2), au niveau hypothalamo-hypophysaire et une action périphérique sur l'adéno-hypophyse: effet agoniste spécifique, puissant et prolongé sur les récepteurs D2 des cellules lactotropes; stimulation de la CTZ de l'arée posterema : faible effet hypotenseur. [136], [137].

La *Cabergoline* est la molécule la plus puissante parmi les anti-prolactines existant en médecine vétérinaire et humaine. Son effet est, par exemple, six fois plus puissant que celui de la *Bromocriptine* [137].

Cette action est également de longue durée. Cela s'explique par la persistance de la *Cabergoline* dans l'hypophyse durant plusieurs jours.

Enfin, son activité est sélective: la *Cabergoline* n'a pas d'autre action endocrine et est pratiquement dénuée d'effets centraux (marge de sécurité

importante, au contraire de la *Bromocriptine* qui induit de nombreux vomissements) [138].

Le traitement à base de dérivés de l'*ergoline* inhibe de façon rapide et prolongée la sécrétion de *prolactine*. La période lutéale est diminuée de 78% chez les chiennes traitées à la *Bromocriptine* en comparaison aux chiennes témoins [135].

Lorsque des chiennes gestantes ou non sont traitées par une anti-prolactine (*Metergoline*), l'intervalle interœstral est diminué de façon significative [126].

Les schémas de sécrétion de la progestérone sont identiques chez les chiennes traitées à la bromocriptine entre le 1^{er} et le 5^{ème} jour et entre le 20^{ème} et 24^{ème} jour du cycle lutéal et les chiennes non traitées. Cela met en évidence que le corps jaune est indépendant de la prolactine jusqu'au 40^{ème} jour de la gestation [139].

De faibles taux de LH sont nécessaires au fonctionnement du corps jaune, au contraire, de fortes concentrations en prolactine sont nécessaires durant la seconde partie de vie du corps jaune. Cette affirmation trouve un écho dans les conclusions de FERNANDES et al, en 1987, qui montrent que la concentration des récepteurs à prolactine est maximale au 40^{ème} jour de la phase lutéale [139].

Les agonistes dopaminergiques administrées chez une femelle gestante, entraînent systématiquement un avortement par une diminution brutale de la libération de la progestérone. Une progestéronémie inférieure à 2 ng/ml (équivalent à 6nmol/l) est la preuve du succès du traitement à la Cabergoline [140]. Le niveau de sécrétion basale de progestérone est atteint en 2 à 5 jours (lutéolyse fonctionnelle) [136].

La stimulation dopaminergique peut causer des nausées ou des vomissements et ceci représente l'effet secondaire principal notamment de la *Bromocriptine*. On peut assister aussi à une léthargie et une constipation occasionnelle. Ces effets secondaires sont beaucoup moins prononcés avec la *Cabergoline*. Il est possible de réduire ces effets avec la *Bromocriptine* en utilisant

le minimum de dose efficace et en mélangeant le médicament avec un aliment. Il est à noter ici que les antiémétiques spécifiques tel que la *métoclopramide* peuvent prévenir les vomissements, cependant, leur utilisation n'a pas de sens pharmacologique, car ils agissent par le même biais des récepteurs dopaminergiques [128].

4.3.4. Mode d'action de déclenchement des chaleurs des agonistes dopaminergiques

Les agonistes dopaminergiques utilisés pour induire l'œstrus chez la chienne sont des dérivés de l'ergot qui inhibent la sécrétion de la *prolactine*. Ils régulent l'action dopaminergique (*Bromocriptine* et *Cabergoline*) et sérotoninergique (*Méteergoline*). La *Méteergoline* qui est un antagoniste de la sérotonine décroît les concentrations de la *prolactine* et exerce également un effet agoniste dopaminergique quand elle est utilisée à des fortes doses indiquées pour l'induction de l'œstrus. Pour cette raison, le même mécanisme d'action est proposé pour les trois molécules [04].

Le mécanisme précis des agonistes dopaminergiques dans le raccourcissement de l'anœstrus n'est pas encore parfaitement connu. Il reste à déterminer si cette action provoque une diminution de la concentration en prolactine par son effet dopaminergique ou par une action dopaminergique directe sur l'axe gonadotrophique ou sur les récepteurs gonadotrophiques ovariens. La prolactine possède quelques effets anti-gonadotrophiques et/ou des effets de diminution de la réponse ovarienne aux gonadotrophines chez certaines espèces animales, bien que l'interaction exacte entre la prolactine et les gonadotrophines n'est pas encore connue chez la chienne. La prolactine diminue lentement depuis la fin du Metoestrus jusqu'à la fin de l'anœstrus, et les agonistes dopaminergiques induisent l'œstrus chez la chienne.

Des études ont montré que les concentrations de la FSH sont élevées et les concentrations de la LH sont faibles pendant presque tout l'anœstrus. La FSH et la LH augmentent progressivement à la fin de la période d'anœstrus. Cet accroissement de la concentration en LH cause probablement une amplification de la folliculogénèse à la fin de l'anœstrus. Inversement, il a été récemment rapporté un accroissement de la concentration en FSH sans augmentation

concomitante de la LH chez les femelles induites à la bromocriptine. Cette découverte indique que la bromocriptine cause l'accroissement de la concentration en FSH qui à son tour augmente le développement folliculaire. L'absence de corrélation entre la *prolactine* et la LH et d'autre part la concentration basale en prolactine pendant l'anœstrus sont deux éléments en défaveur de l'hypothèse qui implique la prolactine dans la terminaison de l'anœstrus.

D'ailleurs, le raccourcissement de l'intervalle interœstral obtenu par administration de la *Méteergoline* à des doses élevées dites dopaminergiques et non obtenu par les faibles doses usuelles dites anti-sérotoninergiques suggère l'existence d'un effet non dépendant de l'inhibition de la prolactine mais une autre action agoniste dopaminergique. Les études conduites sur les rats ont mis en évidence un effet stimulateur direct de la dopamine dans la synthèse de la GnRH par les neurones hypothalamo-hypophysaires. Ces résultats concordent avec les résultats rapportés précédemment qui montrent que la GnRH est produite par l'éminence médiane en réponse à l'administration centrale de la dopamine, cependant les résultats obtenus chez les rats semblent hétérogènes et l'extrapolation à l'espèce canine hypothétique. Le rôle des voies dopaminergiques dans le contrôle de la sécrétion gonadotrophique demeure inconnu chez la chienne [04].

Il a été également postulé que les agonistes dopaminergiques ont un effet direct sur les ovaires. Il est possible que la *Cabergoline* puisse provoquer la maturation des récepteurs ovariens des gonadotrophines par son action agoniste dopaminergique. Il en est conclu qu'à présent l'hypothèse la plus plausible pour expliquer l'action des agonistes dopaminergiques semble être un effet de stimulation directe soit par libération des gonadotrophines ou bien par une action sur le tissu ovarien [04].

4.4. Conclusion

Les applications cliniques de ces protocoles d'induction de l'œstrus comprennent le traitement de l'anœstrus primaire et secondaire et le raccourcissement des intervalles interœstraux chez la chienne à des fins

d'élevage. Les agonistes dopaminergiques tel que *Bromocriptine* et *Cabergoline* ont été récemment inclus avec succès dans les méthodes d'induction de l'œstrus. La plus plausible des hypothèses expliquant le mécanisme d'action semble être un effet stimulateur direct des agonistes dopaminergiques soit par libération des gonadotrophines soit par action directe sur le tissu ovarien. En dépit du fait que le mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé, ces protocoles d'induction sont efficaces dans l'induction d'œstrus fertile chez la chienne [04].

CHAPITRE 5 PARTIE EXPERIMENTALE

5.1. Introduction et Objectifs

Les anti-prolactines notamment agonistes de la dopamine représentent actuellement le meilleur outil pour instaurer un protocole d'induction de l'œstrus chez la chienne sur le plan efficacité, sécurité, simplicité et coût aussi [08], [59]. Beaucoup d'études comparatives dans la littérature évaluent l'efficacité des différents protocoles d'induction chez la chienne par des essais cliniques ou dans des conditions expérimentales. La *Cabergoline* a été évaluée comparativement à la *Busereline* (Agoniste de la GnRH) par des essais cliniques et s'est avérée pratiquement plus efficace [09].

Cependant, aucune évaluation comparative n'a été faite jusque là entre les deux anti-prolactines agonistes dopaminergiques disponibles et utilisables pour l'induction de l'œstrus chez la chienne qui sont la *Bromocriptine* et la *Cabergoline*.

Le vétérinaire Algérien qui en clientèle se trouve en face d'une indication d'induction de l'œstrus chez la chienne, ne trouve dans l'arsenal médicamenteux qui lui est accessible que le Parlodel® pour la *Bromocriptine* dans la pharmacie humaine et le Galastop® pour la *Cabergoline* dans la pharmacie vétérinaire (Cf Tableau 4.1).

A priori, et pour des raisons de disponibilité et coût, le choix est en faveur du Parlodel® qui est disponible dans notre pays par rapport au Galastop® et qui coûte beaucoup moins cher. Si le Parlodel® s'avère cliniquement plus efficace ou aussi efficace et inoffensif que le Galastop®, il représentera alors le produit de choix à recommander pour le déclenchement volontaire des chaleurs chez la chienne en clientèle vétérinaire dans notre pays.

L'objectif de cet essai clinique est de répondre à cette question et d'évaluer comparativement l'efficacité clinique de deux protocoles de traitement à base de ces deux molécules (*Bromocriptine* versus *Cabergoline*) dans l'induction de l'œstrus chez la chienne domestique en Algérie. Cette évaluation a été faite au

vue de plusieurs critères à savoir le taux d'induction, le taux de gestation, le taux de natalité, la taille de la portée (prolificité), la durée du traitement, le raccourcissement de l'intervalle interœstrus (raccourcissement de l'anœstrus) et l'effet sur la durée de l'interœstrus du cycle suivant le cycle induit (retour en chaleur après cycle induit).

Vers la fin, les données cytologiques (frottis vaginaux) et hormonales (dosages de la progestérone) recueillies à travers la période d'étude ont été exploitées statistiquement en vue d'évaluer un sens de corrélation entre la progestéronémie et les taux cellulaires (taux d'éosinophilie taux de basophilie), puis d'affiner cette corrélation par l'application de certains critères à ces paramètres hormonaux et cellulaires.

Durant le proœstrus, la progestéronémie est inférieure à 2ng/ml de sérum [141]. Donc au tout début de cette phase, il apparaît que la mesure de la progestéronémie fait doublon avec les frottis vaginaux. L'objectif de cette étude statistique était de trouver un ou plusieurs critères cytologiques déterminant un seuil bas de progestéronémie c'est à dire permettant d'affirmer que le taux de progestérone est inférieur à 2ng/ml. Ceci éviterait donc de faire des mesures coûteuses et inutiles de cette hormone en début de pro-œstrus.

Cette approche diffère de celle de l'induction, car la population d'étude ici n'est plus représentée par les seize chiennes qui constituaient le cheptel expérimental lors des essais cliniques d'induction précédents, mais elle est représentée cette fois-ci par l'ensemble des données recueillies pendant toute la période d'étude et pour lesquelles la même chienne peut être reconsidérée plusieurs fois dans des cycles de suivi différents.

5.2. Matériels et méthodes

5.2.1. Lieu de l'expérimentation (CFC/GN de Baïnem)

L'expérimentation a été réalisée au niveau du Centre de Formation Cynotechnique de la Gendarmerie Nationale de Baïnem, qui est un centre spécialisé de la Gendarmerie Nationale chargé de la formation du personnel militaire destiné au domaine de la cynotechnie c'est-à-dire l'emploi utilitaire des chiens de service de Gendarmerie (Cf APPENDICE B).

Le Centre de Formation Cynotechnique de la Gendarmerie Nationale dispose de chenils conformes aux normes zootechniques requises en matière d'habitat des chiens et dispose des moyens humains et matériels lui permettant d'assurer aux chiens qu'il accueille soins et confort psychologique.

5.2.2. Cheptel canin expérimental

Le cheptel expérimental est constitué de seize chiennes (n = 16) domestiques vivant dans le chenil du Centre de Formation Cynotechnique de la Gendarmerie Nationale, logées chacune dans une courette individuelle en respect des conditions sanitaires et de confort psychologique.

Elles sont nourries à base d'aliment sec industrialisé de qualité super premium, en une seule ration quotidienne distribuée en fin de journée, et abreuvées à volonté (Ad Libitum).

Pour chaque chienne, le CFC/GN détient un dossier médico-administratif complet.

Le suivi médical depuis l'arrivée de chaque chienne au centre figurait sur son dossier. Il contenait les pesées mensuelles, les dates de vaccination ainsi que les antécédents pathologiques accompagnées de leurs traitements.

La carrière reproductrice de chaque chienne était répertoriée sur son dossier. Les dates des chaleurs, les dates des saillies, le ou les males utilisés pour les saillies, les dates de mises bas ainsi que la taille des portées y étaient mentionnés.

En dehors du cadre de la présente expérimentation, ces chiennes sont soumises à un suivi sanitaire périodique et un contrôle médical continu assurés par le Service Vétérinaire du Centre de Formation Cynotechnique de la Gendarmerie Nationale au même titre que le reste du cheptel canin du Centre.

Avant le début du suivi préliminaire ayant précédé la présente expérimentation, ces chiennes ne faisaient l'objet d'aucun suivi médicalisé des chaleurs, et les saillies pratiquées auparavant se faisaient de manière subjective, sur la base de l'observation des écoulements vaginaux et le comptage de nombre de jours à partir du début d'écoulement.

Les seize ($n = 16$) femelles de l'expérimentation étaient alors âgées de 4.63 ± 0.53 ans (Moy \pm SEM) avec un intervalle de [4.09 – 5.16].

Elles pesaient habituellement 25.81 ± 1.53 Kg (Moy \pm SEM) avec un intervalle de [24.28 – 27.34].

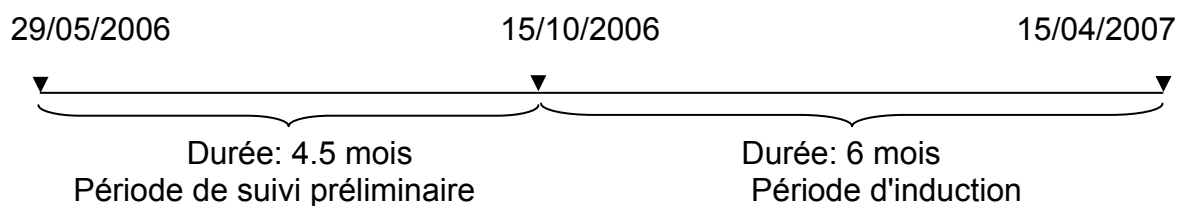
Hors mise une femelle de race commune (corniaud), les quinze (15) femelles restantes appartiennent à cinq races différentes à savoir dans l'ordre décroissant de leurs effectifs relatifs: Berger. Allemand (10/16), Berger. Belge. Malinois (02/16), Berger de l'Atlas (01/16), Sloughi Azawakh (01/16) et Doberman (01/16). La race du Berger Allemand prédominait avec un pourcentage de 62,5 %. Cependant, aucune sélection n'a été faite sur la base du facteur race.

Un état nominatif de ces seize (16) femelles de l'expérimentation est en appendice (APPENDICE C) et la fiche individuelle de renseignement reproductif est également annexée (APPENDICE D).

5.2.3. Période expérimentale

La première période expérimentale s'étalant sur quatre mois de demi (4.5 mois) et allant du 29 mai au 15 octobre de l'année 2006 représente une période de suivi préliminaire sans traitement d'induction.

La deuxième période expérimentale dite d'induction s'étale sur six (06) mois et va du 15 Octobre 2006 jusqu'au 15 Avril 2007. C'est la période d'application des traitements d'induction des chaleurs et comprend les périodes de traitement et de suivi per et post traitement de toutes les femelles induites.



5.2.4. Protocole expérimental

5.2.4.1. Sélection des femelles de l'expérimentation

Sur la totalité des chiennes disponibles au chenil central du Centre de Formation Cynotechnique de la Gendarmerie Nationale, les seize chiennes domestiques constituant le cheptel expérimental ont été sélectionnées sur la base des facteurs suivants:

L'âge: seules ont été retenues les chiennes âgées entre trois (03) et sept (07) ans avec une moyenne de 4.63 ± 0.53 ans (Moy \pm SEM). Ainsi, nous avons exclu du cheptel les jeunes chiennes n'ayant pas encore extériorisé leurs chaleurs, ainsi que les chiennes ayant dépassé l'âge de sept (07) ans.

L'état de santé: Toute femelle présentant une quelconque pathologie d'ordre général ou intéressant la fonction reproductrice ou l'appareil génital a été exclue de cette expérimentation. Exception faite pour les cas d'ancœstrus primaire et secondaire sans causes extra-gonadiques qui étaient gardées dans le cheptel expérimental à des fins d'étude.

Même si la race du Berger Allemand prédominait dans le cheptel expérimental avec un pourcentage de 62,5 %, il y a lieu de préciser qu'aucune sélection n'a été faite sur la base de la race.

Le cheptel expérimental de seize (16) femelles a été divisé en deux (02) lots d'étude de huit (08) chiennes chacun. Les chiennes du Lot A (n=8) ont subi un traitement d'induction de l'œstrus à base de *Bromocriptine* (Parlodel© cp 2.5 mg) et les femelles du Lot B un traitement d'induction de l'œstrus à base de *Cabergoline* (Galastop ©).

La constitution des lots a été effectuée en fonction des critères d'étude suivants:

L'intervalle interœstral: Les femelles connues pour leurs intervalles interœstraux prolongés de façon inhabituelle mais physiologique accusant ainsi une hypo prolificité ont été sélectionnées dans le cheptel expérimental et réparties équitablement sur les deux lots d'étude lors des essais d'induction dans l'intention d'évaluer l'efficacité du traitement d'induction en cas d'intervalle interœstral anormalement prolongé.

L'anoestrus primaire et secondaire: Les femelles présentant un problème d'anoestrus primaire ou secondaire ont été sélectionnées dans le cheptel expérimental et réparties équitablement sur les deux lots d'étude pour évaluer l'efficacité du traitement d'induction sur l'anoestrus primaire et secondaire.

Le stade d'anoestrus: Les lots ont été constitués de manière à retrouver dans le lot de traitement d'induction trois stades d'anoestrus, à savoir le début, la moitié et la fin d'anoestrus.

5.2.4.2. Suivi préliminaire des femelles de l'expérimentation

5.2.4.2.1. Objectif du suivi préliminaire

Les seize femelles sélectionnées pour cette expérimentation ont été mises sous suivi pour leur cycle œstral pendant une période préliminaire allant de la fin du mois de mai 2006 jusqu'à la moitié du mois d'octobre 2006 totalisant ainsi quatre (04) mois et demi de suivi du cycle, et ce dans le but de:

- Evaluer leurs cyclicités et mieux connaître leurs profils de cytologie vaginale et de progestéronémie avant d'entamer l'expérimentation proprement dite (l'induction de l'œstrus) surtout que ces femelles n'ont fait auparavant l'objet d'aucun suivi médicalisé de leur chaleurs, et que tous leurs cycles reproductifs précédents ont été suivis de manière subjective.
- Calculer sur une base relativement fiable leurs intervalles inter œstraux précédents sur la base des données recueillies dans leurs dossiers et celles provenant de ce suivi préliminaire.

- Choisir sur une base fiable le moment propice pour instaurer les deux traitements d'induction de façon simultanée aux deux lots A et B (de telle sorte que les critères de constitution des lots qui reflètent les critères d'étude soient réunis dans le cheptel expérimental).

5.2.4.2.2. Modalité du suivi

Le suivi préliminaire des femelles de l'expérimentation consistait en des visites périodiques bihebdomadaires. Chaque visite comprend un examen clinique gynécologique, un examen cytologique vaginal (frottis vaginal) et une prise d'un échantillon sanguin pour le dosage ultérieur de la progestérone.

5.2.4.2.2.1. Examen clinique gynécologique:

A chaque visite bihebdomadaire, les femelles sont soumises individuellement à un examen clinique général puis un examen spécial de l'appareil génital à la recherche des signes cliniques et comportementaux des chaleurs. Les résultats de cet examen sont consignés sur une fiche de suivi préétablie et préalablement conçue à cet usage (Cf APPENDICE E).

5.2.4.2.2.2. Examen Cytologique Vaginal (ECV):

A chaque visite, toutes les femelles subissent systématiquement un frottis vaginal qui est réalisé de la manière décrite et présentée en annexes (Cf APPENDICES G & K).

Une fois les cellules vaginales prélevées, le coton est immédiatement fait rouler sur l'extrémité d'une lame porte objet de microscope qui est immédiatement plongée pendant cinq (05) minutes dans un mélange alcool-éther ce qui va assurer la fixation de l'étalement. Après cette étape; la coloration pourrait être différée si nécessaire.

La lame est ensuite colorée selon la méthode du trichrome d'Harris-Schorr qui est technique de coloration contraignante mais de référence. (Cf APPENDICES H – I - K).

5.2.4.2.2.3. Prise d'échantillon sanguin et dosage de la progestérone (RIA):

A chaque visite, et à l'issue de l'examen clinique et cytologique de la femelle, il est procédé à une prise d'échantillon sanguin à partir de la veine radiale

et à l'aide d'un dispositif vacutainer sur tube sous vide hépariné pré identifié avec de l'encre indélébile.

Immédiatement séparé, le plasma est recueilli dans des cônes Ependorf secs pré-identifiés qui sont conservé à -18°C jusqu'à envoi au laboratoire.

Le dosage de la progestérone sera fait à posteriori par méthode radio immunologique au Laboratoire de Zootechnie du Centre de Recherche Nucléaire de Draria.

5.2.4.3. Traitements d'induction

5.2.4.3.1. Constitution des lots de traitement

Avant l'application des traitements d'induction, nous avons constitué deux lots de traitement d'induction à savoir le "**Lot A**" d'un effectif de huit (08) femelles (**n=8**) et dit "**lot d'induction à la Bromocriptine**" et un "**Lot B**" d'un effectif de huit (08) femelles (**n=8**) et dit "**lot d'induction à la Cabergoline**".

Comme expliqué précédemment, pour la constitution de ces lots d'étude, nous avons observé une période de suivi et de sélection (4.5 mois) au cours de laquelle nous avons choisi parmi les seize (16) chiennes de l'expérimentation, les femelles qui étaient en anœstrus confirmé par examen clinique de l'appareil génital externe, par examen de cytologie vaginale et finalement par dosage de la progestérone plasmatique qui doit être inférieure au seuil basal (dosage individuel effectué dans un laboratoire d'analyse médicales pour des résultats rapides) au moment du début des traitements d'induction.

Les données anamnestiques et les antécédents reproductifs ainsi que les données du suivi préliminaire nous ont permis de sélectionner parmi les seize (16) femelles de l'expérimentation huit (08) chiennes présentant des anomalies de cyclicité et qui se répartissent comme suit:

Quatre (04) femelles qui présentent un intervalle interœstral très long bien qu'il reste dans les limites physiologiques rapportées dans la littérature. Ces quatre (04) femelles présentées dans le tableau ci-dessous ne représentent donc pas des motifs d'anœstrus secondaire. Il s'agit de la femelle nommée NEBRASKA code 13, présentant les deux derniers intervalles interœstraux respectivement de

9 mois et 10 mois; la femelle nommée RYM code 14, présentant les deux derniers intervalles interœstraux respectivement de 8 mois et 10 mois; la femelle nommée VENUS code 15, présentant les deux derniers intervalles interœstraux respectivement de 8 mois et 7.5 mois et finalement la femelle nommée XAVA code 16, présentant les deux derniers intervalles inter pro-œstrus respectivement de 9 mois et 10 mois;

Deux (02) femelles en anœstrus primaire qui sont la femelle nommée ARINA Numéro de code 01 et la femelle nommée DATCHA Numéro de code 05;

Deux (02) femelles en anœstrus secondaire et qui sont la femelle IRA02 numéro de code: 08 n'ayant pas manifesté de chaleurs depuis plus de seize (16) mois, et la femelle nommée LISA numéro de code 09 n'ayant pas manifesté de chaleurs depuis plus de 19 mois. Ces deux dernières femelles ont été soumises à des explorations cliniques et biologiques pour écarter toutes causes extra gonadiques de cet anœstrus.

Ces huit (08) femelles à cyclicité anormale ont été réparties équitablement sur les deux lots d'induction à savoir la **lot A** et le **lot B** de telle sorte qu'il y ait deux (02) femelles à interœstrus long, une femelle en anœstrus primaire et une femelle en anœstrus secondaire dans chaque lot d'induction.

Les données relatives aux intervalles interœstraux précédents des femelles de l'expérimentation (des deux lots d'induction) ont été recueillies depuis leurs dossiers ainsi que des données du suivi préliminaire de leur cycle effectué durant la période qui précède cette expérimentation. Ces données sont représentées par les deux tableaux suivants:

Tableau N° II.1a: Constitution de lots de femelles à cyclicité normale et régulière.

Ordre	Nom/Code	Lot	Intervalle Interœstral	Intervalle Interœstral	Intervalle Proœstrus - J ₁ traitement
01	BONA01/02	(Lot A)	177 jours	185 jours	63 jours (Metoœstrus)
02	BONA02/03	(Lot A)	158 jours	166 jours	87 jours (début anœstrus)
03	DOUSHKA/06	(Lot A)	181 jours	174 jours	128 jours (mi-anœstrus)
04	IRA01/07	(Lot A)	161 jours	157 jours	126 jours (Fin d'anœstrus)
05	MITCHA/12	(Lot B)	189 jours	194 jours	63 jours (Metoœstrus)
06	CHARLOTTE/04	(Lot B)	161 jours	166 jours	90 jours (début d'anœstrus)
07	LYSA/11	(Lot B)	179 jours	183 jours	120 jours (mi-anœstrus)
08	LORA02/10	(Lot B)	186 jours	178 jours	135 jours (fin d'anœstrus)

Tableau N° II.1b : Constitution de lots de femelles à cyclicité anormale.

Ordre	Nom/Code	Lot	Intervalle Interœstral	Intervalle Interœstral	Intervalle Proœstrus - J ₁ traitement
01	NEBRASKA/13	(Lot A)	270 jours	299 jours	229 jours
02	RYM/14	(Lot A)	253 jours	311 jours	297 jours
03	VENUS/15	(Lot B)	243 jours	213 jours	270 jours
04	XAVA/16	(Lot B)	267 jours	307 jours	221 jours
05	IRA02/08	(Lot A)	ND	ND	478 jours
06	LISA/09	(Lot B)	ND	ND	536 jours
07	ARINA/01	(Lot A)	ND	ND	ND
08	DATCHA/05	(Lot B)	ND	ND	ND

5.2.4.3.2. Moment du début de traitement (Détermination du J₁)

Le traitement d'induction a débuté le 15 Octobre 2006 simultanément pour les deux lots d'induction le **lot A** d'induction à la Bromocriptine et le **lot B** d'induction à la Cabergoline.

La situation du cheptel expérimental au moment du début des deux traitements d'induction est présentée par les deux tableaux ci-dessus (Cf Tableaux II.1a & II.1b).

Pendant cette période de traitement d'induction, ces deux lots d'étude étaient hébergés et suivis séparément pour éviter toute inter-influence sensorielle pouvant compromettre les résultats d'induction. Ce ci a été facilité par la grande capacité d'accueil du Centre de Formation Cynotechnique de la Gendarmerie Nationale de Baïnem qui dispose de plusieurs chenils séparés et d'un personnel spécialisé et disponible capable de prendre en charge ces femelles séparément.

5.2.4.3.3. Protocole de traitement

Protocole d'induction à la Bromocriptine

Le traitement d'induction à la Bromocriptine destiné aux chiennes du **lot A** consistait à administrer de la Bromocriptine (Parlodol® cp sec 2.5 mg Novartis) à la dose 0.05 mg/kg de Poids Vif par jour PO. Cette dose quotidienne administrée à une heure fixe de la journée se continue du 15/10/2006 jusqu'à apparition des signes du pro-œstrus ou pendant une période de traitement maximale de 40 jours [36], [142].

Ce protocole a été introduit progressivement, en commençant par une faible dose de 0.6 mg/chienne pendant trois jours puis la dose est élevée progressivement jusqu'à atteindre la dose complète (0.05 mg/kg de PV) et cela pour éviter l'effet émétisant de la bromocriptine. La littérature rapporte que cette méthode s'est avérée très efficace dans la prévention de l'effet émétisant de cette molécule [119].

Protocole d'induction à la Cabergoline

Le traitement d'induction à la Cabergoline destiné aux chiennes du **lot B** consiste en l'administration par voie orale de la Cabergoline à la dose de 0.005

mg/kg PO, soit 0.1 ml par Kg de Poids Vif d'une solution buvable de Galastop® d'une contenance de 15ml (Galastop® Sol.Orale 15ml. CEVA Santé Animale. Fabricant: VETEM. Sp.A. – Italie). Cette administration quotidienne à une heure fixe de la journée se continue jusqu'à apparition des signes du pro-œstrus ou pendant une période maximale de traitement de 40 jours.

5.2.4.3.4. Critère de positivité du traitement

Pour le protocole d'induction à la *Bromocriptine*, la chienne est considérée comme ayant répondu au traitement d'induction si elle manifeste les signes cliniques, cytologiques et hormonaux (évalué à posteriori) d'un pro-œstrus dans la période s'étalant du premier jour de traitement jusqu'à (15) jours après l'arrêt du traitement, soit 55jours à compter du début de traitement [36], [142].

Pour le protocole d'induction à la *Cabergoline*, la chienne est considérée comme ayant répondu au traitement d'induction si elle manifeste les signes cliniques, cytologiques et hormonaux (évalué à postériori) d'un pro-œstrus dans la période s'étalant du premier jour de traitement jusqu'à 40 jours de traitement [36], [142].

5.2.4.4. Suivi du cycle pendant et après le traitement d'induction

Le suivi du cycle œstral pendant et après le traitement d'induction permet d'évaluer l'efficacité de ce traitement en déclenchant un œstrus avec ovulation, suivie d'une conception puis une gestation qui aboutisse à la naissance de chiots en bonne santé.

Ce suivi clinique, cytologique et hormonal accompagnera toutes les femelles de l'expérimentation pendant toute la période d'étude, cependant la cytologie et la prise de sang pour dosage de la progestérone sont arrêtées une fois l'état gestatif confirmé. La gestation est suivie cliniquement jusqu'à mise bas pour recueillir les données liées aux taux de gestation, de natalité et la taille de la portée. La date d'apparition du prochain pro-œstrus de la femelle est notée pour évaluer le retour en chaleur après cycle induit (évaluer la durée de l'intervalle interœstral du cycle suivant le cycle induit).

En somme, outre le critère de positivité du traitement retenu pour nos essais cliniques et appelé (Taux d'induction), il y a lieu d'établir et suivre d'autres critères d'évaluation de l'efficacité des traitements d'induction, à savoir :

- Taux de gestation
- Taux de natalité
- Taille de la portée
- Durée du traitement
- Raccourcissement de l'intervalle interœstral (raccourcissement de l'œstrus)
- Effet sur la durée de l'intervalle interœstral du cycle suivant le cycle induit.

Nous présenterons ci-après les trois méthodes et les moyens avec lesquels a été réalisé le suivi du cheptel expérimental pendant toute la période d'induction. Ce suivi consistait en des visites périodiques trihebdomadaires (trois fois par semaine) pendant lesquelles nous effectuons un examen clinique et comportemental, un examen de cytologie vaginale et une prise d'échantillon sanguin pour un dosage ultérieur de la progestérone plasmatique.

5.2.4.4.1. Examen clinique gynécologique

A chaque visite, les femelles sont soumises individuellement à un examen clinique général puis un examen spécial de l'appareil génital à la recherche des signes cliniques et comportementaux des chaleurs.

Les résultats de cet examen sont consignés sur une fiche de suivi préétablie et préalablement conçue à cet usage (Cf Appendice E). Les caractères cliniques et comportementaux recherchés dans cet examen sont considérés comme des variables dont les modalités sont codifiées pour faciliter toute exploitation ultérieure des résultats.

Comportement d'œstrus:

- *Comportement social non sexuel*
- *Attrait – refus du mâle*
- *Attrait – acceptation du mâle*

Réflexe et posture:

- *Le réflexe d'Amantéa*
- *La posture de lordose*

Examen de l'appareil génital externe:

- *Œdème vulvaire*
- *Muqueuse vulvaire*
- *Écoulement vulvaire*

Une photographie de l'aspect des organes génitaux externes est réalisée sur chaque femelle et est conservée pour une meilleure appréciation visuelle de l'œdème et l'écoulement vulvaire ainsi que l'état de la muqueuse vaginale, et pour pouvoir également comparer et suivre l'évolution dans le temps de ces caractères.

5.2.4.4.2. Examen Cytologique Vaginal «ECV»

A chaque visite, toutes les femelles subissaient systématiquement un frottis vaginal qui est réalisé de la manière décrite ci-après (Cf Appendice G & K).

Prélèvement:

On utilise un écouvillon stérile long de 15 cm minimum, humidifié à l'aide d'une ou deux gouttes d'eau physiologique et introduit le long du bord supérieur des lèvres vulvaires afin d'éviter la fosse clitoridienne. Ensuite l'écouvillon est basculé à l'horizontale et est enfoncé doucement, le plus profondément possible. Après quelques mouvements de rotation, l'écouvillon est lentement retiré vers l'arrière.

La couleur de l'écouvillon est une donnée qui sera consigné sur la fiche de suivi mentionnée dans l'examen clinique (Cf Appendice E). Là aussi, une photographie de l'écouvillon est réalisée pour une meilleure appréciation visuelle ainsi que pour pouvoir comparer ultérieurement l'évolution dans le temps de ce caractère.

Étalement:

Le coton est immédiatement fait rouler sur l'extrémité de la lame sans écraser ni frotter ni faire passer deux fois au même endroit pour ne pas altérer les cellules.

Fixation:

La lame est immédiatement plongée pendant cinq (05) minutes dans un mélange alcool-éther qui réalise la fixation de l'étalement. Après cette étape; la coloration pourrait être différée si nécessaire.

Coloration:

Les lames sont colorées selon la méthode du trichrome d'Harris-Schorr en les faisant passer par les quatorze bains de cette méthode de coloration contraignante mais de référence. (Cf APPENDICES H, I, K).

L'observation des lames a été réalisée à l'aide d'un microscope Motic® binoculaire, muni d'un oculaire d'un grossissement de 10 et de quatre objectifs d'agrandissements respectifs de x4, x10, x40 et x100. Les grossissements indiqués par la suite sont ceux du microscope.

Les frottis étaient d'abord visualisés au plus faible grossissement (x40) dans leur totalité. Ceci nous permettait d'apprécier la tendance tinctoriale, la richesse en cellules et leur répartition.

Le comptage cellulaire a été réalisé en se basant sur un minimum de 30 cellules épithéliales. Pour cela, les lames étaient visualisées à un grossissement plus fort (x100 et/ou x400). Selon la richesse en cellules, deux à trois champs nous permettaient de visualiser 30 cellules. Si ce nombre était atteint mais que le dernier champ contenait plus de cellules, l'ensemble des cellules étaient prises en compte.

La saisie des données cytologiques brutes exprimées en nombre des différentes classes cellulaires ainsi que le calcul des pourcentages cellulaires ont été faits sur le logiciel Microsoft Office © Excel 2007.

Après exploitation immédiate ou différée des lames de frottis (comptage cellulaire et calcul des pourcentages et indices cytologiques), des microphotographies de ces lames ont été capturées à l'aide d'un appareil photo

spécial pour microscope "Moticam 350" (Cf APPENDICE L) et le logiciel professionnel "Motic Images Plus Version 2.0 ML Motic China Group Co., Ltd. Copyright © 2001-2004".

5.2.4.4.3. Prise d'échantillon sanguin et dosage de la progestérone «RIA»

A chaque visite, et à l'issue de l'examen clinique et cytologique de la femelle, il est procédé à une prise d'échantillon sanguin à partir de la veine radiale ou saphène en se servant d'un dispositif vacutainer qui permet de prélever le sang directement dans un tube sous vide hépariné pré identifié avec de l'encre indélébile.

Ce sang est immédiatement séparé dans l'unité laboratoire de la clinique vétérinaire du Centre de Formation Cynotechnique de la Gendarmerie Nationale à l'aide d'une centrifugeuse à six tubes de marque NÜVE Modèle NF 615 made in ANKARA TURKEY.

A l'aide de pipettes Pasteur munies de poire, le plasma est recueilli dans des cônes Ependorf secs pré-identifiés qui sont aussi tôt mis sur un petit portoir et conservés à -20°C jusqu'au moment de les envoyer au laboratoire.

Le dosage à été fait ultérieurement une fois les échantillons rassemblés et les kits RIA de dosage radio-immunologique de la progestérone prêts au Laboratoire de Zootechnie du Centre de Recherche Nucléaire de Draria.

La progestérone est ainsi dosée in vitro, sur des échantillons plasmatiques conservés congelés dans des tubes héparinés sous vide, par méthode radio-immunologique au Laboratoire de Zootechnie du Centre de Recherche Nucléaire de Draria, en utilisant les KIT IMMUNOTECH "A BECKMAN COULTER COMPANY" (Cf APPENDICE J).

5.2.5. Analyses statistiques

Dans notre présente étude, nous avons comparé plusieurs résultats entre eux. D'abord les pourcentages de succès des deux traitements d'induction étudiés dans la première partie expérimentale, puis le test de la liaison entre différentes variables deux par deux (progestéronémie et taux cellulaire) dans la deuxième partie du travail.

Cependant, il n'est pas difficile d'imaginer que l'association entre les deux résultats ou entre les deux variables puisse être due au seul hasard. C'est justement en réponse à cela que nous avons fait recours à l'application ou l'exécution de certains tests d'hypothèse. La méthode du test d'hypothèse va permettre de quantifier le rôle du hasard dans l'observation de cette différence.

La formulation de l'hypothèse nulle (H_0) est la première étape du test d'hypothèse, elle est l'hypothèse d'absence de différence. Cette différence est susceptible d'être vérifiée statistiquement. Dans notre exemple, l'hypothèse nulle pourrait s'énoncer par la phrase suivante : « Il n'existe pas de relation entre le traitement et le résultat produit » ou encore « Il n'existe pas de différence entre les deux traitements comparés ou entre les deux variables étudiées ».

Sous forme abrégée, si p_A et p_B désignent les pourcentages de succès pour les deux traitements, on peut écrire H_0 sous la forme suivante : $H_0 : P_A = P_B$

H_0 peut être vérifiée et sera, soit rejetée, soit gardée. Cette décision est basée sur les tests statistiques (ou tests de signification).

Le test statistique donne la probabilité p que le hasard puisse expliquer les résultats. Si la probabilité p est inférieure ou égale à un certain seuil, appelé seuil de signification, on rejette H_0 et on dit que la différence est significative. Si la probabilité p est supérieure au seuil, on ne rejette pas H_0 et on dit que la différence est non significative.

Le seuil de signification noté α est habituellement fixé à 5%. Il s'agit d'une convention très largement adoptée. Un seuil de 5% réduit à une proportion acceptable le rôle du hasard puisque celui-ci ne va intervenir que dans 5 cas sur 100 pour expliquer la différence observée.

En tout cas, le rôle du hasard ne peut être éliminé totalement. Il faut bien comprendre que le jugement se fonde sur une probabilité et n'offre pas une sécurité absolue.

Dans notre cas, pour la comparaison des deux traitements d'induction d'œstrus, le sens de la liaison consiste à déclarer, en cas de rejet de H_0 , le traitement B « induction à la *Cabergoline* » plus efficace, significativement, que le

traitement A « induction à la *Bromocriptine* ». Quand à l'étude de la corrélation entre les séries statistiques libres de la progestéronémie et du taux d'éosinophilie d'une part et entre la progestéronémie et le taux de basophilie d'autre part, l'objectif était de montrer l'existence d'une corrélation significative entre ces variables deux par deux.

Pour la comparaison des deux traitements d'induction, le test d'hypothèse appliqué est le test des probabilités exactes de Fisher, et pour la corrélation des deux variables "hormonale et cytologique", il a été exécuté le test de khi-deux (χ^2). Le principe de chaque test d'hypothèse sera expliqué succinctement dans la section suivante (Cf § 2.5.1).

5.2.5.1. Test des probabilités exactes de Fisher

Il s'agit d'un test statistique non paramétrique qui s'applique aux tableaux de contingence 2*2. Ce test est recommandé lorsqu'un effectif théorique est largement inférieur à la valeur 5 et lorsque la taille échantillonnale est inférieure à 25, comme c'est le cas dans notre essai d'induction (n=16).

Ce test sera appliqué aux résultats des traitements d'induction dans notre étude car c'est le test d'hypothèse pour comparaison de deux pourcentage le mieux adapté à notre situation.

Le test exact de Fisher est basé sur la probabilité d'avoir entre les deux distributions à comparer un écart égal ou supérieur à l'écart observé, les distributions marginales doivent rester identiques. Si on adopte, pour un tableau 2*2, la situation des deux traitements d'induction de l'œstrus chez les seize chiennes, la probabilité $p_i = (l_1! l_2! c_1! c_2!) / (a! b! c! d! n!)$

Où $l_1!$ Se lit factorielle l_1 , etc. (exemple $4! = 4*3*2*1 = 24$) et où n est la taille globale de l'échantillon.

Les probabilités p_i des différentes configurations sont ensuite additionnées, ce qui donne la probabilité globale p qui permet de prendre une décision vis-à-vis de H_0 en tenant compte de l'hypothèse alternative. Pour un test unilatéral, au seuil de 5%, il faut comparer p à 0.05. Si les deux groupes à

comparer sont de taille égale, on comparera en situation bilatérale, au seuil 5%, $2p$ à 0.05 (p étant la probabilité trouvée en situation unilatérale).

5.2.5.2. Test de khi-deux.

Le test de khi deux (χ^2) sera appliqué dans la deuxième partie expérimentale, lors de l'exploitation des données de cytologie et de progestéronémie. Ce test permettra d'étudier la liaison (corrélation) entre les indicateurs cytologiques (pourcentages cellulaires d'éosinophilie et de basophilie) d'une part et la progestéronémie d'autre part.

Le principe de ce test du χ^2 consiste à calculer pour chacune des cases du tableau de contingence l'écart quadratique: $(O - C)^2 / C$ et à en faire la somme. Donc: $\chi^2 = \sum [(O - C)^2 / C]$. Dans l'expression de l'écart quadratique:

- O est l'effectif observé;
- C est l'effectif calculé (appelé aussi effectif théorique) qui devrait être observé si H_0 était vraie.

Soulignons dès maintenant que le χ^2 ne considère que les effectifs et non les pourcentages.

A côté du calcul du χ^2 , il faut déterminer le nombre de degrés de liberté (dl). Celui-ci dans un tableau de contingence de l lignes (l modalités pour une variable) et c colonnes (c modalités pour une variable) est tout simplement : $dl = (l - 1)(c - 1)$.

La probabilité p que le hasard puisse expliquer les résultats est donnée par la table du χ^2 à la ligne identifiée par le dl. La table du χ^2 est une table pour un test bilatéral. Au seuil de signification 5%, la différence entre les deux distributions est significative si $p \leq 5\%$.

A l'issue de cet exposé sur les méthodes statistiques utilisées dans notre travail, il est à signaler que nous avons utilisé le logiciel Microsoft Office © Excel 2007 pour la réalisation de toutes les étapes de l'exploitation de nos données; à savoir la quantification, la construction, l'organisation et la représentation des données, ainsi que les mesures descriptives (moyenne, écart type, intervalle de confiance) et l'application des tests d'hypothèse (χ^2 et Fisher).

5.3. Résultats

5.3.1. Recueil des renseignements reproductifs sur les femelles d'étude.

Le Tableau II.2a regroupe les renseignements reproductifs en données brutes sur les seize (16) femelles de l'étude recueillis à partir de leurs dossiers et des résultats du suivi préliminaire.

Il présente les seize (16) femelles de l'étude avec leurs noms et numéro de code, et pour chaque femelle ce tableau fournit les données suivantes:

- Le lot d'induction dans lequel se trouve chaque femelle: "A" ou "B";
- Une moyenne de la taille de la portée (nombre de chiots par naissance) pour chaque femelle. Cette moyenne individuelle a été calculée sur la base des données précédentes disponibles. Quand aucune naissance n'avait eu lieu auparavant ou n'avait été disponible, il est inscrit "ND" dans la case correspondante. Cette donnée comparée à celle suivant le cycle induit permet d'évaluer l'action des deux molécules étudiées sur ce paramètre.
- Les deux intervalles interœstraux précédant l'induction exprimés en nombre de jours. Ces intervalles sont obtenus à partir des dates de pro-œstrus des cycles précédents recueillies du dossier de la femelle et des résultats du suivi préliminaire. Une table de calcul a été programmée sur le logiciel Microsoft Office Excel 2007 pour calculer automatiquement ces intervalles et les exprimer en nombre de jours à partir des dates de pro-œstrus précédents; la comparaison de cette donnée à l'intervalle qui suit l'induction permet d'évaluer l'éventuel raccourcissement de ces intervalles par les deux protocoles d'induction étudiés.
- L'intervalle qui sépare le dernier pro-œstrus de la date du début de traitement d'induction. Cet intervalle est exprimé en nombre de jours et permet de définir le dernier renseignement fourni par ce tableau et qui est le stade du cycle de chaque femelle au moment du début du traitement.

Tableau II.2a: Renseignements reproductifs et constitution des lots "groupes" de traitement.

CODE	NOM/FEMELLE	LOT	TAILLE PORTEE (CHIOTS)	INTERVALLE INTERŒSTRAL	INTERVALLE INTERŒSTRAL	INTERVALLE PROESTRUS - J ₁ TRAITEMENT	STADE DU CYCLE AU DEBUT DE TRAITEMENT
02	BONA01	(Lot A)	5	(177j)	(185j)	(63j)	(Metoestrus)
03	BONA02		ND	(158j)	(166j)	(87j)	(début anœstrus)
06	DOUSHKA		5	(181j)	(174j)	(128j)	(mi-anœstrus)
07	IRA01		5	(161j)	(157j)	(126j)	(Fin d'anœstrus)
13	NEBRASKA		6	(270j)	(299j)	(229j)	Anœstrus (Interœstrus long)
14	RYM		5	(253j)	(311j)	(297j)	Anœstrus (Interœstrus long)
01	ARINA		ND	ND	ND	ND	Anœstrus primaire
08	IRA02		4	ND	ND	(478j)	Anœstrus secondaire
12	MITCHA	(Lot B)	ND	(189j)	(194j)	(63j)	(Metoestrus)
04	CHARLOTTE		6	(161j)	(166j)	(90j)	(début d'anœstrus)
11	LYSA		5	(179j)	(183j)	(120j)	(mi-anœstrus)
10	LORA02		7	(186j)	(178j)	(135j)	(fin d'anœstrus)
15	VENUS		6	(243j)	(218j)	(270j)	Anœstrus (Interœstrus long)
16	XAVA		6	(267j)	(307j)	(221j)	Anœstrus (Interœstrus long)
05	DATCHA		ND	ND	ND	ND	Anœstrus primaire
09	LISA		5	ND	ND	(536j)	Anœstrus secondaire

Le tableau II.2b a été construit à partir des données brutes du tableau II.2a en calculant la moyenne et l'intervalle de confiance pour les variables âge, poids, taille de la portée précédente exprimée en nombre de jours et durée de l'interœstrus précédent exprimée également en nombre de jours.

Ces données ainsi construites sont écrites : Moyenne \pm Intervalle de Confiance (Moy \pm SEM) suivies de la plage de confiance entre deux crochets [valeur – valeur].

La lecture de ce tableau nous montre que les deux lots d'étude "A" et "B" sont parfaitement appariés pour les trois premières variables (effectif, âge moyen et poids moyen) avec respectivement pour les lots A et B les valeurs d'effectif: (n = 8) versus (n = 8), valeurs d'âge moyen: 4.50 ± 0.74 ans versus 4.75 ± 0.81 et valeurs de poids moyen: 26.38 ± 2.09 versus 26.00 ± 2.54 .

Les données de la variable "Taille de la portée précédente" ou encore "Taille de la portée avant induction" concernent chaque groupe séparément, elles serviront à établir une comparaison entre ces données et les données de taille de la portée après induction. De ce fait, aucun intérêt n'est porté à la comparaison de ces données entre les deux lots d'induction.

Pour la variable "durée de l'interœstrus précédent", nous lisons deux valeurs différentes pour chaque groupe d'induction.

Dans le cas du Lot "A", la valeur 215.33 ± 56.14 avec l'intervalle de [159.19 – 271.48] a été calculée sur la base de toutes les femelles même celles ayant un interœstrus prolongé à savoir les chiennes (13) et (15) qui ont respectivement un intervalle de 270 jours et 253 jours. C'est la raison pour laquelle ce chiffre est élevé.

Si nous calculons cette variable sans tenir compte de ces deux femelles à interœstrus très long, nous obtiendrons le deuxième chiffre de 170 ± 11.66 avec l'intervalle de [158.84 – 182.16] qui représente un intervalle tout à fait normal d'un peu moins de six mois.

Dans le cas du Lot "B", la valeur de $204,17 \pm 33.02$ avec la plage de confiance de [171.15 – 237.18] est ainsi élevée à cause de la prise en compte des deux femelles à inter-œstrus prolongé qui sont les chiennes (15) et (16) ayant respectivement un intervalle de 218 jours et 307 jours.

Tableau II.2b : Renseignements reproductifs des deux groupes d'induction
 [Lot A, (n=8); Bromocriptine (50µg/kg PO)] et [Lot B, (n=8); Cabergoline (5µg/kg PO)]
 (Moy ± SEM) : (Moyenne ± Intervalle de confiance)
 Plage de confiance : [valeur – valeur]

Groupe (Lot)	Effectif (n)	Age moyen (ans)	Poids moyen (Kg)	Taille de portée précédente (Nb de chiots)	Durée de l'interœstrus précédent (Nb de jours)	
Lot A	8	4.50 ± 0.74 [3.67 – 5.24]	26.38 ± 2.09 [24.28 – 28.47]	5.00 ± 0.51 [4.49 – 5.51]	215.33 ± 56.14*	170.50 ± 11.66** [158.84–182.16]
Lot B	8	4.75 ± 0.81 [3.94 – 5.56]	26.00 ± 2.54 [23.46 – 28.54]	5.83 ± 0.60 [5.23 – 6.44]	204.17 ± 33.02*	178 ± 12.30** [166.45 – 191.05]

(*): Ces valeurs de la variable durée de l'interœstrus sont calculée sur la base de toutes les femelles y compris les femelle à interœstrus prolongé, en l'occurrence les femelles (13) et (15) du lot A et les femelles (15) et (16) du lot B. Pour cette raison, ces valeurs sont anormalement élevées.

(**): Ces valeurs de la variable durée de l'interœstrus sont calculée sans tenir compte des femelles à interœstrus prolongé. Ces valeurs sont donc celles des femelles à cyclicité normale.

Le calcul de cette variable sans ces deux chiennes donne la valeur de 178.75 ± 12.30 avec l'intervalle de [166.45 – 191.05].

Par ailleurs, les deux lots d'étude "A" et "B" sont parfaitement appariés pour cette variable dans les deux cas de figures. Soient respectivement pour "A" et "B" les valeurs : 215.33 ± 56.14 versus $204,17 \pm 33.02$ et 170 ± 11.66 versus 178.75 ± 12.30 .

Les valeurs de cette variable serviront à établir la comparaison entre la durée de l'interœstrus avant la mise en application du traitement d'induction et celle du cycle suivant le cycle induit.

5.3.2. Résultats du traitement d'induction des chaleurs

Les résultats des traitements d'induction appliqués aux deux groupes de femelles (Lot "A" et lot "B") seront présentés respectivement par les tableaux II.3 et II.4 (Cf Tableaux II.3 & II.4).

Le Tableau II.3 présente les résultats bruts du traitement d'induction à la Bromocriptine appliqué aux huit (08) femelles du premier lot d'étude (Lot "A", n=8).

Le Tableau II.4 présente les résultats bruts du traitement d'induction à la Cabergoline appliqué aux huit (08) femelles du deuxième lot d'étude (Lot "B", n=8).

Avant de lire les résultats des deux tableaux dans les sections suivantes, nous allons définir les différentes variables de ces deux tableaux.

Chacun des deux tableaux reprend d'abord pour chaque femelle des données relatives aux intervalles interœstraux précédents et l'intervalle proœstrus- J_1 du traitement exprimés en nombre de jours, puis il présente pour chaque femelle les données suivantes:

L'intervalle J_1 du traitement-début du proœstrus. Cette variable fournit deux résultats à savoir la confirmation de la réponse au traitement d'induction par apparition des signes cliniques comportementaux et cytologiques du pro-œstrus ainsi que la durée d'application du traitement d'induction. Quand aucune réponse n'est obtenue au traitement d'induction, il est transcrit "ND" dans la case

correspondante. La confirmation ou l'infirmité de la réponse à l'induction est une variable qualitative dichotomique c'est-à-dire elle ne peut prendre que deux valeurs possibles (oui / non) et qui ne sont pas des chiffres autorisant des calculs et mesures descriptives. La deuxième variable qui est la durée du traitement est par contre un variable quantitative qui s'exprime par des données en chiffre autorisant le calcul et l'exécution des différentes mesures de statistique descriptive (moyenne arithmétique, écart type, intervalle de confiance...).

La confirmation ou l'infirmité de l'état gestatif. Cette variable dichotomique aura deux modalités possibles qui sont codifiées par les deux chiffres "0" pour l'absence de gestation et "1" pour la confirmation de l'état gestatif.

La confirmation ou l'infirmité de la mise-bas. Cette variable dichotomique aura deux modalités possibles qui sont codifiées par les deux chiffres "0" pour l'absence de natalité et "1" pour la confirmation de la natalité.

La taille de la portée. Il s'agit d'une variable quantitative qui est le nombre de chiots par naissance.

Le raccourcissement de l'intervalle interœstral. Cette variable est quantitative, et ses données sont exprimées en nombre de jours. Elle permet d'évaluer l'efficacité des deux traitements d'induction dans la réduction ou le raccourcissement de cet intervalle. Cette donnée est calculée par la différence entre la moyenne des deux intervalles inter-œstraux précédents et l'interœstrus du cycle induit.

L'interœstrus suivant le cycle induit: Exprimé en nombre de jours, cet intervalle concerne le cycle qui suit le cycle induit et il permet d'évaluer la normalité du retour en chaleur après un traitement d'induction, comparativement entre l'induction à la *Bromocriptine* et à la *Cabergoline*.

5.3.2.1. Traitement d'induction à la Bromocriptine (Parlodel®)

Nous lisons dans le Tableau II.3 les résultats bruts du traitement d'induction à la Bromocriptine appliqué aux huit (08) femelles du premier lot d'étude (Lot "A", n=8).

Tableau II.3 : Résultats du traitement d'induction à la *Bromocriptine*
[Lot A, (n=8); Bromocriptine (50µg/kg PO)]

N° DE LA CHIENNE	02	03	06	07	13	14	01	08
Interœstrus avant précédent. (jours)	(177j)	(158j)	(181j)	(161j)	(270j)	(253j)	ND	ND
Interœstrus précédent. (jours)	(185j)	(166j)	(174j)	(157j)	(299j)	(311j)	ND	ND
Intervalle pro-œstrus précédent.-J ₁ de traitement (jours)	(63j)	(87j)	(128j)	(126j)	(229j)	(297j)	ND	(478j)
Intervalle J ₁ de traitement – proœstrus induit (jours)	ND	ND	38	31	ND	ND	ND	ND
Gestation confirmée (0/1)	0	0	1	1	0	0	0	0
Mise bas à terme (0/1)	0	0	1	1	0	0	0	0
Taille de la portée	ND	ND	6	5	ND	ND	ND	ND
Raccourcissement de l'interœstrus (jours)	0	0	11.5j	2j	0	0	0	0
Interœstrus suivant le cycle induit (jours)	(182j)	(159j)	(184j)	(170j)	(268j)	(237j)	ND	ND

(*): NS : valeur non significative car la plage de confiance contient la valeur nulle 0 [(-2.56) – (16.06)]. Ceci corrobore le fait que cette moyenne est calculée sur la base de seulement deux valeurs disponibles et qui sont trop écartées. Il ne sera pas tenu compte de ce résultat.

L'intervalle J₁ du traitement - début du proœstrus.

Deux femelles seulement sur les huit chiennes du lot ont répondu au traitement d'induction à la *Bromocriptine* et qui sont les femelles portant les numéros de code: (06) et (07). Les durées de traitement pour ces deux femelles sont respectivement 38 et 31 jours de traitement.

La confirmation ou l'infirmité de l'état gestatif.

Deux femelles seulement sur les huit chiennes du lot ont été confirmées gestantes, ce sont les deux femelles induites à la *Bromocriptine* portant les numéros de code: (06) et (07).

La confirmation ou l'infirmité de la mise-bas.

Deux femelles seulement sur les huit chiennes du lot ont mis bas à terme de leurs gestations, il s'agit des deux femelles induites à la *Bromocriptine* et confirmées gestantes portant les numéros de code: (06) et (07).

La taille de la portée.

Pour les deux femelles ayant mis bas à savoir les femelles (06) et (07); la taille de la portée a été respectivement **6** et **5** chiots.

Le raccourcissement de l'intervalle interœstrus.

Pour les deux femelles induites en l'occurrence (06) et (07), l'intervalle inter-œstral a été raccourci respectivement de 11.5 jours et 2 jours.

L'interœstrus suivant le cycle induit:

L'interœstrus suivant le cycle induit a été pour les femelles (02), (03), (06), (07), (13) et (14) respectivement de 182, 159, 184, 170, 268, et 237 jours. Cette variable n'a pu être déterminée chez les deux femelles restantes du lot d'induction à savoir (01) et (08), ces femelles sont en anœstrus primaire et secondaire.

5.3.2.2. Traitement d'induction à la Cabergoline (Galastop®)

Nous lisons dans le Tableau II.4 les résultats bruts du traitement d'induction à la *Cabergoline* appliqué aux huit (08) femelles du deuxième lot d'étude (Lot "B", n=8).

Tableau II.4 : Résultats du traitement d'induction à la *Cabergoline*
 [Lot B, (n=8); Cabergoline (5µg/kg PO)]

N° DE LA CHIENNE	12	04	11	10	15	16	05	09
Interœstrus avant précédent. (jours)	(189 j)	(161 j)	(179 j)	(186 j)	(243 j)	(267 j)	ND	ND
Interœstrus précédent. (jours)	(194 j)	(166 j)	(183 j)	(178 j)	(218 j)	(307 j)	ND	ND
Intervalle pro-œstrus précédent - J ₁ de traitement (jours)	(63 j)	(90 j)	(120 j)	(135 j)	(270 j)	(221 j)	ND	(536 j)
Intervalle J ₁ de traitement – proœstrus induit (jours)	ND	32 j	20 j	12 j	18 j	16 j	46 j**	33 j
Gestation confirmée (0/1)	0	1	1	1	1	1	1	1
Mise bas à terme (0/1)	0	1	1	1	1	1	1	1
Taille de la portée	ND	7	6	6	5	7	4	6
Raccourcissement de l'interœstrus (jours)	15 j	27 j	40 j	33 j	(69 j)	(48 j)	ND	(334 j)
Interœstrus suivant le cycle induit (jours)	(184 j)	(170 j)	(185 j)	(189 j)	(191 j)	(177j)	ND	(208j)

(*): Pour le calcul de cette moyenne; nous avons retiré les deux femelles présentant l'anœstrus primaire et secondaire; en l'occurrence les femelle portant les numéros de code : 05 et 09. (**): Pro-œstrus apparu 6 jours après arrêt du traitement; la durée de traitement : 40j.

L'intervalle J₁ du traitement- proœstrus:

Sept femelles sur les huit chiennes du lot (7/8) ont répondu au traitement d'induction à la *Cabergoline* et qui sont les femelles portant les numéros de code: (04) (11) (10) (15) (16) (05) et (09). L'intervalle J₁ de traitement – proœstrus est pour ces femelles est respectivement **32, 20, 12, 18, 16, 46 et 33 jours**. On peut parler de durée de traitement au lieu d'intervalle J1 traitement – Proœstrus, sauf pour la femelle numéro (05) chez laquelle cet intervalle est de 46 jours mais la durée de traitement est 40jours, car durée maximale de traitement selon le protocole. Pour cette femelle le pro-œstrus est apparu six jours après la fin du traitement.

La confirmation ou l'infirmité de l'état gestatif:

Deux femelles seulement sur les huit chiennes du lot ont été confirmées gestantes, ce sont les deux femelles induites à la *Cabergoline* portant les numéros de code: (04) (11) (10) (15) (16) (05) et (09).

La confirmation ou l'infirmité de la mise-bas:

Sept femelles sur les huit chiennes du lot ont mis bas à terme de leurs gestations, il s'agit des femelles induites à la *Cabergoline* et confirmées gestantes portant les numéros de code: (04) (11) (10) (15) (16) (05) et (09).

La taille de la portée:

Pour les sept femelles ayant mis bas à savoir les femelles (04) (11) (10) (15) (16) (05) et (09); la taille de la portée a été respectivement 7, 6, 6, 5, 7, 4 et 6 chiots.

Le raccourcissement de l'intervalle interœstral:

Pour les sept femelles induites en l'occurrence (04) (11) (10) (15) (16) (05) et (09), l'intervalle interœstral a été raccourci respectivement de 27, 40, 33, 69 et 48 jours.

L'interœstrus suivant le cycle induit:

L'interœstrus suivant le cycle induit a été pour les femelles (12), (04), (11), (10), (15), (16) et (09) respectivement de 184, 170, 185, 189, 191, 177 et 208

jours. Cette variable n'a pu être déterminée chez la femelle restante du lot d'induction à savoir (05) qui est en anœstrus primaire.

A partir des données brutes présentées dans les tableaux II.3 et II.4 interprétés plus haut, nous avons construit de nouvelles données en procédant à un simple calcul de pourcentage pour les données des variables qualitatives dichotomiques et mesures statistiques descriptives (moy, écart type, intervalle de confiance) pour les données des variables quantitatives. Ces données sont présentées par le tableau II.5 qui sera interprété dans la section suivante.

5.3.2.3. Comparaison des deux traitements d'induction précédents

Le tableau II.5 a été construit à partir des données brutes des deux tableaux II.3 et II.4. Nous avons calculé le nombre de femelles ayant répondu aux traitements d'induction par l'apparition du pro-œstrus puis par un état gestatif confirmé e enfin par la naissance de chiots viables et en bonne santé.

Ces trois rapports des femelles répondantes aux femelles traitées (x/n) nous ont permis de calculer respectivement trois pourcentages à savoir le **taux d'induction** ou de réponse à l'induction, le **taux de gestation** et le **taux de natalité** exprimés en pourcentage de succès. Les résultats des ces taux ont été exactement de même valeur pour les trois; soit respectivement pour les lots "A" et "B" : **25% versus 87.50%**.

Ces pourcentages seront comparés un peu plus loin par l'application d'un test d'hypothèse qui est dans notre cas le test des probabilités exactes de Fisher.

Les autres variables sont l'**intervalle 1^{er} jour de traitement – proœstrus** exprimé en nombre de jours, le **raccourcissement de l'interœstrus**, la **taille de la portée après induction** et finalement l'**interœstrus du cycle suivant le cycle induit**.

Pour chacune de ces variables quantitatives, il a été calculé la moyenne et l'intervalle de confiance. Nous avons écrit le résultat: Moyenne ± Intervalle de confiance (Moy ± SEM) suivie de la plage de confiance écrite [valeur – valeur]. Ces chiffres serviront à établir la comparaison entre les deux groupes de traitement pour ainsi évaluer l'efficacité de ces protocoles.

Tableau II.5 : Résultats d'induction des deux groupes d'étude

[Lot A, (n=8); Bromocriptine (50µg/kg PO)] et [Lot B, (n=8); Cabergoline (5µg/kg PO)]
 (Moy ± SEM) : (Moyenne ± Intervalle de confiance)
 Plage de confiance : [valeur – valeur]

Groupe (Lot)	Effectif (n)	Nb de réponses + ----- Taux d'induction	Nb de réponses + ----- Taux de gestation	Nb de réponses + ----- Taux de natalité	Intervalle: J ₁ de trait – prœstrus (Durée de traitement) (Nb de jours)	Raccourcissement De l'intervalle interœstral. (Nb de jours)	Taille de portée (Nb de chiots)	Interœstrus post induction (Nb de jours)
Lot A	8	2/8 ----- 25%	2/8 ----- 25%	2/8 ----- 25%	34.50 ± 6.86 [27.64 – 41.36]	06.75 ± 9.31 NS* [(-2.56) – 16.06]	5.50 ± 0.98 [4.52 – 6.48]	200.00 ± 34.24 [165.76 – 234.24]
Lot B	8	7/8 ----- 87.50	7/8 ----- 87.50	7/8 ----- 87.50	24.43 ± 7.77 [16.66 – 32.20]	43.40 ± 14.30 [29.10 – 57.70]	5.86 ± 0.79 [5.07 – 6.65]	186.29 ± 8.87 [177.42 – 195.15]

(*): NS : valeur non significative car la plage de confiance contient la valeur nulle 0 [(-2.56) – (16.06)]. Ceci corrobore le fait que cette moyenne est calculée sur la base de seulement deux valeurs disponibles et qui sont trop écartées. Il ne sera pas tenu compte de ce résultat.

Les deux sections suivantes, seront comparés séparément entre les deux lots d'induction, les résultats des variable qualitatives (pourcentage de succès) et les résultats des variables quantitatives (moyennes exprimées en nombre de jours ou nombre de chiots).

5.3.2.3.1. Comparaison des pourcentages de succès

Les traitements d'induction de l'œstrus conduits, rappelant le, de manière simultanée sur le groupe des seize (16) chiennes pendant toute la période expérimentale ont permis de constituer deux groupes ou deux lots de traitement ; à savoir un groupe de huit (08) chiennes (Lot A) traitées à la *Bromocriptine* et un deuxième groupe ou lot de huit (08) chiennes (Lot B) également traitées à la *Cabergoline*.

Le Tableau de données construites (Cf. Tableau II.5) nous montre que les différents pourcentages ou taux de réussite d'induction à savoir taux d'induction, de gestation et de natalité, sont en faveur du protocole d'induction à la Cabergoline. Cependant, la seule confrontation de ces résultats ne peut dégager une différence significative. L'application d'un test d'hypothèse adapté à la situation et à la petitesse de l'effectif qui est le test des probabilités exactes de Fisher permet de comparer les deux résultats.

Les taux d'induction, de gestation et de natalité ont donné la même valeur dans chaque groupe de traitement car les femelles répondant à l'induction sont toutes devenues gestantes et ont toute mené à terme leurs gestations dans de bonnes conditions.

Taux d'induction: 25% versus 87.50% (Lot A versus Lot B)

Taux de gestation: 25% versus 87.50% (Lot A versus Lot B)

Taux de natalité: 25% versus 87.50% (Lot A versus Lot B)

A partir de ces valeurs de pourcentage de succès et leurs compléments à 100 qui constituent les pourcentages d'échec, nous construisons un nouveau tableau de données en deux lignes par deux colonnes "2*2" (Cf Tableau II.6) pour lui appliquer le test d'hypothèse choisi (Test de Fisher).

Les résultats de l'application du test de Fisher sur ces deux pourcentages ainsi que leurs effectifs seront valables pour le taux d'induction; le taux de gestation et finalement le taux de natalité.

Le tableau II.6 est ainsi construit en définissant deux variables qualitatives dichotomiques, à savoir la variable « Traitement » ayant deux modalités, (A ou B) et la variable « Résultat obtenu » avec comme modalités (Succès ou Echec) puis en obtenant les données de ces variables qui sont des effectifs et des pourcentages, car il s'agit ici de variables qualitatives et non quantitatives.

Tableau II.6 : Données relatives à la comparaison des deux traitements d'induction (*Bromocriptine* versus *Cabergoline*) chez les seize chiennes (Effectif et Pourcentage).

Résultat	Traitement A (<i>Bromocriptine</i>)		Traitement B (<i>Cabergoline</i>)	
	Effectif	%	Effectif	%
Succès	02	25.00	07	87.50
Echecs	06	75.00	01	12.50
Ensemble	08	100	08	100

Tableau II.7 : Données relatives à la comparaison des deux traitements d'induction (*Bromocriptine* versus *Cabergoline*) chez les seize chiennes (Effectifs seulement)

Résultat	Traitement A (<i>Bromocriptine</i>)	Traitement B (<i>Cabergoline</i>)	Total
	Effectif	Effectif	
Succès	02	07	9
Echecs	06	01	7
Ensemble	08	08	16

L'application d'un test d'hypothèse nous permet de tester la liaison entre les deux variables citées supra, car l'association entre deux variables puisse être due au seul hasard. Il s'agit donc de savoir si les sujets soumis au traitement d'induction à la *Bromocriptine* (Traitement A) sont caractérisés par la même proportion de succès (ou d'échec) que les sujets soumis au traitement d'induction à la *Cabergoline* (Traitement B). Ou encore, en d'autres termes, s'il existe une liaison entre le traitement (modalités A et B) et le résultat obtenu (modalités : succès, échec).

Si l'on se tenait aux seules données du Tableau II.4., on pourrait conclure que le traitement B est plus efficace que le traitement A puisque le pourcentage de succès avec le traitement B « induction à la *Cabergoline* » (87.50%) est plus élevé que celui obtenu avec le traitement A « induction à la *Bromocriptine* » (25%). Mais cette différence pourrait être expliquée par le seul hasard qu'on appelle aussi fluctuation d'échantillonnage.

La première étape du test d'hypothèse étant la formulation de l'hypothèse nulle ($H_0 : P_A = P_B$) qui dans notre exemple, pourrait s'énoncer par la phrase suivante : « Il n'existe pas de relation entre le traitement et le résultat produit » ou encore « Il n'existe pas de différence entre les deux traitements ».

La deuxième étape est le Choix du seuil de signification qui est choisi égal à 5% ($\alpha = 5\%$).

La troisième étape est de faire le choix du test statistique, qui est pour notre cas le test exact de Fisher ou le test des probabilités exactes de Fisher. Ce choix étant motivé par les deux faits suivants :

- Variables quantitatives à deux modalités offrant un tableau de contingence 2x2
- Effectif global faible $n=16$ ($n < 50$).

La quatrième étape est l'exécution du test des probabilités exactes de Fisher aux résultats d'induction obtenus. Pour ne pas alourdir cette section, nous avons préféré mettre l'exécution du test en appendice (Cf APPENDICE Q).

La cinquième et dernière étape de l'application du test d'hypothèse étant la prise d'une décision au seuil choisi et sens de la liaison, ou autrement dit, la conclusion de l'analyse statistique.

Il est donc à conclure de l'application du test de Fisher que le traitement B « induction à la *Cabergoline* » est significativement plus efficace que le traitement A « induction à la *Bromocriptine* » avec un taux de réussite de 87.5% versus 25% s'appliquant à la fois aux "**taux d'induction**", "**taux de gestation**" et "**taux de natalité**".

Cette différence d'efficacité en faveur du traitement à la *Cabergoline* est statistiquement significative ($P < 0.05$); ceci dit que la probabilité pour que le hasard puisse expliquer cette différence est de loin en dessous du seuil de signification ($P = 0.020279721$).

5.3.2.3.2. Comparaison des moyennes

A part les trois pourcentages de réussite d'induction analysés dans la section précédente (Cf § 4.3.3.1), les autres variables du tableau II.5 sont quantitatives et ont donné des valeurs numériques exprimées en nombre de jours et nombre de chiots autorisant donc des calcul directs sur données et des mesure statistiques descriptives (moyenne écart type et intervalle de confiance).

Durée de traitement:

Lot d'induction à la *Cabergoline* : 24.43 ± 7.77 jours avec une plage de confiance de [16.66 – 32.20]

Lot d'induction à la *Bromocriptine*: 34.50 ± 6.86 jours avec un intervalle de [27.64 – 41.36].

Raccourcissement de l'intervalle interoestrus

Lot d'induction à la *Cabergoline* : 43.40 ± 14.30 jours avec l'intervalle [29.10 – 57.70]

Lot d'induction à la *Bromocriptine*: 6.75 ± 9.31 jours [NS] Cette valeur est non significative car l'intervalle de confiance contient la valeur zéro.

Taille moyenne de la portée:

Lot d'induction à la *Bromocriptine*: 5.50 ± 0.98 avec l'intervalle [4.52 – 6.48]

Lot d'induction à la *Cabergoline*: 5.86 ± 0.79 avec l'intervalle [5.07 – 6.65].

Ces valeurs sont calculées après traitement d'induction. Il s'agit ici de comparer pour chaque groupe d'induction à part, la taille moyenne de la portée avant et après induction. La comparaison des résultats de cette variable dans ce

sens permet d'évaluer dans chaque groupe séparément, l'action du traitement d'induction sur la taille de la portée. Ce n'est que par la suite que cette action, si existante, sera comparée entre les deux groupes d'induction de notre étude.

La taille moyenne de la portée avant induction a déjà été calculée pour chaque groupe de traitement dans le tableau II2b et les résultats sont:

Lot "A" d'induction à la *Bromocriptine*: 5.00 ± 0.51 avec l'intervalle [4.49 – 5.51]

Lot "B" d'induction à la *Cabergoline*: 5.83 ± 0.60 avec l'intervalle [5.23 – 6.44].

Pour mieux établir la comparaison, nous avons construit un tableau 2x2 où les valeurs sont exprimées en (Moy \pm SEM) et plage de confiance entre crochets [valeur – valeur].

	TAILLE MOYENNE DE LA PORTEE	
	AVANT INDUCTION	APRES INDUCTION
LOT "A" D'INDUCTION A LA <i>BROMOCRIPTINE</i>	5.00 ± 0.51 [4.49 – 5.51]	5.50 ± 0.98 [4.52 – 6.48]
LOT "B" D'INDUCTION A LA <i>CABERGOLINE</i>	5.83 ± 0.60 [5.23 – 6.44]	5.86 ± 0.79 [5.07 – 6.65]

Intervalle interœstral suivant le cycle induit:

Lot "A" : 200.00 ± 34.24 avec l'intervalle [165.76 – 234.24]

Lot "B": 186.29 ± 8.87 avec l'intervalle [177.42 – 195.15].

Ces résultats devront être comparés à ceux obtenus avant le traitement d'induction. A cette fin, nous avons construit le tableau suivant:

	INTERŒSTRUS SUIVANT	
	AVANT INDUCTION	APRES INDUCTION
LOT "A" D'INDUCTION A LA <i>BROMOCRIPTINE</i>	215.33 ± 56.14 [159.19 – 271.48]	200.00 ± 34.24 [165.76 – 234.24]
LOT "B" D'INDUCTION A LA <i>CABERGOLINE</i>	204.17 ± 33.02 [171.15 – 237.18]	186.29 ± 8.87 [177.42 – 195.15]

Ce tableau montre que le traitement d'induction qu'il soit à la Bromocriptine ou à la Cabergoline, n'affecte pas considérablement l'interœstrus du cycle suivant le cycle induit chez la chienne traitée. Celle-ci reviendrait donc en chaleur dans un délai habituel.

5.3.3. Résultats de l'étude de corrélation des données hormonales et cytologiques

Cette approche diffère de celle de l'induction, car l'individu ici n'est plus la chienne, mais un couple de données constituant au total une série statistique à laquelle on appliquera le test de khi deux (X^2) en vue d'évaluer la corrélation entre deux paramètres de suivi des chaleurs chez la chienne, et ce dans l'optique de revaloriser la cytologie vaginale en début de pro-œstrus et en introduisant un nouveau critère cytologique qui est le taux de basophile.

Cette population est sélectionnée parmi les résultats du suivi cytologique et hormonal durant la période de suivi préliminaire et durant la période d'induction. Les couples de données cytologique et hormonale sélectionnés pour cette exploitation statistique sont celles de la période des chaleurs de chaque femelle d'étude, c'est-à-dire les données cytologiques et hormonales recueillies au cours du pro-œstrus et œstrus. Si la femelle est saillie et est confirmée gestante et si elle reste vide et passe en metoestrus confirmé; il n'est plus utile de continuer le suivi cytologique et hormonal.

La population étudiée ici est représentée par 282 lames de frottis auxquelles correspondent naturellement le même nombre 282 de valeurs de progestéronémie. 88 échantillons (couple données cytologiques – progestéronémie) issus de la période de suivi préliminaire et 194 échantillons issus de la période d'étude proprement dite (période d'induction).

Cette population d'étude (282 individus) a été sélectionnée à partir de la totalité des frottis vaginaux effectués tout au long de la période d'étude, aussi bien la période du suivi préliminaire (4.5 mois) ayant précédé l'expérimentation que la période des traitements d'induction (6 mois). Le nombre total des frottis réalisés est 824 frottis, répartis en 440 frottis pour la période de suivi préliminaire dont 88 échantillons ont eu des valeurs de progestéronémie, et 384 frottis pour la période

d'induction dont 194 échantillons ont eu des valeurs de progestéronémie. Toutes ces lames de frottis ne sont pas intéressantes pour notre étude statistique qui recherche la corrélation entre les faibles valeurs de progestéronémie et le taux de basophilie et d'éosinophilie pendant le pro-œstrus. Beaucoup de ces frottis correspondraient à des valeurs de progestéronémie nulles (Anœstrus) ou trop élevées (Métœstrus) d'où l'inutilité et le non sens économique de demander le dosage hormonal pour tous ces frottis.

5.3.3.1. Elaboration des classes cellulaires et des intervalles de progestéronémie

Il est important de signaler que dans cette étude statistique, le typage cellulaire ne se fait pas selon la morphologie des cellules vaginales observées au microscope ce qui demande plus de temps et de précision à la lecture. Pour plus de facilité et rapidité à la lecture des lames de frottis, le typage cellulaire se fera en fonction de l'affinité tinctoriale des cellules vaginales, et comme nos frottis ont été colorés par le trichrome d'Harris-Schorr, nous définirons trois classes cellulaires à savoir:

- ✓ Les cellules basophiles comprenant les cellules parabasales et les cellules intermédiaires basophiles.
- ✓ Les cellules polychromatophiles.
- ✓ Les cellules éosinophiles ou acidophiles comprenant les cellules complètement et partiellement kératinisées.

A partir de ces trois classes cellulaires, nous déterminerons les pourcentages cellulaires respectifs à savoir pourcentage des cellules basophiles ou encore appelé dans notre étude "taux ou pourcentage de basophilie", pourcentage des cellules polychromatophiles et finalement le pourcentage des cellules éosinophiles ou encore appelé "taux ou pourcentage d'éosinophilie".

Concernant la progestéronémie; à partir des données de base brutes, et à des fins d'exploitation statistique, nous avons procédé à un tri à plat et constitué ainsi un tableau d'effectifs en regroupant les valeurs de progestéronémie en huit intervalles (Cf Tableau II.1).

Les effectifs de ces huit (08) intervalles de progestéronémie élaborés se répartissent comme présenté dans la figure ci-dessous (Cf Fig II.1).

Tableau II.8: Tableau des effectifs des intervalles de progestéronémie

INTERVALLE DE PROGESTERONEMIE	EFFECTIF	FREQUENCE RELATIVE
[0,00 - 0,03[37	13,12
[0,03 - 0,09[55	19,50
[0,09 - 0,5[45	15,96
[0,5 - 2,00[32	11,35
[2,00 - 4,00[23	8,16
[4,00 - 10,00[25	8,87
[10 - 20[34	12,06
> 20	31	10,99
TOTAL:	282	100,00

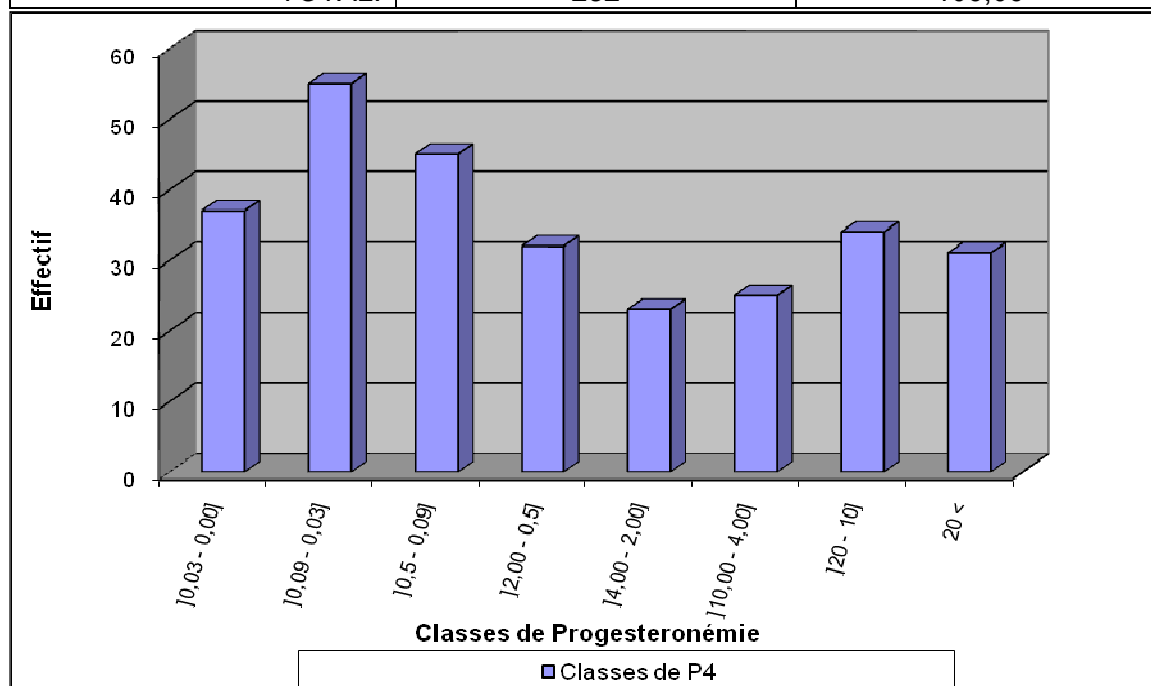


Figure II.1: Répartition des effectifs relatifs aux huit (08) intervalles de progestéronémie élaborés.

5.3.3.2. Evolution des trois classes cellulaires en fonction de la progestéronémie.

En procédant à un tri à plat à partir des données de base brutes et en calculant la moyenne des pourcentages des trois classes cellulaires par intervalle de progestéronémie, nous sommes arrivés à construire ce tableau.

Tableau II.09: Pourcentages des trois classes cellulaires en fonction de la progestéronémie pour les 282 lames de frottis vaginaux étudiées

INTERVALLES DE PROGESTERONEMIE (NG/ML)	POURCENTAGE DES CELLULES BASOPHILES (%)	POURCENTAGES DES CELLULES POLYCHROMATOPHILES (%)	POURCENTAGE DES CELLULES EOSINOPHILES (%)
< 0.03 (37 Frottis)	70,56	21,30	7,97
[0.03 – 0.09[(55 frottis)	39,60	40,87	19,47
[0.09 – 0.5[(45 frottis)	27,43	26,66	45,90
[0.5 – 2.00[(32 frottis)	9,75	39,14	51,11
[2.00 – 4.00[(23 frottis)	6,68	27,10	66,22
[4.00 – 10.00[(25 frottis)	0,09	1,65	98,26
[10.00 – 20.00[(34 frottis)	5,25	61,66	73,09
>20 (31 frottis)	28,28	46,69	24,97

Pour chacun des huit intervalles de progestéronémie précédemment établis, ce tableau (Cf Tableau II.09) donne la répartition des trois classes cellulaires en pourcentages sur la population d'étude représentée dans notre travail par les 282 frottis étudiés.

Les trois classes cellulaires sont naturellement les cellules basophiles, le pourcentage des cellules polychromatophiles et finalement le pourcentage des cellules éosinophiles ou encore appelées acidophiles.

Pour mieux apprécier visuellement l'évolution de ces différentes classes cellulaires en fonction de la progestéronémie, nous avons établi un histogramme à partir de du tableau qui est présenté dans la figure suivante (Cf Fig II.2).

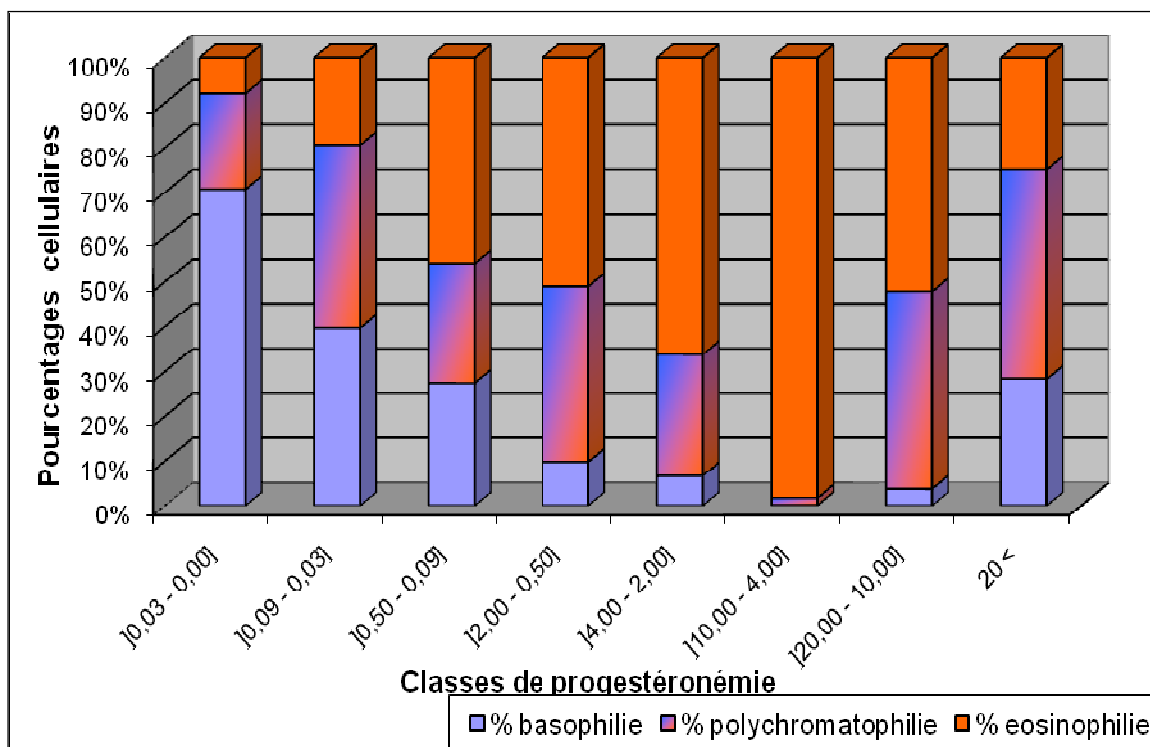


Figure II.2: Evolution des pourcentages des classes cellulaires en fonction de la progestéronémie pour les 282 lames de frottis étudiées.

Cette figure représente graphiquement les données numériques du tableau précédent (Tableau II.09) et qui représentent l'évolution comparative des trois classes cellulaires en fonction des huit intervalles de progestéronémie.

L'évolution de chaque classe cellulaire sera étudiée séparément et représentée graphiquement par une courbe dans les sections suivantes (Cf § 4.4.2.1).

5.3.3.2.1. Les pourcentages des classes cellulaires en fonction de la progestéronémie

5.3.3.2.1.1. Les cellules basophiles

L'évolution du pourcentage des cellules basophiles en fonction de la progestéronémie pour les 282 lames de frottis étudiées est ici représentée par une courbe de variation (Cf FigII.3).

Cette courbe nous montre que lorsque la progestérone sérique est en dessous de la valeur de 0.03ng/ml, le pourcentage des cellules basophiles est de 70.56%, puis la courbe décroît au fur et à mesure de la chute de la

progestéronémie jusqu'à atteindre la valeur de 0.09% qui correspond à l'intervalle de progestéronémie de [4.00 – 10.00[.

A partir de ce point, (représenté sur la figure II.3 par une flèche noire) la courbe prend une nouvelle tendance en croissant vers 5.25% quand la progestéronémie varie dans l'intervalle [10.00 – 20.00[puis 28.28% pour une progestéronémie >20ng/ml.

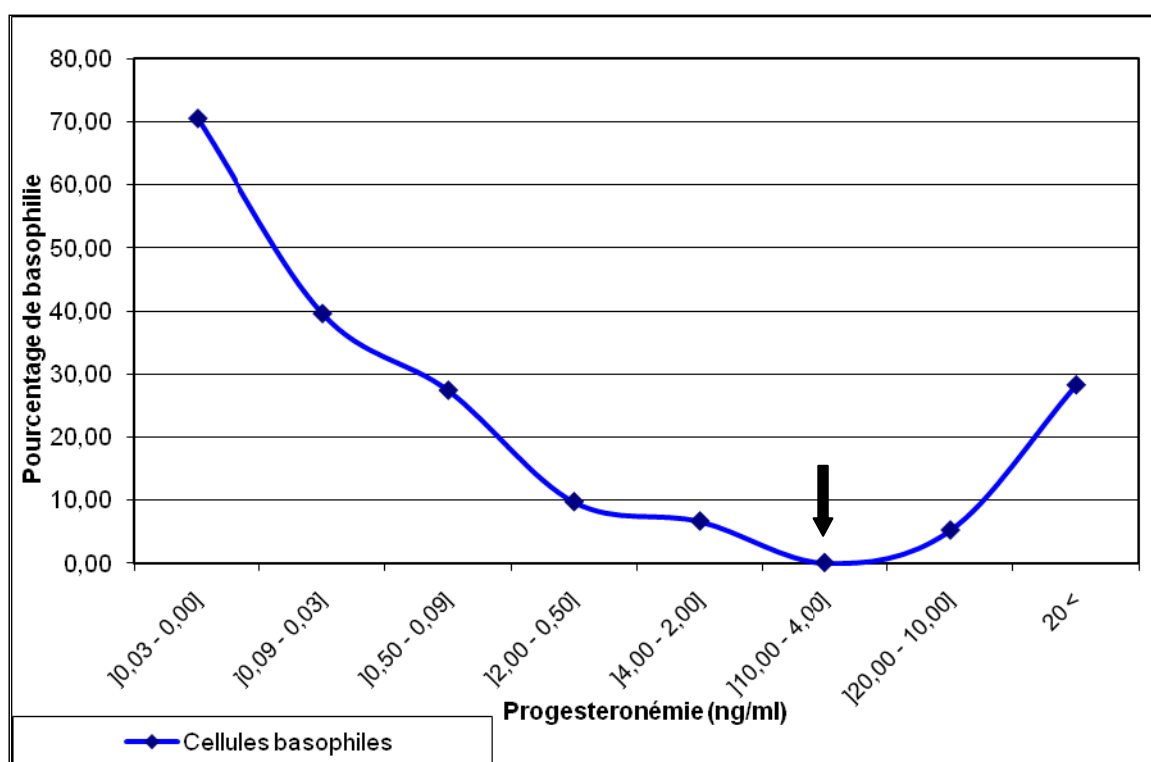


Figure II.3: Evolution du pourcentage des cellules basophiles en fonction de la progestéronémie pour les 282 lames de frottis vaginaux étudiés.

En réalité, le pourcentage de basophilie regroupe deux types de cellules vaginales à savoir les parabasales et les intermédiaires basophiles. Étudiées séparément, ces deux types cellulaires avaient tracé pratiquement le même profil de courbe et qui est similaire à notre courbe [61].

On note ici une corrélation entre la décroissance de cette courbe et l'élévation de la progestéronémie qui change de sens à partir de la valeur de 10ng/ml. Cette corrélation sera bien étudiée plus tard (Cf § 4.4.2.2).

5.3.3.2.1.2. Les cellules polychromatophiles

La figure II.4 représente la courbe d'évolution du pourcentage des cellules vaginales polychromatophiles en fonction de la progestéronémie.

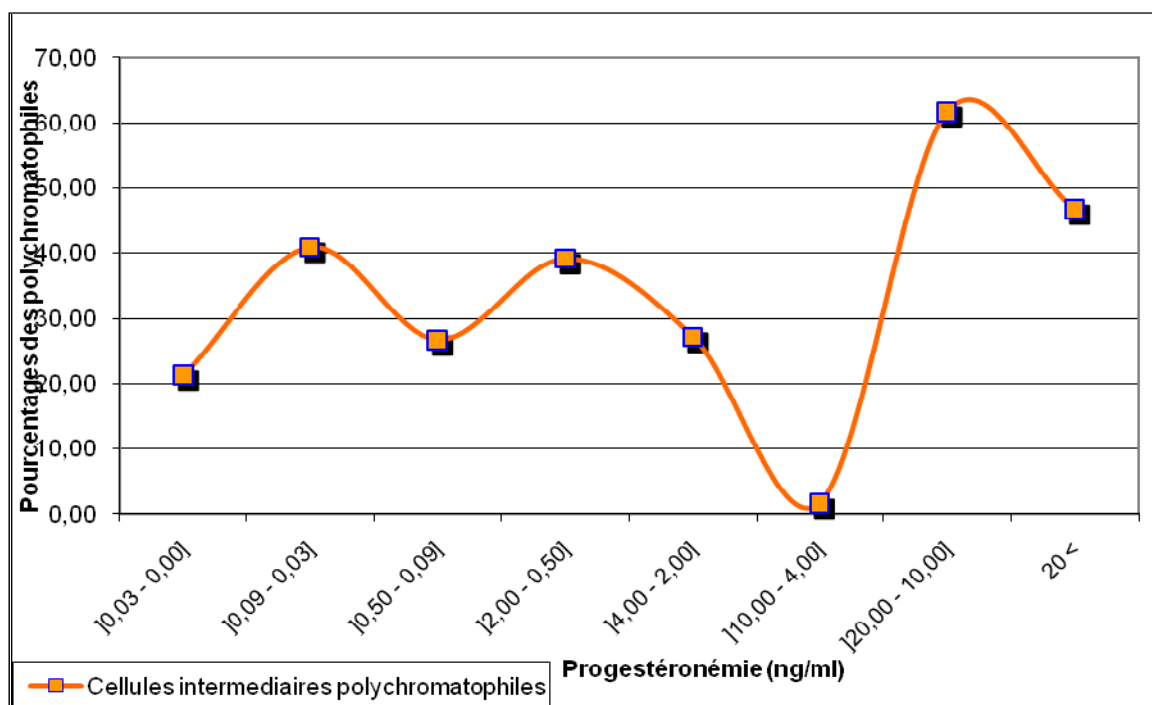


Figure II.4: Evolution du pourcentage des cellules polychromatophiles en fonction de la progestéronémie pour les 282 lames de frottis vaginaux étudiés.

Cette courbe représente l'évolution du pourcentage des cellules vaginales polychromatophiles en fonction de la progestéronémie.

Nous remarquons que cette courbe montre un pourcentage relativement constant oscillant entre 20 et 40% pendant la première partie du cycle jusqu'à l'intervalle [2.00 – 4.00]. Entre 4 et 10ng/ml de progestéronémie, le pourcentage des cellules polychromatophiles décroît considérablement jusqu'à atteindre la valeur de 1.65% puis la courbe croît à nouveau jusqu'à la valeur de 61.66% à l'intervalle [10.00 – 20.00] et 46.69% à l'intervalle de (<20ng/ml).

Ce profil signifie que cette classe cellulaire constitue un réservoir de cellules en voie de kératinisation présent tout au long du pro-œstrus. Ce sens s'éclaircira sur la courbe comparative des trois classes cellulaires (Cf Fig II.8).

5.3.3.2.1.3. Les cellules éosinophiles

Nous avons représenté l'évolution du pourcentage d'éosinophilie ou des cellules éosinophiles en fonction de la progestéronémie par une courbe de variation (Cf Figll.5) pour les 282 frottis étudiées.

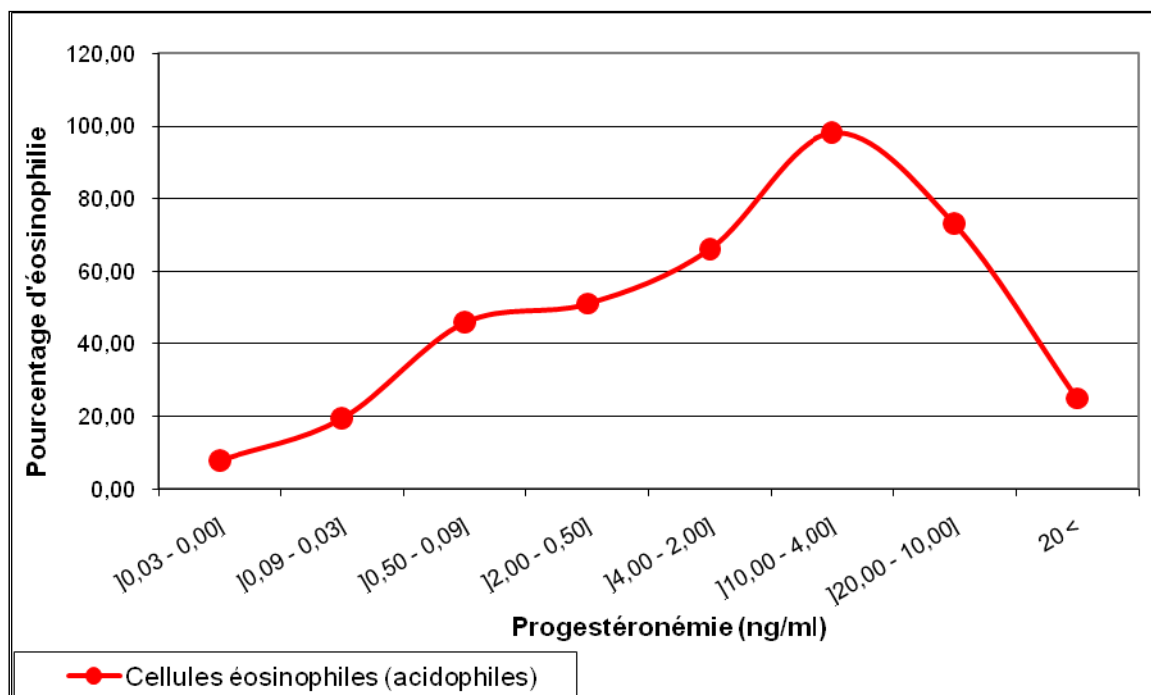


Figure II.5: Evolution du pourcentage des cellules éosinophiles en fonction de la progestéronémie pour les 282 lames de frottis vaginaux étudiés.

Lorsque la progestéronémie est inférieure à 0.03ng/ml, la courbe est à 7.97% d'éosinophilie, puis elle augmente progressivement pour tracer un plateau allant de la valeur de 45.90% à 51.11% d'éosinophilie entre 0.5 et 2 ng/ml de progestéronémie. Ce plateau se suit d'une ascension jusqu'à la valeur de 66.22% entre 2-4ng/ml, puis un pic franc de 98.26% entre 4 – 10ng/ml. Au delà de cette valeur, la courbe commence à décroître pour atteindre un pourcentage de 24.97 une fois la progestéronémie aura dépassé 20ng/ml.

Le profil de cette courbe confirme la corrélation entre la croissance du pourcentage d'éosinophilie et l'élévation de la progestéronémie. Cette corrélation change de sens à partir de la valeur de progestéronémie de 10ng/ml.

Dans la figure suivante (Cf Figll.6) nous tracerons les trois courbes précédentes sur le même graphe pour pouvoir comparer leurs profils.

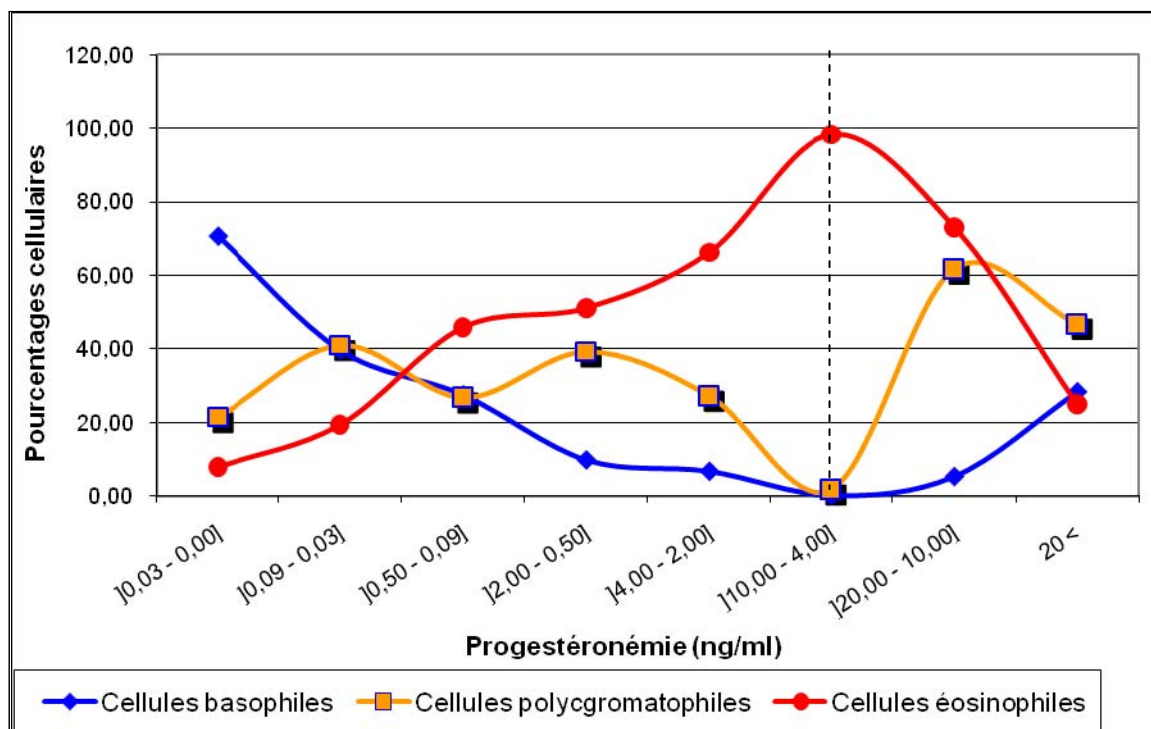


Figure II.6: Evolution comparative des pourcentages des trois classes cellulaires en fonction de la progestéronémie pour les 282 lames de frottis vaginaux étudiés.

Nous remarquons que l'évolution des trois classes cellulaires en fonction de la progestéronémie, change de sens de corrélation à partir de la valeur de progestéronémie de 10 ng/ml. Cela signifierait que les paramètres cellulaires perdent leur indication au-delà de 10 ng/ml de progestéronémie.

Etudions la situation en reprenons uniquement les valeurs situées en dessous de 10 ng/ml de progestéronémie; soit pour un effectif de 217 frottis représentant 76,95% des 282 frottis étudiés.

Nous représenterons graphiquement dans les deux figures ci-après, par histogramme (FigII.7) et par courbes (Fig II.8) l'évolution des pourcentages des trois classes cellulaires en fonction de la progestéronémie pour les 217 frottis remplissant la condition ($P_4 < 10 \text{ ng/ml}$).

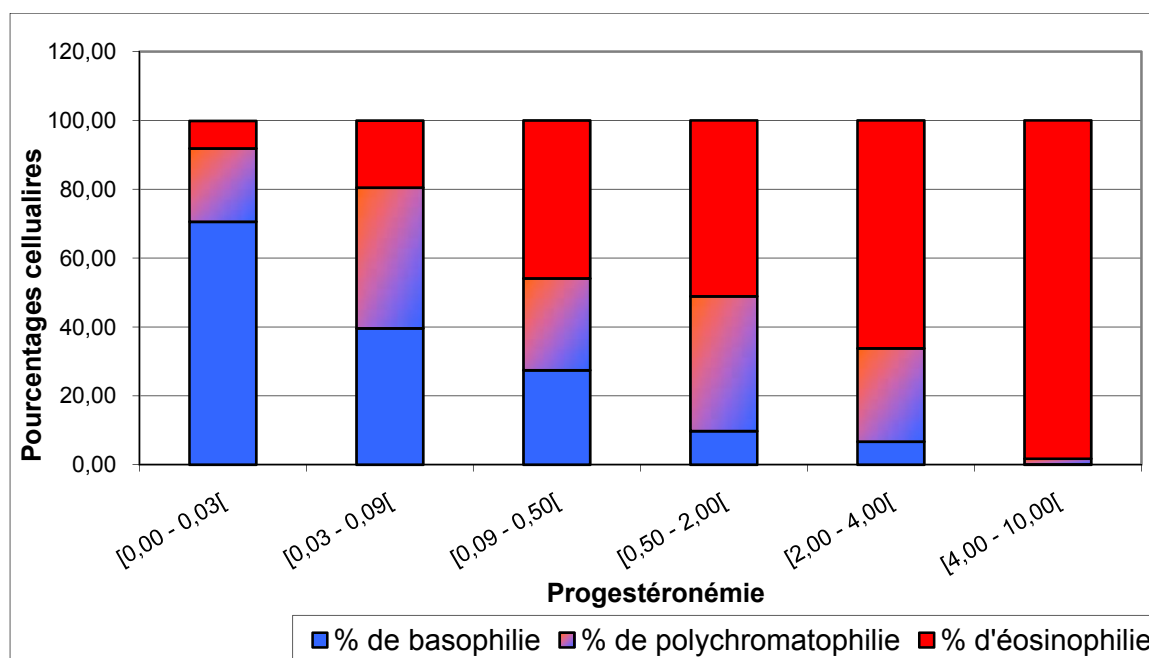


Figure II.7: Histogramme d'évolution des pourcentages de classes cellulaires en fonction de la progestéronémie pour les 217 frottis ($P4 < 10\text{ng/ml}$).

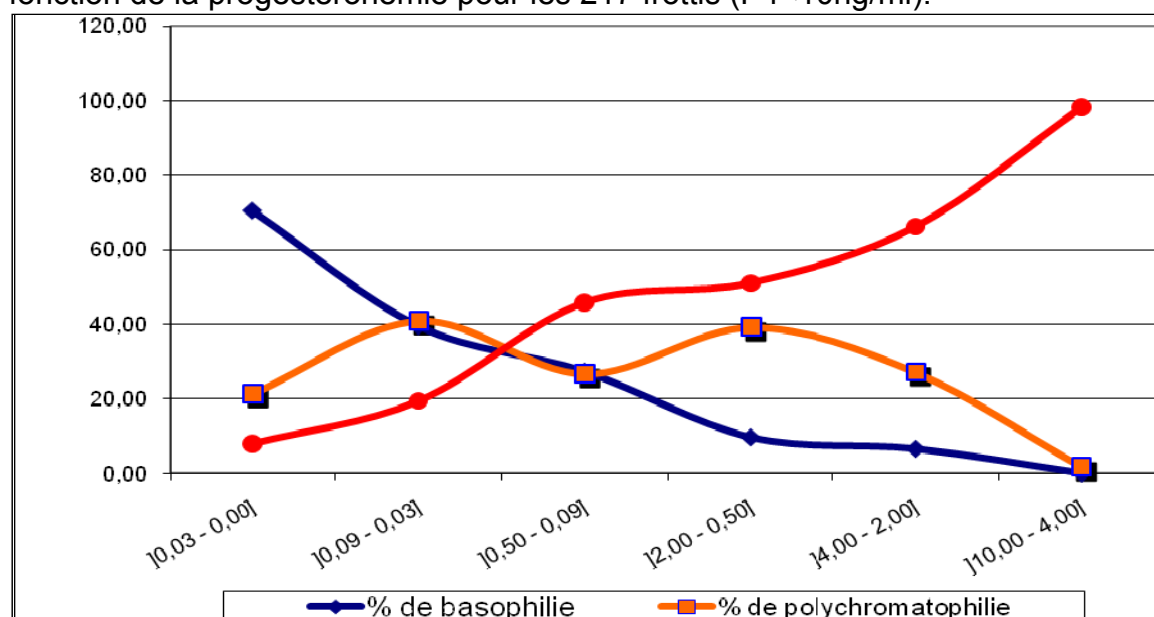


Figure II.8: Courbe d'évolution comparative des pourcentages des trois classes cellulaires en fonction de la progestéronémie pour 217 frottis ($P4 < 10\text{ng/ml}$).

Ces deux figures (Cf FigII.7 & FigII.8) montrent clairement les deux sens opposés de corrélation avec la progestéronémie que présentent le pourcentage des cellules éosinophiles et celui des cellules basophiles.

Le profil de la courbe de pourcentage de polychromatophilie est différent, il évoque une constance du pourcentage pendant que la progestéronémie évolue de son taux basal jusqu'à l'intervalle 2-4ng/ml. Au delà, cette courbe montre une

décroissance concomitante avec la croissance des cellules éosinophiles traçant ainsi une parfaite symétrie entre les deux courbes.

5.3.3.2.2. Corrélation entre le taux de progestérone et les taux d'éosinophilie et de basophilie

Nous ne sommes pas intéressés à la classe des cellules polychromatophiles, car il est clair d'après les sections précédentes que cette classe cellulaire ne montre aucun intérêt pour notre objectif dans le test de corrélation.

Dans cette section nous avons appliqué le test d'hypothèse du khi-deux (χ^2) pour tester la corrélation d'une part entre la progestéronémie et le pourcentage des cellules basophiles (taux de basophilie) et d'autre part entre la progestéronémie et le pourcentage des cellules éosinophiles (taux d'éosinophilie).

A partir du tableau d'effectif des différents intervalles de progestéronémie et du tableau des données brutes en pourcentages cellulaires, nous avons établi un tableau de contingence de 28° degré de liberté qui a servi au calcul de khi-deux.

Ce tableau de contingence ainsi que la dernière table de calcul du khi-deux (χ^2) ont été mis en appendice (Cf APPENDICE O1 & O2).

Pour la corrélation entre la progestéronémie et le taux de basophilie, l'exécution du khi-deux a permis d'avoir une valeur de $\chi^2 = 284,74$. Pour la corrélation entre la progestéronémie et le taux d'éosinophilie, l'exécution du khi-deux a permis d'avoir une valeur de $\chi^2 = 184,66$. Ces valeurs devront être comparées à une valeur théorique donnée par la table de khi-deux.

La table de la loi de khi-deux montre que pour un degré de liberté de 28° (dl = 28) et un intervalle de confiance de 0.050 (p = 0,050), le χ^2 théorique = **41.34** et pour un intervalle de confiance de 0.010 (p = 0,010) le χ^2 théorique = **48.28** et pour un intervalle de confiance de 0.001 (p = 0,001) le χ^2 théorique = **56.89** [χ^2 théorique (0.05, 28°): **41.34** ; (0.01, 28°): **48.28** ; (0.001, 28°): **56.89**].

C'est-à-dire pour que le résultat soit significatif, il faut que le khi-deux expérimental soit supérieur au khi-deux théorique (χ^2 expérimental > χ^2 théorique). Comme cette condition est parfaitement remplie pour le cas du taux

de basophilie ($284.74 > 56.89$) ainsi que pour le cas du taux d'éosinophilie ($184.66 > 56.89$), l'hypothèse d'indépendance (H_0) sera rejetée et le khi-deux (χ^2) très significatif dans les deux cas.

Il existe donc entre la progestéronémie et les différents intervalles de pourcentages de basophilie d'une part et d'éosinophilie d'autre part, une corrélation hautement significative avec un intervalle de confiance de moins de 0,001 ($p < 0,001$).

En conclusion, à l'issue de l'application de ce test statistique, nous confirmons sans doute que le taux sérique de la progestérone est en parfaite corrélation avec d'une part le pourcentage des cellules basophiles et d'autre part le pourcentage des cellules éosinophiles. La basophilie semble même être mieux corrélée avec la progestéronémie que le pourcentage d'éosinophilie. Cependant, il ne suffit pas de prouver cette corrélation pour pouvoir utiliser le pourcentage de basophilie comme indicateur d'un seuil de progestéronémie. A cette fin, il faut mettre en relation des seuils de progestéronémie et quelques critères cytologiques.

5.3.3.2.3. Les taux de progestérone en fonction des critères cytologiques

Pour le calcul des pourcentages suivants nous considérons uniquement les frottis pour lesquels la progestéronémie ne dépasse pas la valeur de 10ng/ml soit 217 frottis sur les 282 étudiés, car à cette valeur (10ng/ml), la corrélation entre les pourcentages cellulaires et la progestéronémie change de sens de plus que cette valeur est le seuil maximal de l'intervalle de progestéronémie qui correspond à l'incidence de l'ovulation. Au delà de cette valeur les paramètres cellulaires perdent leur indication (Cf § 4.4.2.1). Par exemple, dans nos données existent des progestéronémies de fin d'œstrus et de début metoestrus associées à des taux élevés de basophilie qui risquent de fausser le calcul.

Dans cette approche, plusieurs critères cytologiques sont définis ($>50\%$ et $>40\%$ de basophilie et $<10\%$, $<25\%$ et $<33\%$ d'éosinophilie) et mis en relation avec trois seuils de progestéronémie ($<1\text{ng/ml}$ - $<1.5\text{ng/ml}$ - $<2\text{ng/ml}$). L'objectif étant de comparer ces critères entre eux à la recherche de celui qui aura le maximum de précision et la plus petite marge d'erreur.

Tableau II.10: Critères cytologiques et valeurs seuil de progestéronémie

Critères		Taux<1ng/ml	Taux<1.5ng/ml	Taux<2ng/ml
% des cellules éosinophiles	<33% (107 frottis)	91.59%	94.39%	95.33%
	<25% (96 frottis)	92.71%	95.83%	95.83%
	<10% (78 frottis)	96.15%	97.44%	97.44%
% des cellules basophiles	>50% (59 frottis)	100%	100%	100%
	>40% (67 frottis)	98.51%	100%	100%

5.3.3.2.3.1. Pourcentage des cellules éosinophiles

Les trois critères du pourcentage d'éosinophilie étudiés ont montré tous des marges d'erreur intolérables.

Le critère le plus restrictif (soit moins de 10% de cellules éosinophiles) présente une marge d'erreur de 2.66% pour le seuil de progestéronémie [P4<2ng/ml] et de 3.75 pour le seuil [P4<1ng/ml]. Respectivement, 2 sur 78 frottis répondant au critère correspondaient à des progestéronémie supérieures au seuil de 2ng/ml et 3 frottis sur 78 correspondaient à des progestéronémie supérieures à 1ng/ml.

Le critère le moins restrictif (soit moins de 33% de cellules éosinophiles) présente une marge d'erreur de 4.67% pour le seuil de progestéronémie de [P4<2ng/ml], soit 5 sur 107 frottis correspondent à des progestéronémie supérieures à 2ng/ml. Il présente aussi une marge d'erreur de 7.29% pour le seuil [P4<1ng/ml], soit 9 frottis sur 107 correspondent à des progestéronémies supérieures à 1ng/ml.

Le pourcentage des cellules éosinophiles ne semble pas offrir des critères fiables et utilisables comme indicateurs d'un seuil de progestéronémie.

5.3.3.2.3.2. Pourcentage des cellules basophiles

Par contre, le critère de trouver plus de 40% de cellules basophiles sur une lame d'un frottis vaginal présente un maximum de précision avec une marge d'erreur nulle pour les seuils de progestéronémie de (P4<2ng/ml) et (P4<1.5ng/ml) et une marge d'erreur de seulement 1.49% pour le seuil le plus restrictif de (P4<1ng/ml).

Ces résultats signifient que sur les 67 frottis répondant à ce critère cytologique de plus de 40% de basophilie, seulement un frottis correspondait à une progestéronémie supérieure à 1ng/ml. Il s'agit d'un frottis qui pour un pourcentage de basophilie de 45.98% il correspondait à un taux de progestérone de 1.01ng/ml. Nous voyons que l'écart entre cette valeur de progestéronémie et la valeur du seuil ($P4 < 1.00 \text{ ng/ml}$) est minime, elle est de 0.01 ng/ml.

Ce critère (plus de 40% de cellules basophiles) pourrait être retenu comme un indicateur fiable d'un seuil de progestéronémie ($\text{Taux} < 1 \text{ ng/ml}$). Ceci implique que lorsque sur un frottis vaginal on compte 4 cellules basophiles sur 10 ou 12 cellules basophiles sur 30, il est inutile de doser la progestérone, car elle est inférieure à 1ng/ml.

5.4. Discussion

5.4.1. Discussion des résultats des traitements d'induction à la Bromocriptine et à la Cabergoline.

5.4.1.1. Etude comparative des Taux d'Induction de gestation et de natalité.

Les taux d'induction, de gestation et de natalité ont donné la même valeur dans le groupe de traitement à la Bromocriptine qui est celle de **25%** de succès contre **75%** d'échec (Cf Tableau II.11).

Tableau II.11: Taux d'induction; de gestation et de natalité relatifs au traitement à la *Bromocriptine*.

	TRAITEMENT D'INDUCTION (BROMOCRIPTINE)		
	TAUX D'INDUCTION	TAUX DE GESTATION	TAUX DE NATALITE
SUCCES	25 %	25 %	25 %
ÉCHEC	75 %	75 %	75 %
TOTAL	100 %	100 %	100 %

Ces trois critères d'étude ou d'évaluation (taux d'induction, de gestation et de natalité) ont donné également la même valeur entre eux dans le groupe de traitement à la Cabergoline qui est celle de **87.5%** de succès contre **12.5%** d'échec (Cf Tableau II.12).

Tableau II.12: Taux d'induction; de gestation et de natalité relatifs au traitement à la *Cabergoline*.

	TRAITEMENT D'INDUCTION (<i>CABERGOLINE</i>)		
	TAUX D'INDUCTION	TAUX DE GESTATION	TAUX DE NATALITE
SUCCES	87.5 %	87.5 %	87.5 %
ÉCHEC	12.5 %	12.5 %	12.5 %
TOTAL	100 %	100 %	100 %

Les valeurs sont identiques pour ces trois variables car les femelles répondant à l'induction sont toutes devenues gestantes et ont toutes mené à terme leurs gestations dans de bonnes conditions (Cf Tableau II.6).

C'est-à-dire que toutes les femelles ayant répondu au traitement d'induction ont ovulé normalement et ont été fécondées normalement et ont maintenu leur gestations dans des conditions normales jusqu'à terme et ont mis bas leurs petits.

Pour cette raison, le taux d'induction dans notre étude pourrait être considéré comme taux d'ovulation aussi.

Nos résultats des taux d'induction de gestation et de natalité pour le traitement d'induction à la *Cabergoline* sont comparables à quelques différences de ceux rapportés par Professeur John VERSTEGEN de la Faculté Vétérinaire de Liège en Belgique en 1999 dans une étude qu'il a conduite avec le même protocole de *Cabergoline* que le notre sur trois groupes de cinq (n=5) femelles chacun [124].

Professeur John VERSTEGEN a rapporté un taux d'induction de 80% pour un taux de gestation et de natalité de 60%. Cette différence entre les taux d'induction et de gestation incrimine l'incidence de chaleurs anovulatoires dans ce groupe d'étude; ce qui n'a pas été le cas dans notre étude.

Dans la même étude sur deux autres groupes d'induction (n=5), John VERSTEGEN a obtenu un taux d'induction à la *Cabergoline* de 100% pour un taux de gestation de 80% et un taux d'induction et de gestation de 100%. La petitesse de l'effectif d'étude (n=5) aurait pu contribuer à l'amplification des résultats d'induction dans ce travail.

Les résultats de notre étude ne s'éloignent pas de ceux rapportés par A ROTA et ses collaborateurs en 2003 à l'Université de Turin en Italie [09] dans une étude comparative de deux protocoles d'induction (*Cabergoline* versus *Buserelin*) où ils ont obtenu un taux d'induction, de gestation et de natalité de 83% pour un effectif de 12 femelles (n=12) pour le groupe de Cabergoline. Ils ne s'éloignent pas non plus des résultats obtenus par L ZOLDAG et ses collaborateurs en 2001 à l'Université des Sciences Vétérinaires de Budapest en Hongrie qui ont rapporté un taux d'induction, de gestation et de natalité de 84.6% à la différence de la dose de Cabergoline utilisée qui était beaucoup plus forte dans l'essai clinique de L ZOLDAG (6mg/kg/j PO pdt 14j). ZOLDAG voulait étudier l'effet de la dose sur la durée du traitement.

Nos résultats sont proches aussi de ceux rapportés dans une étude faite en 2006 à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université d'Istanbul par Ümüt CIRIT et ses collaborateurs qui ont obtenu un taux d'induction de 80% associé à un taux de gestation de 60% sur une effectif de 10 femelles (n=10) soumises à un protocole d'induction à la *Cabergoline* identique au notre [143].

Les résultats obtenus dans notre étude pour le traitement d'induction à la *Cabergoline*, se rapprochent mais restent légèrement faibles par rapport à ceux rapportés par Samuel BUFF en 2001 sur une étude d'induction de l'œstrus à la *Cabergoline* (même dose utilisée) lancée par le CERREC à l'ENV de Lyon en France qui a obtenu un taux d'induction et de gestation de **93%** [59]. Cependant cette étude du Centre d'Etude et de Recherche en Reproduction et Elevage des Carnivores en France a été conduite sur un effectif plus large (n=97) et dans un contexte de clientèle canine (36 clientèles) ce qui rend ses résultats beaucoup plus représentatifs et moins biaisés par l'effet du mode de vie communautaire des chiennes de chenil sur la synchronisation naturelle due à l'inter-influence sensorielle [08].

Pour le traitement d'induction à la *Bromocriptine*, nos résultats sont faibles par rapport à ceux rapportés dans la littérature. Un taux de gestation de 62% après quatre mois de traitement (40µg/kg/j PO) a été rapporté par Van HAAFTEN B et ses collaborateurs en 1989 [111]. Professeur Patrick William CONCANNON a

rapporté en 1993 un taux d'induction à la Bromocriptine de 80% mais le taux de gestation n'a pas été déterminé [36].

Pour les autres études rapportées; les taux d'induction obtenus étaient associés à des périodes assez longues de traitement allant de 92 ± 11 jusqu'à 136 ± 16 jours [127], [142] ce qui pose un réel problème avec les effets secondaires surtout émétisants de cette molécule.

5.4.1.2. Etude comparative du paramètre taille moyenne de la portée.

Pour le groupe d'induction à la Bromocriptine; le tableau II.5 nous montre une moyenne calculée pour la taille de la portée d'une valeur de 5.50 ± 0.98 exprimée en nombre de chiots avec un intervalle de [4.52 – 6.48]. Il y a lieu de signaler en revenant au tableau II.3 que cette moyenne n'est pas représentative du lot d'étude, car elle est calculée sur seulement deux femelles qui ont répondu à l'induction à la *Bromocriptine* à savoir les femelles portant les numéros de code (06) et (07) qui avaient mis bas respectivement 6 et 5 chiots.

La taille moyenne de la portée calculée dans le groupe d'induction à la *Cabergoline* était 5.86 ± 0.79 avec une plage de confiance de [5.07 – 6.65] et résultait des données des 7 femelles sur 8 qui ont répondu à l'induction.

	TAILLE MOYENNE DE LA PORTEE	
	AVANT INDUCTION	APRES INDUCTION
LOT "A" D'INDUCTION A LA BROMOCRIPTINE	5.00 ± 0.51 [4.49 – 5.51]	5.50 ± 0.98 [4.52 – 6.48]
LOT "B" D'INDUCTION A LA CABERGOLINE	5.83 ± 0.60 [5.23 – 6.44]	5.86 ± 0.79 [5.07 – 6.65]

Comparativement aux cycles précédents des femelles induites, aucune influence ne semble être exercée par aucun des deux traitements sur ce facteur.

La comparaison des données de cette variable (la taille de portée) pour chaque groupe de traitement avec les données précédentes (avant induction) ne permet de dégager aucune différence significative, bien que cette conclusion est peu significative dans le cas du groupe de traitement à la *Bromocriptine* à cause

du faible nombre de femelles induites (Cf Tableau II.3). Il est de ce fait inutile de chercher à comparer ces résultats entre les deux groupes de traitement.

Donc, contrairement à ce qu'est rapporté dans la littérature par certains auteurs [119], les deux traitements d'induction aux anti-prolactines (*Bromocriptine* et *Cabergoline*) n'ont montré dans notre étude aucune influence sur la taille de la portée.

5.4.1.3. Etude comparative du paramètre raccourcissement de l'intervalle interœstral.

Dans le groupe d'induction à la *Bromocriptine*, les deux femelles induites (06) et (07) ont connu un raccourcissement de leur intervalle interœstral respectivement de 11.5 jours et 2 jours avec une moyenne de 6.75 ± 9.31 jours [NS] et un intervalle de $[-2.56] - 16.06$. Cette valeur est non significative car l'intervalle de confiance contient la valeur zéro. Aucun raccourcissement significatif de cet intervalle n'est donc enregistré par la *Bromocriptine*.

Par contre, le groupe d'induction à la *Cabergoline* a connu un raccourcissement moyen de l'intervalle interœstral de 43.40 ± 14.30 jours avec une plage de confiance de $[29.10 - 57.70]$. Pour le calcul de cette moyenne, nous avons retiré les deux femelles présentant l'anœstrus primaire et secondaire soit les femelles portant les codes (05) et (06).

Dans la littérature, des moyennes de raccourcissement de l'interœstrus beaucoup plus importantes sont rapportées [59], [08].

5.4.1.4. Etude comparative du paramètre durée du traitement.

Les deux femelles induites à la *Bromocriptine* portant les numéros de code (06) et (07) ont répondu respectivement au bout de 38 et 34 jours de traitement avec une moyenne de 34.50 ± 6.86 jours de traitement avec un intervalle de $[27.64 - 41.36]$.

Ce chiffre s'éloigne des résultats d'études de la plupart des auteurs, certainement parce qu'il n'est pas significatif et pas représentatif du lot d'étude (2 femelles induites sur 8 femelles traitées à la *Bromocriptine*).

A part CONCANNON qui a rapporté une durée de traitement de 17-28 jours et Van-HAAFTEN B et ses collaborateurs une durée de 47 ± 2 jours de traitement à la *Bromocriptine* [99], [111]; la littérature évoquent des périodes assez longues de traitement allant de 92 ± 11 jusqu'à 136 ± 16 jours [127], [142].

Ce ci nous a posé un réel problème dans notre étude accentué par les effets secondaires surtout émétisants de cette molécule et nous a empêché de prolonger la durée du traitement, malgré toutes les tentatives d'habituer progressivement les chiennes au traitement.

Dans le cas du groupe d'induction à la *Cabergoline*, la durée de traitement moyenne est de 24.43 ± 7.77 jours avec une plage de confiance de [16.66 – 32.20] pour les 7 femelles induites sur 8 chiennes traitées. Cette moyenne est ainsi relativement plus significative.

Notre résultat se rapproche des valeurs rapportées dans la littérature pour le même protocole de traitement en termes de dose utilisée. En l'occurrence des périodes de (23.5 ± 3.2) jours et de (23.5 ± 5) jours de traitement ont été rapportées respectivement par [09], [123].

Des durées de traitement beaucoup plus courtes ont été rapportées. Cristina GOBELLO et ses collaborateurs à la Faculté des Sciences vétérinaires de l'Université de La Plata en Argentine rapportent en 2002 une durée de traitement de $16.2 + 2.7$ jour et ZOLDAG L et ses collaborateur rapporte en 2001 une durée de traitement qui oscille entre 6 -14 jours [144], [119].

Ces valeurs qui s'éloignent à la baisse de nos résultats sont expliquées par la dose de Cabergoline utilisée dans ces travaux qui est beaucoup plus élevée que la notre (6mg/kg/j).

Nous avons constaté dans notre étude qu'un autre facteur influe sur la durée du traitement. C'est le stade d'anœstrus dans lequel se trouve la femelle au moment du début de traitement d'induction.

Dans le groupe d'induction à la *Cabergoline*, les femelles portant les numéros de code (04) (11) et (10) ont commencé a recevoir leur traitement alors qu'elles étaient situées dans leurs cycles respectivement au début, à la moitié et à

la fin de l'anœstrus. Leurs durées de traitement sont respectivement de 32, 20 et 12 jours.

Ces résultats suggèrent qu'un traitement d'induction à la Cabergoline débuté au stade précoce de l'anœstrus requerra une longue durée pour pouvoir induire l'œstrus, par contre il sera de courte durée s'il est débuté à un stade tardif de l'anœstrus. Sa durée sera moyenne s'il est débuté à la moitié de l'anœstrus.

Professeur John François VERSTEGEN a rapporté des durées de traitement de (20 ± 3) jours (14 ± 3) jours et (6 ± 1) jours respectivement pour les femelles traitées en début d'anœstrus, au milieu d'anœstrus et en fin d'anœstrus [124] ce qui est en parfaite concordance avec nos résultats.

Enfin dans notre étude, ce critère d'évaluation comparative des deux traitements d'induction favorise donc le protocole *Cabergoline* et défavorise le protocole *Bromocriptine*.

5.4.1.5. Etude comparative du paramètre intervalle interœstral suivant le cycle induit.

Le tableau 2x2 comparatif des résultats de l'interœstrus suivant le cycle induit pour les deux lots de traitement avant et après induction se présente comme suit:

	INTERŒSTRUS SUIVANT	
	AVANT INDUCTION	APRES INDUCTION
Lot "A" D'INDUCTION A LA BROMOCRIPTINE	215.33 ± 56.14 [159.19 – 271.48]	200.00 ± 34.24 [165.76 – 234.24]
Lot "B" D'INDUCTION A LA CABERGOLINE	204.17 ± 33.02 [171.15 – 237.18]	186.29 ± 8.87 [177.42 – 195.15]

Ce tableau montre que le traitement d'induction qu'il soit à la Bromocriptine ou à la Cabergoline, n'affecte pas considérablement l'interœstrus du cycle suivant le cycle induit chez la chienne induite. Celle-ci reviendrait donc en chaleur dans un délai habituel.

En revenant au tableau des résultats bruts (Cf Tableau II.3), nous remarquons que dans le groupe d'induction à la *Bromocriptine*, et sur les deux femelles induites du lot (06) et (07) sont revenues en chaleurs dans des délais comparables à ceux de leurs cycles précédents. Les deux femelles induites (06) et (07) ont eu un intervalle interœstral suivant le cycle induit de respectivement 184 et 170 jours comparés respectivement à 177.5 et 170 jours avec un écart de respectivement 6.5 et 11 jours.

Les femelles induites dans le groupe d'induction à la *Cabergoline* à part les deux chiennes présentant le problème d'œstrus primaire et secondaire sont les femelles portant les numéros de code suivants: (04), (11), (10), (15) et (16). Elles ont eu des intervalles interœstraux suivant le cycle induit de respectivement 170, 185, 189, 191 et 177 jours comparés respectivement à 163.5, 181, 182, 230.5 et 287 jours avec un écart de respectivement 6.5, 04, 7, -39.5 et -110 jours.

Pour les trois premières femelles à savoir (04), (11) et (10) qui sont à cycle régulier; les intervalles interœstraux suivant le cycle induit sont pratiquement inchangés par rapport aux intervalles précédents recueillis des renseignements reproductifs des femelles de l'expérimentation (Tableau II.2).

Par contre, les deux autres femelles à savoir (15) et (16) ont connu un raccourcissement de leurs intervalles interœstraux prolongé, car ce sont des chiennes à cycle irrégulier présentant le problème d'un interœstrus long mais physiologique (<12mois).

Cette constatation suggère que le traitement d'induction chez une chienne à cycle régulier ne modifie pas son interœstrus qui suit le cycle induit. Ce traitement d'induction réduit cet intervalle chez la femelle à cycle irrégulier en le réduisant considérablement.

Enfin, l'évaluation comparative des deux traitements d'induction de notre étude et leur action sur l'intervalle interœstral qui suit le cycle induit ne permet de tirer aucune différence significative entre les deux molécules.

5.4.1.6. Etude comparative de l'efficacité des traitements sur les interœstrus longs.

Dans le groupe d'induction de l'œstrus à la *Cabergoline*, deux femelles parmi celles induites présentaient un interœstrus long soit un intervalle interœstral de 270 jours et un intervalle interœstral de 221 jours respectivement pour les femelles codées (15) et (16) du lot B. ces deux chiennes ont toutes les deux répondu au traitement après respectivement 18 et 16 jours d'administration de la *Cabergoline* (Cf Tableau II.4).

Par contre dans le lot A d'induction à la *Bromocriptine*, les deux femelles présentant un interœstrus long et qui sont les chiennes codées (13) et (14) avec respectivement des intervalles interœstraux de 229 jours et 297 jours; elles n'ont pas répondu au traitement d'induction (Cf Tableau II.4).

L'évaluation comparative des deux traitements d'induction (*Cabergoline* versus *Bromocriptine*) montre d'après l'étude de ce facteur que la *Cabergoline* est plus efficace que la *Bromocriptine* dans l'induction de l'œstrus chez les femelles présentant des interœstrus longs sans pour autant constituer un problème d'anœstrus secondaire; c'est-à-dire sans dépasser douze 12 mois de non retour en chaleurs.

5.4.1.7. Etude comparative de l'efficacité des traitements sur les anœstrus primaire et secondaire.

Dans le groupe d'induction à la *Bromocriptine*, aucune réponse à l'induction n'a été enregistrée sur les deux femelles présentant l'anœstrus primaire "femelle: (01)" et l'anœstrus secondaire "femelle: (18)" n'ayant pas manifesté de chaleurs depuis 478 jours soit à peu près 16 mois d'anœstrus.

Pour le lot d'induction à la *Cabergoline* la femelle présentant l'anœstrus primaire "femelle: (5) et la femelle présentant l'anœstrus secondaire "femelle: (09)" depuis 536 jours soit à peu près 18 mois, ont répondu toutes les deux au traitement d'induction avec respectivement 40 jours et 33 jours de traitement.

L'évaluation comparative des deux traitements d'induction (*Cabergoline* versus *Bromocriptine*) montre d'après l'étude de ce facteur que la *Cabergoline* est plus efficace que la *Bromocriptine* dans l'induction de l'œstrus chez les femelles

présentant des problèmes d'anoëstrus primaires ou secondaires à condition que ces femelles soient soumises avant tout traitement d'induction à une exploration poussée de leurs anoëstrus pour écarter une quelconque origine déterminée imposant des mesures thérapeutiques particulières.

Dans le cas de notre étude, les femelles présentant le problèmes d'anoëstrus primaire à savoir les chiennes numéro (01) et (05) et les chiennes présentant le problèmes d'anoëstrus secondaire à savoir les chiennes numéro (08) et (09) ont été largement explorées cliniquement et biologiquement avant l'expérimentation dans le cadre de la prise en charge médicale de leur cas d'anoëstrus. La décision d'induire a été le dernier recours pour ces femelles après avoir écarté toute cause extra-gonadique d'anoëstrus.

C'est ainsi qu'elles ont été réparties équitablement sur les deux groupes d'induction de notre étude dans le but de tenter enfin le déclenchement de l'oëstrus et la restauration de la fonction de reproduction.

En plus des critères d'évaluation précitées ayant servi à étudier comparativement les deux protocoles d'induction, nous évoquons le facteur effets secondaires du traitement, et facilité de préparation, mesure et administration de la dose quotidienne.

5.4.1.8. Evaluation du facteur "Effets secondaires" des traitements.

La *Bromocriptine* dès le début du traitement a eu un effet émétisant intense sur pratiquement la totalité des femelles traitées. Aucun anti émétique n'a été utilisé dans notre étude pour éviter tout éventuel antagonisme par compétition car les antiémétiques spécifiques agissent par le même biais des récepteurs dopaminergiques D2 [128]. Ces effets secondaires enregistrés dans notre étude sont concordants avec ce qui est rapporté dans la littérature [144], [08], [137]. Cependant, l'effet émétisant n'a pas complètement disparu malgré la progression que l'on a observée dans l'application du protocole.

Dans le groupe de traitement à la *Cabergoline*, aucun effet de ce genre n'a été enregistré et la dose quotidienne a été très bien tolérée par les femelles d'étude. La *Cabergoline* semble mieux tolérée à la dose utilisée (0.005 mg/kg/j)

que la *Bromocriptine* (0.05 mg/kg/j). Cela est en parfaite concordance avec la littérature qui rapporte l'action sélective de la *Cabergoline* dénuée d'effets centraux offrant ainsi une marge de sécurité importante [138].

Il apparaît clairement de l'étude de ce facteur que l'évaluation comparative des deux traitements d'induction (*Bromocriptine* versus *Cabergoline*) favorise indéniablement la *Cabergoline* dans l'application des protocoles d'induction de l'œstrus et défavorise la *Bromocriptine* pour son inconvénient lié aux effets secondaires (effet émétisant) rendant parfois son utilisation problématique notamment avec les longues durées de traitement imposées par cette molécule et l'impossibilité d'emploi des antiémétiques spécifiques à cause de leur antagonisme par compétition avec les récepteurs dopaminergiques D2 .

5.4.2. Discussion des résultats de l'étude de corrélation des données hormonales et cytologiques

Il ressort de la compulsion de la littérature que dans les anciennes études sur la cytologie vaginale et les indices cytologiques, les auteurs ne se sont pas intéressés à étudier l'évolution des taux cellulaires en fonction de la progestéronémie. Ces auteurs ont par contre étudié la relation de ces ratio cellulaires avec les modifications anatomiques et comportementales [145], [146] et avec la variation et le pic de la LH [147].

LINDE et KARLSSON ont pour la première fois en 1984 étudié la relation des variations de la kératinisation vaginale avec celles des taux de la progestérone et de l'œstradiol [60]. Cependant; cette étude diffère de la notre dans son approche et n'offre malheureusement pas de possibilités de comparaison. Dans nos résultats, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'existence franche d'un pic mineur de kératinisation dans les 3 à 4 jours qui précèdent le pic principal de kératinisation de l'œstrus comme rapporté dans cette étude.

En 2005, Professeur Alain FONTBONNE de l'ENV d'Alfort s'est intéressé à l'établissement de critères cytologiques pour tenter d'évaluer la progestéronémie en début de pro-œstrus. Il a lancé sous sa direction une étude rétrospective sur les données de suivi d'une année complète (2003) au Centre d'Etude en

Reproduction Canine Assistée à Alfort [61]. Compte tenu de l'originalité de cette approche, nous nous sommes trouvés limités dans nos possibilités de comparaison aux seuls résultats de cette étude.

Concernant l'évolution du taux de la progestérone sérique en fonction des critères cytologiques, nos résultats s'accordent parfaitement avec ceux du Docteur FONTBONNE et le critère le plus fiable retenu comme bon indicateur d'une progestéronémie inférieure à 2ng/ml est d'avoir sur une lame de frottis vaginal plus de 40% de cellules basophiles (>40% de basophilie).

Ce critère cytologique a reçu dans notre étude un pourcentage de 100% pour deux des trois seuils de progestéronémie étudiés à savoir ($P4 < 1.5\text{ng/ml}$ et $P4 < 2\text{ng/ml}$) avec une marge d'erreur de 0%; et 98.51% avec une marge d'erreur de 1.49% pour le seuil de progestéronémie le plus restrictif des trois ($P4 < 1\text{ng/ml}$) alors que dans l'étude de FONTBONNE les résultats étaient de 93.41%, 94.74% et 98.68% avec des marges d'erreur respectivement de 6.59%, 5.26% et 1.32% pour les seuils respectifs de ($P4 < 1\text{ng/ml}$; $P4 < 1.5\text{ng/ml}$; $P4 < 2\text{ng/ml}$).

Pour le seuil de progestéronémie le plus restrictif ($P4 < 1\text{ng/ml}$) et le critère de >40% de basophilie, le résultat de 98.51% était représenté par 66 frottis sur 67 étudiés. Un seul frottis correspondait donc à une progestéronémie au dessus du seuil étudié ($P4 < 1\text{ng/ml}$). Il s'agit d'un frottis qui pour un pourcentage de basophilie de 45.98% il correspondait à un taux de progestérone de 1.01ng/ml. Nous voyons que l'écart entre cette valeur de progestéronémie et la valeur du seuil ($P4 < 1.00\text{ng/ml}$) est minime, elle est de 0.01 ng/ml.

Quand au critère d'avoir plus de 50% de basophilie (>50% de basophilie) beaucoup plus restrictif que le critère (>40% de basophilie), nous avons reçu un résultat de 100% avec une marge d'erreur nulle pour les trois seuils de progestéronémie étudiés. C'est à dire que les 59 frottis répondant à ce critère cytologiques correspondaient tous à des progestéronémies en dessous du seuil restrictif de 1ng/ml ($P4 < 1\text{ng/ml}$).

Contrairement à l'étude de Alain FONTBONNE, nos marges d'erreur pour les critères cytologiques de basophilie étaient nulles à l'exception de la combinaison du critère cytologique (>40% de basophilie) avec le seuil de

progéstonémie ($P4 < 1\text{ng/ml}$). Ceci pourrait s'expliquer par la différence de la taille échantillonnale qui était de 543 frottis étudiés pour l'étude de FONTBONNE et se 282 frottis étudiés dans notre cas ce qui confère plus de puissance aux tests statistiques de la première étude.

Pour les critères cytologiques relatifs au pourcentage d'éosinophilie à savoir trouver sur la lame du frottis vaginal moins de 10%, moins de 25% et moins de 33% de cellules éosinophiles (kératinisées), nous avons obtenu comme résultats pour le seuil de progéstonémie de ($P4 < 2\text{ng/ml}$) respectivement 96.15%, 92.71% et 91.59% avec des marges d'erreur respectives de 3.85%, 7.29% et 8.41%.

Ces résultats sont proches de ceux trouvés dans l'étude de FONTBONNE est qui étaient respectivement de 93.13%, 92.23% et 90.17% avec des marges d'erreur respectivement de 6.87%, 7.77% et 9.83%.

Dans notre étude comme dans l'étude comparative, ces marges d'erreur ne sont pas tolérables et les trois critères cytologiques relatifs au taux d'éosinophilie ($< 10\%$, $< 25\%$ et $< 33\%$) semblent peu fiables; même le plus restrictif des trois étudiés n'a pu être retenu comme bon indicateur d'une progéstonémie inférieure à 2ng/ml .

En conclusion, le pourcentage des cellules éosinophiles est un critère d'analyse facile à appliquer car il n'exige aucun typage cellulaire mais seulement de comptabiliser les cellules complètement acidophiles. Cependant, ce critère souffre d'une marge d'erreur importante, il paraît donc très peu fiable et ne peut être retenu comme indicateur d'un seuil de progéstonémie.

Le pourcentage de cellules basophiles est lui aussi facile à analyser car il n'exige aucun typage cellulaire selon la morphologie, le lecteur aura seulement à comptabiliser les cellules complètement basophiles sans avoir à distinguer leurs morphologies. De plus, il est plus fiable que le taux d'éosinophilie. Avoir sur une lame de frottis vaginal plus de 40% de cellules basophiles " $> 40\%$ de basophilie" a été retenu comme un critère fiable et a été considéré comme bon indicateur d'une progéstonémie inférieure au seuil de 2ng/ml .

CONCLUSION

Lés résultats de cette étude suggèrent d'une part que le protocole d'induction à la *Cabergoline* utilisé [0.005 mg/kg/j PO de Cabergoline (Galastop © Sol Buv 15 ml) jusqu'à apparition du pro-œstrus ou pendant une durée maximale de 40 jours] s'avère plus efficace et plus sûr que celui à la *Bromocriptine* [0.05 mg/kg/j PO de *Bromocriptine* (Parlodel© cp sec 2.5 mg) jusqu'à apparition du pro-œstrus ou pendant une durée maximale de 40 jours] à induire chez la chienne domestique un œstrus fertile suivi d'une gestation, mise-bas et d'une prolificité normales et également un retour en chaleur dans un délai normal.

D'autre part, la *Cabergoline* serait plus efficace que la *Bromocriptine* dans l'induction d'œstrus chez les chiennes souffrant d'un inter-œstrus prolongé et également chez les femelles présentant un problème d'anœstrus primaire et secondaire.

Les taux d'induction, de gestation et de natalité ont eu les mêmes valeurs de 87.5% pour la Cabergoline versus 25% pour la Bromocriptine. Pour la comparaison de ces pourcentages loin de l'influence du hasard, le test des probabilités exactes de Fisher a été appliqué.

Il est à conclure, dans les conditions de cette étude, que le traitement à la *Cabergoline* est cliniquement plus efficace que le traitement à la *Bromocriptine*, à induire un œstrus fertile suivi de gestation et mise bas, avec des taux d'induction de gestation et de natalité de **87.5%** versus **25%**; et une différence statistiquement significative ($P < 0.05$). La probabilité pour que le hasard puisse expliquer cette différence est ($P = \mathbf{0.020279721}$) de loin en dessous du seuil de signification de 5%.

Le traitement à la Cabergoline a duré 24.43 ± 7.77 jours (Moy \pm SEM) avec un intervalle de [16.66 – 32.20] contre une durée de traitement moyenne de 34.50 ± 6.86 jours pour le traitement à la Bromocriptine avec un intervalle variant entre [27.64 – 41.36].

De plus, le traitement à la *Cabergoline* a permis de raccourcir l'intervalle interœstral chez les femelles d'étude à cyclicité normale d'une moyenne de 43.40 ± 14.30 jours avec un intervalle de [29.10j – 57.70j] par contre aucun

raccourcissement de cet intervalle n'a été obtenu avec le traitement à la *Bromocriptine* sur les deux chiennes induites.

Pour la moyenne de prolificité ou la taille moyenne de la portée, aucune différence significative n'a pu être enregistrée entre les mise-bas précédentes et la mise-bas du cycle induit.

Par ailleurs, l'étude statistique des données cytologiques et hormonales de l'étude a montré qu'au début du pro-œstrus, la corrélation entre le taux de progestérone et les pourcentages en cellules basophiles et éosinophiles est nettement marquée. Parmi les critères cytologiques étudiés, celui d'avoir plus de 40% de cellules basophiles sur le frottis vaginal (>40% de basophilie) s'est montré le plus fiable avec une marge d'erreur nulle. Son application signifie que lorsque le pourcentage des cellules basophiles est strictement supérieur à 40%, nous avons une très forte certitude que la progestéronémie est inférieure à 2ng/ml, il est donc inutile de doser cette hormone. Lorsque ce pourcentage de basophilie sera inférieur à 40%, alors les dosages prendront toute leur valeur.

Ce critère permettrait donc de revaloriser les examens cytologiques en début de pro-œstrus en évitant de pratiquer des dosages de progestéronémie coûteux et inutiles d'où son intérêt financier indéniable pour toute structure assurant le suivi médicalisé des chiennes de reproduction par cytologie vaginale et dosage de la progestérone.

RECOMMANDATIONS

Ce modeste travail a été pour nous une source d'enseignements divers dans le domaine de la reproduction des carnivores et des problèmes de la recherche scientifique dans ce domaine. A son issue, nous voudrions émettre quelques recommandations d'abord dans le sujet de l'étude à l'attention des vétérinaires praticiens qui en clientèle seront confrontés aux indications diverses du traitement d'induction de l'œstrus, puis à l'attention du Centre de Formation Cynotechnique de la Gendarmerie Nationale de Baïnem lieu de cette expérimentation et finalement à l'attention de notre chère Faculté Agro-Bio-Vétérinaire de l'Université de Blida,

Si les auteurs s'accordent à recommander, dans un contexte clinique, l'emploi des agonistes de la dopamine dans l'induction de l'œstrus chez la chienne, par rapport aux autres protocoles hormonaux demeurant encore à l'échelle expérimentale; nous recommandons à l'issue de notre étude comparative, le protocole *Cabergoline* (5 µg/kg/j PO jusqu'à apparition du pro-œstrus) comme traitement de choix aussi bien dans le déclenchement volontaire des chaleurs que dans le rétablissement de la cyclicité en cas d'interœstrus anormalement prolongé, par rapport à la *Bromocriptine* car il présente l'avantage d'efficacité clinique, de rapidité d'action, et d'inoffensivité. La *Bromocriptine* ne peut être recommandée cliniquement, car son protocole souffre, dans les conditions de notre travail, d'un défaut d'efficacité et des effets secondaires émétisants difficilement contrôlables notamment pendant les longues périodes de traitement.

A l'attention du Centre de Formation Cynotechnique de la Gendarmerie Nationale de Baïnem lieu de notre expérimentation, où se pratique déjà un protocole de suivi médicalisé pour les femelles de reproduction; nous voudrions recommander vivement l'application de ce protocole d'induction à la Cabergoline qui permettra d'accroître le nombre annuel des portées et d'augmenter ainsi le nombre de chiots produits ce qui offre au CFC/GN d'une part une source importante et stable pour la réalisation de la ressource canine et d'autre part un outil pour la planification optimale de ses programmes de reproduction en fonction de ses objectifs et ses convenances.

A l'attention de la Faculté Agro-Bio-Vétérinaire de l'Université de Blida, nous voudrions aussi recommander d'instaurer en clinique vétérinaire un suivi médicalisé du cycle œstral (frottis vaginal et prise de sang pour dosage ultérieur de la progestérone) au profit des propriétaires de chiennes désireux de faire reproduire leurs femelles et surtout au profit des éleveurs officiellement inscrits à l'association des éleveurs canins. Une fois en route, ce suivi systématique des chaleurs constituera progressivement une base de données diversifiée qui offrira matière aux études rétrospectives et prospectives. De plus, c'est dans le cadre d'un tel suivi médicalisé du cycle, que trouve son entière utilité l'emploi du critère de basophilie que nous avons étudié (plus de 40% de basophilie) et que nous recommandons ici comme indicateur cytologique fiable pour orienter et raisonner les dosages de la progestérone en début du pro-œstrus.

REFERENCES

1. **Portal ARJ.** « Les chiens d'utilité » (2002) Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
2. **Buff S.** « Protocoles d'induction de l'oestrus chez la chienne » Le Point Vétérinaire N° 212 (Janvier-Février 2001).
3. **Concannon PW.** "Estrus Induction in Dogs: Approaches, Protocols and Applications" *In: Proceedings of the 30th World Congress of the WSAVA.* (2005). Disponible en ligne à l'adresse: [<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2005>], (Consulté le 21/09/2009)
4. **Gobello C and Corrada Y.** « °Estrous induction with dopaminergic agonists in the bitch : A review » Theriogenology (2001a).
5. **Martinez-Ruitz JA, Parrea-Gutierrez VJ, and Eecobar-Mdina fj.** « Ciclo ovarico de la perra » Veterinaria Zacatecas. 2 (2006) : 229-238.
6. **Butinar J, Mujagic E, and Galac S.** "The oestrus cycle in the bitch: a review article" Slov Vet Res Vol 41 n° 1 (2004) 5-11.
7. **Kutzler MA.** « Induction and synchronization of estrous in dogs » Theriogenology 64 (2005) 766-775
8. **Gobello C, De La Sota RI, and Goya RG.** "Study of the change of prolactin and progesterone during dopaminergic agonist treatments in pseudopregnant bitches" Theriogenology. N° 66 (2001) 257-267
9. **Rota A, Mollo A, Marinelli L, Gabai G, and Vincenti L.** « Evaluation of Cabergoline and Buserilin efficacy for oestrous induction in the bitch » Reprod Dom Anim 38 (2003) p 440-443.
10. **Drion PV, Beckers JP, Derivaux J et Ectors F.** « *Physiologie de la Reproduction Tome I, II et III* » Polycopié de l'Université de Liège, Belgique. Faculté de Médecine Vétérinaire. IIIe Candidature, (Août 2003).
11. **Barone R.** « Anatomie comparée des mammifères domestiques » Tome 04 Splanchnologie II, Vigot, Paris, 2^{ème} Edit, (1990), 425-435.
12. **Fontbonne A.** « Faire reproduire son chien et sa chienne ; les clés d'une pratique réussie » Maradi, Martissere, (1996), 17 - 21.

13. **Barone R.** « Anatomie comparée des mammifères domestiques » Splanchnologie, Vigot, Paris, (1978).
14. **Done SH, Goody PC, Evans SA and Stickland NC.** « Color Atlas of Veterinary Anatomy Volume 3 The Dog & Cat » Mosby, London, (1996), 401p.
15. **Senger PL.** « Pathway to pregnancy and parturition », Current Conceptions Inc, USA, (2007), p 381.
16. **Orlandi C.** « Anatomy of the bitch and stud » *In: Proceeding of Canine Theriogenology Conference.* Columbus OH. Ohio State. December 10, 2000. The Ohio State University (2000).
17. **Anderson AC, Anderson BG.** « Atlas of canine anatomy » Lea and Febiger, Philadelphia (1994), 774-779.
18. **Feldman EC and Nelson RW.** « Infertility associated breeding disorders, and disorders of sexual development ». *In: Canine and Feline endocrinology and reproduction.* WB. Saunders Company Ed. 2ed, Philadelphia, (1996), 619-648.
19. **Derivaux J et Ectors F.** « Physiologie de la gestation et obstétrique vétérinaire » Le Point Vétérinaire, Maison Alfort, (1980), 273p.
20. **Heape W.** « The sexual season of mammals and the relation of the pro oestrum to menstruation » *Q J Micr Sci*, V. **44**, n° 1, (1900), 70.
21. **Heape W.** « The sexual season of mammals and the relation of the pro oestrum to menstruation » *Q J Micr Sci*, V. **44**, n° 1, (1900), 70.
22. **Davidson A.** « Current concepts on infertility in the bitch » *WALTHAM Focus*, V. 16, n° 6, (2006), 13-21.
23. **Eilts BE.** "The Normal Canine Estrous Cycle" *In: Polycopié de Louisiana State University. Department of Veterinary Clinical Sciences. VMED 5361. Comparative Theriogenology (Index).* Edit 2007a pp 526. Disponible en ligne à l'URL : [www.vetmed.lsu.edu/Default.htm] (Consulté le 05 juillet 2008) (Dernière mise à jour le : 01 Octobre 2007).
24. **Root--Kustritz MV.** "Breeding Management in the Dog" *In: Congresso Brasileiro De Reprodução Animal*, Belo Horizonte, Palestras. 1999. Edit Rev. Bras. Reprod. Anim V. 23, n° 2, (1999), 106-108.
25. **Fontbonne A, Buff S et Garnier F.** "Données récentes en physiologie et endocrinology sexuelle dans l'espèce canine" *Le Point Vétérinaire*, n° 209, (2000), 27-33.

26. **Noakes DE, Parkinson TJ and England GCW.** "Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity – Normal Oestrous Cycles - Bitch" In: NOAKES DE, PARKINSON TJ, ENGLAND GCW. « Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics » SUNDERS, UK, (2001), p 843.
27. **Walters EM.** "Comparative Reproductive Physiology of Domestic Animals" In: SCHATTEN H, CONSTANTINESCU G. « Comparative Reproductive Biology » Blackwell Publishing, Iowa USA, (2007), p 377.
28. **Schatten H.** "Histology Cellular and Molecular Biology of Reproductive Organs" In: SCHATTEN H, CONSTANTINESCU G. « Comparative Reproductive Biology » Blackwell Publishing, Iowa USA (2007) p 377.
29. **Tsusui Toshihiko et al.** « Intrauterine transfer of early canine embryos » Theriogenology. (2006) Article In Press. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.01.009.
30. **Jeffcoate IA.** "Endocrinology of anestrus bitches". J Reprod Fertil 47(1993) 69–76.
31. **Al-Bassam MA et al.** "Normal postpartum involution of the uterus in the dog" Can.J.comp.Med. 45 (July 1981) 217-232.
32. **Van-Haaften B, Bevers MM, Van Den Browe, Okkens AC, Van Sluijs FJ, Willems AH and Dieleman SJ.** "Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch" *Journal of Reproduction and Fertility* 101 (1994) pp 221-225.
33. **Klein R, Schams D, Failing K and Hoffmann B.** « Investigations on the Reestablishment of the Positive Feedback of Oestradiol during Anoestrus in the Bitch » Reprod Dom Anim, n° 38, (2003), 13-20.
34. **Concannon PW, Hansel W and Visek J.** "The ovarian Cycle of the Bitch: Plasma Estrogen, LH and Progesterone" *Biology of Reproduction*, n° 13, (1975), 112-121.
35. **Dolozel R, Kyliankova R, Kummer V, Maskova J, Stara P and Vitasek R.** "Follicular population and oestrogen receptor Alpha in ovary of the bitch" *Acta Vet, BRNO*, n° 73, (2004), 37-43.
36. **Concannon PW.** « Biology of Gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs » J. Reprod. Fertil. N° 47, (1993), 3-27.
37. **Martinez-Ruitz JA, Parrea-Gutierrez VJ, Escobar-M'dina fj.** « Ciclo ovarico de la perra » *Veterinaria Zacatecas*. 2 (2006), 229-238.

38. **Onclin K, Verstegen JP and Concannon PW.** "Time-related changes in canine luteal regulation: in vivo effects of LH on progesterone and prolactin during pregnancy" *Journal of Reproduction and Fertility*, n° 118, (2000), 417-424.
39. **Verstegen-Onclin K and Verstegen JP.** "Endocrinology of pregnancy in the dog – A review" *Theriogenology*, n° 70, (2008), 291-299.
40. **Hoffmann B, Riesenbeck R and Klein R.** « Reproductive endocrinology of bitches » *Animal Reproduction Science*, n° 42, (1996), 275-288.
41. **Prelaud P, Rosenberg D and Fornel P De** « Tests hormonaux : Explorations fonctionnelles en endocrinologie des carnivores domestiques » Masson-AFVAC, Paris, (2002), p 276.
42. **Hoffmann B, Busges F, Engel E, Kowalewski MP and Papa P.** « Regulation of Corpus Luteum-function in the Bitch » *Reprod Dom Anim*, n° 39, (2004), 232-240.
43. **Gobello C, Bolognani F, Ri de la Soya and Goya Rg.** « Twenty-four-hour Profiles of Serum Prolactin and LH in Anoestrus Crossbred Bitches » *Reproduction in Domestic Animals*, V. 36, n° 1, (February 2001), pp 41.
44. **England GCW, Concannon PW.** « 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).
45. **Baker R and Lumsden JH.** « Atlas de cytologie canine et féline » Masson, Paris (2001) 235-252.
46. **Eilts BE.** "*Canine Vaginal Cytology*" In: Polycopié de Louisiana State University. Department of Veterinary Clinical Sciences. VMED 5361. Comparative Theriogenology (Index). Edit 2006 pp 32; Disponible en ligne à l'URL : [www.vetmed.lsu.edu/Default.htm] (Consulté le 05 juillet 2008) (Dernière mise à jour le : 29 August 2006).
47. **Neveux M.** « Les frottis vaginaux chez la chienne » *Le Point Vétérinaire*, V. 30, n° 202, (Septembre-octobre 1999), 557-564.

48. **Ehlers JP.** "Standardization and reproducibility of vaginal cytology in the bitch and its use in determination of the breeding optimum" Dissertation, München Univ., Diss, (2000).
49. **Oettle EE and Weldhagen AA.** "A modified Shorr's stain: a practical rapid stain for canine vaginal cytology" J S Afr Vet Assoc, V. 53, n° 4, (December 1982), pp 267-268.
50. **Papanicolaou GN.** "A new procedure for staining vaginal smears" Science; n° 95 (1942), 438-439.
51. **Malandain E and Fontbonne A.** « Vagial smears in the bitch – The Royal Canin Cut-out and Keep guide » WALTHAM Focus, V. 16, n° 2, (2006), 39-40.
52. **Tammer I, Blendinger K, Sobiraj A and Bostedt H.** "The use of exfoliative vaginal cytology for the gynecological evaluation of the bitch" Tierarztl Prax. V. 22, n° 3, (Jun 1994), pp 199-207.
53. **Eilts BE.** "*Induction of Estrous*" In: Polycopié de Louisiana State University. Department of Veterinary Clinical Sciences. VMED 5361. Comparative Theriogenology (Index). Edit 2007_b, 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 2007).
54. **Taradach C.** « 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, (1980), 775–782.
55. **Tammer I, Blendinger K, Sobiraj A and Bostedt H.** "The use of exfoliative vaginal cytology for the gynecological evaluation of the bitch" Tierarztl Prax. V. 22, n° 3, (Jun 1994), pp 199-207.
56. **Root-Kustritz MV.** « 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).
57. **Borden MJ and Kennaway DJ.** «Circadian rythms and reproduction» Reproduction, n° 132, (2006), 379-392.
58. **Volkman DH, Lamb SV, Schanbacher BJ, Salerno VS, Kretz CM, Hansen BS and Vincent SE.** "The effects of storage time and temperature and anti-

- coagulant on canine blood progesterone concentrations” In: Proceeding of the 5th International Symposium of Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, Bresil, 4-6 (August 2004), 78-80.
59. **Buff S.** «Protocoles d’induction de l’oestrus chez la chienne» Le Point Vétérinaire N° 212 (Janvier-Fevrier 2001).
60. **Linde C and Karlsson I.** "The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch" J. Small. Anim. Pract., n° 25, (1984), 77-82.
61. **Luc A.** « Intérêt de l’interprétation des frottis vaginaux chez la chienne en début de proestrus lors du suivi des chaleurs : Etude expérimentale» (2005) Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d’Alfort. France.
62. **Boschiero S et Truelle F.** « Contribution de l’échographie ovarienne à la détermination du moment de l’ovulation chez la chienne : Comparaison avec les autres méthodes para cliniques couramment utilisées » (2002) Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. France.
63. **England GCW, Yeager A and Concannon PW.** « Ultrasound Imaging of the Reproductive tract of the Bitch » (21-July-2003) ; 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).
64. **Marseloo N, Fontbonne A, Bassu G, Riviere S, Leblanc B, Rault D, Biourge V and Chastant-Maillard S.** “Comparision of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches” In: Proceeding of the 5th International Symposium oc Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, Bresil, 4-6 (August 2004), 75-77.
65. **Köster K, Poulsen Nautrup C and Gunzel-Appel AR.** « A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch » *Reproduction*, n° 122, (2001),453-461.
66. **Notling JO.** « Luteal and follicular count in bitches: Assessment by means of magnetic resonance imaging » *Theriogenology*, (2006) Article In Press doi:10.1016/j.theriogenology.2006.05.009.

67. **Kutzler MA.** « Estrous induction and synchronization in canids and felids » *Theriogenology* (2007) Article in Press, doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.04.014.
68. **Verstegen J, Onclin K, Silva L and Concannon PW.** “Early termination of anoestrus and induction of fertile estrus in dog by the dopamine superagonist cabergoline” *Biol Reprod*, n° 157, (1994).
69. **Christie DW and Bell ET.** "Some observations on the seasonal incidence and frequency of oestrus in breeding bitches in Britain". *J Sm Anim Pract*, n° 12, (1971),159–67.
70. **Chastant-Maillard S et Reynaud K.** “ A la poursuite de l’embryon de chien ” *Le Magazine de l’ENVA*, n° 16, (Juin 2004), 6-7.
71. **Durrant BS, Ravida N, Spady T and Cheng A.** « New technologies for the study of carnivore reproduction » *Theriogenology* (2006) Article in Press.
72. **Fontbonne A.** “La reproduction c’est tendance!” *Pratique. Vet. Anim. Comp.* n° 14, (2005), 15-16.
73. **Gobello C and Corrada Y.** «°Biotechnology in canine reproduction: an update» *Analecta Veterinaria*, V. 23, n° 1, (2003), 30-37.
74. **Thibier M.** « The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives » *Reprod. Nutr. Dev*, n° 45, (2005), 235–242.
75. **Holst BS et al.** « Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucid of stored canine oocytes » *Journal of Reproduction and Fertility*, n° 119, (2000), 77-83.
76. **Romagnoli S E.** “Control of Estrous Cycle in the Bitch and Queen (Including the use of Progestins and GnRH Agonists)” In: Proceedings of the 28th World Congress of the WSAVA. (2003). Disponible en ligne à l’adresse : [<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2003>], (Consulté le 21/03/2009).
77. **Nizanski W.** « Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: Use of an infusion pipette and the Osiris catheter » *Theriogenology*, n° 66, (2006), 470–483.
78. **Rijsselaere T.** « Sperm distribution in the genital tract of the bitch following artificial insemination in relation to the time of ovulation » *Reproduction*, n° 128, (2004), 801–811.

79. **Wilson MS.** « Endoscopic Transcervical Insemination in the Bitch » (12-Dec-2003). In: CONCANNON PW, ENGLAND G, VERSTEGEN JP, LINDEFORSBERG 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](http://www.ivis.org)], (Consulté le 21/03/2009).
80. **Holst BS.** « Disease Transmission by Mating or Artificial Insemination in the Cat: Concerns and Prophylaxis » (13-Sep-2002). In: CONCANNON P.W, ENGLAND GCW, VERSTEGEN J, LINDEFORSBERG 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](http://www.ivis.org)], (Consulté le 21/03/2009).
81. **Linde-Forsberg C.** « Intrauterine Insemination in the Dog Using the Scandinavian Trans-Cervical Catheter and a Comparison with other Methods » (2-Feb-2001). In: CONCANNON PW, ENGLAND G, VERSTEGEN J, LINDEFORSBERG 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](http://www.ivis.org)], (Consulté le 21/03/2009).
82. **Gimenez C.** « Techniques de préparation et d'évaluation des ovocytes chez les carnivores domestiques » (2007) Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. France.
83. **Toshihiko T et al.** « Intrauterine transfer of early canine embryos » Theriogenology. (2006) Article In Press. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.01.009.
84. **Jeffcoate IA.** "Endocrinology of anestrus bitches". J Reprod Fertil 47(1993) 69–76.
85. **Ishijama T et al.** « Cryopreservation of Canine Ovaries by Vitrification » Journal of Reproduction and Development, n° 52, (2006), 293-299.
86. **Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Viaris de Losegno C, Thoumire S and Chastant-Maillard** « Maturation ovocytaire, fécondation et développement embryonnaire chez la chienne » Bull. Acad. Vét. France, V. 158, n° 2, (2005), 167-172.

87. **Bogliolo et al.** "Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on in vitro maturation of canine oocytes" *Reprod. Nutr. Dev.* N° 42, (2002), 265-273.
88. **Rota A and Cabianca G.** « In vitro maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media » *Reprod. Nutr. Dev.* N° 44, (2004), 105-109.
89. **Viaris de Lesegno C, Tanguy-Dezaux C, Chebrou M, Reynaud K et Chastant-Maillard S.** « Maturation ovocytaire in vitro chez la chienne » *Bull. Acad. vét. Fr V.* 158, n° 2, (2005), 173-180.
90. **Tanguy-Dezaux CMM.** « Etude du rôle de l'AMPc dans la reprise de la meiose ovocytaire chez la chienne » (2004) Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. France.
91. **Saint-Dizier M, Renard JP, Chastant-Maillard S.** « Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes » *Reproduction*, n° 121, (2001), 97–105.
92. **Lafort M** "Le Contrôle de la maturation nucléaire des ovocytes porcins" (2005) Thèse pour le grade de Maître ès sciences (M. Sc.) Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation. Université Laval Québec.
93. **Hossein MS et al.** « Influence of season and parity on the recovery of in vivo canine oocytes by flushing fallopian tubes » *Theriogenology* (2006) Article in Press.
94. **Concannon PW.** "Canine Pregnancy: Predicting Parturition and Timing Events of Gestation" (9 May 2000). In: CONCANNON PW, ENGLAND G, 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](http://www.ivis.org)], (Consulté le 21/09/2009).
95. **Dumassy M.** « Analyse in vivo de la fécondation dans l'espèce canine : Dosages hormonaux, suivi échographique de l'ovulation et immunocytochimie sur ovocytes » (2001) Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. France.
96. **Luvoni GC.** « Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production » *Reprod. Nutr. Dev.* N° 40, (2000), 505–512.

97. **Otoi T, Shin T, Kraemer DC and Westhusin ME.** « Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization » *Repro. Nutr. Dev.* N° 44, (2004), 631–637.
98. **Bertrand J.** “Clonage et maintenant un chat...” *M/S V.* 18, n° 4, (Avril 2002), 425-427.
99. **Hull ME and Kenigsberg DJ.** “Gonadotropin releasing hormone: function and clinical use.” *Lab Manag,* n° 25, (1987), 51–8.
100. **Concannon P, Lasley B, Vanderlip S.** “LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrous dogs”. *J Reprod Fertil,* n° 51, (1997), 1–54.
101. **Shille VM, Thatcher MJ, Simmons KJ.** “Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins” *J Am Vet Med Assoc.* V. 184, n° 12, (Jun 1984), 1469-1473.
102. **McRae GI, Roberts BB, Worden AC, Bajka A, Vickery BH.** Long-term reversible suppression of oestrus in bitches with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J Reprod Fertil,* n° 74, (1985), 389–97.
103. **Jacobi GH, Wenderoth UK.** “Gonadotropin-releasing hormone analogues for prostate cancer: untoward side effects of high-dose regimens acquire a therapeutical dimension”. *Eur Urol,* n° 8, (1982), 129–34.
104. **Trigg TE, Wright PJ, Armour AF, Williamson PE, Junaidi A, Martin GB et al.** “Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs”. *J Reprod Fertil,* n° 57, (2001), 255–61.
105. **Wright PJ, Verstegen JP, Onclin K, Jochle W, Armour AF, Martin GB, et al.** "Suppression of the oestrous responses of bitches to the GnRH analogue deslorelin by progestin". *J Reprod Fertil,* n° 57, (2001), 263–8.
106. **Bouchard GF, Gross S, Ganjam VK, Youngquist RS and Concannon PW.** “Estrous induction in the bitch with the synthetic estrogen DES” *J. Reprod. Fertil,* n° 47, (1993), 515-516.
107. **Concannon PW.** “Methods for Induction of Estrus in Dogs Using Gonadotropins GnRH or Dopamine Agonists” *In: Proceedings of the 27th World Congress of the WSAVA. 2002.* Disponible en ligne à l'adresse : [<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002>],(Consult é le 21/09/2009).

108. **Verstegen J, Onclin K, Silva L and Concannon PW.** « Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in dogs by administration of purified pig LH » J Reprod Fert, n° 111, (1997), 35-40.
109. **Moses DL, Shille VM.** "Induction of estrus in greyhound bitches with prolonged idiopathic anestrus or will suppression of estrus after testosterone administration". J Am Vet Med Assoc, n° 192, (1988), 1541–5.
110. **Arnold S, Arnold P, Concannon PW, Weilenmann R, Hubler M, Casal M, et al.** "Effects of duration of PMSG treatment on induction of estrus, pregnancy rates and the complications of hyperestrogenism in dogs". J Reprod Fertil, n° 39, (1989), 115–22.
111. **Wanke M, Farina J, Loza M, Rebuelto M, Concannon P.** Induction of oestrus in bitches with normal and persistent anestrus using human menopausal gonadotropin (hMG). Theriogenology, n° 47, (1997), 935–42.
112. **Van-Haaften B, Dieleman SJ, Okkens AC, Bevers MM and Willemse AH.** "Induction of estrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and/or bromocriptine. J. Reprod. Fertil. Suppl, n° 39, (1989), 330-331.
113. **Okkens AC, Bevers MM, Dielemann SJ and Willemse AH.** "Shortening of the interestrus interval of the cyclic dog by bromocriptine treatment" Vet. Quat. N° 7, (1985), 173-176.
114. **Arbeiter K, Brass W, Ballabio R, Jochle W.** Estrus induction and fertility with cabergoline, a prolactin inhibitor, in the bitch. J Small Anim Pract, n° 29, (1988), 781–8.
115. **Jochle W, Arbeiter K, Post K, Ballabio R and D'Ver AS.** "Effects on pseudopregnancy, pregnancy and interoestrus intervals of pharmacological suppression of prolactin secretion in female dogs and cats" J. Reprod. Fertil, n° 39, (1989), 199-207.
116. **Okkens AC, Kooistra HS, Dielemann DJ and Bevers M.** « Dopamine agonistic effects as opposed to the prolactin concentrations as the influencing factor on the length of the anestrus in the dog » In Proceedings. Third International Symposium on Reproduction of Dogs, Cats and Exotic Carnivores. Utrecht. N° 36, (1996).
117. **Kooistra HS, Bevers MA, Popp-Snilders C, Van-Haaften B, Dielemann SJ, Schoemaker J.** "Concurrent pulsatile secretion of Luteinizing Hormone and

- Follicle-Stimulating Hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in Beagle bitches" *Biology of Reproduction*, n° 60, (1999), 65-71.
118. **Olson PN et al.** "Concentrations of reproductive hormones in canine serum through late anoestrus, proestrus and estrus" *Biology of Reproduction*, n° 27, (1982), 1196-1206.
 119. **Verstegen JP, Onclin K, Silva LDM and Concannon PW.** "Effect of stage of anoestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist Cabergoline in dogs" *Theriogenology*, n° 51, (1999), 597-611.
 120. **Zoldag L, Fekete S, Csaky I and Bersenyi A.** "Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial" *Theriogenology*. V. 55, n° 8, (May 2001), 1657-1666.
 121. **Okkens AC, Bevers MM, Dielemann SJ and Willemse AH.** "Shortening of the interestrus interval of the cyclic dog by bromocryptine treatment" *Vet. Quat.* N° 7, (1985), 173-176.
 122. **Okkens AC et al.** "Evidence of prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog" *The Vet Quaterly*. V. 12, n° 4, (1990), 193-201.
 123. **Arbeiter K, Barsch E.** « Possibilities of oestrus induction in the bitch in than ergoline derivate » *J. Vet. Med.* N° 35, (1988), 111-117.
 124. **Jeukenne P, Verstegen J.** "Termination of dioestrus and induction of oestrus in dioestrous nonpregnant bitches by the prolactin antagonist cabergoline" *J Reprod Fertil Suppl.* N° 51, (1997), 59-66.
 125. **Verstegen JP, Onclin K, Silva LDM and Concannon PW.** "Effect of stage of anoestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist Cabergoline in dogs" *Theriogenology*, n° 51, (1999), 597-611.
 126. **Handaja Kusuma PS et Tainturier D.** « Comparaison of induction of œstrus in dogs using metergoline, metergoline plus human chorionic gonadotropin, or pregnant mare serum gonadotropin » *J. Reprod. Fertil.* N° 47, (1993), 363-370.
 127. **Tainturier D et al.** "Déclenchement des chaleurs chez la chienne par une anti-prolactine: la Metergoline" *Prat. Med. Chir. Anim. Comp.* n° 29, (1994), 197-203.
 128. **Okkens AC, Kooistra HS, Dielemann DJ and Bevers M.** « Dopamine agonistic effects as opposed to the prolactin concentrations as the influencing factor on the length of the anestrus in the dog » In *Proceedings. Third*

- International Symposium on Reproduction of Dogs, Cats and Exotic Carnivores. Utrecht. n° 36, (1996).
129. **England G.** "Pharmacological Control of Reproduction in the Dog and Bitch" In : England G, Harvey M. « Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology » BSAVA, UK (2004) p 235.
 130. **Spattini G et al.** "Follicular development and plasma concentrations of LH and prolactin in anoestrus female dogs treated with the dopamine agonist cabergoline" *Theriogenology*. n° 68 (2007), 826-833.
 131. **Kutzler MA.** "Canine estrus induction using deslorelin (Ovuplant)" Proc. Annual Meeting Eur. Vet Soc. Sm. Anim. Reprod., Liège, Belgium. (2002) Abstract.
 132. **Kutzler MA, Wheeler R, Lamb S, Volkmann DH.** Deslorelin implant administration beneath the vulvar mucosa for the induction of synchronous estrus in bitches. Proc Ann Meet Eur Vet Soc Small Anim Reprod Liege (2002) [abstract].
 133. **De Rensis F et al.** "The effect of administering a dopamine agonist (Cabergoline) on follicular and luteal development during pro-estrus and estrus in the female greyhound" *Theriogenology*. n° 66, (2006), 887-895.
 134. **Page CP, Curtis MJ, Walker MJ, Sutter CS and Hoffman B.B** *Pharmacologie intégrée* Traduction de la 1^{ère} Edition anglaise par George Cheymol. De Boeck Université Paris, Bruxelles. (1999), p 606.
 135. **Burger O.** «Déclenchement des chaleurs chez la chienne et la chatte avec une antiprolactine : la metergoline» (1994) Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. France.
 136. **Duprat SA.** « Insuffisance lutéale chez la chienne – Etude d'un modèle expérimental-Validation d'un traitement à l'aide d'un progestagène retard- » (2003) Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. France.
 137. **Fieni F et al.** "Physiologie de la prolactine. Pharmacologie des antiprolactines et application chez la chienne" *Prat. Med. Chir. Anim. Comp.* n° 34, (1993), 187-199.
 138. **Heraud V.** « La prolactine: Mécanisme de contrôle de la sécrétion, rôles physiologiques et applications thérapeutiques des antiprolactines chez la

- chienne » (1997) Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. France.
139. **Onclin K et al.** "Luteotrophic action of polactin in dogs and effects of a dopamine agonist Cabergoline" J. Repro. Fert Suppl, n° 47, (1993), 403-409.
 140. **Okkens AC et al.** "Evidence of prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog" The Vet Quaterly. V. 12, n° 4, (1990), 193-201.
 141. **Verstegen JP et al.** "Induction de l'avortement chez la chienne par la Cabergoline: agoniste dopaminergique, anti-prolactine spécifique" Ann. Med. Vet. N° 137 (1993) 251-259.
 142. **England GCW, Lotstedt R.** «Reproductive Physiology of Bitches» In: Proceedings of the Canine reproduction Seminar. Canada September 2000. Atlantic Veterinary College. Canada September 2000. England G, Hewitt D. "Follicular growth and ovulation in the bitch" (Abstr) In: Proceedings. EVSSAR Annual Symposium, n° 51, (1999), Lyon.
 143. **Beijerink NJ, Dieleman SJ, Kooistra HS and Okkens AC.** « Low doses of Bromocriptine shorten the interestrous interval in the bitch without lowering plasma prolactin concentration » Theriogenology, n° 60, (2003), 1379-1386.
 144. **Cirit Ü et al.** "The Effects of a low dose of Cabergoline on induction of estrus and pregnancy rates in anoestrus bitches" Anim. Repro. Sce. n° 101, (2007), 134-144.
 145. **Gobello C, Castex G, Corrada Y.** "Use of Cabergoline to treat primary and secondary anoestrus in dogs" J. Am. Vet. Med. Assoc, V. 220, n° 11, (June 2002), 1653-1654.
 146. **Schutte AP.** « Canine Vaginal Cytology » J. Small Anim. Pract. N° 08, (1967), 301–318. **Bell ET, Bailey JB, Christie DW.** "Studies on vaginal cytology during the canine estrous cycle" Journal of Endocrinology, n° 51, (1970), 225-226.
 147. **Concannon PW and DiGregorio GB.** "Canine vaginal cytology". In: Burke T (Ed), Small Animal Reproduction and Infertility, Lea & Febiger, (1986), 96-111.
 148. **Beckers A, Socin HV.** "Micro-adénomes à prolactine : la traitement par cabergoline" Médecine Thérapeutique Endocrinologie et Reproduction. Vol 2 N° 6 (Nov-Dec 2000) 496-500.
 149. **Fontbonne A, Guerin C.** « Les frottis vaginaux et le suivi du cycle oestral chez les carnivores » Intervet SA, Angers, (2003) 23 pages + Annexes.

APPENDICE A

APPENDICE A - LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

AD	: Agoniste Dopaminergique
BA	: Berger Allemand
BBM	: Berger Belge Malinois
CERCA	Centre d'Etude en Reproduction Canine Assistée
CERREC	Centre d'Etude et de recherche en Reproduction et Elevage des Carnivores
CFC/GN	Centre de Formation Cynotechnique/Gendarmerie Nationale de Bainem
CRND	Centre de Recherche Nucléaire de Draria
CIB	: Cellule Intermédiaire basophile
CIPC	: Cellules Intermédiaire Polychromatophile
CPB	: Cellule Parabasale
DES	: Di-Ethylstilboestrol
dl	: Degré de liberté d'un tableau de contingence
ECV	: Examen Cytologique Vaginal (Frottis vaginal)
EDTA	: Ethylène Di-méthyle Tetra Acétique
EIA	: Enzyme-Immuno-Assay
FSH	: Follicule Stimulating Hormone
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormon
hCG	Human Chorionic Gonadotropin
IE	: Indice Eosinophile
MGG	: May Grünwald Giemsa
PGF ₂ α	: Prostaglandin F2 alpha
PLT	: Prolactine
PMSG	: Pregant Mare's Serum Gonadotropin
PNN	Polynucléaire neutrophiles
P4	Progestérone
RIA	: Radio Immuno Assay
SA	Saillie Assistée
SN	Saillie Naturelle
χ^2	Test statistique de Khi-deux de Pierson

APPENDICE B

APPENDICE B - DEPLIANT DE PRESENTATION DU CFC/GN DE BAINEM

REPUBLIQUE ALGERIENNE
DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

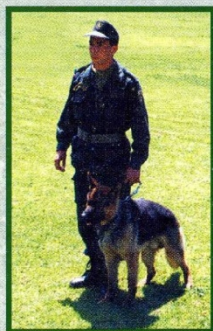
MINISTERE DE LA DEFENSE
NATIONALE

COMMANDEMENT DE LA
GENDARMERIE NATIONALE



Centre de formation cynotechnique de la gendarmerie nationale.

C'est à BAINEM, commune de HAMMAMAT, dans une forêt superbe, située sur les hauteurs ouest de la Wilaya d'ALGER, surplombant les plus belles plages de la Capitale que se trouve implanté LE CENTRE DE FORMATION CYNOTECHNIQUE DE LA GENDARMERIE NATIONALE..



Missions dévolues au Centre:

- 1 - La formation des Conducteurs, Maîtres de Chiens et personnels instructeurs.
- 2 - Le suivi technique des équipes Cynophiles, Groupes Cynophiles et Annexes Régionales.
- 3 - La remise en condition des personnels spécialisés et l'entretien des chiens de la Gendarmerie Nationale.



Le CENTRE organise Annuellement:

- Deux (02) Stages de formation de Conducteurs de Bêtes Spécialisés ou Maîtres de chien en Février et en Septembre.
- Un (01) Stage de remise à niveau (Recyclage) en juin.
- Un (01) Stage de Chiens détecteurs d'Armes.
- 1 Stage de Chiens d'interventions et secours.

Quelques chiffres:

- En 2002, la Gendarmerie compte 200 équipes cynophiles:
- 108 Chiens de garde et d'accompagnement.
 - 47 Chiens pisteurs.
 - 39 Chiens de recherche de stupéfiants.
 - 02 Chiens de recherche d'Armes
 - 04 Chiens d'assauts.



Les interventions en 2001...

- 213 interventions de pistage;
- 466 interventions de recherches de stupéfiants;
- 2625 sorties de gardes et patrouilles
- 325 Services de Barrages de Contrôles routiers.



Depuis 1962, le Centre de Formation Cynotechnique de la Gendarmerie Nationale a formé 750 équipes Cynophiles (militaire + chien)

Il assure également le remplacement des bêtes mortes ou réformées pour inaptitude au service.



Le public est cordialement invité à visiter le Centre chaque année de septembre à juin, tout les lundi de (14:00-18:00).

CENTRE DE FORMATION CYNOTECHNIQUE
DE LA GENDARMERIE NATIONALE
BAINEM, COMMUNE DE HAMMAMAT B.P. 199
Ain-Berlen - ALGER (16.202)
Tél.: 021.904.552 - Fax: 021.904.554

APPENDICE C

APPENDICE C - ETAT NOMINATIF DES FEMELLES DE L'EXPERIMENTATION

N	Nom	Matricule	Tatouage	Née le	Age (A la période expérimentale)	Race	OBSERVATIONS
1	ARINA	2120805	FN.7491	28/10/00	6 ANS	B/A	R.A.S
2	BONA 1	2210821	GN.821	31/01/02	4 ANS	B/A	R.A.S
3	BONA 2	2210822	GN.822	31/01/02	4 ANS	B/A	R.A.S
4	CHARLOTTE	2110837	GN.837	20/03/01	5 ANS	B/A	R.A.S
5	DATCHA	ND	BAT 85	25/04/01	5 ANS	BERGER ATLAS	R.A.S
6	DOUSHKA	ND	BBM 54	19/06/03	3 ANS	BBM (X)	R.A.S
7	IRA 1	2210827	GN.827	08/02/02	4 ANS	B/A	R.A.S
8	IRA 2	2210828	GN.828	08/02/02	4 ANS	B/A	R.A.S
9	LIZA	ND	BA 245	08/08/02	4 ANS	B/A	R.A.S
10	LORA2	21.10.818	GN.818	21/11/01	5 ANS	B/A	R.A.S
11	LYSA	ND		17/12/02	4 ANS	BBM	R.A.S
12	MITCHA	9920801	DA-5738	14/04/99	7 ANS	B/A	R.A.S
13	NEBRASKA	2020801	GI-8113	04/12/2000	6 ANS	B/A	R.A.S
14	RYM	ND	AZAW 5	03/02/01	5 ANS	AZAWAKH	R.A.S
15	VENUS	ND	COR 44	04/06/01	5 ANS	CORNIAUD	R.A.S
16	XAVA	ND	DOB 99	12/03/03	3 ANS	DOBERMAN	R.A.S

APPENDICE D

APPENDICE D - FICHE INDIVIDUELLE DE FEMELLE REPRODUCTRICE

FICHE INDIVIDUELLE DE FEMELLE REPRODUCTRICE

- **NOM/** IRA-1
- **MATRICULE/** 22.10.827
- **TATOUAGE/** GN-827
- **DATE DE NAISSANCE/** 08/02/2002
- **RACE/** BERGER ALLEMAND
- **ROBE/** N/F
- **DATE DES PREMIERES CHALEURS (PUBERTE)/**
- **POIDS VIF D'ENTRETIEN/** 30 Kg



PARAMETRE REPRODUCTIF		ORDRE DES CYCLES OESTRAUX							
		CYCLE N°.	CYCLE N° ..	CYCLE N° ..	CYCLE N° ..	CYCLE N° ..	CYCLE N° ..	CYCLE N° ..	CYCLE N° ..
ECOULEMENT VULVAIRE SANGUINOLENT	DEBUT D'ECOULEMENT	17/07/05	28/12/05	06/06/06	15/11/06	05/05/07	//	//	//
	FIN D'ECOULEMENT	08/08/05	10/01/06	20/06/06	06/12/06	26/05/07	//	//	//
METHODE DE DETECTION DE L'OVULATION	COMPORTEMENT	✓	✓	✓	✓	✓	//	//	//
	FROTTIS VAGINAL	ND	ND			✓	//	//	//
	FROTTIS + DOSAGE- P4	ND	ND	✓	✓		//	//	//
	DOSAGE-P4	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
	DOSAGE-LH	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
DATE D'INSEMINATION (SN/SA/IA)		31/07/05	02/01/06	ND	12/12/06	23/05/07	//	//	//
METHODE D'INSEMINATION	SAILLIE NATURELLE (SN)	SN	SN	ND	SN	SN	//	//	//
	SAILLIE ASSISTEE (SA)	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//

	INSEM ARTIFICIELLE (IA)	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
DATE DU DOUBLEMENT		02/08/25	04/01/06	ND	14/12/06	25/05/07	//	//	//
DATE DU DEUXIEME DOUBLEMENT		04/08/05	06/01/06	ND	ND	27/05/07	//	//	//
ETALON UTILISE		MAX	BENEFIT	ND	NERO	NERO	//	//	//
DIAGNOSTIC DE GESTATION	DGC CLINIQUE	✓	✓	ND	✓	✓	//	//	//
	DGC BIOLOGIQUE	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
	DGC ECHOGRAPHIQUE	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
	DGC RADIOLOGIQUE	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
DENOMBREMENT RADIO DES FŒTUS	DATE D'EXAMEN	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
	NOMBRE DE FOETUS	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
CONTROLE DE VIABILITE DES FŒTUS	DATE D'EXAMEN	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
	METHODE D'EXAMEN	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
	RESULTATS	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
AVORTEMENT		ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
DATE DE LA MISE BAS		01/10/05	02/03/06	ND	13/02/07	24/07/07	//	//	//
DEROULEMENT DE LA MISE BAS	FACILE	✓	✓	ND	✓	✓	//	//	//
	DIFICILE	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
	DUREE	ND	ND	ND	ND	ND	//	//	//
TAILLE DE LA PORTEE	CHIOTS FEMELLE	2	2	ND	2	3	//	//	//
	CHIOTS MALE	4	2	ND	3	4	//	//	//
NOMBRE DE TARRES CONGENITALES		0	0	ND	0	0	//	//	//
MORTALITE	MORTALITE 0-48 H	1	0	ND	0	2	//	//	//
	MORTALITE - 8 JOURS	0	0	ND	0	0	//	//	//
	MORTALITE -15 JOURS	0	0	ND	0	0	//	//	//
	NB DE CHIOTS SEVRES	5	4	ND	0	5	//	//	//

APPENDICE E

APPENDICE E - FICHE INDIVIDUELLE DE RENSEIGNEMENT

CHIENNE NOMMEE « IRA-1 » CODE (07)

Ordre de Passage	Date de passage	EXAMEN DE L'APP GENITAL EXTERNE (Modifications organiques)			AUTRES SIGNES D'OESTRUS		FROTTIS VAGINAL		PRISE DE SANG		OBS
		Cedeme vulvaire	Muqueuse vulvaire	Ecoulement vulvaire	Comportement	Réflexes-postures	Couleur écouvillon	Odeur écouvillon	Heure de prise	Code échantillon	
1.	03/06/06	2	1	(+) Sg	1	0	3	RAS	ND	ND	RAS
2.	06/06/06	2	1	(+) Sg	2	S. Am (+)	3	RAS	ND	ND	RAS
3.	10/06/06	2	1	(+) Sg	2	S. Am (+)	2-3	RAS	ND	ND	RAS
4.	13/06/06	2	1	(+) Sg	2	S. Am (+)	4	RAS	10H15	7(13/06/06)	RAS
5.	17/06/06	2	1	(+) Sg	2	ND	4	RAS	09H45	7(17/06/06)	RAS
6.	20/06/06	2	1	(-)	0	0	4	RAS	10H05	7(20/06/06)	RAS
7.	24/06/06	1-2	0	(-)	0	0	1	RAS	09H10	7(24/06/06)	RAS
8.	27/06/06	1	0	(-)	0	0	4	RAS	11H10	7(27/06/06)	RAS
9.	01/07/06	1	0	(-)	0	0	1	RAS	09H37	7(01/07/06)	RAS
10.	15/07/06	0	0	(-)	0	0	1	RAS	10H28	7(15/06/06)	RAS
11.	22/07/06	0	0	(-)	0	0	1	RAS	10H20	7(22/07/06)	RAS
12.	29/07/06	0	0	(-)	0	0	1	RAS	10H10	7(29/07/06)	RAS
13.	05/08/06	0	0	(-)	0	0	1	RAS	09H20	7(05/08/06)	RAS
14.	12/08/06	0	0	(-)	0	0	1	RAS	09H44	7(12/08/06)	RAS
15.	19/08/06	0	0	(-)	0	0	1	RAS	10H16	7(19/08/06)	RAS
16.	26/08/06	0	0	(-)	0	0	1	RAS	10H57	7(26/08/06)	RAS
17.	27/09/06	0	0	(-)	0	0	1	RAS	10H20	7(27/09/06)	RAS
18.	30/09/06	0	0	(-)	0	0	1	RAS	09H40	7(30/09/06)	RAS

**01. Tableau de codification des modalités du caractère
« Œdème vulvaire » :**

CODE	SIGNFICATION
« 0 »	Absence d'œdème
« 1 »	Œdème léger
« 2 »	Œdème intense

**02. Tableau de codification des modalités du caractère
« Muqueuse vulvaire » :**

CODE	SIGNFICATION
« 0 »	Normale
« 1 »	Œdédiés

**03. Tableau de codification de modalité du caractère
« Ecoulement vulvaire » :**

CODE	SIGNFICATION
(-)	Absent
(+/-)	Peu abondant
(+)	Abondant
Sg	Sanguinolent
Sx-Sg	Sero-sanguinolent
Sx	Séieux
Mq	Muqueux

**04. Tableau de codification des modalités du caractère
« Comportement d'œstrus » :**

CODE	SIGNFICATION
« 0 »	Comportement social non sexuel
« 1 »	Comportement sexuel : Attrait – refus du mâle
« 2 »	Comportement sexuel : Attrait – Acceptation du mâle

**05. Tableau de codification des modalités du caractère
« Réflexes et postures » :**

CODE	SIGNFICATION
S.Am +	Signe (Réflexe) d'Amantéa positif
P. Lordose +	Posture de Lordose positive

**06. Tableau de codification des modalités du caractère
« Couleur de l'écouvillons s » :**

CODE	SIGNFICATION
01	Blanc
02	Rose
03	Rouge
04	Marron
Autre	Spécifier

APPENDICE F

APPENDICE F - TIMING ET CODIFICATION DES ECHANTILLONS SANGUINS POUR LE DOSAGE DE LA P4

VISITE DU :13/06/2006				VISITE DU :17/06/2006				VISITE DU :20/06/2006			
N°	Nom Chienne	Heure prise	Code échant	N°	Nom Chienne	Heure Prise	Code échant	N°	Nom Chienne	Heure prise	Code échant
01	ARINA	10H45	1(13/06/06)	01	ARINA	11H12	1(17/06/06)	01	ARINA	09H39	1(20/06/06)
02	BONA1	11H20	2(13/06/06)	02	BONA1	10H09	2(17/06/06)	02	BONA1	10H30	2(20/06/06)
03	BONA2	11H10	3(13/06/06)	03	BONA2	09H39	3(17/06/06)	03	BONA2	10H45	3(20/06/06)
04	CHARLOTTE	10H55	4(13/06/06)	04	CHARLOTTE	11H25	4(17/06/06)	04	CHARLOTTE	09H51	4(20/06/06)
05	DATCHA	10H00	5(13/06/06)	05	DATCHA	10H45	5(17/06/06)	05	DATCHA	11H50	5(20/06/06)
06	DOUSHKA	10H20	6(13/06/06)	06	DOUSHKA	09H30	6(17/06/06)	06	DOUSHKA	10H05	6(20/06/06)
07	IRA 1	11H25	7(13/06/06)	07	IRA 1	10H52	7(17/06/06)	07	IRA 1	11H25	7(20/06/06)
08	IRA 2	10H40	8(13/06/06)	08	IRA 2	09H20	8(17/06/06)	08	IRA 2	09H12	8(20/06/06)
09	LISA.BA	11H04	9(13/06/06)	09	LISA.BA	10H00	9(17/06/06)	09	LISA.BA	10H21	9(20/06/06)
10	LORA 2	10H35	10(13/06/06)	10	LORA 2	11H00	10(17/06/06)	10	LORA 2	09H00	10(20/06/06)
11	LYSA.BBM	11H30	11(13/06/06)	11	LYSA.BBM	10H25	11(17/06/06)	11	LYSA.BBM	08H45	11(20/06/06)
12	MITCHA	11H00	12(13/06/06)	12	MITCHA	09H10	12(17/06/06)	12	MITCHA	10H14	12(20/06/06)
13	NEBRASKA	09H45	13(13/06/06)	13	NEBRASKA	11H10	13(17/06/06)	13	NEBRASKA	10H52	13(20/06/06)
14	RYM	09H53	14(13/06/06)	14	RYM	11H54	14(17/06/06)	14	RYM	11H10	14(20/06/06)
15	VENUS	09H40	15(13/06/06)	15	VENUS	10H15	15(17/06/06)	15	VENUS	08H39	15(20/06/06)
16	XAVA	11H40	16(13/06/06)	16	XAVA	10H31	16(17/06/06)	16	XAVA	09H20	16(20/06/06)

APPENDICE G

APPENDICE G - CONSIGNES POUR LES FROTTIS VAGINAUX

(D'après Pr Brigitte SILIARD du Service d'Endocrinologie ENVA France)

CONSIGNES POUR LES FROTTIS VAGINAUX

R E A L I S A T I O N

PRELEVEMENT

On utilise un écouvillon stérile long de 15 cm minimum, humidifié à l'aide d'une goutte d'eau physiologique (l'eau distillée ou l'eau de robinet altèrent les cellules).

Cet écouvillon doit être introduit le long du bord supérieur des lèvres vulvaires afin d'éviter la fosse clitoridienne (mouvement réalisé avec l'écouvillon vertical).

Il est ensuite basculé à l'horizontale et enfoncé doucement, le plus profondément possible.

Après quelques mouvements de rotation, il est lentement retiré vers l'arrière.

ETALEMENT

Il convient alors de faire rouler sans écraser le coton sur l'extrémité de la lame et surtout ne pas froter pour ne pas altérer les cellules. Ne pas passer deux fois au même endroit. Cet étalement doit être réalisé immédiatement après le prélèvement pour éviter la dessiccation.

FIXATION

La lame est immédiatement plongée pendant cinq minutes dans un mélange alcool-éther qui réalise la fixation de l'étalement.

Si vous ne possédez pas de mélange alcool-éther (AA), il est préférable de sécher à l'air et de ne pas utiliser de bombe fixante.

COLORATION

Coloration Harris Schorr et MGG (faire au moins 2 lames).

Dans la lecture d'un frottis vaginal, trois éléments sont considérés:

- Présence d'hématies ou de leucocytes;
- Formes de cellules, présence ou absence de noyau et forme du noyau s'il existe;
- Affinité tinctoriale du cytoplasme de ces cellules (bleu: basophile, jaune/orangé: acidophile).

ENVOI

Protéger avec une autre lame, envelopper le tout dans du papier aluminium ou bien envoyer dans un étui porte-lame.

APPENDICE H

APPENDICE H - TECHNIQUE DE COLORATION DE HARRIS-SCHORR

[SCHUTTE AP; 1967]

ORDRE DE PASSAGE	PRODUITS A UTILISER	TEMPS
1	MELANGE ALCOOL- ETHER ½	5 MINUTES
2	ALCOOL A 70°	PLONGER 10 FOIS
3	ALCOOL A 50°	PLONGER 10 FOIS
4	EAU DISTILLEE	PLONGER 10 FOIS
5	HEMATOXYLINE DE HARRIS	2 MINUTES
6	EAU DISTILLEE	PASSAGE
7	EAU DISTILLEE	PASSAGE
8	ALCOOL AMMONIACAL	1 MINUTE
9	EAU DISTILLEE	PASSAGE
10	ALCOOL 70°	PASSAGE
11	ALCOOL 95°	PASSAGE
12	COLORANT DE SHORR	2 MINUTES
13	ALCOOL 95°	PASSAGE
14	ALCOOL ABSOLU	PASSAGE

APPENDICE I

APPENDICE I - NOTICE D'UTILISATION DU COLORANT HEMATOXYLINE D'HARRIS UTILISE

(ACCUSTAIN® HARRIS HEMATOXYLIN SOLUTION – SIGMA-ALDRICH)



**ACCUSTAIN® HARRIS
HEMATOXYLIN SOLUTION**
(Procedure No. HHS)

INTENDED USE

Harris Hematoxylin Solutions are nuclear stains intended for use in Histology and Cytology. Harris Hematoxylin Solutions are for "In Vitro Diagnostic Use".

Hematoxylin, a common nuclear stain, is isolated from an extract of logwood (Haematoxylin campechianum).¹ The first successful biologic application of hematoxylin was described by Bohmer² in 1865. Since then numerous formulations have appeared. Of these, Harris', Gill's, Mayer's and Weigert's have retained popularity.

Before hematoxylin can be used as a nuclear stain, it must be oxidized to hematein and combined with a metallic ion (mordant). Most successful mordants have been salts of aluminum or iron.

Hematoxylin Solutions are regressive stains for use in routine histology and cytology. The positively charged aluminum-hematein complex combines with negatively charged phosphatase of nuclear DNA forming the blue purple color characteristic of hematoxylin stains.

Harris Hematoxylin Solution, may also be used in conjunction with Papanicolaou staining procedures for cytology use. See Sigma-Aldrich Procedure No. HT40.

REAGENT

HARRIS HEMATOXYLIN SOLUTION, Catalog No. HHS

Certified hematoxylin, 7.0 g/l, sodium iodate, aluminum ammonium sulfate 12 H₂O, preservative and stabilizers.

STORAGE AND STABILITY:

Store reagent at room temperature (18-26°C) protected from light. Reagent is stable until expiration date shown on the label.

DETERIORATION:

Discard if staining time becomes excessive or if solution color changes from plum to blue or brown.

PREPARATION:

Filter Harris Hematoxylin Solution before each use.

PRECAUTIONS:

Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. Dispose of waste observing all local, state, provincial or national regulations. Refer to Material Safety Data Sheet for any updated risk, hazard or safety information.

US Risks and Safety Statements

Avoid contact and inhalation of Harris Hematoxylin Solution. Target organs: Heart and nerves.

Reagent Alcohol is **FLAMMABLE** and an **IRRITANT**. Irritating to eyes, respiratory system and skin. Keep container tightly closed. Keep away from sources of ignition - no smoking. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing. Target organs: Nerves and liver.

Scott's Tap Water Substitute. Caution: Substance not yet fully tested.

ACCUMATE™ Differentiation Solution is **CORROSIVE** and **FLAMMABLE**. Causes burns. Wear suitable protective clothing. Keep away from sources of ignition - no smoking. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.

Alcoholic Eosin Solutions are **FLAMMABLE** and **HARMFUL**. Harmful by inhalation, in contact with skin, and if swallowed. Harmful: possible risk of irreversible effects through inhalation, in contact with skin, and if swallowed. Irritating to eyes, respiratory system and skin. Keep away from sources of ignition - no smoking. Wear suitable protective clothing and gloves. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

Aqueous Eosin Solution. Caution: Substance not yet fully tested.

Xylene is **FLAMMABLE** and **HARMFUL**. Possible risk of impaired fertility. May cause harm to the unborn child. Harmful by inhalation and in contact with skin. Irritating to respiratory system and skin. Risk of serious damage to eyes. Keep away from sources of ignition - no smoking. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

Hydrochloric Acid Solution is **TOXIC**. Toxic by inhalation. Causes burns. Irritating to respiratory system. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

EU Risks and Safety Statements

Harris Hematoxylin Solution. Do not breathe vapor. Avoid contact with skin and eyes.

Reagent Alcohol is **HIGHLY FLAMMABLE** and an **IRRITANT**. Highly Flammable. Irritating to eyes, respiratory system and skin. Keep container tightly closed. Keep away from sources of ignition - no smoking. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing.

Scott's Tap Water Substitute. Caution: Substance not yet fully tested.

ACCUMATE™ Differentiation Solution is **TOXIC**. Flammable. Causes burns. Keep away from sources of ignition - no smoking. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

Alcoholic Eosin Solutions are **HIGHLY FLAMMABLE** and **HARMFUL**. Harmful by inhalation, in contact with skin, and if swallowed. Harmful: possible irreversible effects through inhalation, in contact with skin, and if swallowed from sources of ignition - no smoking. Wear suitable protective clothing in case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

Aqueous Eosin Solution. Caution: Substance not yet fully tested.

Xylene is **HARMFUL**. Flammable. Harmful by inhalation and in contact with skin. Avoid contact with eyes.

Hydrochloric Acid Solution is **CORROSIVE**. Causes burns. Irritating to respiratory system. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing, gloves, and eye/face protection in case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

PROCEDURE

SPECIMEN COLLECTION:

It is recommended that specimen collection be carried out in accordance with document M29-A2. No known test method can offer complete assurance samples or tissue will not transmit infection. Therefore, all blood derivative specimens should be considered potentially infectious.

Standard histology texts provide necessary details for specimen collection.^{2,3}

SPECIAL MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

ACCUMATE™ Differentiating Solution, Catalog Nos. A 3179 or A 3429

Eosin Y Solution Counterstains:

Alcoholic, Catalog No. HT110-1

OR

Aqueous, Catalog No. HT110-2

OR

Alcoholic with Phloxine, Catalog No. HT110-3

Reagent Alcohol OR Ethanol, 100%

Scott's Tap Water Substitute Concentrate

Xylene

Hydrochloric Acid, Concentrated

Microscope, Microscope slides, coverslips, and staining dishes

NOTES:

1. Staining times may be varied for individual color preference.
2. Other dilute alkaline solutions may be used in place of Scott's Tap Water Substitute.
3. A 0.25% acid alcohol solution may be used in place of **ACCUMATE™** Differentiating Solution. Prepare by adding 0.25 ml concentrated Hydrochloric Acid to 70% alcohol.
4. The times given in the insert are approximate. Personal preferences will vary. Times can be adjusted to suit personal preferences. Stain solutions which are used will lose their staining powers and the staining times should be determined for new solutions should be used.⁴
5. Some tap water supplies are acidic and unsuitable for use in the "blueing" step of this procedure. If tap water is acidic, use a dilute alkaline solution.
6. Purple or red-brown nuclei are indicative of inadequate "blueing".
7. If eosin staining is excessive, nuclear staining may be masked. Proper rinsing will demonstrate a 3-tone effect. To increase differentiation of eosin, in alcohols or use a first alcohol with a higher water content. The times given may be adjusted to obtain the proper degree of Eosin staining.
8. Positive control slides should be included in each run.
9. The data obtained from this procedure serves only as an aid to diagnosis and should be reviewed in conjunction with other clinical diagnostic tests or information.

PROCEDURE:

1. Prepare a 95% alcohol solution by adding 5 ml deionized water to 95% Alcohol, No. R 8382, or Ethanol (100%).
2. Prepare Scott's Tap Water Substitute solution as indicated on bottle label.
3. Deparaffinize to water or fix and dehydrate frozen sections.
4. Stain in Harris Hematoxylin Solution2.1
5. Rinse slide in running tap water.
6. **ACCUMATE™** Differentiating Solution.....
7. Rinse slide in running tap water.
8. Blue in Scott's Tap Water Substitute.....
9. Reagent Alcohol, 95%
10. Eosin Y Solution Counterstain:
Alcoholic, No. HT110-1
OR
Alcoholic with Phloxine, No. HT110-3.....
11. Dehydrate, clear and mount.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

EXPECTED RESULTS:

Nuclear chromatin should be blue. Nucleoli should be conspicuous and lined. Cytoplasm will display various shades of pink to pink-orange depending on counterstain used and RBC's will be red.

If observed results vary from expected results, please contact Sigma Technical Service for assistance.

REFERENCES

1. Natural Dyes, IN J Conn's Biological Stains, 9th ed., RD Lillie, Editor, Williams and Wilkens Co., Baltimore, MD, 1977, pp 468, 472
2. Theory and Practice of Histotechnology, 2nd ed., DC Sheehan, BB Hrapchak, Editors, CV Mosby Co., St. Louis, MO, 1980
3. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd ed., LG Luna, Editor, McGraw Hill, New York, 1968
4. Theory and Practice of Histological Techniques, Edited by Bancroft JD and Gamble, M, Churchill Livingstone, New York, 2002, p129

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Procedure No. HHS
Previous Revision: 2003-03
Revised: 2003-09



EC REP

AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham TW20 9BD United Kingdom

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765
Technical Service: 800-325-0250 or call collect 314-771-3122
or e-mail at clintech@sial.com
To Order: 800-325-3010 or call collect 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Germany 49-7329-970

APPENDICE J

APPENDICE J - NOTICE D'UTILISATION DU KIT RIA-PROGESTERONE UTILISE (IMMUNOTECH A BECKMAN COULTER COMPANY)

IMMUNOTECH
A BECKMAN COULTER COMPANY

Notice d'utilisation

IVD

RIA PROGESTERONE

REF

IM1188

ISO 9001
13485

certified

TROUSSE RADIOIMMUNOLOGIQUE POUR LE DOSAGE IN VITRO
DE LA PROGESTERONE DANS LE SERUM OU LE PLASMA HUMAIN



1. PRINCIPE DU DOSAGE

Le dosage radioimmunologique de la progestérone est un dosage par compétition. Les échantillons à doser ou les calibrateurs sont incubés dans des tubes recouverts d'anticorps avec un traceur progestérone marquée à l'iode 125. Après incubation, le contenu du tube est vidé par aspiration, puis la radioactivité liée est mesurée. Une courbe d'étalonnage est établie. Les valeurs inconnues sont déterminées par interpolation à l'aide de cette courbe.

2. REACTIFS FOURNIS

Tous les réactifs de la trousse conservés à 2-8°C sont stables jusqu'à la date de péremption mentionnée sur la trousse.

2.1 Tubes revêtus d'anticorps anti-progestérone : 2 x 50 tubes (prêts à l'emploi)

2.2 Traceur progestérone marquée à l'iode 125 : 1 flacon de 55 mL (prêt à l'emploi)

Le flacon de 55 mL contient 185 kBq (en début de lot) de progestérone marquée, sous forme liquide en tampon avec des protéines.

2.3 Calibrateurs : 6 flacons de 0,5 mL (prêts à l'emploi)

Les flacons de calibrateurs liquides contiennent des concentrations de progestérone permettant d'établir une gamme d'étalonnage de 0 à 60 ng/mL. Les calibrateurs sont fabriqués dans du sérum humain, en présence d'azide de sodium (<0,1% ; voir § Précautions). La concentration exacte est indiquée sur chaque flacon. Les calibrateurs ont été calibrés par rapport à la solution de référence BCR 347.

2.4 Sérum de contrôle : 1 flacon de 0,5 mL (prêt à l'emploi)

Le sérum de contrôle contient de la progestérone dans du sérum humain et de l'azide de sodium (<0,1% voir § Précautions). La fourchette de concentrations attendues en progestérone est indiquée sur l'étiquette du flacon.

Remarque: Les températures et dates d'expiration imprimées sur les étiquettes des flacons, concernent uniquement le stockage à long terme des réactifs par le fabricant, avant l'assemblage de la trousse. Ne pas en tenir compte.

3. MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

En plus de l'équipement de laboratoire usuel, il est nécessaire d'utiliser le matériel suivant :

- micropipette de précision (50 µL).
- pipette semi-automatique (500 µL).
- mélangeur de type vortex.
- agitateur à mouvement de va et vient horizontal ou à plateau oscillant.
- système d'aspiration.
- compteur gamma calibré pour l'iode 125.

4. PRECAUTIONS

4.1 Précautions générales

- Equilibrer les réactifs à la température du laboratoire avant utilisation.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Effectuer simultanément la courbe standard et le dosage des échantillons.
- Le bon réglage de l'agitateur est une condition importante pour la reproductibilité du dosage.
- Il est recommandé de réaliser les dosages en double.
- Chaque tube ne doit être utilisé qu'une seule fois.

4.2 Protection contre les rayonnements ionisants

L'achat, la possession, l'utilisation et l'échange de matières radioactives sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur.

L'application des règles de base de protection contre les rayonnements ionisants assure une protection adéquate. Certaines d'entre elles sont rappelées ci-après :

- Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer de cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés.
- Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
- Eviter le contact direct avec tout produit radioactif en utilisant des blouses et des gants de protection.
- Toute manipulation de matières radioactives se fera dans un local approprié.
- Les produits radioactifs seront stockés dans leur conditionnement d'origine dans un local approprié.
- Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour.

- Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes.
- Chaque cas de contamination ou perte de substance radioactive devra être résolu selon les procédures établies.
- Toute mise aux déchets de matière radioactive se fera en accord avec les règlements en vigueur.

4.3 Azide de sodium

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium comme agent conservateur. L'azide de sodium peut réagir avec le plomb, le cuivre et le laiton et former des azides métalliques explosifs. Lors du rejet de telles solutions à l'évier, laisser couler un volume important d'eau dans les canalisations.

4.4 Sérum Humain

Les produits d'origine humaine contenus dans les réactifs de cette trousse ont subi un dépistage négatif, concernant les anticorps anti-VIH 1, et VIH 2, les anticorps VHC, et l'antigène de surface HBs, mais doivent cependant être manipulés comme des produits infectieux. En effet, aucune méthode connue ne peut assurer l'absence complète de virus, c'est pourquoi il est nécessaire de prendre des précautions lors de leur manipulation.

Tous les échantillons de sérum ou de plasma doivent être manipulés comme étant susceptibles de contenir les virus de l'hépatite ou du SIDA. Les déchets doivent être éliminés selon les réglementations nationales en vigueur.

5. PRELEVEMENT, PREPARATION, CONSERVATION ET DILUTION DES ECHANTILLONS

- Recueillir le sang dans des tubes secs sans additif, des tubes héparinés ou contenant de l'EDTA.
- Séparer le sérum ou le plasma par centrifugation.
- Les échantillons sériques ou plasmatiques peuvent être conservés à 2-8°C si le dosage est réalisé dans les 24 heures. Sinon, il est préférable de les conserver congelés (<-18°C) et de préférence aliquotés, afin d'éviter les congélations et décongélations successives.
- Si l'échantillon analysé a une concentration supérieure au calibrateur le plus élevé de la gamme, le diluer dans un échantillon bas en progestérone (sérum d'homme de concentration <0,1 ng/mL).

6. MODE OPERATOIRE (voir tableau page suivante).

7. RÉSULTATS

Les résultats sont déduits de la courbe standard par interpolation. La courbe sert à déterminer les taux de progestérone de tous les échantillons mesurés en même temps que les calibrateurs.

7.1 Courbe standard

Les résultats présentés dans cette notice ont été calculés en employant un mode de tracé semi-logarithmique pour la gamme standard (mode "spline") avec en ordonnée le rapport B/T (%) ou B/B0 (%) et en abscisse les concentrations en progestérone des calibrateurs (ng/mL). L'utilisation d'un autre mode de calcul peut conduire à des résultats légèrement différents.

Activité totale : 54227 cpm				
Calibrateurs	Progestérone (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B0 (%)
0	0	21739	40.1	100
1	0.10	19335	35.7	88.9
2	0.55	16226	29.9	74.6
3	2.20	9414	17.4	43.3
4	13	3790	6.99	17.4
5	60	1147	2.12	5.28

(Exemple de courbe standard, ne pas utiliser pour les calculs.)

7.2 Echantillons

Pour chaque échantillon, repérer le rapport B/T (%) ou B/B0 (%) sur l'axe vertical, puis le point correspondant de la courbe standard et en déduire par lecture sur l'axe horizontal la concentration en progestérone de l'échantillon. Pour convertir des concentrations de ng/mL en nmol/L, multipliez les résultats par 3,18.

8. CONTROLE DE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire impliquent que des échantillons de contrôle soient utilisés dans chaque série de dosage pour s'assurer de la qualité des résultats obtenus. Ces échantillons devront être traités de la même façon que les prélèvements à doser et il est recommandé d'en analyser les résultats à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

En cas de détérioration de l'emballage ou si les résultats obtenus montrent une perte de performance du produit, veuillez contacter :

Beckman Coulter France Tel 01 49 90 90 00 ou notre service Support Technique :
Tel : 04 91 17 27 27, Fax : 04 91 17 27 25, e-mail, immuno-techsup@beckman.com

9. VALEURS ATTENDUES

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales. Les valeurs suivantes déterminées chez des sujets sains sont données à titre indicatif.

Progesterone	ng/mL	nmol/L
Hommes (20 à 70 ans)	0,13 - 1,26	0,4 - 4,0
Femmes en période d'activité génitale		
phase folliculaire	0,06 - 1,26	0,2 - 4,0
phase ovulatoire	0,08 - 1,2	0,25 - 3,8
phase luteale	2,5 - 25	8 - 78
Femmes ménopausées	0,06 - 1,6	0,2 - 5

10. CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

(voir la feuille "APPENDIX" pour plus de détails)

10.1 Sensibilité analytique: 0,05 ng/mL (0,16 nmol/L)

10.2 Spécificité

L'anticorps utilisé dans ce dosage est hautement spécifique de la progesterone. Des réactivités croisées extrêmement basses ont été obtenues vis à vis de nombreux stéroïdes naturels (Cortisol, Estradiol, 5 α - et 5 β -Pregnandione, 16 α , 17 α - et 6 β -Hydroxyprogesterone, etc...) ou vis à vis de médicaments pouvant être présents dans les échantillons à tester (Danazol, Prednisolone, etc...).

10.3 Précision

10.3.1 Intra-essai

Des échantillons ont été dosés 10 fois dans une même série. Les coefficients de variation obtenus étaient inférieurs ou égales à 5,8 % pour les sérums.

10.3.2 Inter-essais

Des échantillons ont été dosés en doublet dans 18 séries différentes. Les coefficients de variation obtenus étaient inférieurs ou égales à 9,0 % pour les sérums.

10.4 Exactitude

10.4.1 Epreuve de dilutions

Des échantillons de concentration élevée ont été dilués dans un échantillon bas en progesterone (sérum d'homme de concentration <0,1 ng/ml). Les pourcentages de recouvrement s'échelonnent entre 87 % et 115 %.

10.4.2 Epreuve de surcharge

Des quantités connues de progesterone ont été ajoutées à des sérums humains. Les pourcentages de recouvrement s'échelonnent entre 85 % et 110 %.

10.5 Plage de mesure (de la sensibilité analytique au calibre le plus élevé) :
0,05 - 60 ng/mL.

11. LIMITATIONS DE LA METHODE

Le non-respect des recommandations indiquées dans cette notice peut avoir un impact significatif sur les résultats. Les résultats doivent être interprétés à la lumière du dossier clinique complet du patient, incluant l'historique clinique et les données des tests additionnels et toute autre information appropriée.

6. MODE OPERATOIRE

Etape 1 Répartition	Etape 2 Incubation	Etape 3 Comptage
Dans les tubes recouverts d'anticorps, distribuer successivement: - 50 μ L de calibre ou d'échantillon et - 500 μ L de traceur* Agiter	Incuber 1 heure à 18-25°C avec agitation (350 rpm)	Aspirer soigneusement le contenu de chaque tube (sauf les 2 tubes «cpm totaux») Compter les cpm liés (B) et cpm totaux (T) pendant 1 min.

* Ajouter 500 μ L de traceur dans 2 tubes supplémentaires pour obtenir les cpm totaux.

APPENDICE K

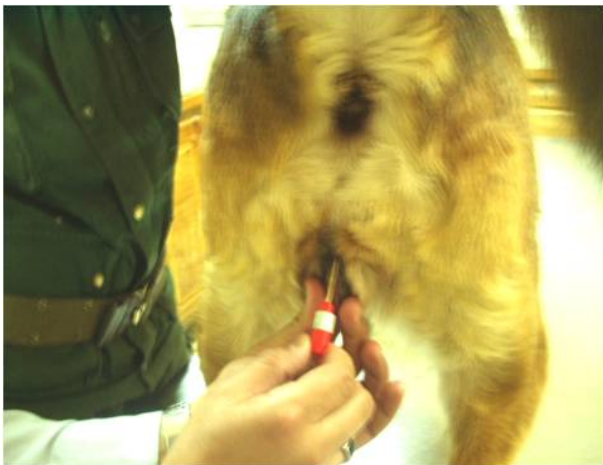
APPENDICE K - PHOTOGRAPHIES PRISES PENDANT LE TRAVAIL EXPERIMENTAL
(REALISATION D'UN EXAMEN CYTOLOGIQUE VAGINAL)



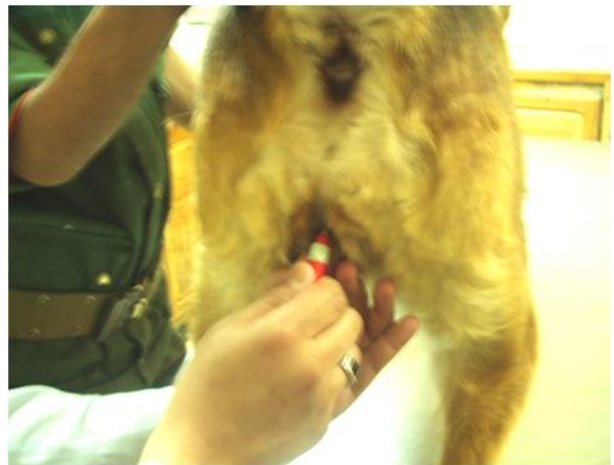
PREPARATION DE L'ECOUVILLON



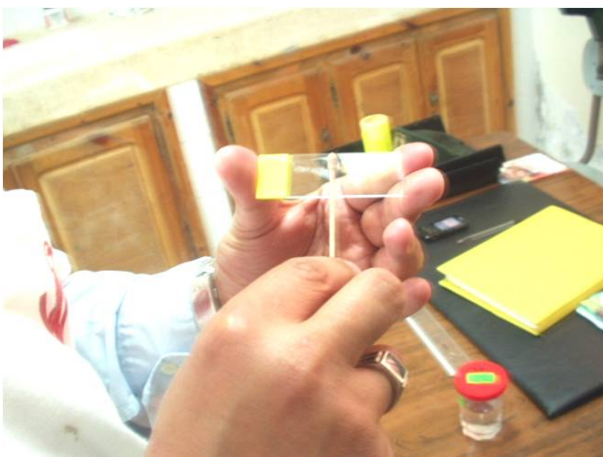
PRELEVEMENT 1



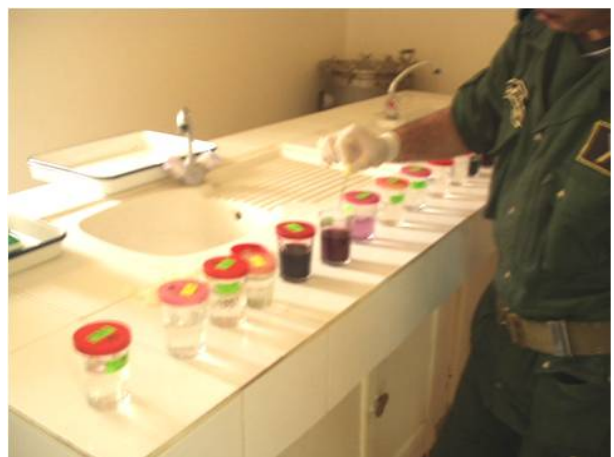
PRELEVEMENT 2



PRELEVEMENT 3



ETALEMENT



COLORATION (HARRIS-SCHORR)

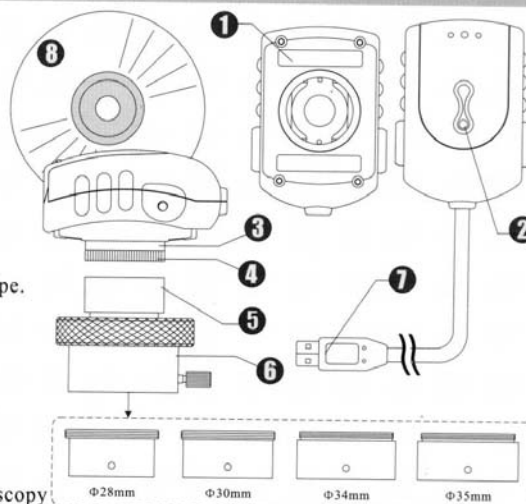
APPENDICE L

APPENDICE I – MANUEL D'UTILISATION DU MOTICAM 350

Quick Assembly Moticam 350

Parts

- ❶ Moticam 350 main unit.
- ❷ LED indicative lamp.
- ❸ C ring.
- ❹ Dust cap.
- ❺ 8mm CCD lens.
- ❻ Connection adapters
Φ28 & Φ30 for biological microscope.
Φ34 & Φ35 for stereo microscope.
- ❼ USB plug.
- ❽ Application software
MOTIC IMAGES 2000 Ver. 1.2 CD.




Parts functions

- ❶ This main unit enables digital microscopy applications.
- ❷ This LED, when the driver of the camera is clicked on, will light up to indicate Moticam 350 is powered and ready for operation.
- ❸ C ring is for microscopes of other brands requiring such accessory.
- ❹ Dust cap to avoid dust going into the main unit.
- ❺ This lens forms basic part of Moticam 350 and it enables the field of view in focus.
- ❻ The connection adapter is the linkage tube connecting to the eyepiece tube of your microscope.
- ❼ The USB plug extended from the Moticam 350 is to output signal to your computer.
- ❽ Motic Images 2000 Ver. 1.2 is a user friendly application software provided specially for Moticam 350.

Technical Data

Image device	1/4" interline
Effective pixels	659*494
Framed resolution	640*480 pixels
Frame rate	8-15 frames/sec
Audio output	Transmission across Motic Images 2000 direct into memory of the PC
Video output	Transmission across Motic Images 2000 direct into memory of the PC
White Balance	Auto white balance
B.L.C	Auto
Minimum Illumination	5 Lux (F.1.4)
Data transfer	7.5MB/second
Color image	Take-up time below one second
Color depth	24 bit (16.7 million colors)
Power Supply	5V self powered from computer USB
Consumption	250mA
Operating system	Windows® 98/2000/Me
Data Format	BMP.JPG.MIG(for recording)
Immediate printout	On printer
Position and size of image on monitor	Freely definable
Menu on monitor	Pull-down menus for opening, storing, printing, print preview, regulator for brightness, color, gamma correction; icons for recording, image interpolation, switching between large and small image quality, automatic and manual white balance. Automatic reference number, date, time.
Image data	Color, brightness, contrast.
Interactive adjustment	Possible
Import of stored data	Yes
Print preview	Yes
Environment conditions:	
Operating temperature	-10°C to +70°C
Storage temperature	-10°C to +80°C
Relative humidity	90% Maximum

Motic

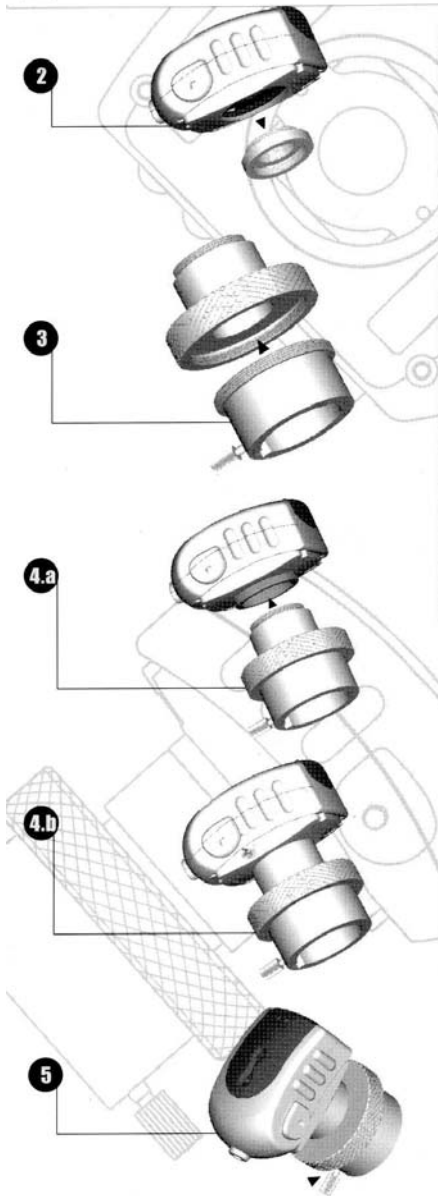
 Before using this product, ensure it is properly connected to the computer.

Installation of Moticom 350

Please take reference of the pictures at left and below, and follow the steps listed hereafter:

- 1 Remove the dust cap.
- 2 Turn connecting the appropriate optional adapter with the end with threads to the main unit (without the C ring in between)
- 3 Turn connecting the adapter tube end (with threads) to the bigger end of the 8mm CCD lens.
- 4 Turn connecting smaller end of the 8mm CCD lens (with threads) to the Moticom 350 main unit.
- 5 Lock fixing the adapter to cover the eyepiece of your microscope by tightening the screw thereat.
- 6 Connect the USB plug from the Moticom 350 main unit to your computer.
- 7 Install the application software and driver by following the Quick Start Guide or User's Manual.

When above steps finished, your Digital Microscope will be ready for operation.

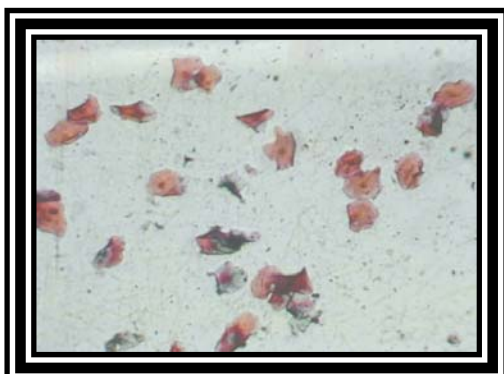


Motic®

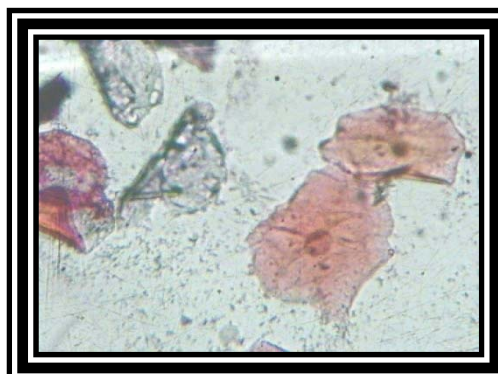
<http://www.motic.com>

APPENDICE M1

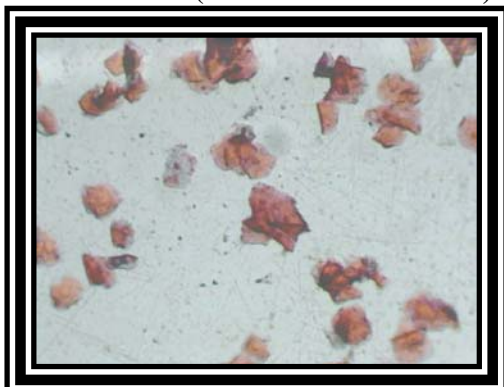
APPENDICE M1 – FROTTIS VAGINAUX DE LA FEMELLE "IRA 1" EN PROESTRUS



PRO-ŒSTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



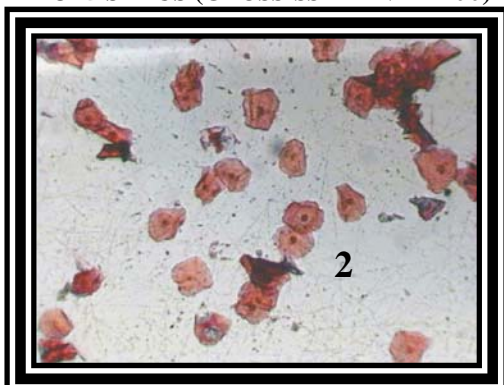
PRO-ŒSTRUS (GROSSISSEMENT X 400)



PRO-ŒSTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



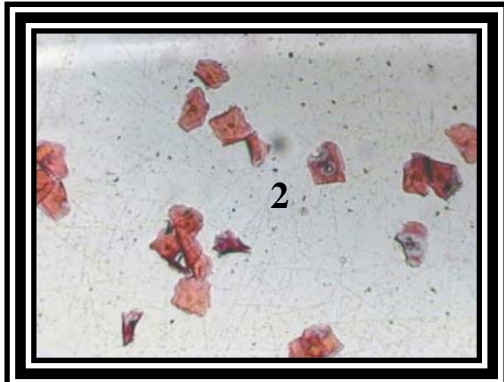
PRO-ŒSTRUS (GROSSISSEMENT X 400)



PRO-ŒSTRUS TARDIF (GROSSISSEMENT X 100)



PRO-ŒSTRUS TARDIF (GROSSISSEMENT X 400)



PRO-ŒSTRUS TARDIF (GROSSISSEMENT X 100)



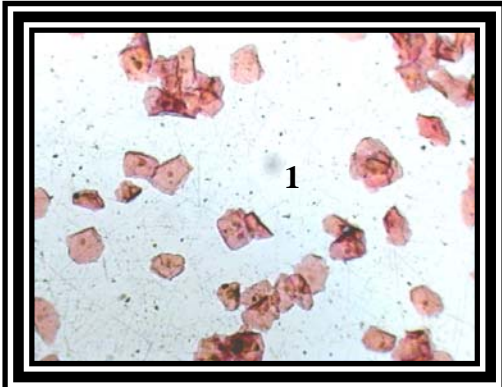
PRO-ŒSTRUS TARDIF (GROSSISSEMENT X 400)

NB/ Le grossissement du microscope est amplifié par une lentille CCD de 8 mm intégrée au caméra pour microscope "Moticam 350" ayant servi pour la capture des photographies.

LEGENDE/ 1: Cellules vaginales Grandes Intermédiaires polychromatophiles. 2: Le pro-œstrus tardif a une tendance plutôt éosinophile car il s'agit de la transition du pro-œstrus vers l'œstrus. 3: Superficielles partiellement kératinisées.

APPENDICE M2

APPENDICE M2 - FROTTIS VAGINAUX DE LA FEMELLE "IRA 1" EN OESTRUS



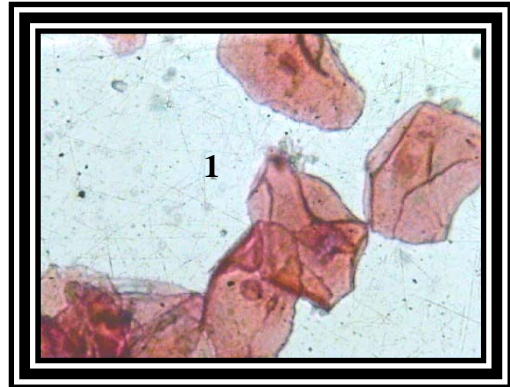
CESTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



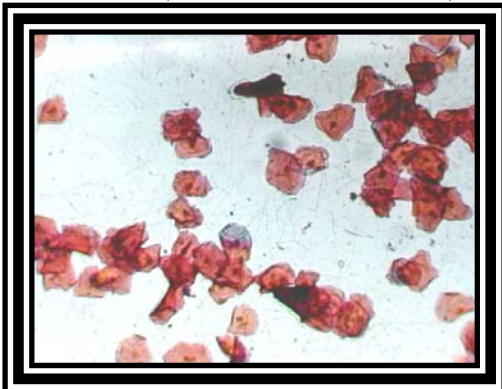
CESTRUS (GROSSISSEMENT X 400)



CESTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



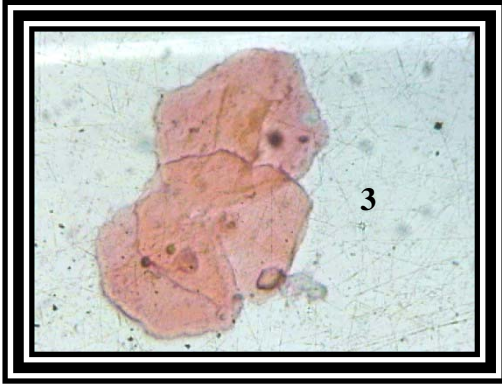
CESTRUS (GROSSISSEMENT X 400)



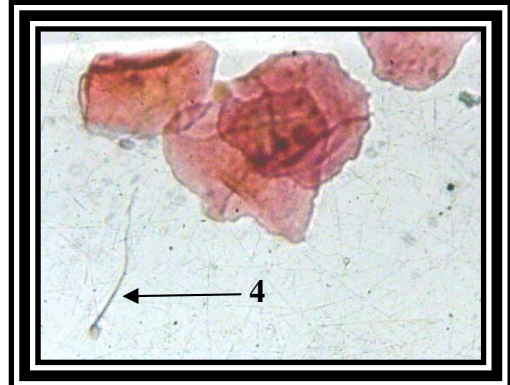
CESTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



CESTRUS (GROSSISSEMENT X 400)



CESTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



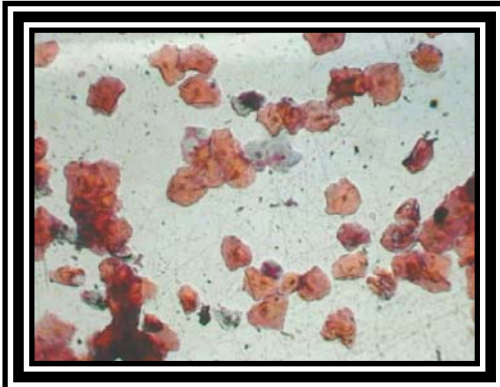
CESTRUS (GROSSISSEMENT X 400)

NB/ Le grossissement du microscope est amplifié par une lentille CCD de 8 mm intégrée au caméra pour microscope "Moticam 350" ayant servi pour la capture des photographies.

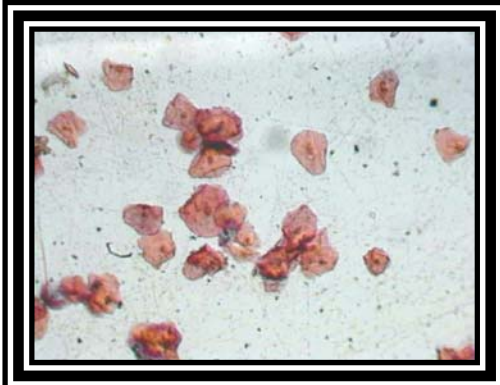
LEGENDE/1: Cellules superficielles kératinisées (éosinophiles). 2: Amas de superficielles kératinisées. 3: Superficielles entièrement kératinisées "anucléées". 4: Spermatozoïde.

APPENDICE M3

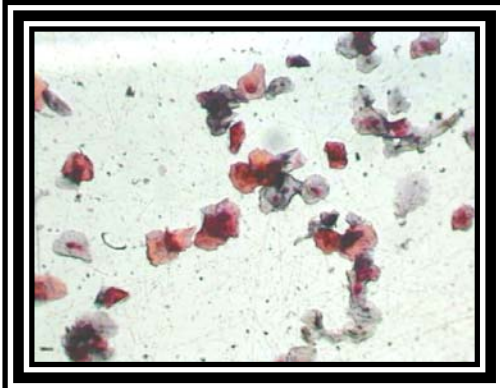
APPENDICE M3 - FROTTIS VAGINAUX DE LA FEMELLE "IRA 1" EN METOESTRUS



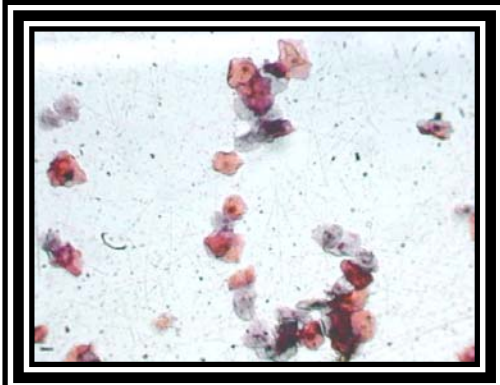
METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



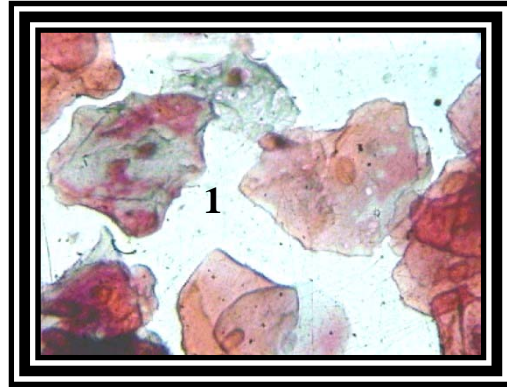
METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



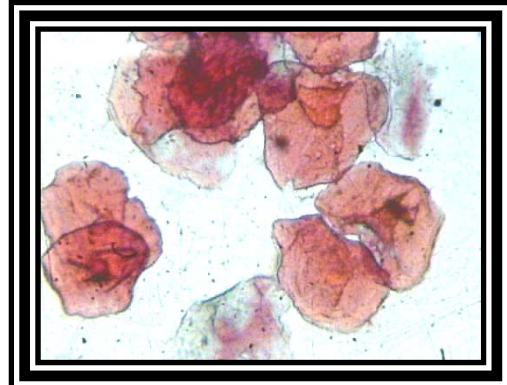
METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



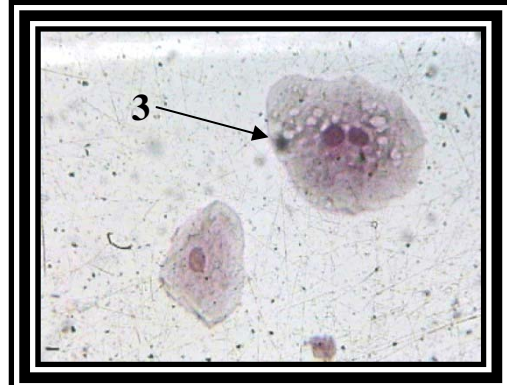
METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 400)



METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 400)



METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 400)



METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 400)

NB/ Le grossissement du microscope est amplifié par une lentille CCD de 8 mm intégrée au caméra pour microscope "Moticam 350" ayant servi pour la capture des photographies.

LEGENDE/1: Réapparition des grandes intermédiaires polychromatophiles. **2:** Réapparition des intermédiaires basophiles. **3:** Cellules métoestrale.

APPENDICE M4

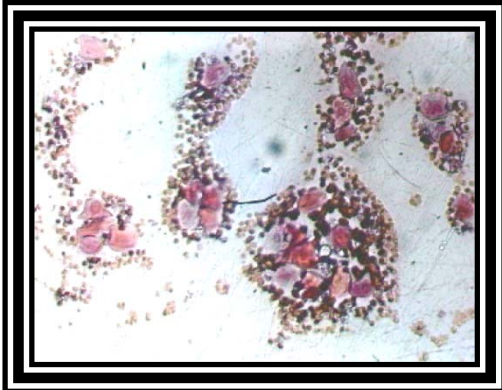
APPENDICE M4 - FROTTIS VAGINAUX DE LA FEMELLE "IRA 1" EN METOESTRUS



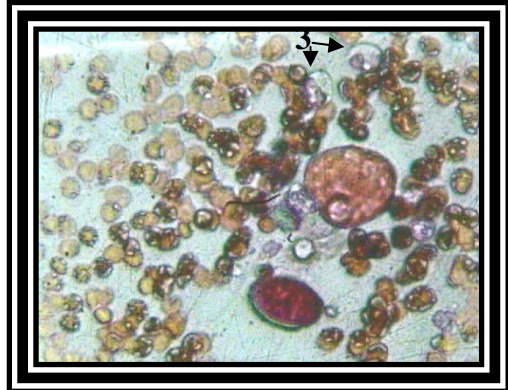
METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 400)



METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 400)

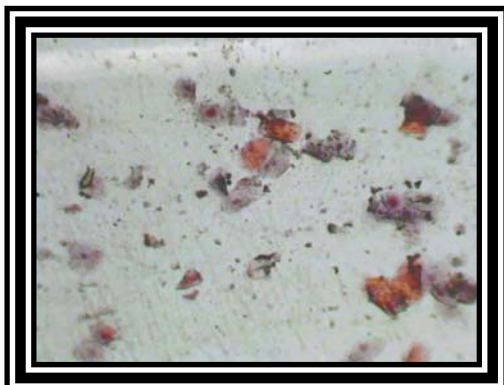
***NB/** Le grossissement du microscope est amplifié par une lentille CCD de 8 mm intégrée au caméra pour microscope "Moticam 350" ayant servi pour la capture des photographies.*

LEGENDE/

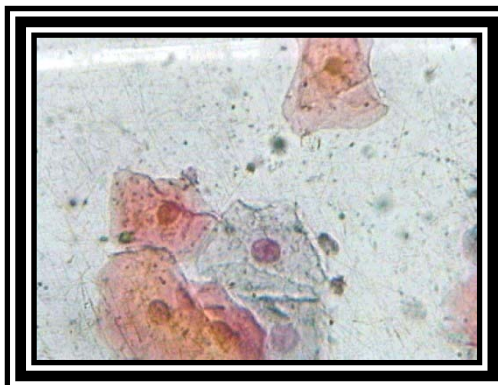
1: Réapparition des cellules vaginales parabasales. **2:** Réapparition des hématies. **3:** Apparition des leucocytes.

APPENDICE M5

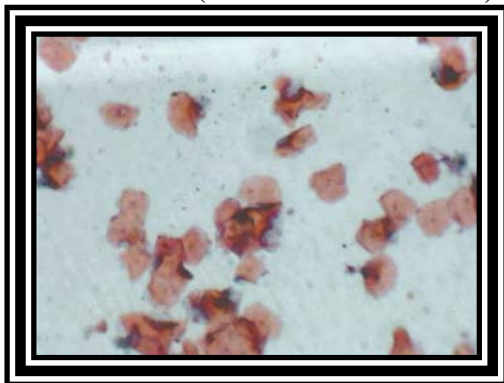
APPENDICE M5 - FROTTIS VAGINAUX DE LA FEMELLE "MITCHA"



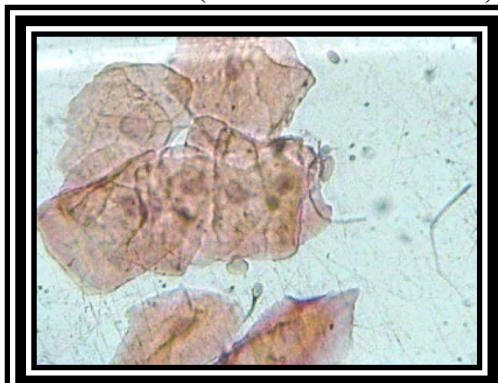
PRO-ŒSTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



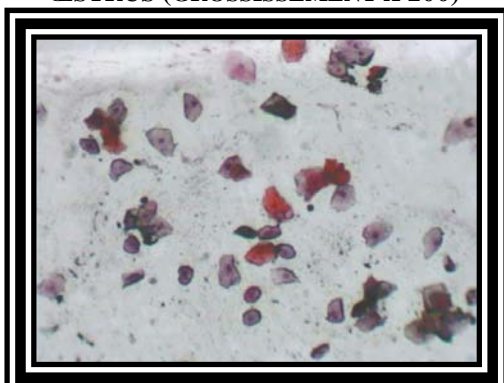
PRO-ŒSTRUS (GROSSISSEMENT X 400)



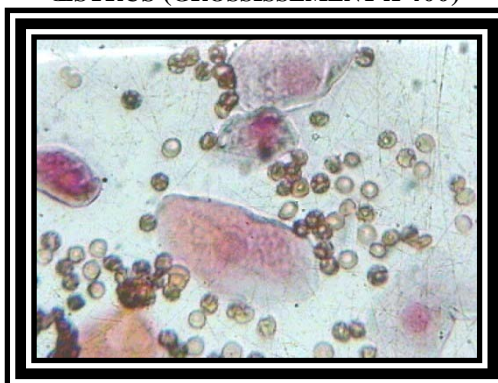
ŒSTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



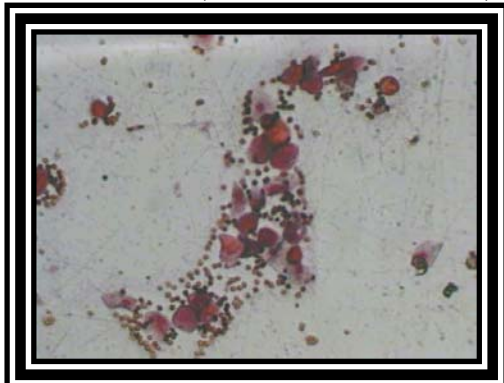
ŒSTRUS (GROSSISSEMENT X 400)



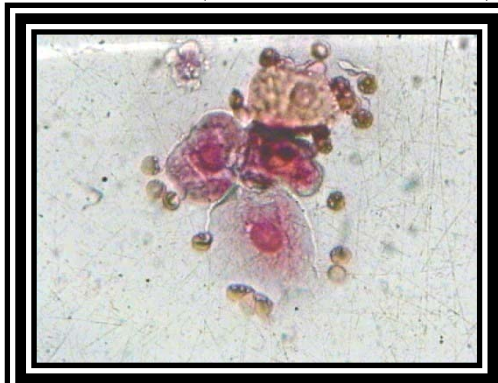
METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 400)



METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 100)



METOESTRUS (GROSSISSEMENT X 400)

NB/ Le grossissement du microscope est amplifié par une lentille CCD de 8 mm intégrée au caméra pour microscope "Moticam 350" ayant servi pour la capture des photographies.

APPENDICE N

APPENDICE N - EXECUTION DU TEST DES PROBABILITES EXACTES DE FICHER

Tableau II.6 : Données relatives à la comparaison des deux traitements d'induction (*Bromocriptine* versus *Cabergoline*) chez les seize (16) chiennes d'étude.

Résultat	Traitement A (<i>Bromocriptine</i>)		Traitement B (<i>Cabergoline</i>)	
	Effectif	%	Effectif	%
Succès	02	25.00	07	87.50
Echecs	06	75.00	01	12.50
Ensemble	08	100	08	100

Tableau II.7 : Données relatives à la comparaison des deux traitements d'induction (*Bromocriptine* versus *Cabergoline*) chez les seize (16) chiennes d'étude (Effectifs seulement)

Résultat	Traitement A (<i>Bromocriptine</i>)	Traitement B (<i>Cabergoline</i>)	Total
	Effectif	Effectif	
Succès	02	07	9
Echecs	06	01	7
Ensemble	08	08	16

Considérons les données suivantes relatives aux résultats d'un essai d'induction de l'œstrus chez seize chiennes par deux traitements différents A et B. Le résultat du traitement est soit un succès soit un échec (cf. tableau II.7).

Nous adoptons la situation unilatérale ou l'on suppose le traitement B (à la Cabergoline) plus efficace que le traitement A (à la Bromocriptine), ou en d'autres termes : B supérieur à A.

Le pourcentage de succès avec B (87.50% = 7/8) est apparemment supérieur au pourcentage de succès avec A (25% 2/8). En plus des données du tableau 7.4, on peut avoir une autre possibilité avec une différence encore plus accrue en faveur du traitement B, les distributions marginales restent identiques. Cette possibilité est contenue au tableau 7.5.bis

Tableau II.7.bis. : Autre configuration à partir du tableau 7.5

Résultat	Traitement A (<i>Bromocriptine</i>)	Traitement B (<i>Cabergoline</i>)	Total
	Effectif	Effectif	
Succès	01	08	9
Echecs	07	00	7
Ensemble	08	08	16

La probabilité d'obtenir la configuration contenue au tableau II.7 est :

$$P_1 = (9! 7! 8! 8!) / (2! 6! 7! 1! 16!) = 0,01958042$$

La probabilité d'obtenir la configuration contenue au tableau II.7.bis est :

$$P_2 = (9! 7! 8! 8!) / (1! 7! 8! 0! 16!) = 0,000699301$$

La somme des probabilités est $p = p_1 + p_2 = 0,01958042 + 0,000699301 = \mathbf{0.020279721}$

La différence est donc très significative. La probabilité trouvée (02.02%) est largement inférieure à 5%.

Pour refaire le calcul en situation bilatérale, envisageons la configuration suivante :

Résultat	Traitement A (<i>Bromocriptine</i>)	Traitement B (<i>Cabergoline</i>)	Total
	Effectif	Effectif	
Succès	08	01	9
Echecs	00	07	7
Ensemble	08	08	16

$$P = (9! 7! 8! 8!) / (8! 0! 1! 7! 16!) = 0.000699301$$

$$P = \mathbf{0.020279721} + 0.000699301 = 0.02097902 \text{ (} p < 0.05 \text{)}.$$

APPENDICE O

APPENDICE O - TABLEAU DE CONTINGENCE POUR LE CALCUL DE χ^2 (Correlation entre Progestéronémie et Pourcentage d'éosinophilie)

**Table de contingence de qui-deux (χ^2) à 28° degrés de liberté
(O= χ^2 théorique)**

Intervalles(P4)	0 - 20	20 - 40	40 - 60	60 - 80	80 - 100	
[0,00 - 0,03[33	3	0	0	1	37
[0,03 - 0,09[35	5	11	3	1	55
[0,09 - 0,5[15	6	5	7	12	45
[0,5 - 2,00[6	10	4	4	8	32
[2,00 - 4,00[4	1	4	4	10	23
[4,00 - 10,00[0	0	0	0	25	25
[10 - 20[6	1	2	5	20	34
> 20	22	2	1	1	5	31
	121	28	27	24	82	282

$dl = (8-1) (5-1) = 7 \times 4 = 28^\circ$

$\chi^2 = \text{Somme de } [(O - C)^2 / C]$

Table de calcul du χ^2

1	18,4704811	0,12356582	3,54255319	3,14893617	8,85181185	34,1373481
2	5,50763037	0,03891499	6,24373522	0,60357834	14,0554355	26,4492944
3	0,9614032	0,52522796	0,11097977	2,62423168	0,08998443	4,31182705
4	4,35239728	14,6505193	0,28605201	0,59840426	0,18301332	20,0703861
5	3,49006633	0,72157614	1,46782814	2,13135985	1,64022322	9,45105369
6	10,7269504	2,4822695	2,39361702	2,12765957	43,2451133	60,9756098
7	5,05632385	1,67210501	0,48407732	1,5333229	10,3456353	19,0914644
8	5,68851521	0,37755335	1,30500267	1,01733013	1,78759116	10,1759925
	54,2537677	20,591732	15,8338454	13,7848229	80,1988081	184,66

La table de la loi de qui-deux montre que pour un $dl = 28$, le χ^2 théorique :

$\chi^2 (p=0,050 ; dl=28) = 41,34$

$\chi^2 (p=0,025 ; dl=28) = 44,46$

$\chi^2 (p=0,010 ; dl=28) = 48,28$

$\chi^2 (p=0,001 ; dl=28) = 56,89$

Pour être significatif, le χ^2 expérimental (calculé) doit être supérieur ou égal au χ^2 théorique.

Résultat : Dans notre cas, le khi-deux expérimental $\chi^2 = 184,66$

Le khi-deux est hautement significatif et l'hypothèse d'indépendance (H_0) est rejetée.

Ce résultat confirme qu'il existe entre la progestéronémie et les différents intervalles de pourcentages d'éosinophilie

une corrélation hautement significative avec un intervalle de confiance de moins de 0,001 ($p < 0,001$).

APPENDICE P

APPENDICE P - TABLEAU DE CONTINGENCE POUR LE CALCUL DE χ^2 (Correlation entre Progesteronémie et Pourcentage de basophilie)

**Table de contingence de qui-deux (χ^2) à 28° degrés de liberté
(O= χ^2 théorique)**

Intervalles(P4)	0 - 20	20 - 40	40 - 60	60 - 80	80 - 100	
[0,00 - 0,03[3	3	2	8	21	37
[0,03 - 0,09[22	10	8	3	12	55
[0,09 - 0,5[28	5	4	1	7	45
[0,5 - 2,00[28	3	1	0	0	32
[2,00 - 4,00[21	2	0	0	0	23
[4,00 - 10,00[25	0	0	0	0	25
[10 - 20[31	1	2	0	0	34
> 20	16	4	6	4	1	31
	174	28	23	16	41	282

dl = (8-1) (5-1) = 7x4 = 28°

χ^2 = Somme de [(O - C)/C]

Table de calcul du χ^2

1	6,081299508	0,12356582	0,34322991	16,5857773	45,35833836	68,4922109
2	1,628863599	3,77268122	2,75300928	0,00465828	2,004436162	10,1636485
3	14,85208643	0,0633232	0,02963306	0,94485816	0,031984086	15,9218849
4	34,09607455	0,00989425	0,99308125	1,81560284	4,65248227	41,5671352
5	27,88678298	0,03524074	1,87588652	1,30496454	3,343971631	34,4468464
6	39,60085766	2,4822695	2,03900709	1,41843972	3,634751773	49,1753257
7	41,05073687	1,67210501	0,21550489	1,92907801	4,943262411	49,8106872
8	4,532670402	0,27617087	4,76679797	2,85563944	2,72896474	15,1602434
	169,729372	8,43525061	13,01615	26,8590183	66,69819143	284,74

La table de la loi de qui-deux montre que pour un dl = 28, , le χ^2 théorique :

χ^2 (p=0,050 ; dl=28) = 41,34

χ^2 (p=0,025 ; dl=28) = 44,46

χ^2 (p=0,010 ; dl=28) = 48,28

χ^2 (p=0,001 ; dl=28) = 56,89

Pour être significatif, le χ^2 expérimental (calculé) doit être supérieur ou égal au χ^2 théorique.

Résultat : Dans notre cas, le khi-deux expérimental χ^2 = 284,74

Le khi-deux est hautement significatif et l'hypothèse d'indépendance (H0) est rejetée.

Ce résultat confirme qu'il existe entre la progesteronémie et les différents intervalles de pourcentages de basophilie

une corrélation hautement significative avec un intervalle de confiance de moins de 0,001 (p<0,001).