

59 TH V



059THV-# 2

الجمهورية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agronomiques, Vétérinaires et Biologiques

Département des Sciences Vétérinaires

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme

DOCTEUR VETERINAIRE

ETUDE DU CYCLE ŒSTRAL CHEZ LA CHIENNE

Application des frottis vaginaux et du dosage de la progestérone

au suivi des chaleurs

Présenté par

ATTABA Amina

Devant le jury composé de

BOUMAHDI Z.
FERROUKH M.
ADEL D.

Maître de Conférence, Université de Blida
Chargé de Cours, Université de Blida
Chargé de Cours, Université de Blida

Président
Examineur
Examineur

KAIDI R.
BELLALA R.

Professeur, Université de Blida
Docteur Vétérinaire, CFC/GN de Bainem, Alger

Promoteur
Co-Promoteur

Blida, Promotion 2006

REMERCIEMENTS

Je remercie :

Le tout puissant de m'avoir donné la santé, la force et la patience pour réaliser ce travail.

Mme BOUMAHDI, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.

Dr. FERROUKH et Dr. ADEL, pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Mon promoteur, Pr. KAIDI, pour m'avoir confié cette étude.

Hommage respectueux

Mon co-promoteur, Dr. BELLALA, pour son aide précieuse et ses encouragements constants.

Toute ma reconnaissance.

Le directeur du centre de formation cynotechnique de Bainem pour son accueil chaleureux, ainsi que tout le personnel pour leurs aide et assistance.

Sincères remerciements.

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

La bibliothécaire du département, Melle IHSENE, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Le professeur Michelle KUTZLER du département des Sciences Biomédicales de l'Université de Cornell (USA), pour ses généreux et précieux conseils, et sa gracieuse documentation.

Le docteur Karine REYNAUD du département de Biologie du Développement et Reproduction de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (France), pour la documentation qu'elle m'a offerte.

Mes très chers parents, pour avoir cru en moi, pour leurs encouragements et leurs conseils ainsi que toutes leurs relectures.

Mon frère et mes deux sœurs, pour leur soutien et leurs encouragements constants.

Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

DÉDICACES

Je dédie mon travail :

*A mes parents qui m'ont accordés leur amour et leur confiance.
Ce travail vous est dédié, en témoignage de mon immense affection.*

*A ma mère, qui a toujours su m'encourager et me soutenir avec patience tout au long de mes études. Pour
ses sacrifices, son attention et la bonté de son cœur.
Merci d'être la meilleure des mamans.*

*A mon père, qui est pour moi un modèle de sérieux, de rigueur et de réussite et qui m'incite toujours à aller
plus loin.
Merci à toi d'être le meilleur des papas.*

*A mes deux chères sœurs AMEL et ASSIA et mon très cher frère MEHDI, pour toute leur affection, leur
soutien et cette complicité.*

A tous les membres des familles ATTABA et CHERROUK petits et grands.

*A la mémoire de KHALOU HAMID, ton souvenir restera inaltérable et l'affection que je porte pour toi
inestimable.*

A tous mes enseignants qui, depuis mon enfance m'on transmis le goût d'apprendre.

A Mr BOUCHALI, mon enseignant de mathématiques pour avoir cru en moi.

*Au Dr. ADEL, mon professeur au département vétérinaire pour sa générosité, ses encouragements et sa
patience en clinique.*

*A mes amies AMEL, ASSIA, MAYA, IMENE, MYRIAM, TAOUS, YASMINE et toutes les autres pour
tous les merveilleux moments passés ensemble et ceux à venir.*

A la fabuleuse promotion vétérinaire 2006, mon travail est dédié à chacun d'entre vous.

ETUDE DU CYCLE ŒSTRAL CHEZ LA CHIENNE :

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

RESUME :

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

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

Dans un premier temps, l'auteur rappelle les principales particularités de la physiologie de la reproduction chez la chienne. Ensuite, il décrit les différentes méthodes déjà mises en œuvre dans la littérature pour réaliser un suivi de chaleurs dans le but de déterminer la période optimale de fécondabilité.

Dans un second temps, l'auteur réalise un suivi de chaleurs pour seize chiennes par application de la méthode des frottis vaginaux (coloration de Harris-Shorr) associée à la mesure de la concentration de la progestérone plasmatique (dosage radio-immunologique). Parmi l'effectif suivi, neuf chiennes ont présentées leurs chaleurs durant la période du 29-05-2006 au 31-08-2006. Une analyse des résultats a été effectuée et montre que la majorité des chiennes (88,9%) présentent une évolution de chaleurs conforme au standard général.

En outre, l'auteur a accompli une étude statistique comparant les paramètres cytologiques, à savoir les taux cellulaires d'acidophilie aux mesures de la progestérone plasmatique. L'utilisation d'un test statistique a permis d'établir l'étude de la corrélation.

MOTS CLES: REPRODUCTION, CYCLE ŒSTRAL, CHALEURS, OVULATION, PERIODE FERTILE, PERIODE DE FECONDABILITE, FROTTIS VAGINAUX, PROGESTERONE, CHIENNE, CARNIVORES DOMESTIQUES.

STUDY OF THE ESTRUS CYCLE OF THE BITCH:

Application of vaginal smears and progesterone assay to follow heat

ABSTRACT:

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

This study of the estrus cycle of the bitch, with analytic character, represents a comparative attempt of two markers of heat. The main objectives are to evaluate precision of each of them, and look for criteria in order to ameliorate their utilisation in the assessment of the optimal period of fertilization, by way of accommodating the factors time and price.

First, the author has reminded us about the genital and sexual particularity of the bitch. Then, he described the different methods already done on literature to follow heat, in order to determinate the optimal period for fertilisation.

Secondly, the author achieves a heat follow for sixteen bitches by applying vaginal smears (Harris-Shorr coloration) and assaying the plasmatic progesterone concentration (radio-immuno-assay). Among the bitches followed, nine of them express heat during the period from 29-05-2006 to 31-08-2006. An examination of results has been done and showed that the majority of bitches (88.9%) presents a heat evolution conform to the general standard.

By the way, the author accomplished a statistic study. He compared the cytological parameters, exactly acidophilic cellular rates, with progesterone plasmatic concentration. The utilisation of a statistic test made possible the study of correlation.

KEY WORDS: REPRODUCTION, ESTRUS CYCLE, HEAT, OVULATION, FERILE PERIOD, FERTILIZATION PERIOD, VAGINAL SMEARS, PROGESTERONE, BITCH, DOMESTIC CARNIVOES.

دراسة الدورة النزوية لدى أنثى الكلب

تطبيق طريقة فحص الحك المهبلي ومعايرة البروجسترون لمتابعة الاهتياج

ملخص:

التكاثر عند الكليات يختلف عن تكاثر الحيوانات الأليفة الأخرى بالخصائص الفيزيولوجية للتبييض، للنضج البويضي و التطور الجنيني.

هذه الدراسة للدورة النزوية لدى أنثى الكلب، ذات طابع تحليلي، تمثل محاولة لمقارنة طريقتين لمتابعة الاهتياج. الهدف المقصود هو تقييم دقة كل منهما، و البحث عن معايير تمكن من تحسين استعمالهما لتحديد فترة التلقيح، وذلك بمراعاة عاملي الوقت والمصروف.

بداية، المؤلف ذكر بأهم الخصائص الفيزيولوجية المتعلقة بالتكاثر عند أنثى الكلب. بعد ذلك، قام بوصف الطرق التي استعملت سابقا لمتابعة الاهتياج بهدف تحديد فترة التخصيب.

في المرحلة الثانية، تم إتباع اهتياج ستة عشر أنثى كلب بتطبيق طريقة فحص الحك المهبلي (معالجة هاريس-شور)، ومعايرة تركيز هرمون البروجسترون في مصل الدم. من بين عدد إناث الكلاب الذي تم إتباعه، تسع إناث اظهرن الاهتياج أثناء الفترة ما بين 2006-05-29 و 2006-08-31. بعد أن تم فحص النتائج، تم الاستنتاج أن معظم إناث الكلاب (88.9%) أتت باهتياج ذا تطور مطابق لما هو معتاد.

من جهة أخرى، تم إنجاز دراسة إحصائية لمقارنة المعايير الخلوية، لتحديد نسبة الخلايا المهبلية ذات الطابع الحمضي بالنسبة لتركيز هرمون البروجسترون في مصل الدم. استعمال فحص إحصائي مكن من دراسة التوافق.

مفتاح: تكاثر، دورة نزوية، اهتياج، تبييض، فترة تخصيب، فترة تلقيح، فحص الحك المهبلي، معايرة البروجسترون، أنثى الكلب، كليات أليفة.

TABLE DES MATIERES

REMERCEMENTS.....	II
DEDICACES.....	III
RESUME :	IV
ABSTRACT:.....	V
ملخص:	VI
TABLE DES MATIERES	VII
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	XI
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIII
GLOSSAIRE.....	XIV
INTRODUCTION	1
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	2
CHAPITRE 1. APPAREIL GENITAL DE LA CHIENNE :.....	3
1.1. REPRESENTATION GENERALE :	3
1.1.1. Le bassin :	3
1.1.2. Section glandulaire :	3
1.1.3. Section tubulaire :	3
1.1.3.1. Oviductes ou trompes utérines :	3
1.1.3.2. Utérus ou matrice :	5
1.1.3.2.1. Les cornes utérines (<i>cornua uteri</i>) :	5
1.1.3.2.2. Le corps utérin (<i>corpus uteri</i>) :	5
1.1.3.2.3. Le col utérin (<i>cervix uteri</i>) :	5
1.1.4. Section copulatrice :	6
1.1.4.1. Le vagin :	6
1.1.4.2. La vulve :	7
1.1.5. Appareil mammaire :	7
1.2. PARTICULARITES HISTO-CYTOLOGIQUES DU VAGIN :	7
1.2.1. La séreuse :	7
1.2.2. La musculeuse :	7
1.2.3. La muqueuse :	7
1.2.3.1. Les cellules basales :	8
1.2.3.2. Les cellules parabasales :	8
1.2.3.3. Les cellules intermédiaires :	9
1.2.3.3.1. Les petites cellules intermédiaires :	9
1.2.3.3.2. Les grandes cellules intermédiaires :	9
1.2.3.4. Les cellules superficielles :	10
CHAPITRE 2. ETUDE DU CYCLE ŒSTRAL DE LA CHIENNE :	11
2.1. LA PUBERTE :	11
2.2. GENERALITES – DEFINITIONS :	12
2.3. MODIFICATIONS AU COURS DES DIFFERENTES PHASES DU CYCLE ŒSTRAL :	13
2.3.1. Le <i>pro-œstrus</i> :	13
2.3.1.1. Modifications comportementales :	13
2.3.1.2. Modifications cliniques :	13
2.3.1.3. Modifications histo-physiologiques :	13
2.3.1.4. Modifications hormonales :	15
2.3.2. L' <i>œstrus</i> :	16
2.3.2.1. Modifications comportementales :	16
2.3.2.2. Modifications cliniques :	16
2.3.2.3. Modifications histo-physiologiques :	16
2.3.2.4. Modifications hormonales :	17
2.3.3. Le <i>metœstrus</i> :	17
2.3.3.1. Modifications comportementales :	17
2.3.3.2. Modifications cliniques :	17

2.3.3.3. Modifications histo-physiologiques :	18
2.3.3.4. Modifications hormonales :	18
2.3.3.4.1. Chez la chienne gestante :	18
2.3.3.4.2. Chez la chienne non gestante :	19
2.3.4. <i>l'anoestrus</i> :	19
2.3.4.1. Modifications comportementales :	19
2.3.4.2. Modifications cliniques :	19
2.3.4.3. Modifications histo-physiologiques :	19
2.3.4.4. Modifications hormonales :	20
CHAPITRE 3. OVULATION ET PERIODE DE FECONDABILITE :	22
3.1. L'OVULATION :	23
3.1.1. <i>Mécanismes de l'ovulation</i> :	23
3.1.1.1. Modifications folliculaires :	23
3.1.1.2. Modifications ovocytaires :	25
3.1.1.2.1. Maturation cytoplasmique :	25
3.1.1.2.2. Maturation nucléaire :	25
3.1.1.3. Conditionnement neuro-endocrinien de l'ovulation :	27
3.1.2. <i>Moment de l'ovulation</i> :	28
3.1.3. <i>Taux d'ovulation</i> :	28
3.2. LA PERIODE DE FECONDABILITE :	30
3.2.1. <i>Définitions : fécondabilité – fertilité</i> :	30
3.2.1.1. La période de fécondabilité :	30
3.2.1.2. La période de fertilité :	30
3.2.2. <i>Période optimale de fécondabilité</i> :	31
3.2.3. <i>Taux de fécondabilité</i> :	32
CHAPITRE 4. LE SUIVI DES CHALEURS :	33
4.1. LES MARQUEURS DES CHALEURS :	33
4.1.1. <i>Critères subjectifs</i> :	33
4.1.1.1. Nombre de jours après le début de l'écoulement sanguin :	33
4.1.1.2. Acceptation du mâle par la chienne :	34
4.1.1.3. Acceptation de la chienne par le mâle :	34
4.1.1.4. Aspect des écoulements vulvaires :	35
4.1.2. <i>Critères objectifs</i> :	35
4.1.2.1. Résistivité du mucus vaginal :	35
4.1.2.2. Endoscopie vaginale :	35
4.1.2.3. Laparoscopie :	36
4.1.2.4. Frottis vaginaux :	37
4.1.2.4.1. Principe de l'examen cytologique vaginal :	37
4.1.2.4.2. La technique de réalisation d'un frottis vaginal :	37
4.1.2.4.2.1. Le prélèvement :	37
4.1.2.4.2.2. L'étalement :	39
4.1.2.4.2.3. La fixation :	39
4.1.2.4.2.4. La coloration :	39
4.1.2.4.3. Interprétation d'un frottis vaginal :	43
4.1.2.4.3.1. Lecture des lames :	43
4.1.2.4.3.2. Les types cellulaires retrouvés sur un frottis vaginal :	43
4.1.2.4.3.3. Les variations de la cytologie vaginale au cours du cycle œstral :	44
4.1.2.4.3.4. Les indices cytologiques :	49
4.1.2.5. Dosages hormonaux :	51
4.1.2.5.1. Dosage de FSH :	52
4.1.2.5.2. Dosage de LH :	53
4.1.2.5.3. Dosage des œstrogènes :	53
4.1.2.5.4. Dosage de la progestérone :	54
4.1.2.5.4.1. Dosage semi quantitatif de la progestérone :	55
4.1.2.5.4.2. Dosage quantitatif de la progestérone :	56
4.1.2.6. Échographie ovarienne :	58
4.1.2.6.1. Anatomie échographique des ovaires de la chienne :	58
4.1.2.6.2. L'examen échographique :	58
4.1.2.6.2.1. Préparation de l'animal :	59
4.1.2.6.2.2. La contention :	59
4.1.2.6.2.3. Le choix de la sonde :	59
4.1.2.6.2.4. La recherche des images :	60
4.1.2.6.2.5. La lecture des images échographiques :	60

4.2. LES PROTOCOLES DE SUIVI DES CHALEURS :	63
4.3. LES PERSPECTIVES D'AVENIR :	67
CHAPITRE 5. LA MAITRISE DU CYCLE ŒSTRAL :	68
5.1. L'INDUCTION DES CHALEURS :	69
5.2. LA SYNCHRONISATION DES CHALEURS :	69
5.3. LA SUPEROVULATION :	70
5.4. L'INSEMINATION ARTIFICIELLE (IA) :	70
5.4. LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE :	71
5.5. LA RECOLTE D'OVOCYTES :	71
5.6. LA MATURATION IN VITRO (MIV) :	72
5.7. LA FECONDATION IN VITRO (FIV) :	72
5.8. LE CLONAGE :	73
II. ETUDE EXPERIMENTALE	74
II.1. OBJECTIFS :	75
II.2. ANIMAUX, MATERIEL ET METHODE :	75
II.2.1. <i>Le lieu d'expérimentation (CFC/GN) :</i>	75
II.2.2. <i>Les animaux :</i>	75
II.2.3. <i>Le suivi de chaleurs :</i>	76
II.2.3.1. Examen gynécologique :	77
II.2.3.2. Examen cytologique (frottis vaginaux) :	78
II.2.3.3. Examen endocrinologique (dosage de la progestérone) :	79
II.2.4. <i>Saisie et traitement des données :</i>	80
II.3. RESULTATS :	80
II.3.1. <i>Étude clinique :</i>	80
II.3.1.1. Nombre de cas :	80
II.3.1.2. Durée des chaleurs :	80
II.3.1.3. Expression des signes externes :	81
II.3.2. <i>Etude des frottis vaginaux :</i>	82
II.3.2.1. Nombre de cas :	82
II.3.2.2. Etude des courbes individuelles du taux d'éosinophilie :	82
II.3.2.2.1. Durée de persistance du frottis d'œstrus :	82
II.3.2.2.2. Valeur du pic d'éosinophilie au cours des chaleurs :	82
II.3.2.2.3. Moment du pic du taux d'éosinophilie par rapport au pic de LH :	83
II.3.2.2.4. Courbes d'évolution de l'éosinophilie à caractère particulier :	83
II.3.2.2.4.1. Présence de deux pics d'éosinophilie – courbe de la femelle n°12 :	83
II.3.2.2.4.2. Présence d'un plateau d'éosinophilie – courbe de la femelle n°02 :	84
II.3.2.3. Étude de la transition œstrus – metœstrus :	85
II.3.3. <i>Etude des courbes de la progestérone :</i>	85
II.3.3.1. Nombre de cas :	85
II.3.3.2. Confirmation de l'ovulation :	85
II.3.3.3. Moments de l'augmentation de la progestéronémie au cours des chaleurs :	85
II.3.3.4. Durée du passage de la progestéronémie de 2 vers 4 à 10ng/ml :	86
II.3.3.5. Etude des courbes individuelles de progestéronémie :	86
II.3.3.5.1. Courbes à évolution habituelle :	86
II.3.3.5.2. Courbes atypiques :	87
II.3.4. <i>Etude statistique :</i>	87
II.3.4.1. Analyse statistique-Les résultats du test de chi-deux (χ^2) :	87
II.3.4.2. Evolution des différentes classes cellulaires en fonction de la progestéronémie :	88
II.3.4.2.1. Constitution des classes de progestéronémie :	88
II.3.4.2.2. Les pourcentages des classes cellulaires en fonction de la progestéronémie :	88
II.3.4.2.2.1. Les cellules basophiles : (cf. figure II.17)	89
II.3.4.2.2.2. Les cellules polychromatophiles : (cf. figure II.18)	90
II.3.4.2.2.3. Les cellules éosinophiles (acidophiles) :	90
II.3.4.3. Corrélation entre le taux de progestérone et les pourcentages cellulaires :	91
II.4. DISCUSSION :	91
II.4.1. <i>Comparaison avec la littérature :</i>	91
II.4.1.1. Durée des chaleurs :	91
II.4.1.2. Profil des courbes d'éosinophilie :	92
II.4.1.3. Profil des courbes de progestéronémie :	92
II.4.1.4. Moment de l'ovulation :	92
II.4.1.5. Localisation de la période de fécondabilité :	93
II.4.1.6. Les résultats statistiques :	93

II.4.2. Difficultés rencontrées :	94
II.4.3. Évaluation des marqueurs du cycle utilisés:	94
II.4.3.1. Etude clinique :	94
II.4.3.2. Etude des frottis vaginaux :	94
II.4.3.3. Etude des mesures de la progestérone plasmatique :	94
II.4.4. Biais :	95
II.5. RECOMMANDATIONS :	95
CONCLUSION	96
BIBLIOGRAPHIE	97
ANNEXES	112
ANNEXE 1: IDENTIFICATION DES FEMELLES EN EXPERIMENTATION.	113
ANNEXE 2: MODELE DE FICHE D'EXPLOITATION POUR FROTTIS VAGINAL	114
ANNEXE 3: BASE DE DONNEES INITIALE REGROUPANT LES PARAMETRES ETUDIES POUR LES 88 ECHANTILLONS SELECTIONNES.	115
ANNEXE 4: TEST DU CHI-2 (X-2).....	118
ANNEXE 5: ETUDE DU CYCLE GESTRAL DE LA FEMELLE N°03 PAR APPLICATION DES FROTTIS VAGINAUX ET DU DOSAGE DE LA PROGESTERONE PLASMATIQUE.	119

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Fig. 1.1.	Appareil génital de la chienne (d'après <i>Barone</i> 1990).	4
Fig. 1.2.	Particularités anatomiques du col utérin chez la chienne (d'après <i>Feldman</i> et <i>Nelson</i> 1996).	5
Fig. 1.3.	Représentation schématique du vagin de la chienne. (<i>Pineda</i> 1973).	6
Fig. 1.4.	Coupe histologique d'une portion de l'épithélium vaginal. (d'après la division d'histologie du département de médecine de l'université de Fribourg).	8
Fig. 1.5.	Classification des cellules de l'épithélium vaginal suivant le processus de maturation (d'après <i>Schutte</i> 1967).	9
Fig. 2.1.	Evolution de l'épithélium vaginal en fonction du stade physiologique (d'après <i>Fontbonne</i> et <i>Guérin</i> 2003).	14
Fig. 2.2.	Représentation schématique des modifications endocriniennes au cours du cycle ovarien de la chienne non gestante (d'après <i>Concannon</i> et al. 1989).	21
Fig. 3.1.	Ovulation, maturation ovocytaire et période de fécondabilité chez la chienne. (d'après <i>Concannon</i> 1983).	22
Fig. 3.2.	Schémas de l'ovaire et de ses principaux constituants réunissant sur le même diagramme les stades successifs du cycle ovarien (d'après <i>Klein</i> et <i>Mayer</i> 1963).	24
Fig. 3.3.	Microphotographies de (A) ovocytes de chat et de chien; (B) ovocyte de chien entouré par de multiples assises de cellules du cumulus; (C) ovocyte de chien après 48h de culture <i>in vitro</i> et (D) embryons canins (48h après insémination) provenant d'ovocytes maturés <i>in vitro</i> . (d'après <i>Songsasen</i> et <i>Wildt</i> 2006).	25
Fig. 3.4.	Les principales étapes de la vie de l'ovocyte canin, depuis la cellule germinale primordiale jusqu'à l'embryon.	26
Fig. 3.5.	Photos d'ovocytes canins pris sous microscope à fluorescence (d'après <i>Hosseini</i> et al. 2006).	27
Fig. 3.6.	Régulation de la fonction gonadique chez la chienne durant le pro-œstrus et l'œstrus.	29
Fig. 4.1.	Aspect endoscopique de la muqueuse vaginale au cours du pro-œstrus, de l'œstrus et du métoœstrus respectivement de gauche à droite (d'après <i>England</i> et <i>Concannon</i> 2002).	36
Fig. 4.2.	Technique d'écouvillonnage chez la chienne (d'après <i>Johnston</i> et al. 2001).	38
Fig. 4.3.	Frottis vaginaux de chienne colorés avec la méthode MGG modifiée : Diff-Quick®. (d'après <i>England</i> et <i>Concannon</i> 2002).	40
Fig. 4.4.	Frottis vaginaux pratiqués chez une femme et colorés avec la technique de Papanicolaou (d'après <i>Heron</i> 2006).	41
Fig. 4.5.	Les cellules d'un frottis vaginal (d'après <i>Neveux</i> 1999).	43
Fig. 4.6.	Frottis vaginaux (colorés au Harris- Shorr) représentant les différents stades du cycle sexuel de la chienne (d'après <i>Fontbonne</i> et <i>Guérin</i> 2003).	46
Fig. 4.7.	Schéma typique de la modification des cellules épithéliales vaginales à la survenue du métoœstrus (d'après <i>Holst</i> et <i>Phémister</i> 1974)	48
Fig. 4.8.	Courbe théorique de l'évolution de l'indice éosinophile (d'après <i>Taradach</i> 1980).	50
Fig. 4.9.	Principe des techniques d'immunodosage (d'après <i>Prélaud</i> et al.).	52
Fig. 4.10.	Pic de LH, ovulations et période de fécondabilité par rapport à l'évolution de la de progestéronémie (d'après <i>Fontbonne</i> et <i>Guérin</i> 2003).	54
Fig. 4.11.	Examen échographique des ovaires de la chienne dans les différentes positions possible (d'après <i>Fontbonne</i> 2005).	59
Fig. 4.12.	Echographie sur une chienne debout utilisant une sonde sectorielle. (d'après <i>Wolfgang</i> 1994).	60
Fig. 4.13.	Photos d'échographies trans-abdominales en mode B d'ovaires de chienne avant et après l'ovulation (d'après <i>England</i> , <i>Yeager</i> et <i>Concannon</i> 2003).	62
Fig. 4.14.	Protocole de suivi de chaleurs utilisé au CERCA (d'après <i>Fontbonne</i> 1996a)	66
Fig. II.1.	Photos de quelques unes des chiennes en expérimentation	76
Fig. II.2.	Déroulement du suivi des chaleurs durant la période d'expérimentation.	76
Fig. II.3.	Inspection de la vulve et du périnée (à gauche), et de la muqueuse vaginale (à droite) chez la chienne.	77
Fig. II.4.	Prélèvement pour frottis vaginal chez une chienne par écouvillonnage profond du vagin	78
Fig. II.5.	Prélèvement pour frottis vaginal chez une chienne - étalement de l'écouvillon sur une	78

	lame.	
Fig. II.6.	Observation d'un frottis vaginal sous microscope optique.	79
Fig. II.7.	Couleur de l'écoulement vulvaire par appréciation de l'écouvillon.	81
Fig. II.8.	Pourcentage de chiennes présentant un frottis d'œstrus durant 0 à 11 jours des chaleurs.	82
Fig. II.9.	Pourcentage de chiennes présentant un taux maximum d'éosinophilie donné au cours des chaleurs.	83
Fig. II.10.	Evolution de l'éosinophilie, courbe individuelle de la femelle n°12, J0 représente le jour du pic de LH	84
Fig. II.11.	Evolution de l'éosinophilie, courbe individuelle de la femelle n°02, J0 représente le jour du pic de LH.	84
Fig. II.12.	Transition cytologique œstrus – métœstrus, frottis vaginaux de la femelle n°06.	85
Fig. II.13.	Courbe individuelle de la progestéronémie, femelle n°14.	86
Fig. II.14.	Courbe individuelle de la progestéronémie, femelle n°12.	87
Fig. II.15.	Effectifs des différentes classes de progestéronémie.	88
Fig. II.16.	Evolution des pourcentages (%) des types cellulaires en fonction de la progestéronémie (ng/ml) pour les 84 échantillons sélectionnés.	89
Fig. II.17.	Evolution du taux de la basophilie en fonction de la progestéronémie (84 échantillons).	89
Fig. II.18.	Evolution du taux de polychromatophilie en fonction de la progestéronémie (84 échantillons).	90
Fig. II.19.	Evolution du taux d'éosinophilie en fonction de la progestéronémie (84 échantillons).	90
Fig. II.20.	Evolution des pourcentages (%) des types cellulaires en fonction de la progestéronémie (ng/ml) pour les 84 échantillons sélectionnés.	91
Tableau 3.1	Estimations de la période de fertilité, de la maturation ovocytaire et de la période de fécondabilité par rapport au pic de LH et au jour de l'ovulation chez la chienne (d'après <i>England</i> et <i>Concannon</i> 2002).	31
Tableau 4.1	La coloration de Harris-Shorr (d'après <i>Schutte</i> 1967).	40
Tableau 4.2	La coloration de Papanicolaou. (<i>Papanicolaou</i> – en ligne)	41
Tableau 4.3	Corrélation entre la concentration plasmatique de progestérone et l'ovulation. (<i>Root Kustritz</i> 2001a).	54
Tableau 4.4	Estimation du jour de l'ovulation par dosage quantitatif et semi quantitatif de la progestérone (d'après <i>Root Kustritz</i> 2001a).	56
Tableau 4.5	Tableau récapitulatif des principaux événements se produisant pendant le pro-œstrus et l'œstrus de la chienne (d'après <i>England</i> et <i>Concannon</i> 2002).	65
Tableau 5.1	Fertilité et prolificité après insémination artificielle (IA) intra vaginale ou intra utérine à l'aide de semence fraîche, réfrigéré ou congelée chez la chienne (d'après <i>Linde-Forsberg</i> 2001).	73
Tableau 5.2	Le moment optimal pour l'insémination suivant la méthode utilisée (d'après <i>England</i> et <i>Concannon</i> 2002).	73
Tableau II.1	Durée des chaleurs et expression des signes externes pour les 9 femelles entrés	80
Tableau II.2	Tableau regroupant le pourcentage des trois classes cellulaires étudiées en fonction de la progestéronémie pour 84 échantillons (frottis vaginaux).	88
Tableau II.3	Estimations de la période de fécondabilité et de la période de fertilité par rapport au pic de LH et au jour de l'ovulation pour les 9 chiennes qui ont présentés leurs chaleurs.	93

LISTE DES ABREVIATIONS

AMPc	Adénosine Mono-Phosphate cyclique.
BA	Berger Allemand.
BBM	Berger Belge Malinois.
CERCA	Centre d'Etudes en Reproduction Canine Assistée.
CERREC	Centre d'Etudes et de Recherche en Reproduction et Elevage des Carnivores.
CFC/GN	Centre de Formation Cynotechnique de la Gendarmerie Nationale.
cm	Centimètre.
C.R.N.D.	Centre de Recherches Nucléaire de Draria
d.d.l	Degrés de libertés.
DO	Densité optique.
DPI	Diagnostic Pré-Implantatoire.
EDTA	Ethylène Di-méthyle Tétra Acétique.
EIA	Enzyme-Immuno-Assay.
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.
FIV	Fécondation <i>In Vitro</i> .
FSH	Follicule Stimulating Hormone.
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone.
GVBD	Germinal Vesicl Break-Down.
h	Heure.
hCG	Human Chorionic Gonadotropin.
HISA	Human Immunometric Sandwich Assay.
IA	Insémination Artificielle.
IE	Indice Eosinophile.
ICP	Indice Caryo-Pycnotique.
IS	Indice Superficiel.
ICSI	Intra-Cytoplasmic Sperm Injection.
J	Jour.
LH	Luteinising Hormone.
µg	Microgramme.
MGG	May Grünwald Giemsa.
MIV	Maturation <i>In Vitro</i> .
Mode A	Mode Amplitude.
Mode B	Mode Brillance.
Mode TM	Mode Temps Mouvements.
ml	Millilitre.
µm	Micromètre.
mm	Millimètre.
ng	Nanogramme.
ND	Non déterminé.
NS	Non Significatif.
OPU	Ovum Pick-Up.
pg	Picogramme.
PGF2-α	Prostaglandine F2-Alfa.
PMSG	Pregnant Mare's Serum Gonadotropin
PNN	Poly-Nucléaire Neutrophile.
RIA	Radio-Immuno-Assay.
s. d.	Sans date.
VG	Vésicule Germinative.
χ-2	Chi-2, ou qui-2 ou encore khi-2 (test statistique).

GLOSSAIRE

Acidophilie cytoplasmique	Une cellule ou une zone cellulaire est acidophile lorsqu'elle présente une affinité sélective pour un colorant qui est sous forme anionique (la partie colorante est chargée négativement). Parmi les colorants acides les plus utilisés : l'éosine, l'orange G, la fushine acide, le bleu d'aniline et le vert lumière [ALLIET et LALEGERIE 1997].
Artéfact	En échographie, l'artéfact est une représentation à l'image qui ne correspond pas à la réalité de l'objet imagé [MAI 1999b].
Basophilie cytoplasmique	A l'inverse de l'acidophilie, la basophilie d'une structure ou d'une cellule dans son ensemble correspond à une affinité dominante pour un colorant basique, c'est-à-dire une molécule dont la partie colorante présente des charges positives. Un tel colorant aura la faculté de colorer des structures ou des zones cytoplasmiques riches en charges négatives comme les acides nucléiques par exemple. Parmi les colorants basiques : le bleu de toluidine et le bleu de méthylène [ALLIET et LALEGERIE 1997].
Bromocriptine	Dérivé de l'ergot de seigle, c'est une substance à effet anti-prolactine. Véritable agoniste de la dopamine, elle est responsable de l'effet PIF (<i>Prolactin Inhibiting Factor</i>). Son indication majeure en médecine vétérinaire est le tarissement de la lactation de pseudogestation chez la chienne [ALLIET et LALEGERIE 1997].
Diéthyl-stilbœstrol	Dérivé du stilbène, c'est l'œstrogène de synthèse le plus utilisé en médecine vétérinaire en raison de son haut pouvoir œstrogène [FONTAINE et CADORE 1995].
Haptène	Molécule de faible poids moléculaire peu ou pas antigénique [PRELAUD et al. 2002].
Isotope	Élément chimique ayant le même numéro atomique qu'un autre élément, mais un nombre de masse différent. Les divers isotopes d'un même élément peuvent avoir des propriétés différentes. Beaucoup, obtenus artificiellement, sont radio-actifs; mélangés aux atomes naturels, ils permettent de « marquer » les molécules et de les suivre dans leurs transformations. Les principaux isotopes radio-actifs employés en médecine sont : l'iode, le calcium et le phosphore [LAROUSSE 1966].

INTRODUCTION

En matière de reproduction canine, et selon la majorité des publications, un choix inapproprié de la saillie ou de l'insémination artificielle est la cause majeure d'infertilité. En effet, les saillies sont souvent programmées à un mauvais moment, représentant de loin la plus fréquente cause d'infertilité dont l'incidence peut représenter de 40 à 80% des cas [FELDMAN et NELSON 1996, GUERIN et *al.* 1997, JOHNSTON et *al.* 2001, FONTBONNE 2005 et 2006].

Et comme la chienne est une espèce mono-œstrienne (qui ne présente qu'une seule période de chaleurs par cycle), à un intervalle inter-œstral physiologiquement très long, oscillant entre 3.5 et 13 mois [CONCANNON 1993], les périodes de chasses sont espacées de manière à accentuer cet état d'infertilité.

Les particularités de la chienne, encore peu étudiées, pourraient expliquer à elles seules beaucoup de problèmes rencontrés dans la conduite de la reproduction en élevage canin. En effet, contrairement à ce qui est observé chez les autres femelles de mammifères domestiques, au moment de l'ovulation, l'ovocyte est encore bloqué à un stade immature (en prophase I, stade vésicule germinative), et il ne poursuit sa maturation ovocytaire qu'une fois dans l'oviducte, durant 48 à 72h après l'ovulation [TSUTSUI 1989, FONTBONNE et *al.* 2004, REYNAUD et *al.* 2005a].

Cette « maturation extra-folliculaire » est à l'origine d'une importante « variabilité dans la période de fécondabilité » car les ovocytes ne sont pas fécondables immédiatement après l'ovulation, mais bien plus tard une fois atteignant le stade mature (métaphase II) [FONTBONNE et *al.* 2004, REYNAUD et *al.* 2005a].

Le manque de compréhension des particularités de la physiologie de la reproduction chez la chienne, a fait que la conduite de la reproduction soit menée de manière subjective, basée essentiellement sur l'observation de signes externes des chaleurs tel que l'écoulement de sang. Mais, depuis les années 80, la recherche scientifique s'est penchée sur l'étude clinique du cycle œstral ce qui a amélioré considérablement nos connaissances relatives. Ainsi, des protocoles de suivi de chaleurs basés sur des marqueurs fiables du cycle œstral de la chienne ont fini par être mis en œuvre pour déterminer avec précision cette période fertile.

Au cours de la partie bibliographique de ce travail, nous allons exposer les particularités physiologiques propres à la chienne, qui la distinguent des autres femelles de mammifères domestiques, et qui participent à son retard en termes de biotechnologies de la reproduction. Ainsi que les différents moyens tant objectifs que subjectifs déjà mis au point pour suivre ses chaleurs.

Dans un deuxième temps, et au cours de la partie expérimentale, nous allons tenter de mettre en application un protocole de suivi de chaleurs, basé sur une association de critères objectifs (l'examen des frottis vaginaux et le dosage de la progestérone plasmatique) à l'examen gynécologique classique des chiennes, afin de déterminer sa période optimale de fécondité.

**I. ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE 1. APPAREIL GENITAL DE LA CHIENNE :

L'appareil génital de la chienne est localisé en région pelvienne, mais également très largement, dans la cavité abdominale puisque les ovaires n'ont pas migré caudalement dans cette espèce et restent positionnés en regard du pôle caudal des reins. La disposition anatomique de cet appareil génital offre quelques particularités anatomiques. [BARONE 1990, BURDAS et *al.* 1994]

1.1.Représentation générale :

L'appareil génital de la chienne (cf. fig. 1.1), comme chez tous les vertèbres supérieurs, est constitué de trois sections (glandulaire, tubulaire et copulatrice):

1.1.1.Le bassin :

Le bassin de la chienne est cylindrique, aplati dorso-ventralement et à forte inclinaison pelvienne.

Il est soutenu à l'état frais par les **ligaments larges**, ayant une forme en demi cercle, ils sont très amples et présentent au niveau de leurs faces externes une duplication séreuse le **ligament rond** [BARONE 1986, DERIVAUX et ECTORS 1980].

1.1.2. Section glandulaire :

Comportant une paire de gonades : les **ovaires** (du latin *Ovarium*, de *Ovum*, œuf) : localisés très en avant, en position mi-abdominale, contre le rebord caudal du rein correspondant, à l'aplomb de la 3^e-4^e vertèbre lombaire et plaqués contre la paroi abdominale latérale. Les ovaires de la chienne sont de petits corps de tissu conjonctif grisâtre de 2 cm, de forme ellipsoïde, enfermés dans des **bourses ovariennes** presque entièrement closes (constituées par le *mésovarium*, le ligament propre de l'ovaire, la *fimbria ovarica* et le *mésosalpinx*), plus ou moins graisseuses suivant la race et l'âge, ce qui rend difficile leur visualisation lors d'une intervention chirurgicale. [McDONALD 1969, SOKOLOWSKI 1973, GRAU et WALTER 1975, BARONE 1990, VAISSAIRE 1977, DERIVAUX et ECTORS 1980].

1.1.3.Section tubulaire :

Comprend les oviductes et l'utérus.

1.1.3.1. Oviductes ou trompes utérines :

Difficilement mis en évidence à l'examen direct car logés dans les bourses ovariennes, les oviductes sont extrêmement courts (4 à 7.6 cm), étroits, peu sinueux, s'ouvrant directement par un pavillon frangé et plissé, en regard de l'ouverture interne de la bourse ovarienne. Ils contournent ensuite le pôle antérieur de l'ovaire pour se terminer par une étroite fente dans la cavité utérine. Ainsi, on parlera rarement chez la chienne de ligature des trompes - opération qui n'est guère réalisable dans cette espèce - mais de ligature des cornes utérines.

Les oviductes sont le lieu de la fécondation, et ils acheminent l'ovule fécondé vers l'utérus. [ALTMAN 1962, McDONALD 1969, VAISSAIRE 1977].

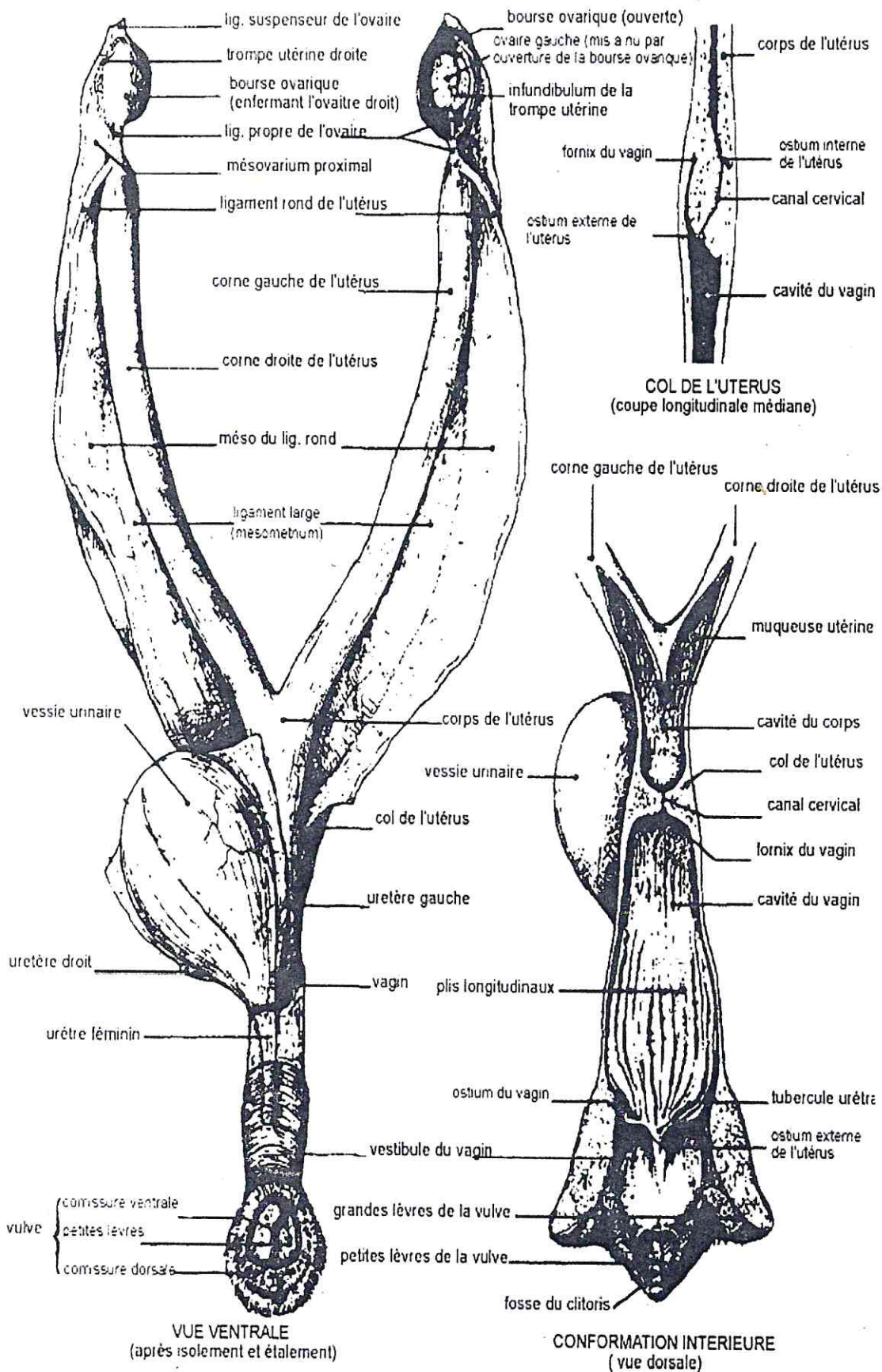


Fig. 1.1: Appareil génital de la chienne (d'après Barone 1990)

1.1.3.2. Utérus ou matrice :

Organe de la gestation, l'utérus de la chienne se divise en trois parties (cf. figure 1.1):

1.1.3.2.1. Les cornes utérines (*cornua uteri*) :

Situées totalement en région abdominale, les deux cornes utérines forment la partie la plus développée de l'utérus de la chienne, lui donnant la forme en "V"; elles sont très longues et grêles, mesurant chacune 10 à 15cm de long pour un peu moins d'un centimètre de large chez un animal de taille moyenne, avec un calibre uniforme sur toute leur longueur, mais effilées à leurs extrémités antérieures [ALTMAN 1962, McDONALD 1969, VAISSAIRE 1977].

1.1.3.2.2. Le corps utérin (*corpus uteri*) :

Ayant un rôle principalement au moment de la mise bas; il est étroit et très court (3 à 4 cm) par rapport aux cornes, d'où la qualification « utérus bipartite ». Il est avec les cornes étiré suivant l'axe longitudinal de l'organisme [ALTMAN 1962, McDONALD 1969, VAISSAIRE 1977].

1.1.3.2.3. Le col utérin (*cervix uteri*) :

Situé en regard du détroit antérieur du bassin, c'est un très court cylindre d'environ 2 cm de long [ALTMAN 1962, McDONALD 1969, VAISSAIRE 1977], de consistance caoutchouteuse mais ferme, et qui fait légèrement saillie latéralement de façon très dissymétrique car le **fornix** est pratiquement inexistant sur la face dorsale, mais réalise ventralement un véritable cul de sac de 4 à 8 mm de long, d'où l'aspect souvent décrit en « nez de tanche » de cette région. (cf. figure 1.2)

L'ostium est entouré de franges engrainées, il donne accès à un canal court, étroit et rectiligne, positionné obliquement d'avant en arrière et du haut vers le bas, appelé « canal cervical », de ce fait, il est très difficile de le franchir avec un instrument introduit par le vagin. [PINEDA et al. 1973, VAISSAIRE 1977, DERIVAUX et ECTORS 1980, ANDERSON et ANDERSON 1994, FELDMAN et NELSON 1996, FONTBONNE 1997, TAINTURIER et al. 2003].

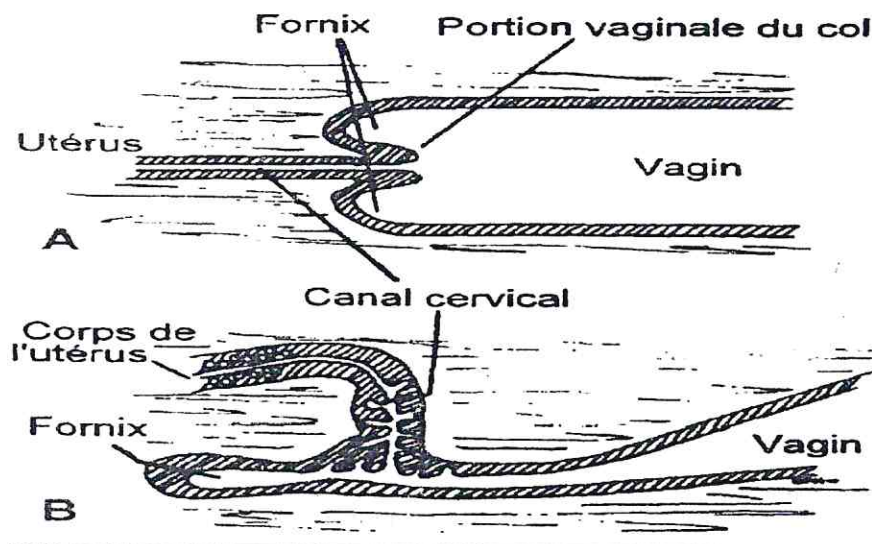


Fig. 1.2 : Particularités anatomiques du col utérin chez la chienne : schéma d'une coupe longitudinale médiane du canal cervical. A- chez de nombreuses espèces ; B- chez la chienne (d'après *Feldman et Nelson* 1996).

1.1.4. Section copulatrice :

Comprend le **vagin** et la **vulve**, ces derniers forment un conduit impair recevant l'organe mâle (pénis) lors du rapprochement sexuel, et donnent passage au nouveau-né lors de la mise bas.

1.1.4.1. Le vagin :

Comme c'est le vagin qui accueille le pénis en érection lors du coït, il est très profond (12 à 15 cm chez un animal de taille moyenne) et très volumineux sur sa partie caudale, puis se rétrécit en région para-cervicale. Il se caractérise par un **vestibule** long (5 à 6 cm) dont l'orientation oblique dorso-ventralement est pratiquement verticale, et fait une sorte de coude avec le reste du vagin, beaucoup plus horizontal (cf. figure 1.3).

La paroi du vagin est facilement mobilisable en raison des nombreux plis longitudinaux qui, d'après *Pineda et al.* (1973), permettent à la lumière vaginale de s'accommoder à la dilatation des bulbes érectiles du gland du pénis en érection lors du coït, elle est également dotée à son extrémité postérieure d'un sphincter qui se resserre très fortement en arrière de la verge du mâle ce qui permet de maintenir l'érection plus longtemps et de déclencher des contractions fortes du vagin favorisant la remontée des spermatozoïdes à travers le col.

Sur le plafond du vagin se situe un repli longitudinal proéminent appelé « pli dorso-médian post-cervical du vagin » (cf. figure 1.3), lors de l'examen au spéculum, il est perçu comme une fissure ventrale qui a longtemps été prise pour l'ostium externe du cervix, d'où le nom de « pseudo-cervix » donné à cette région. D'après *Pineda et al.* (1973), ce pli pourrait avoir un rôle dans le transport du liquide séminal au travers du cervix.

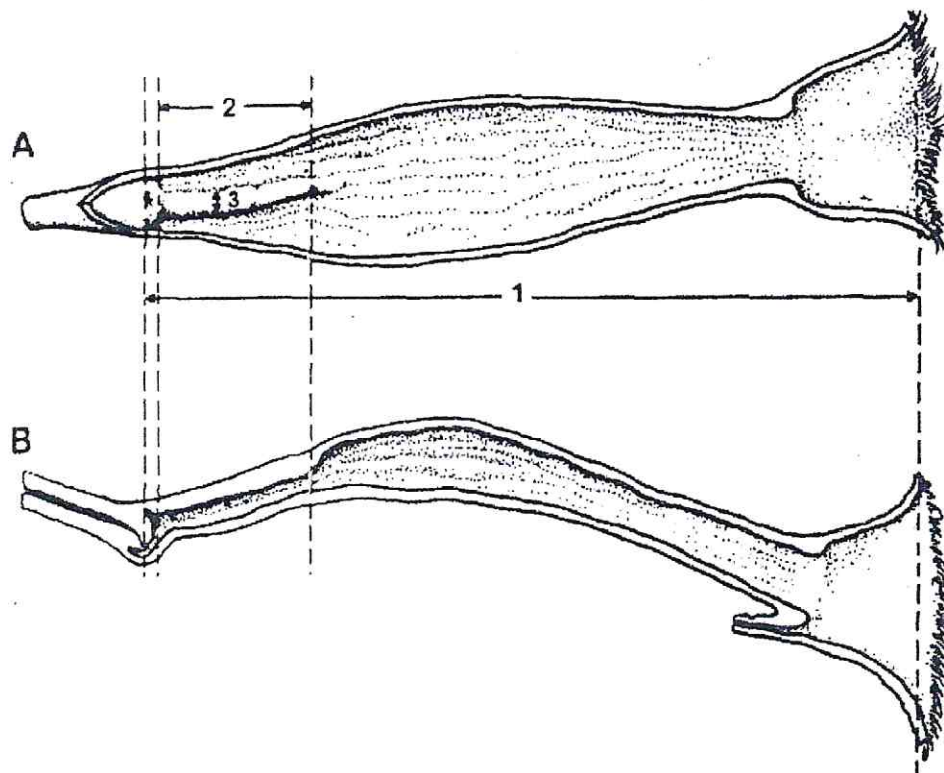


Fig. 1.3 : Représentation schématique du vagin de la chienne.

A- vue ventrale de la paroi dorsale ; **B-** vue latérale d'une section sagittale. **1-** longueur du vagin et de la vulve ; **2-** longueur du plis post cervical dorso-médian ; **3-** profondeur du plis post cervical dorso-médian (d'après *Pineda et al.* 1973).

Sur le plancher du vagin et près de la vulve se localisent le **méat urinaire** et la **fosse clitoridienne**, cette dernière forme un cul de sac plus ou moins profond suivant les chiennes, et dans laquelle est logé le clitoris [BOURDELLE et BRESSOU 1953, PINEDA 1973, VAISSAIRE 1977, FONTBONNE 1995 et 1997].

La connaissance anatomique précise du vagin est indispensable afin de réaliser des prélèvements de cellules vaginales dans de bonnes conditions (cf. § 4.1.2.4.).

1.1.4.2. La vulve :

Séparée du vagin par un rudiment d'hymen, la vulve de la chienne est composée de deux lèvres verticales reliées par un capuchon vers le haut, et une commissure aigue et pendante vers le bas. Le dénivellement entre la commissure ventrale de la vulve et le col de l'utérus atteint plusieurs centimètres; la commissure est en effet très nettement en dessous du niveau de la symphyse pelvienne, alors que le col est situé dorsalement à cette dernière. [BOURDELLE et BRESSOU 1953, VAISSAIRE 1977, TAINURIER et al. 2003].

1.1.5. Appareil mammaire :

Les mamelles sont étendues du pubis au thorax en deux colonnes parallèles, bien séparées par un large sillon médian. En moyenne une chienne possède 5 paires de mamelles (de 4 à 6 paires selon la taille de la race) dont 2 pectorales, 2 abdominales et 1 inguinale. Chaque mamelle a la forme d'un cône court et obtus, avec en général la paire inguinale plus développée que les autres. Il arrive cependant qu'une mamelle manque ou que les mamelles de droite ou de gauche ne soient pas exactement en face l'une de l'autre.

Les tétines (ou tétons) sont perforées de 8 à 20 orifices microscopiques [BOURDELLE et BRESSOU 1953, VAISSAIRE 1977, DERIVAUX et ECTORS 1980].

1.2. Particularités histo-cytologiques du vagin :

Le vagin est un canal musculo-membraneux, une coupe histologique au niveau de sa paroi met en évidence, de la périphérie vers la lumière, trois couches : une séreuse (ou adventice), une musculuse et une muqueuse [GRAU et WALTER 1975, MAILLET et CHIARASINI s.d.].

1.2.1. La séreuse :

Elle est constituée par un tissu conjonctif richement infiltré par des vaisseaux sanguins et des nerfs.

1.2.2. La musculuse :

Elle est constituée par une fine couche de fibres musculaires lisses longitudinales et une fine couche de fibres musculaires lisses circulaires située vers la lumière.

1.2.3. La muqueuse :

La muqueuse est dotée de replis rugueux longitudinaux qui permettent une augmentation du diamètre vaginal pendant la période d'activité sexuelle.

L'épithélium vaginal est de type pavimenteux stratifié non kératinisé ou épithélium « malpighien » (cf. figure 1.4). Une couche de cellules germinatives non glandulaires, reposant sur une lame basale se stratifie en période d'activité sexuelle, et donne naissance à plusieurs couches de cellules, qui se chargent en kératine au fur et à mesure de l'augmentation du taux d'œstradiol plasmatique [GRAU et WALTER 1975, VAISSAIRE 1977, MAILLET et CHIARASINI s.d.]. Cette kératinisation pourrait, selon *Linde et Karlsson* (1984), avoir un rôle protecteur de la muqueuse vaginale lors de l'accouplement.

Lataste a mis en évidence, chez la femelle de Rongeurs, la transformation périodique de l'épithélium vaginal, en rapport avec le cycle œstral. Ainsi il établit en 1892 une loi du « rythme vaginal », selon laquelle on trouve en période d'activité œstrogénique, depuis l'assise germinative vers la lumière utérine, des cellules parabasales, des cellules intermédiaires (issues de la différenciation des cellules parabasales), puis des cellules superficielles [LATASTE 1892, VAISSAIRE 1977].

Selon *Schutte* (1967) les différentes couches cellulaires représentent les trois stades de maturation physiologique : la prolifération, puis la différenciation et enfin l'exfoliation [SCHUTTE 1967, VAISSAIRE 1977].

1.2.3.1. Les cellules basales :

Elles sont à l'origine de toutes les autres cellules de l'épithélium vaginal. Elles bordent la lame basale de la muqueuse vaginale et, normalement, ne s'exfolient pas.

1.2.3.2. Les cellules parabasales :

Ce sont de petites cellules épithéliales de 10 à 20 μm , elles ont une forme généralement ronde et uniforme, avec un noyau rond et volumineux et un cytoplasme peu abondant; le rapport nucléo-cytoplasmique est donc élevé. [SCHUTTE 1967, OLSON et *al.* 1984, CONCANNON et DIGERGORIO 1986, GUYANT 1988, VAUGHAN 1996, FELDMAN et NELSON 1996, JOHNSTON et *al.* 2001]

Ce type cellulaire est mis en évidence à l'examen du frottis vaginal [LATASTE 1892, SCHUTTE 1967, VAISSAIRE 1977] (cf. § 4.1.2.4.) grâce à l'affinité de son cytoplasme aux colorants basiques. [NEVEUX 1999, FONTBONNE et GUERIN 2003].

Les cellules parabasales peuvent contenir des polynucléaires neutrophiles dans leur cytoplasme, *Shutte* en 1967 les nomma « cellules méœstrales » car elles n'apparaissent pas pendant l'œstrus mais se voient chaque fois que les neutrophiles sont présents. Elles seraient témoin de la propriété phagocytaire de l'épithélium vaginal.

Les cellules parabasales peuvent également contenir des vacuoles cytoplasmiques, elles sont nommées à ce moment là « cellules spumeuses ». Leur rôle n'est pas connu.

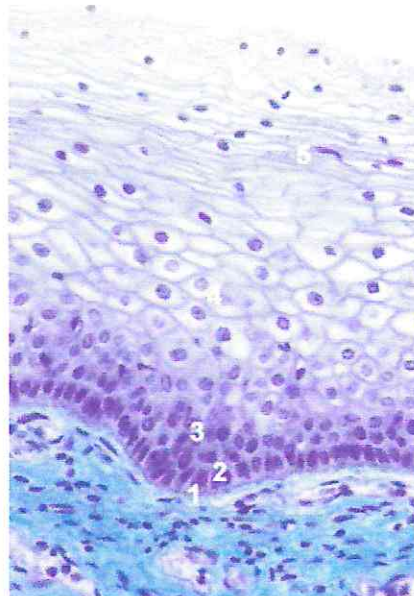


Fig. 1.4: Coupe histologique d'une portion de l'épithélium vaginal. (d'après la Division d'histologie du département de médecine de l'université de Fribourg).

1. lame basale, 2. Cellules germinatives (ou basales), 3. Cellules parabasales, 4. Cellules intermédiaires, 5. Cellules superficielles.

1.2.3.3. Les cellules intermédiaires :

Ces cellules représentent les différentes étapes de maturation cellulaire. Elles présentent, en conséquence, de très grandes variations de taille et de forme. *Schutte* en 1967 (cf. figure 1.5) a défini les deux sous-types suivants :

1.2.3.3.1. Les petites cellules intermédiaires :

Ce sont les cellules épithéliales dont le diamètre est supérieur à $20\mu\text{m}$, leur forme varie de rond à anguleux mais la plupart sont ellipsoïdes. Le noyau est encore bien rond et bien visible. Son diamètre représente de 30 à 35 % de celui de la cellule.

La coloration cytoplasmique reste basophile. Le noyau peut commencer à prendre une légère teinte acidophile

1.2.3.3.2. Les grandes cellules intermédiaires :

Ce sont les cellules épithéliales dont le diamètre est supérieur à $30\mu\text{m}$. elles sont plates, et présentent un contour anguleux. Le noyau est de taille normale, visible et encore fonctionnel. En effet, elles représentent l'assise cellulaire la plus superficielle qui a accès aux nutriments mais comme elle est trop éloignée de la lame basale, elle ne peut assurer une fonction nucléaire correcte. Le diamètre nucléaire représente moins de 35%, et peut ne correspondre qu'à 15% du diamètre cellulaire.

Leur cytoplasme peut afficher soit une basophilie, soit une acidophilie (soit les deux). Le noyau, lui est toujours acidophile.

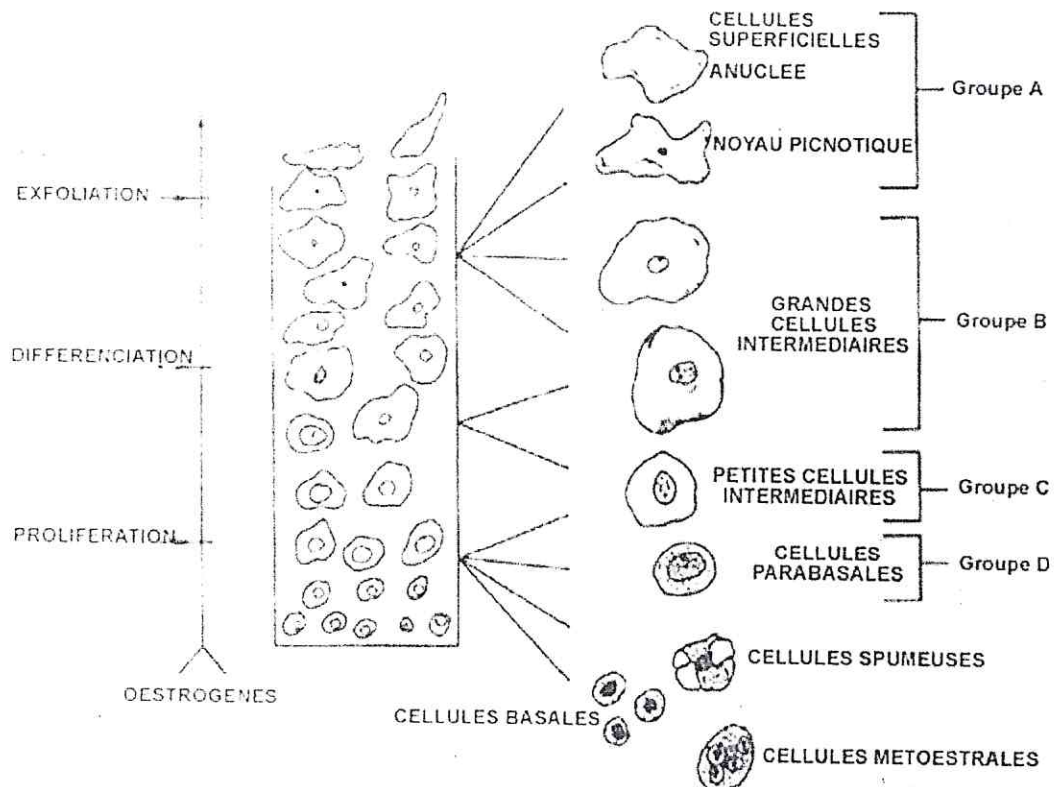


Fig. 1.5 : Classification des cellules de l'épithélium vaginal suivant le processus de maturation (d'après *Schutte* 1967).

1.2.3.4. Les cellules superficielles :

Elles sont nommées ainsi en raison de leur position au sein de l'épithélium vaginal (cf. figure 1.5). Elles représentent les plus grandes cellules épithéliales avec un diamètre compris entre 30 et 75 μm .

Elles se caractérisent par des contours cellulaires irréguliers, anguleux et plissés lui donnant un aspect de « pétale de maïs » ou de « feuille morte », et par un noyau pycnotique ou même absent [FONTBONNE 1996c, FONTBONNE et GUERIN 2003].

Elles sont également appelées « **cellules kératinisées** ». En effet, le phénomène de kératinisation est lié à la dégénérescence qui transforme les cellules d'un épithélium malpighien en cellules mortes. Ceci est reflété par la pycnose nucléaire. Les cellules ne possédant pas de noyau sont également appelées « squames ».

L'ensemble de ces cellules est mis en évidence grâce à l'affinité du cytoplasme, chargée en kératine, pour les colorants acides. L'intensité de la coloration croît en fonction du stade de dégénérescence. Globalement plus la cellule est sénescence, plus l'acidophilie sera marquée [NEVEUX 1999, FONTBONNE et GUERIN 2003].

C'est ce type de cellules qui offre une protection à l'épithélium vaginal lors de l'accouplement.

Ces différentes cellules épithéliales, en plus d'autres cellules se trouvant dans la lumière du vagin tel que les cellules sanguines et les bactéries, sont mises en évidence par la technique des frottis vaginaux. La réalisation du prélèvement, son interprétation et son intérêt pour le suivi du cycle œstral de la chienne seront détaillés au cours du paragraphe 4.1.2.4.

CHAPITRE 2. ETUDE DU CYCLE ŒSTRAL DE LA CHIENNE :

Chez la chienne, l'appareil génital présente au cours de toute la période d'activité sexuelle des modifications structurales, qui se produisent toujours dans le même ordre et reviennent à intervalles périodiques suivant un rythme bien défini [VAISSAIRE 1977, DRIANCOURT et LEVASSEUR 1991].

Ces modifications, connues sous le nom de « cycle œstral » commencent au moment de la puberté et se produisent tout au long de la vie de la chienne [DRIANCOURT et LEVASSEUR 1991] sans être interrompues par la gestation [DERIVAUX 1971, VAISSAIRE 1977], elles dépendent de l'activité fonctionnelle de l'ovaire, elle-même tributaire de l'action hypothalamo-hypophysaire [VAISSAIRE 1977, DRIANCOURT et LEVASSEUR 1991].

2.1. La puberté :

La puberté correspond au début de l'activité cyclique des ovaires, elle s'annonce cliniquement chez la chienne par la survenue des **premières chaleurs**.

L'apparition de la puberté se manifeste selon les races de façon plus ou moins précoce, elle survient lorsque la femelle a atteint **les deux tiers de son poids adulte**; ce qui correspond à un âge de 6 à 9 mois pour les races naines, et de 12 à 18 mois pour les races géantes (on admet des valeurs extrêmes de 4 mois pour les plus précoces, et jusqu'à 24 mois quant aux plus tardives). [VAISSAIRE 1977, FONTBONNE 1996c, MORAILLON et al. 1998, FONTBONNE et al. 2000, CHAFFAUX et BAZILE 2001].

Les facteurs péristaltiques tel que le climat ou la nutrition n'ont guère d'effet sur l'apparition de la puberté [DERIVAUX et ECTORS 1980]. Cependant, la **taille** de la race est le principal facteur déterminant, ce qui explique la puberté précoce chez les petites races, et tardive chez les grandes races [FONTBONNE et al. 2000].

Les premières et parfois les secondes chaleurs de la chienne peuvent apparaître très modifiées, on parle de :

Chaleurs silencieuses (*silent-heats* ou *still-heats*) : très souvent, les premières chaleurs sont caractérisées par la discrétion de leur expression clinique. Soit que les manifestations œstrales soient frustes (peu de saignement vulvaire par exemple), ou même inaperçues. Les premières chaleurs visibles n'apparaissent que plusieurs mois plus tard évoquant à tort une puberté retardée.

Chaleurs disjointes (*split-heats*) : il arrive qu'à la puberté plusieurs périodes de chaleurs, accompagnées ou non d'ovulation, s'enchaînent à 2 ou 3 reprises à intervalles rapprochés d'une semaine à deux mois.

Ces phénomènes propres à la jeune chienne ne sont pas pathologique, et n'auraient apparemment aucune conséquence en terme de fertilité ultérieure [FONTBONNE et al. 2000].

Une fois pubère, la chienne présente tout au long de sa vie adulte une activité ovarienne cyclique, ce que nous allons exposer ci dessous.

2.2. Généralités – Définitions :

La chienne est une espèce mono-œstrienne non saisonnée et à ovulation spontanée, c'est-à-dire qu'elle ne présente qu'une seule période de chaleurs par cycle, durant laquelle l'ovulation se produit indépendamment de la saison et en absence du mâle.

Chez des mammifères d'élevage (vache), des petits rongeurs de laboratoires (rat, souris, hamster) et des primates, les cycles peuvent se succéder toute l'année.

Par contre, chez les mammifères sauvages et divers mammifères domestiques dont la chienne, pendant toute une partie de l'année, l'activité ovarienne reste inapparente et aucun cycle ne se manifeste. La période annuelle de reproduction est ainsi très réduite car le nombre de cycles est limité.

En effet, la chienne présente le cycle sexuel le plus long de toutes les femelles domestiques (180 jours). En raison de la durée de ce cycle et de la durée relativement courte de la gestation (58 à 63 jours), la succession de deux cycles n'est pas modifiée par la fécondation [SMITH et REESE 1968, ANDERSEN et SIMPSON 1973, VAISSAIRE 1977, DRIANCOURT et LEVASSEUR 1991].

Le cycle sexuel de la chienne, tel qu'il a été décrit par *Heape* en 1900, se divise en 4 périodes correspondant aux différentes phases d'activité de l'ovaire :

1. Pro-œstrus (9 jours): période de maturation folliculaire (phase folliculinique).
2. Œstrus (9 jours): période de maturité folliculaire suivie de l'ovulation. (le pro-œstrus et l'œstrus correspondent aux **chaleurs**, c'est-à-dire à l'état physiologique des femelles de mammifères qui les pousse à rechercher l'accouplement. On parle également de femelles en chasse ou en rut)
3. Métœstrus (60 jours): période de formation et de fonctionnement du corps jaune avec installation d'un état pré gravidique de l'utérus (phase lutéale).
4. Anœstrus (125 jours): période de repos sexuel correspondant à la lutéolyse. Cette phase est particulièrement longue chez la chienne (4 à 5 mois).

Heape avait défini le diœstrus d'autres espèces animales comme la phase du cycle œstral qui est immédiatement suivie par le proœstrus. D'après cette définition, le diœstrus ne se manifeste pas chez la chienne dont la phase lutéale était suivie de l'anœstrus et non du proœstrus [HEAPE 1900, VAISSAIRE 1977].

L'inter-œstrus, n'étant pas une phase du cycle œstral, a été défini par *Brion* en 1973 comme étant la période qui sépare deux œstrus successifs.

L'inter-œstrus est très variable selon les races. Alors que la majorité des races expriment deux œstrus par an, certaines races comme le Berger Allemand ou le Rottweiler ont fréquemment des chaleurs rapprochées tous les quatre mois ou quatre mois et demi. D'autres races plus primitives, tel que le Basenji d'Afrique, le Dingo d'Australie ou les chiens croisés loups sont bien connues pour n'extérioriser qu'une période de chaleurs annuelle [FONTBONNE 1996c, FONTBONNE et al. 2000, CHAFFAUX et BAZILE 2001].

Dans notre étude, on adoptera la classification de *Heape*. Toutefois, pour chaque phase seront décrites non seulement les modifications comportementales et cliniques, mais aussi celles concernant l'appareil génital interne de part sa structure et la régulation de son fonctionnement (c'est-à-dire les modifications histo-physiologiques et hormonales).

2.3. Modifications au cours des différentes phases du cycle œstral :

Au cours des paragraphes suivants, les différentes phases du cycle œstral seront abordées avec plus de détail.

Pour chaque phase on va s'intéresser, d'abord aux divers comportements sexuels manifestés par la chienne principalement vis-à-vis du mâle, et par la suite, à l'évolution des multiples signes cliniques. Les phénomènes touchant l'appareil génital interne seront exposés dans la section modifications histo-physiologiques. Et enfin, la dernière section sera consacrée aux processus hormonaux régulateurs des différentes modifications étudiées.

2.3.1. Le pro-œstrus :

La durée moyenne du proœstrus est de 9 jours mais peut aller de 4 à 15 jours selon *Vaissaire* (1977), de 0 à 17 jours, selon *Olson et al.* (1991), de 5 à 20 jours selon *Fontbonne* (1996c) et de 3 à 16 jours selon *Chaffaux et Bazile* (2001).

2.3.1.1. Modifications comportementales :

Le pro-œstrus est marqué par le fait que la chienne attire les mâles grâce aux phéromones dégagés dans les urines et les sécrétions utéro-vaginales. Cependant, elle n'est pas réceptive à la saillie et elle peut même présenter des signes d'agressivité envers les mâles en refusant tout contact. Plus on approche de l'œstrus, plus la chienne recherche ses congénères. Elle peut même essayer de chevaucher d'autres femelles, et si elle laisse un mâle la chevaucher, elle ne permet pas pour autant la saillie. [FONTBONNE 1996c, CHAFFAUX et BAZILE 2001].

2.3.1.2. Modifications cliniques :

Le début des chaleurs est en général annoncé par un gonflement œdémateux de la vulve et du périnée, une forte congestion ainsi que de profonds replis au niveau du vagin et surtout un écoulement sanguin à la commissure inférieure de la vulve issu de l'hyperhémie physiologique de l'utérus.

Cependant, ces signes n'apparaissent pas sur toutes les chiennes. Certaines femelles en particulier ne présentent pas du tout d'écoulement de sang. D'autres ne perdent pas du sang dès le début réel du pro-œstrus. Ceci peut induire en erreurs lors de l'appréciation de la vitesse de progression des chaleurs, conduisant à une mauvaise programmation des accouplements [FONTBONNE 1996c].

2.3.1.3. Modifications histo-physiologiques :

Les ovaires deviennent œdémateux et augmentent de volume, un certain nombre de follicules mûrissent en surface [LESBOUYRIES 1949]. En effet, au moment de l'entrée en chaleurs (pro-œstrus), de petits follicules mesurant de 1 à 1.5mm de diamètre sont présents sur l'ovaire et commencent leur croissance terminale, atteignant 1.5 à 5mm à la fin du pro-œstrus, alors que la concentration de progestérone sérique est inférieure à 1ng/ml.

Chez la chienne, comme c'est le cas pour tous les Canidés, il existe une particularité spécifique : la lutéogenèse est initiée durant la phase de pro-œstrus par une **lutéinisation pré-ovulatoire du follicule cavitaire**, conduisant à une synthèse précoce de progestérone grâce à une réorganisation complexe des cellules folliculaires en cellules lutéales [FONTBONNE et al. 2000, REYNAUD et al. 2005a].

Ces cellules lutéales, comme dans les autres espèces, se chargent en graisse colorée par un pigment caroténoïde, la lutéine, qui donne sa couleur au corps jaune. Cependant, chez la chienne, ce dernier prend une couleur plutôt rosée [VAISSAIRE 1977].

L'oviducte est turgescent, très congestionné, et son épithélium présente des cellules hautes. Le pavillon des trompes devient plus volumineux. [LESBOUYRIES 1949, VAISSAIRE 1977].

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. Son épithélium présente des cellules élevées avec prolifération de nombreuses glandes endométriales [LESBOUYRIES 1949, VAISSAIRE 1972, VAISSAIRE 1977].

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 (cf. figure 2.1). L'épithélium vaginal apparaît macroscopiquement plus épais et œdémateux. A l'examen microscopique, les cellules dites « intermédiaires » apparaissent (cf. § 1.2.3.). 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 » [SCHUTTE 1967, VAISSAIRE 1977, FONTBONNE 1996c, DRIANCOURT et LEVASSEUR 1991].

Au niveau des mamelles, le système excréteur du lait (les canaux galactophores) se développe.

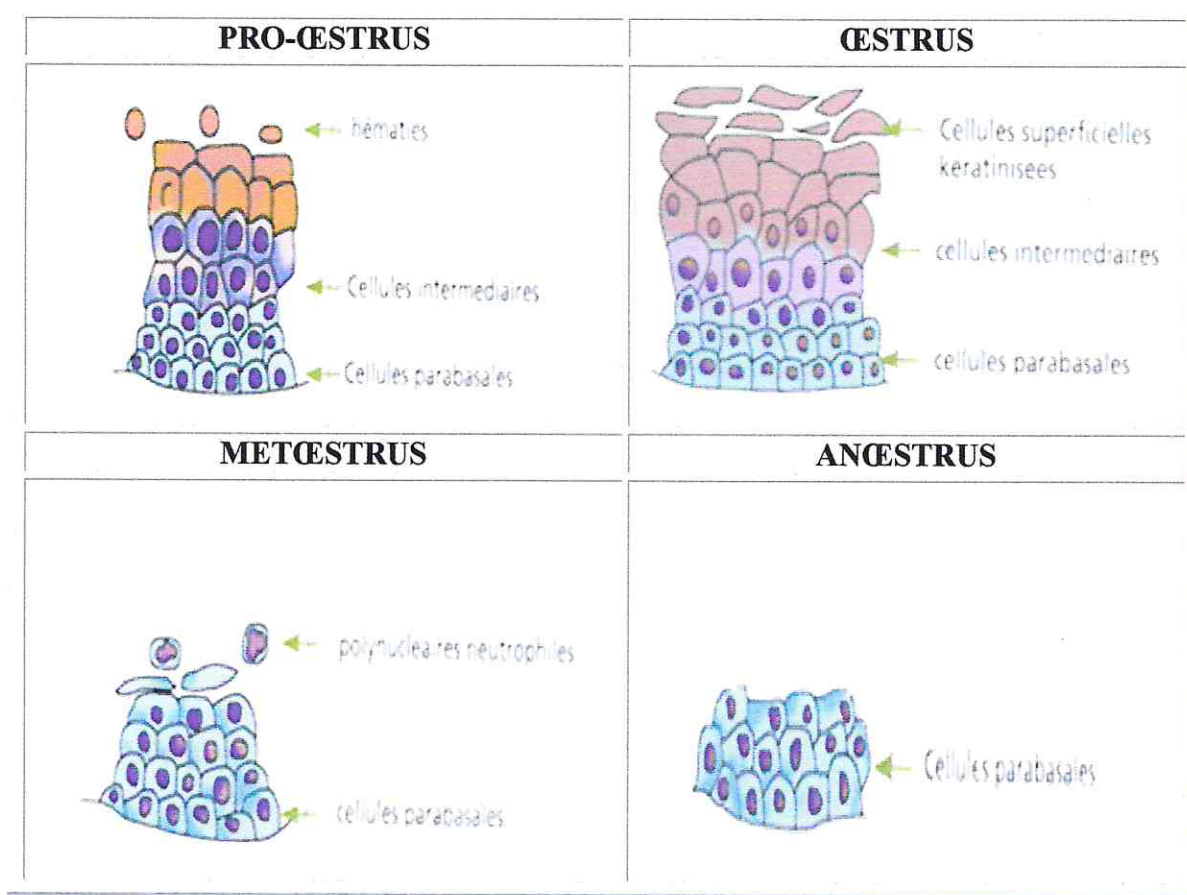


Fig. 2.1 : Evolution de l'épithélium vaginal en fonction du stade physiologique (d'après Fontbonne et Guerin 2003)

2.3.1.4. Modifications hormonales :

La reprise de l'activité sexuelle en fin de phase d'œstrus est liée à 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 [OLSON et al. 1991, FONTBONNE et al. 2000].

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 proœstrus. 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 » (pics et creux de sécrétion au cours d'une même journée). Il est donc difficile d'apprécier la qualité de la maturation folliculaire grâce à un seul dosage d'œstradiol (cf. § 4.1.2.5) [OLSON et al. 1991, FONTBONNE et al. 2000].

Les taux sanguins de LH (*Luteinising Hormone*) restent aux environs des chiffres de base pendant la plus grande partie du proœstrus, pour atteindre un taux maximal entre 10 et 22ng/ml environ 12 à 24 heures après le pic d'œstradiol. Contrairement à ce qui est observé chez d'autres espèces, le pic préovulatoire de LH s'étale sur une période relativement longue de 24 à 96 heures (contre 8h par exemple chez la vache).

La progestéronémie reste basse avant et au début du proœstrus. Son taux sérique s'élève après le pic de sécrétion d'œstradiol, concomitant ainsi avec la chute rapide du taux d'œstradiol, pour atteindre, selon *Concannon* (1993), une concentration de 3ng/ml au moment du pic de LH (cf. figure 2.2) [OLSON et al. 1991, FONTBONNE et al. 2000].

Ainsi, le pic de LH est souvent considéré comme le point central du cycle de la chienne, à partir duquel les événements sont datés (J0), en raison de son rôle dans le déclenchement de l'ovulation et de sa concomitance avec l'augmentation du taux de progestérone. En pratique, l'imminence du pic de LH pourrait être estimée grâce à des mesures répétées de taux de progestérone (cf. § 4.1.2.5) [REIMERS et al. 1978, OLSON et al. 1991, FONTBONNE et al. 2000].

La testostéronémie augmente aussi à la fin du proœstrus et pendant l'œstrus, et peut approcher les taux qu'on observe chez les mâles. On ne sait pas encore si cette augmentation reflète simplement une stéroïdogénèse ou si elle joue un rôle dans les processus physiologiques normaux (œstrus comportemental, prolifération des tissus cibles) [OLSON et al. 1991].

Les taux sanguins de l'hormone folliculostimulante (FSH) sont au plus bas à la fin du proœstrus. Le pic de sécrétion de la FSH se produit en même temps que celui de la LH [OLSON et al. 1991, FONTBONNE et al. 2000]. Cependant, une étude récente [GIER et al. 2006] avancerait que le pic de sécrétion de la FSH s'étalerait sur une période équivalant au triple du pic de LH, et qui serait due à une demi-vie plus longue de la FSH par rapport à la LH. En effet, le mode de glycosylation diffère de sorte que la LH soit éliminée de la circulation sanguine plus rapidement que la FSH. Ceci se traduirait par une concentration plasmatique moyenne de la FSH significativement différente avant et après le pic préovulatoire de LH.

Chez la chienne, peu d'informations sont disponibles concernant les taux sanguins de la prolactine, certainement en raison de ses multiples formes moléculaires qui peuvent circuler à des niveaux en dessous du seuil détectable par les méthodes de dosage actuelles. Encore que l'étude de *Jones et al.* (1976) ait montré une poussée de la prolactine vers la fin du proœstrus coïncidant peut être avec le pic du 17 β -œstradiol qui se produit à ce moment [REIMERS et al. 1978, OLSON et al. 1991, GOBELLO et al. 2002, LEE et al. 2006].

2.3.2. L'œstrus :

La durée moyenne de l'œstrus est de 9 jours mais peut aller de 4 à 9 jours selon *McDonald* (1969) et *Vaissaire* (1977), de 3 à 21 jours selon *Olson et al.* (1991), de 3 à 30 jours selon *Fontbonne* (1996c) et de 4 à 12 jours selon *Chaffaux et Bazile* (2001).

2.3.2.1. Modifications comportementales :

L'œstrus est caractérisé par la recherche et l'acceptation de l'étalon par la chienne. Il se vérifie par stimulation de la région périnéale, la femelle adopte une position de lordose (vousse le dos en relevant la croupe), relève sa queue de côté et s'immobilise. On dit que le signe « d'Amantéa » est positif [FONTBONNE 1996c, CHAFFAUX et BAZILE 2001].

2.3.2.2. Modifications cliniques :

Pendant l'œstrus, l'œdème vulvaire est à son maximum, la muqueuse vaginale devient rose pâle et les replis s'affaissent [CHAFFAUX et BAZILE 2001].

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, on n'observe pas ce phénomène et les femelles perdent alors du sang tout au long de leurs chaleurs [DUFRAISSE 1952, VAISSAIRE 1977, FONTBONNE 1996c].

2.3.2.3. Modifications histo-physiologiques :

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 [ANDERSEN 1973, REYNAUD et al. 2005a]. Au moment de l'ovulation, de nombreux follicules ovariens contiennent plusieurs ovocytes, on ignore cependant si ces « follicules poly-ovocytaires » atteignent l'ovulation et si oui, s'ils expulsent plusieurs ovocytes ou un seul [REYNAUD et al 2005a].

L'ovulation de tous les follicules n'est pas un processus synchrone et ce phénomène peut durer pendant 36h [BOYD et al 1993, REYNAUD et al 2005a]. 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 [TSUTSUI 1989, FONTBONNE et al. 2000].

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 [LESBOUYRIES 1949, VAISSAIRE 1977].

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 [LESBOUYRIES 1949, VAISSAIRE 1977].

En fin de pro-œstrus, 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 2.1). On parle alors de cellules kératinisées ou de « squames », qui sont en fait un stade ultime de différenciation des cellules superficielles (cf. §.1.2.3.) [SCHUTTE 1967, VAISSAIRE 1977, FONTBONNE 1996a, DRIANCOURT et LEVASSEUR 1991].

2.3.2.4. Modifications hormonales :

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 17 β -œstradiol diminue et que la progestéronémie augmente suite au phénomène particulier de lutéinisation préovulatoire des follicules ovariens.

Ainsi, on considère que la poussée préovulatoire de la LH se produit le premier jour de l'œstrus, elle est due au *feed-back* positif exercé par l'œstradiol sur l'hypophyse. L'ovulation survient environ 30 à 48h plus tard [FONTBONNE et al. 2000]. La fin de l'œstrus comportemental survient 6 à 10 jours après le pic de LH.

Chez toutes les chiennes, quelle que soit leur race, on considère que l'ovulation s'est produite lorsque le taux circulant de progestérone dépasse 5 à 10ng/ml [FONTBONNE et al. 2000]. Les variations raciales ou individuelles du taux de progestérone au moment de l'ovulation restent toutefois mal connues.

Il semble en outre que le niveau de sécrétion de la progestérone varie assez largement pendant la période optimale de fécondabilité, il serait compris, selon Fontbonne et al. (2000), entre 14ng/ml et 40ng/ml.

Les particularités physiologiques et hormonales de la période péri ovulatoire, pour leur importance, seront traitées avec plus de détails ultérieurement dans un chapitre à part (cf. Chapitre 3).

2.3.3. Le métœstrus :

Conventionnellement, on regroupe sous le terme « métœstrus » la phase de la fin de la mise en route du corps jaune (métœstrus *sensu stricto*) et la phase d'état de celui-ci (dicœstrus), les deux étant le plus souvent confondus chez la chienne.

La durée moyenne du métœstrus est d'environ 60 jours d'après Vaissaire (1977) et Fontbonne (1996), et peut aller jusqu'à 90 jours pour Chaffaux et Bazile (2001).

2.3.3.1. Modifications comportementales :

Du point de vue comportemental, le début du métœstrus se marque comme le premier jour où une chienne refuse le mâle après l'œstrus. Elle peut présenter alors un excès d'agressivité, mais peu à peu elle redevient calme. Il n'est pas rare que la chienne présente, plus le métœstrus avance, de l'anxiété et un comportement maternel proche de celui d'une chienne gestante, on parle alors de « grossesse nerveuse » ou de « pseudogestation » [FONTBONNE 1996, CHAFFAUX et BAZILE 2001].

2.3.3.2. Modifications cliniques :

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.

Au bout de trois semaines ou d'un mois, on observe chez certaines chiennes non gestantes un élargissement du ventre, particulièrement en arrière des côtes. On peut souvent noter également un durcissement et une turgescence des télines. Ce phénomène peut s'exacerber au cours du deuxième mois et être marqué par un gonflement des mamelles et parfois même une sécrétion de lait. Ce phénomène, dénommé suivant les cas pseudogestation (grossesse nerveuse) ou lactation de pseudogestation (lactation nerveuse) n'est que l'exagération d'un processus normal [FONTBONNE 1996, CHAFFAUX et BAZILE 2001].

2.3.3.3. Modifications histo-physiologiques :

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 [VAISSAIRE 1977].

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 [FONTBONNE et al. 2000, CHAFFAUX et BAZILE 2001].

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 [FONTBONNE et al. 2000, CHAFFAUX et BAZILE 2001].

Ainsi, chez la chienne contrairement aux ruminants, porcs et chevaux, les facteurs lutéotropes (la prolactine et indirectement la LH) sont uniquement des hormones antéhypophysaires d'origine maternelle. Le placenta ne sécrète pas d'hormone gonadotrope et la présence de l'embryon dans l'utérus ne modifie pas la sécrétion progestéronique ovarienne [LEVASSEUR 1983, RONSIN et BERTHELOT 1996].

L'oviducte connaît une involution tubaire progressive, l'activité ciliaire, glandulaire et musculaire diminue [LESBOUYRIES 1949, VAISSAIRE 1977].

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 [LESBOUYRIES 1949, VAISSAIRE 1977].

Pendant le métœstrus, 24 heures après le dernier jour d'acceptation du coït, l'épithélium vaginal se différencie et son épaisseur diminue (cf. figure 2.1). 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 [SCHUTTE 1967, VAISSAIRE 1977, FONTBONNE 1996a, DRIANCOURT et LEVASSEUR 1991].

Le développement des glandes mammaires, chez les femelles gestantes et pseudogestantes, intéresse essentiellement le système sécréteur des acini.

2.3.3.4. Modifications hormonales :

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 [NETT et al. 1975, REIMERS et al. 1978, OLSON et al. 1991, LEYMARIE et MARTAL 1991], ainsi que pour celles qui ont été hystérectomisées [OLSON et al. 1991]. 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 [CONCANNON 1993, LEYMARIE et MARTAL 1991].

2.3.3.4.1. 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 myomètre [LEROYER et al. 2002].

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 [LEYMARIE et MARTAL 1991, BUFF *et al.* 2000].

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 antiprolactinémisants induit un avortement. La prolactinémie présente un pic au moment du part et reste élevée pendant toute la période de lactation [CONCANNON 1983].

2.3.3.4.2. 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 [LEYMARIE et MARTAL 1991, LEROYER *et al.* 2002].

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 [PRELAUD *et al.* 2002].

2.3.4. L'anœstrus :

La durée moyenne de l'anœstrus est de 125 jours, mais peut aller dans les conditions physiologiques de 60 à 240 jours selon *Vaissaire* (1977), de 60 à 300 jours selon *Fontbonne* (1996c) et de 15 à 265 jours selon *Chaffaux et Bazile* (2001).

2.3.4.1. Modifications comportementales :

La chienne en anœstrus retrouve son comportement social, elle redevient calme et sans ardeur sexuelle [FONTBONNE 1996a].

2.3.4.2. Modifications cliniques :

Aucun signe clinique notable n'est à signaler pendant la période de repos sexuel. La vulve est petite et peu dilatée et les mamelles ont retrouvé leurs dimensions initiales.

2.3.4.3. Modifications histo-physiologiques :

Pendant l'anœstrus, les follicules primordiaux qui sont restés longtemps quiescents entament leur croissance. 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 [ANDERSEN et SIMPSON 1973].

L'oviducte reprend ses dimensions, son épithélium est plat sans cils ni glandes sécrétoires [LESBOUYRIES 1949, VAISSAIRE 1977].

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 [LESBOUYRIES 1949, VAISSAIRE 1972, VAISSAIRE 1977].

L'épithélium vaginal au repos est constitué de deux ou trois couches de petites cellules basales et parabasales (cf. figure 2.1) [SCHUTTE 1967, VAISSAIRE 1977, FONTBONNE 1996a, DRIANCOURT et LEVASSEUR 1991].

2.3.4.4. Modifications hormonales :

Bien que depuis de nombreuses années on parle de l'œstrus 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 [REIMERS *et al.* 1978].

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

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

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.

La prolactinémie évolue suivant un rythme circannuel, elle semble être, selon *Concannon* 1886, l'une des hormones qui intervient dans la durée de l'œstrus. L'utilisation de médicaments antiprolactinémiques permet ainsi d'induire des chaleurs lors d'œstrus prolongé [BUFF *et al.* 1998].

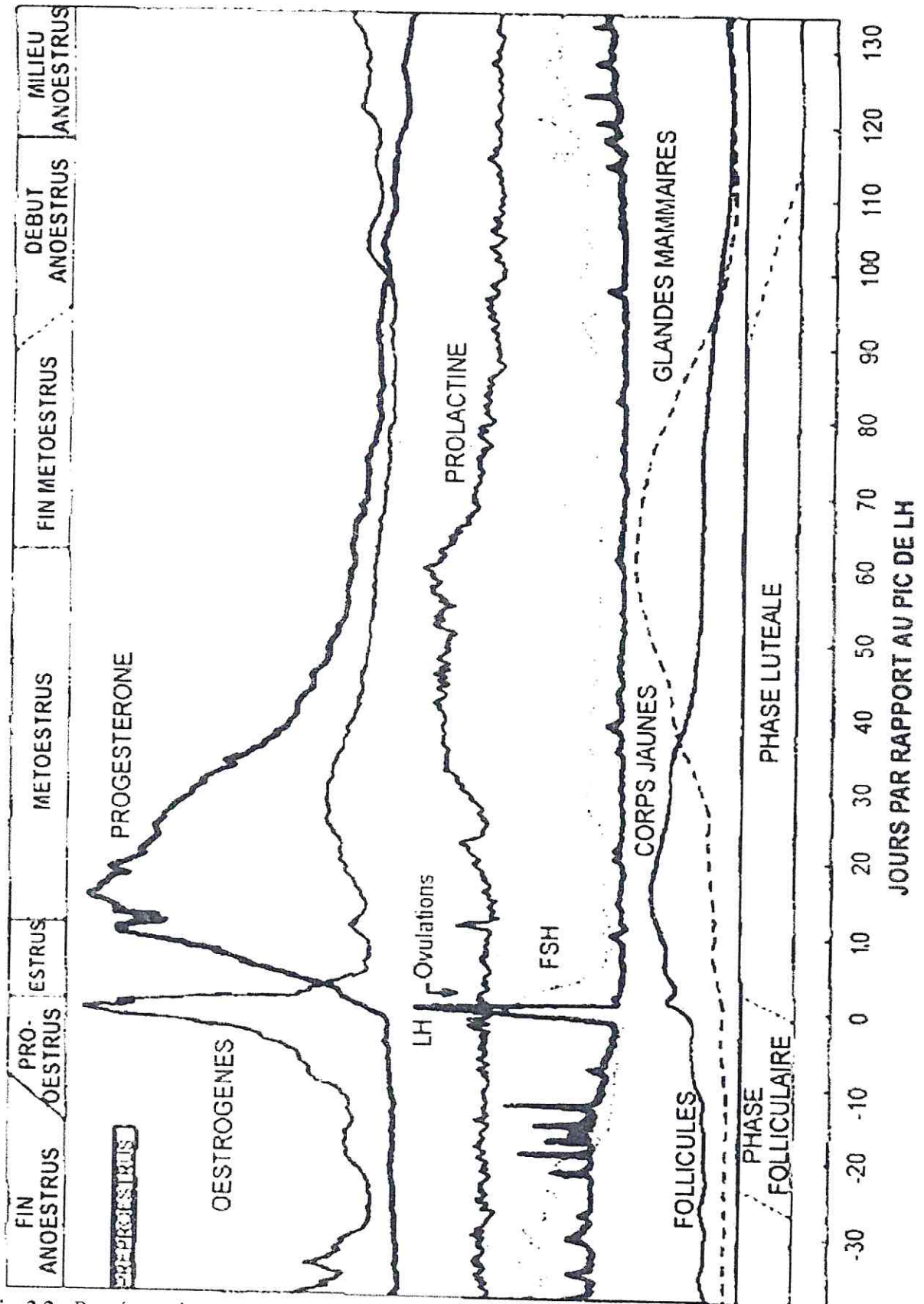


Fig. 2.2 : Représentation schématique des modifications endocriniennes au cours du cycle ovarien de la chienne non gestante (d'après Concannon et al. 1989).

CHAPITRE 3. OVULATION ET PERIODE DE FECONDABILITE :

La production de gamète femelle, dénommé « ovogenèse », comporte chez les mammifères une phase germinative, au cours de laquelle les cellules mères de la lignée ovogénétique, les ovogonies, se multiplient activement pendant la vie fœtale (cf. fig. 3.4.).

La première division réductionnelle de la méiose transforme ces ovogonies en ovocytes de premier ordre (ovocytes I). Néanmoins, ils restent bloqués au stade de la prophase (prophase I) jusqu'à la puberté [ARON et GRASSE 1966, VAISSAIRE 1977].

Chez la majorité des femelles de mammifères, l'ovocyte I achève la première mitose en se transformant en ovocyte II (n chromosomes) avec émission du premier globule polaire à l'intérieur du follicule, et aussitôt après débute la seconde mitose (équationnelle). Au moment de l'ovulation, l'ovocyte II est au stade mature de la métaphase (métaphase II) lorsqu'il est expulsé du follicule et la fécondation peut donc avoir lieu [VAISSAIRE 1977].

Chez la chienne, par contre, l'ovocyte est expulsé de son follicule à un stade encore immature de prophase I (stade vésicule germinative) et la fécondation ne peut avoir lieu que lorsque les ovocytes ont atteint le stade mature métaphase II, c'est-à-dire 54 à 83 heures après l'ovulation [TSUTSUI 1975, REYNAUD et al. 2005a].

La pénétration d'un ovocyte ovulé à un stade immature par un spermatozoïde a toutefois été rapporté dans la littérature [VAN DER STRICHT 1923, REYNAUD et al. 2005a], et de nombreux auteurs ont décrits des fécondations d'ovocytes immatures *in vitro* [MAHI et YANAGIMACHI 1976, YAMADA et al. 1992, HAY et al. 1994, SHIMAZU et NAITO 1996, OTOI et al. 2000, REYNAUD et al. 2005a], avec néanmoins un fort taux de polyspermie (6 à 59 %) et jusqu'à 12 spermatozoïdes par ovocyte [SAINT-DIZIEZ et al 2001, REYNAUD et al. 2005a]. Cependant, les travaux de Fontbonne et al. en 2004 ont révélé que la fécondation d'un ovocyte immature *in vivo* demeurerait rare : sur 112 ovocytes immatures observés dans les oviductes de 30 chiennes, prélevés de 17 à 127 h après l'ovulation, seuls trois ovocytes appartenant à une même chienne, étaient fécondés [MARSELOO et al. 2004, REYNAUD et al. 2005a].

L'ovulation si particulière de la chienne, qui produit des ovocytes immatures, nécessitant 48 à 72h pour compléter leur maturation [TSUTSUI 1989, FONTBONNE et al. 2004] et donc devenir fécondables, à pour conséquence, de différer dans le temps entre le moment de l'ovulation et la période de fécondabilité (cf. figure ci-contre). Ces deux périodes souvent confondues lors de l'étude des cycles des autres femelles de mammifères domestiques, devront être distinguées avec précision pour l'étude du cycle œstral de la chienne. En effet, décrire avec précision les particularités de l'ovulation de la chienne, ainsi que les différents mécanismes aboutissant à la formation d'ovocytes fécondables est nécessaire à la compréhension de la physiologie de la reproduction canine, et donc de toutes les applications pratiques mises en œuvre pour sa maîtrise.

La figure ci contre schématise le moment de l'ovulation, la période de maturation ovocyttaire, et la période de fécondabilité par rapport au pic de LH.

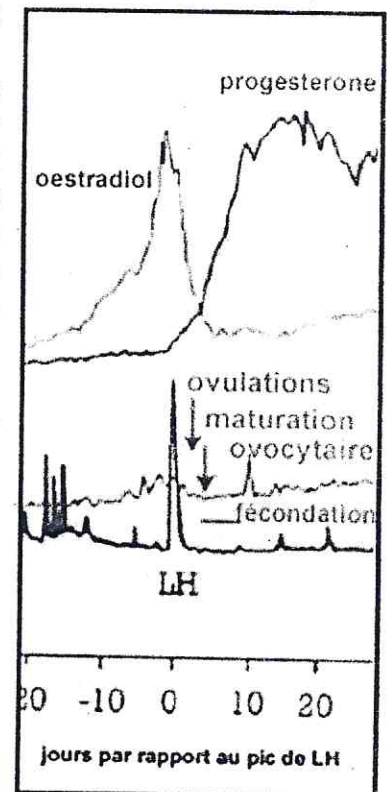


Fig. 3.1 Ovulation, maturation ovocyttaire et période de fécondabilité chez la chienne. (d'après Concannon 1983).

3.1. L'ovulation :

La rupture du follicule de De Graff à la surface de l'ovaire induit la libération d'un ou plusieurs gamètes femelles (ovocytes ou ovules) prêts à être fécondés. Ce phénomène dénommé « ovulation » se produit chez la chienne de façon spontanée c'est-à-dire à certains moments de sa vie, en dehors de tout coût.

Les ovulations de la chienne, tel qu'elles ont été décrites par *Phémister et al.* en 1973 et *Vaissaire* en 1977, sont à déterminisme hormonal.

Les modifications touchant les follicules qui aboutissent à l'ovulation sous contrôle neuro-endocrinien, ainsi que les modifications touchant les ovocytes pondus seront exposées durant les paragraphes suivants.

3.1.1. Mécanismes de l'ovulation :

Contrairement à ce qui est observé chez la plupart des femelles de mammifères, une augmentation de la progestérone sérique est décelée quelques jours avant l'ovulation, avant même le pic pré-ovulatoire de LH. Cette « **lutéinisation pré-ovulatoire** » est caractéristique des Canidés. De plus, de nombreux follicules ovariens contiennent plusieurs ovocytes (follicules poly-ovocytaires).

Une autre particularité concerne la maturation ovocytaire. Effectivement, chez la plupart des femelles de mammifères, suite au pic pré-ovulatoire de LH, l'ovocyte, bloqué en prophase I, reprend sa méiose pour atteindre le stade métaphase II. A ce stade, l'ovulation a lieu et l'ovocyte est directement apte à la fécondation. Chez la chienne, par contre, 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 72 h [TSUTSUI 1989, FONTBONNE *et al.* 2004].

Enfin, après la fécondation, l'embryon reste pendant une longue période dans l'oviducte (8 à 10 jours au lieu de 3 à 4 jours chez les autres mammifères) et s'implante dans l'utérus 18 à 21 jours après l'ovulation [REYNAUD *et al.* 2005a].

3.1.1.1. Modifications folliculaires :

Les follicules primordiaux contenant les ovocytes I et une seule couche de cellules folliculeuses le tout entouré par une enveloppe conjonctive (membrane de Slavjenski) restent quiescent durant la vie pré-pubertaire. Arrivés à l'âge de la puberté, leur plus grand nombre subit un processus involutif, dégénératif appelé « atrésie ». *Andersen et Simpson* en 1973 ont estimé que le nombre de follicules ovariens, chez la chienne Beagle, serait à 54j, 1an et 8ans respectivement d'environ 100 000, 70 000 et 1 500.

En période de repos sexuel, les follicules primordiaux amorcent, sous l'action de FSH, leur croissance pour devenir follicules primaires (unistratifiés), puis secondaires (pluristratifiés) et enfin tertiaires (antriques ou cavitaires) mesurant 0.5 à 1 mm, ces derniers achèvent leur croissance terminale pendant la phase folliculaire pour atteindre la taille pré-ovulatoire soit 5 à 7 mm. L'antrum grossit, et le follicule prend une forme ovulaire et se rapproche de l'épithélium de la surface de l'ovaire (cf. figure 3.2).

En phase folliculaire, la forte activité d'aromatation des cellules de la granulosa permet de transformer massivement les androgènes produits par la thèque interne en œstradiol, concourant au pic d'œstrogènes.

Les cellules de la thèque interne et celles de la granulosa subissent le phénomène de lutéinisation avant l'ovulation, on parle de « lutéinisation pré-ovulatoire ». En effet, les cellules de la thèque interne pénètrent dans la granulosa devenue plus épaisse et constituent le tissu lutéal, d'aspect très hétérogène, à l'origine de la transformation du cholestérol en progestérone

Au moment de l'ovulation, les thèques, la tunique albuginée et l'épithélium de surface ovarien s'amincissent par dissociation de la trame conjonctive due à l'action d'enzymes protéolytiques libérées des lysosomes et par dissociation cellulaire. Une région avasculaire apparaît entre la thèque externe et l'épithélium ovarien. C'est le stigma. La rupture de ce stigma laisse s'écouler le liquide folliculaire et permet l'expulsion de l'ovocyte entouré de quelques couches cellulaires.

Chez la majorité des mammifères domestiques, une petite hémorragie constitue un coagulum ou exsudat sérofibrineux et remplit le centre du follicule déhiscent. Des vaisseaux sanguins viennent directement en contact des cellules folliculeuses de la granulosa, on parle de « corps jaune hémorragique ». Cette structure n'est cependant pas retrouvée chez la chienne [CANIVENC 1970, GIROD et CZYBA 1969, VAISSAIRE 1977].

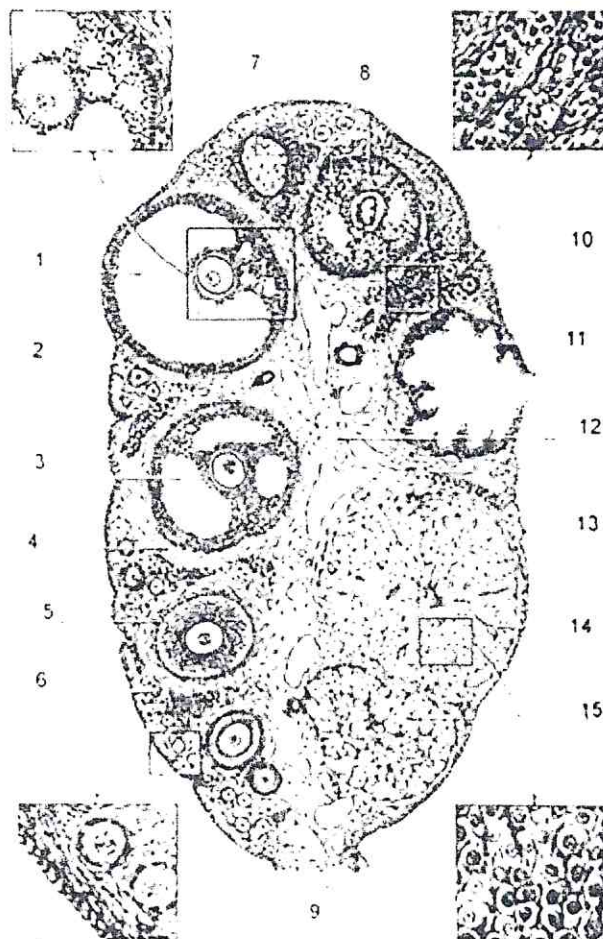


Fig. 3.2: Schémas de l'ovaire et de ses principaux constituants réunissant sur le même diagramme les stades successifs du cycle ovarien (d'après Klein et Mayer 1963).

1 : Follicule de De Graaf, 2 : albuginée, 3 : follicule tertiaire, 4 : thèque, 5 : follicule primaire en croissance, 6 : follicule primordial, 7 : corpus albicans, 8 : follicule atrétique, 9 : hile, 10 : tissu interstitiel, 11 : follicule rompu, 12 : médulla, 13 : épithélium germinatif, 14 : corps jaune, 15 : corps jaune en régression.

3.1.1.2. Modifications ovocytaires :

Des modifications touchent l'ovocyte canin, et contrairement aux autres mammifères domestiques, se produisent en période post-ovulatoire. Elles concernent la maturation cytoplasmique et la maturation nucléaire :

3.1.1.2.1. Maturation cytoplasmique :

La maturation cytoplasmique est définie comme étant la capacité de l'ovocyte à permettre une fécondation monospermique normale, puis un développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste [VAISSAIRE 1977].

Chez la chienne, peu de travaux ont été effectués sur le cytoplasme ovocyttaire. Néanmoins, la migration des granules corticaux vers la périphérie est sans doute le trait le plus marquant de la maturation cytoplasmique car elle concourt à éviter la polyspermie. Cette migration s'accompagne d'un rassemblement des autres organites (mitochondries, appareil de golgi) dans la zone péri-nucléaire [VIARIS DE LESEGNO et al. 2005].

Ces phénomènes sont difficilement visualisés car le cytoplasme a un aspect très sombre (cf. figure 3.3), plus sombre encore que dans les espèces, tel que le porc, chez lesquelles de tels ovocytes sont classiquement décrits, et dont l'origine serait due selon *Tesoriero* (1981), à la richesse du cytoplasme canin en gouttelettes lipidiques qui s'accumulent très tôt au cours de la folliculogénèse [REYNAUD et al. 2005a].

3.1.1.2.2. Maturation nucléaire :

La maturation nucléaire est définie comme étant le passage du matériel génétique depuis le stade diploïde ($2n = 78$ pour le chien) de la prophase I, jusqu'au stade haploïde métaphase II.

Chez la plupart des femelles de mammifères, l'ovocyte I achève la première mitose réductionnelle de la méiose en se transformant en ovocyte II (n chromosomes) à l'intérieur du follicule mûr, avec émission du premier globule polaire. Aussitôt après débute la seconde mitose (équationnelle). Au moment de l'ovulation, l'ovocyte II est au stade de la métaphase.

Par contre, chez la chienne, l'ovocyte est ovulé à un stade immature (prophase I, stade vésicule germinative ou VG) et la maturation ovocyttaire se poursuit dans l'oviducte (cf. figure 3.4).

Au moment de l'ovulation, le pic de LH induit une mucification de la masse des cellules du cumulus entourant l'ovocyte. Cependant, les deux couches directement au contact de la zone pellucide restent très compactes autour de l'ovocyte. Cette mucification incomplète pourrait expliquer que l'ovocyte canin ne reprenne pas immédiatement sa méiose et soit expulsé au stade immature VG (cf. figure 3.3). Il mesure alors 100 à 120 μm [ANDERSEN et SIMPSON 1973, FONTBONNE et al. 2004, REYNAUD et al. 2005a].

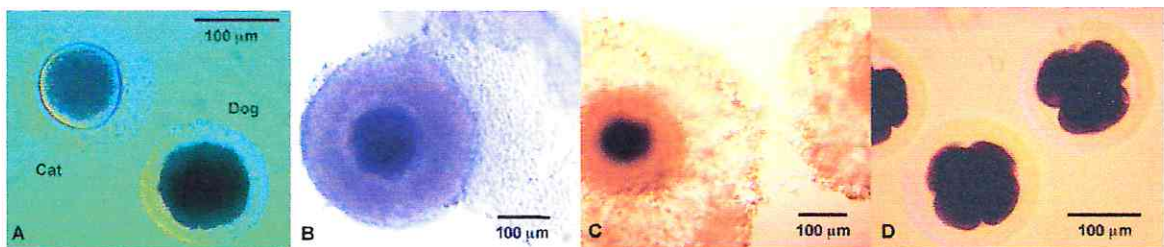


Fig. 3.3: Microphotographies de (A) ovocytes de chat et de chien; (B) ovocyte de chien entouré par de multiples assises de cellules du cumulus; (C) ovocyte de chien après 48h de culture *in vitro* et (D) embryons canins (48h après insémination) provenant d'ovocytes maturés *in vitro*. La barre d'échelle = 100 μm (d'après *Songhsasen et Wildt* 2006).

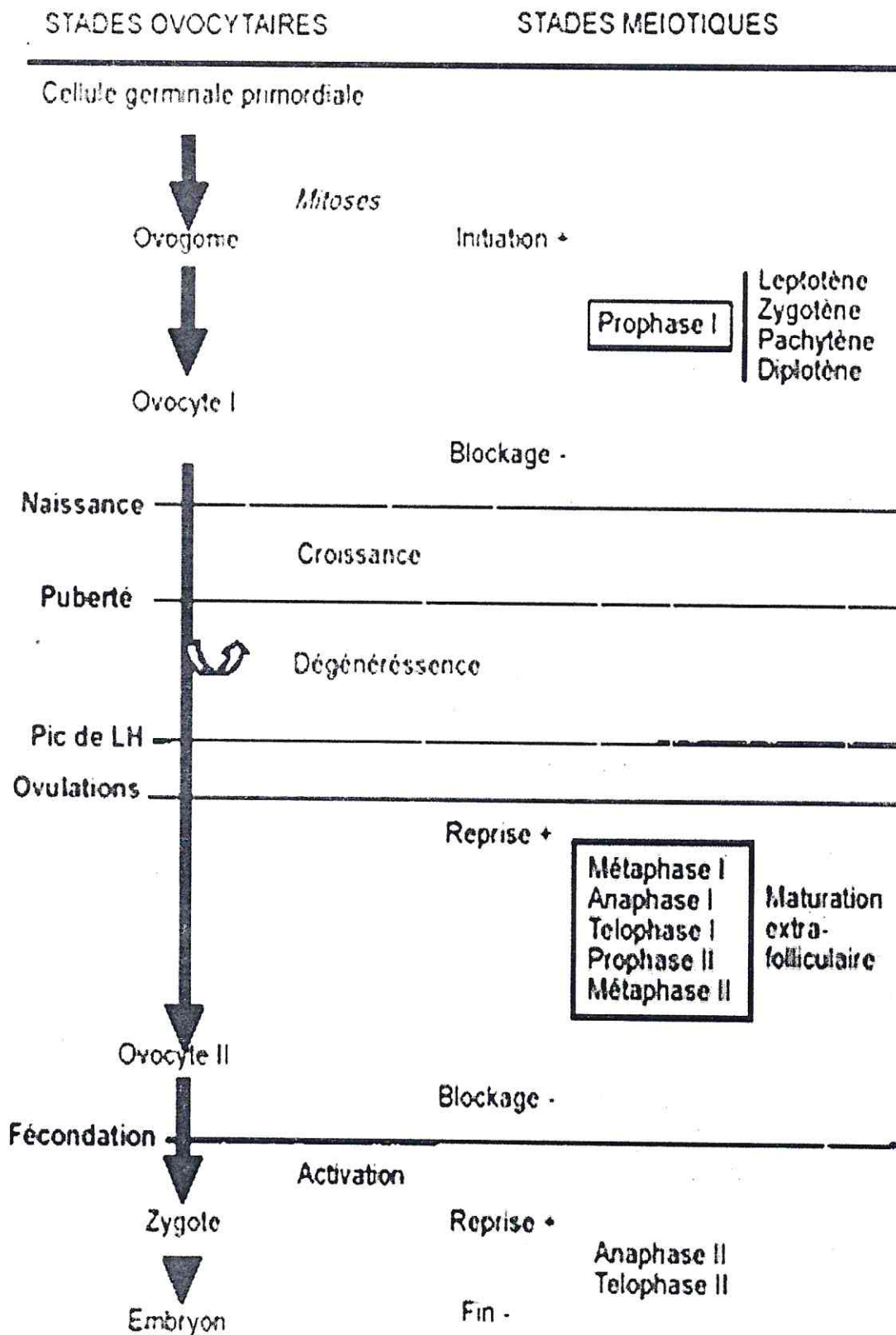


Fig. 3.4 : Les principales étapes de la vie de l'ovocyte canin, depuis la cellule germinale primordiale jusqu'à l'embryon (d'après Tsutsui 1989).

Peu d'études ont décrit l'évolution de l'ovocyte durant les premières heures suivant l'ovulation [TSUTSUI 1975, FONTBONNE *et al.* 2004, REYNAUD *et al.* 2005a]. La bourse ovarique contient 2 à 3 ml de liquide et l'ovocyte est expulsé de son follicule dans cette bourse et commence sa maturation extra-folliculaire [TSUTSUI et EJIMA 1988, METCALFE 1999, REYNAUD *et al.* 2005a]. Jusqu'à 48h, les ovocytes sont tous au stade VG et se situent de la partie proximale à la partie médiane de l'oviducte. L'étude de *Viaris De Lesegno et al.* en 2005 a montré que l'AMPc jouerait un rôle dans la poursuite de la méiose dont la reprise serait également contrôlée par une autre voie, peut-être calcique.

Quelques heures après l'ovulation, les ovocytes sont regroupés dans l'oviducte et encore entourés de quelques couches denses de cellules de la granulosa du cumulus. Ces cellules restent étroitement liées à l'ovocyte, émettant de très nombreuses projections cellulaires qui traversent la zone pellucide et entrent en contact avec la membrane ovocytaire. Il est possible que ces communications ovocyte-cumulus participent au contrôle de la méiose.

La première division méiotique reprend environ 1 jour après l'ovulation, et il faut encore 2 à 3 jours pour que les ovocytes soient matures, c'est-à-dire fécondables. Les premiers ovocytes atteignent le stade métaphase II ne sont observés que 54h après l'ovulation. Ils restent ensuite viables pendant 24 à 72h [CONCANNON *et al.* 1983, LEROYER *et al.* 2002].

La maturation nucléaire passe par trois étapes successives :

1. Rupture de la vésicule germinative : ou GVBD pour *Germinal Vesicel Breakdown*. C'est le premier signe visible de la reprise de la méiose.
2. Condensation des chromosomes : les chromosomes, associés à des fragments d'enveloppe nucléaire, connaissent une condensation croissante.
3. Blocage en métaphase II : les chromosomes quittent ensuite les fragments d'enveloppe et s'arrangent en plaque métaphasique.

L'expulsion du premier globule polaire 48 à 72h après l'ovulation, et la formation du second fuseau méiotique sont les preuves que la maturation nucléaire ovocytaire est complète.

L'observation de ce phénomène est toutefois rendue complexe car le cytoplasme a un aspect noir opaque, ne permettant pas l'observation du noyau par les techniques classiquement employées dans les autres espèces (cf. figure 3.5).

Une fois arrivé en métaphase II, l'ovocyte reste bloqué à ce stade jusqu'à son activation par le spermatozoïde [VIARIS DE LESEGNO *et al.* 2005, REYNAUD *et al.* 2005a].

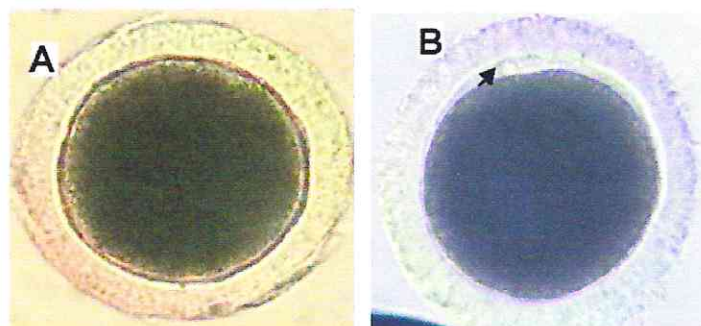


Fig. 3.5 : Photos d'ovocytes canins pris sous microscope à fluorescence. A : ovocyte au stade vésicule germinative. B : ovocyte en métaphase II. La flèche indique le premier globule polaire (d'après *Hossein et al.* 2006).

3.1.1.3. Conditionnement neuro-endocrinien de l'ovulation :

En début de pro-œstrus, la FSH et la LH sont à leur niveau de base. Les rétrocontrôles négatifs exercés sur l'axe hypothalamo-hypophysaire sont alors levés (cf. fig. 3.6). Le centre

de sécrétion tonique de l'hypothalamus produit alors de la GnRH, ce qui stimule la FSH ainsi que dans une moindre mesure la LH. Ceci permet la maturation folliculaire terminale, ainsi que l'augmentation du nombre de récepteurs à la FSH et à la LH. Les follicules synthétisent alors de plus en plus d'œstrogènes. Ces dernières exercent un rétrocontrôle négatif sur le centre tonique de GnRH de l'hypothalamus et un rétrocontrôle positif sur le centre de sécrétion phasique de GnRH. La GnRH sécrétée de façon massive sur une période courte entraîne un pic de LH et une augmentation plus modérée de FSH précédant l'ovulation.

La FSH possède une action mitogène sur les cellules de la granulosa en favorisant l'expression de facteurs de croissance. Durant la phase terminale de croissance folliculaire, la FSH stimule aussi la différenciation des cellules de la granulosa. Le taux de FSH atteint son maximum 24 à 48 heures après le pic de LH, soit au moment de l'ovulation.

La LH participe à la maturation folliculaire en stimulant les cellules de la thèque interne et la sécrétion d'œstrogènes. En action avec la FSH, elle déclenche l'ovulation et installe le corps jaune. On parle d'action de lutéinisation. Elle stimule la sécrétion de progestérone par le corps jaune débutant, on parle de facteur lutéotrope.

Le pic de LH se maintient 24 à 72 heures et provoque l'ovulation dans les 36 à 50 heures qui suivent. Dès lors, la progestéronémie augmente pour atteindre des valeurs comprises entre 3 et 10ng/ml au moment de l'ovulation. Ces valeurs ne cessent d'augmenter durant la phase de mise en place du corps jaune.

3.1.2. Moment de l'ovulation :

L'ovulation a lieu habituellement 48h après le pic de LH [PHEMISTER *et al.* 1973, VAISSAIRE 1977, WILDT *et al.* 1981, CONCANNON 1983, OLSON *et al.* 1991, FONTBONNE *et al.* 2000, LEROYER *et al.* 2002], mais elle peut s'étaler sur plusieurs jours, de 30h [FONTBONNE *et al.* 2000] jusqu'à 72h après le pic de LH [WILDT *et al.* 1981, OLSON *et al.* 1991].

Du point de vue comportemental, le pro-œstrus et l'œstrus sont définis respectivement selon le refus ou l'acceptation du mâle. La transition comportementale entre ces deux phases peut survenir rapidement ou très lentement, elle se produit en moyenne un jour après le pic de LH, mais elle peut varier dans les conditions physiologiques entre 3 jours avant et jusqu'à 5 jours après le pic de LH [ENGLAND *et al.* 2002].

Comme conséquence, l'ovulation se produit à un moment considérablement variable par rapport au début de la tuméfaction vulvaire et de l'écoulement sanguin révélateurs du pro-œstrus. Il en résulte l'impossibilité de déterminer avec précision le moment de l'ovulation en se basant sur les critères cliniques et comportementaux.

L'échec dans la détermination du moment de l'ovulation, et donc de parvenir à une gestation durant un cycle particulier peut représenter un problème significatif pour cette espèce. Car la chienne, rappelons-le, est mono-œstrienne à intervalle inter-œstral physiologiquement très long (entre 4.5 et 13 mois) [ENGLAND *et al.* 2002].

3.1.3. Taux d'ovulation :

La chienne est une femelle polyovulante, le taux naturel d'ovulation a été estimé par McDonald en 1969 sur les deux ovaires entre 3 et 15 ovulations, par Vaissaire en 1972 entre 1 et 22 ovulation, par Tsutsui et Shimizu en 1975 à 5.7 ± 0.3 ovulations et par Fontbonne *et al.* en 2004 à 7.7 ± 0.6 ovulations. De plus, de nombreux follicules ovariens contiennent plusieurs ovocytes (follicules poly-ovocytaires). Tandis que ce type de follicules ne représente que 0.1 à 3 % de la population folliculaire chez la femme ou la souris et 4 % chez la chatte, on trouve jusqu'à 14 % de follicules poly-ovocytaires chez la chienne, contenant de 2 à 17 ovocytes [TELFER *et al.* 1987, McDOUGALL *et al.* 1997, REYNAUD *et al.* 2005a]. Les mécanismes induisant cette mise en place folliculaire originale sont encore inconnus.

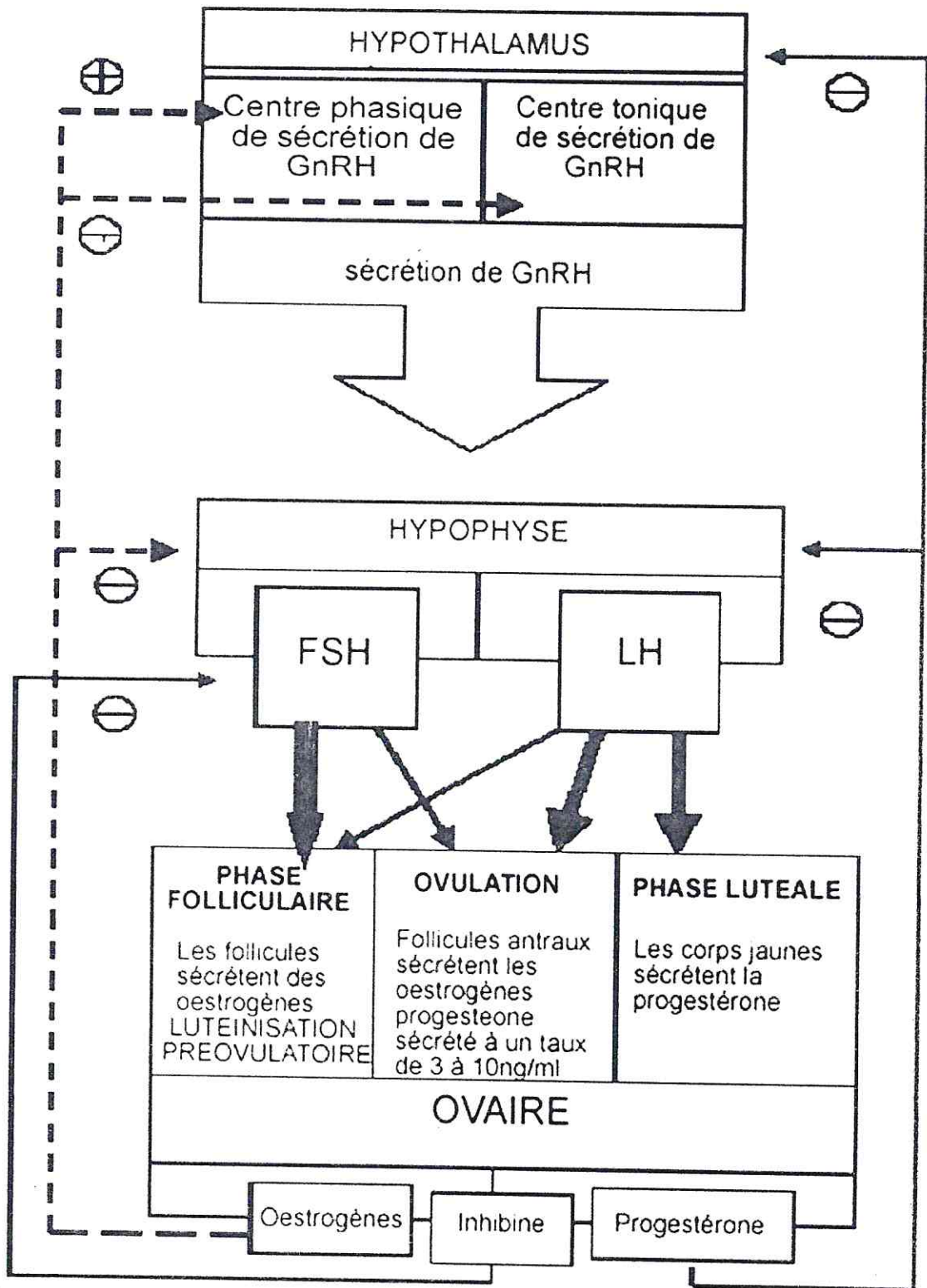


Fig. 3.6 : Régulation de la fonction gonadique chez la chienne durant le pro-œstrus et l'œstrus (d'après Feldman et Nelson 1996).

3.2. La période de fécondabilité :

« Jusqu'à la fin des années 80, les connaissances en physiologie de la reproduction canine étaient fragmentaires et parfois mêmes empiriques. Des dogmes circulaient, qui se révélèrent être faux, comme par exemple le fait qu'une chienne serait en période de fertilité maximale lors de la phase de transition entre la fin du pro-œstrus et le début de l'œstrus. Depuis un peu plus de dix ans, le développement d'équipes de recherche dans ce domaine a permis de mettre en évidence des données nouvelles et d'acquérir des connaissances plus solides ». *Fontbonne et al. 2000.*

3.2.1. Définitions : fécondabilité – fertilité :

Une fois ovulés, les ovocytes canins passent par une période de maturation ovocytaire, au bout de laquelle ils pourront être fécondés, on parle de « période de fécondabilité ». Toutefois, des saillies peuvent être fertiles mêmes si elles sont pratiquées bien plutôt, on parle de « période de fertilité ».

3.2.1.1. La période de fécondabilité :

La période de fécondabilité chez la chienne, tel que décrite par *England et Concannon* en 2002, correspond à la période pendant laquelle des ovocytes viables sont disponibles dans les trompes utérines et sont suffisamment matures –c'est-à-dire des ovocytes secondaires– pour être fécondés par un spermatozoïde. Etant donné les particularités physiologiques de la chienne, cette période s'étend de 4 jours après le pic pré-ovulatoire de LH jusqu'à 7 jours après (de 2 jours après l'ovulation jusqu'à 5 jours après) (cf. tableau 3.1). Dans les cas extrêmes, elle peut s'étendre jusqu'à 8 ou 9 jours (voir même 10 jours) après le pic de LH, bien qu'avec une fertilité réduite. La fertilité d'ordinaire diminue très rapidement à partir du 7^e jour après le pic de LH, à mesure que les ovocytes subissent le processus de dégénérescence et que le col se referme.

En effet, la fin de la période de fécondabilité peut être due à la dégénérescence des ovocyte, ou à la fermeture du col empêchant ainsi l'accès en nombre suffisant des spermatozoïdes vers les trompes utérines. Ces deux phénomènes contribuent significativement à la chute rapide de la fertilité. Les saillies naturelles effectuées le 8^e, 9^e et 10^e jour après le pic de LH aboutissent très rarement, et si c'est le cas, elles s'accompagnent par une faible prolificité. Par contre, l'insémination intra-utérine au 8^e, 9^e et 10^e jour après le pic de LH s'accompagne par des taux de gestation nettement supérieurs (60, 60 et 20 % respectivement), comparée aux taux de gestation faisant suite aux saillies naturelles (0 %).

C'est pourquoi, optimiser les chances de fécondation pour la chienne nécessite de la saillir ou de l'inséminer durant la période de fécondabilité, à un moment qui correspond au pic de fertilité, de préférence 4 à 7 jours après le pic de LH.

3.2.1.2. La période de fertilité :

La période de fertilité, telle que décrite par *England et Concannon* en 2002, correspond à la période durant laquelle une saillie ou une insémination peut donner une gestation. Cette période inclue non seulement la période de fécondabilité, mais aussi les quelques jours qui la précèdent, étant donné que le spermatozoïde canin peut rester fertile pendant plusieurs jours dans les voies génitales femelles.

En effet, le spermatozoïde du chien peut survivre, une fois déposé dans les voies génitales, plus de 5 à 6 jours avant l'ovulation, il peut même pénétrer un ovocyte récemment pondu, et donner ainsi un pronucléus mâle viable et capable de féconder 7 à 8 jours après le dépôt du sperme.

On peut considérer que la période fertile peut s'étendre de 3 jours avant le pic de LH, jusqu'à 7 jours après (cf. tableau 3.1). Et peut s'étaler sur une période bien plus importante si l'étalon possède un sperme de qualité exceptionnelle, ou que la lice possède des ovocytes dont la durée de vie est supérieure de un ou deux jours par rapport à la norme.

Cependant, pour plusieurs mâles, le sperme ne peut survivre que 1 ou 2 jours dans les voies génitales femelles. Les saillies précoces, pratiquées avant le pic de LH donnent un faible taux de fécondation, peut être parce que le sperme ne devient plus capable de pénétrer l'ovocyte après un séjour de 2 jours dans les voies génitales de la chienne.

La période optimale de fertilité avec une saillie naturelle a été estimée, de façon expérimentale chez des animaux hautement fertiles, depuis le jour du pic de LH et jusqu'à 6 jours après (cf. tableau 3.1). C'est-à-dire à partir de 2 jours avant l'ovulation et jusqu'à 4 jours après. Les taux de gestation et la taille des portées ne présentent, selon cette étude, aucune différence avec une saillie unique durant chaque jour de cette période. Les saillies plus précoces donnent des taux plus faibles de gestation, et les saillies plus tardives qui aboutissent de façon exceptionnelle s'accompagnent par une faible prolificité (portée de taille réduite) [ENGLAND et CONCANNON 2002].

3.2.2. Période optimale de fécondabilité :

Si la chienne accepte souvent l'accouplement pendant une longue période, pouvant aller jusqu'à une dizaine de jours, sa période optimale de fécondabilité est plus brève. En d'autres termes, l'accouplement peut avoir lieu sur une longue période, mais les spermatozoïdes ne seraient capables de pénétrer un ovocyte que pendant une période restreinte [FONTBONNE *et al.* 2000].

La période optimale de fécondabilité, est estimée entre le 4^e et le 6^e jour après le pic de LH (cf. tableau 3.1), ou même légèrement plus tôt, le 3^e jour après le pic de LH. Et ce pour permettre la capacitation des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles [ENGLAND et CONCANNON 2002].

Tableau 3.1 : Estimations de la période de fertilité, de la maturation ovocytaire et de la période de fécondabilité par rapport au pic de LH et au jour de l'ovulation chez la chienne (d'après *England et Concannon 2002*).

PERIODES	Jours depuis le pic de LH	Jours depuis l'ovulation
Période de fertilité	-3 jusqu'à +7	-5 jusqu'à +5
Période de faible fertilité	-3 jusqu'à -1	-5 jusqu'à -3
Période optimale de fertilité	0 jusqu'à +6	-2 jusqu'à +4
Période optimale pour la saillie	+2 jusqu'à +6	0 jusqu'à +4
Maturation ovocytaire (estimation)	+4 jusqu'à +5	+2 jusqu'à +3
Période de fécondabilité	+4 jusqu'à +6	+2 jusqu'à +4
Période de faible fécondabilité	+7 jusqu'à +9	+5 jusqu'à +7
Période optimale de fécondabilité	+4 jusqu'à +6	+2 jusqu'à +4

❖ Comment déterminer la période optimale de fécondabilité ?

Suivant les races et les individus, la période optimale de fécondabilité se situe habituellement entre 4 à 6 jours après le pic de LH, c'est-à-dire entre 2 à 4 jours après le moment de l'ovulation (cf. tableau 3.1). Cependant, il existe des variations individuelles considérables entre la date estimée du pic de LH et la date estimée de l'ovulation. Ainsi, dans près de 35% des cas, les chiennes peuvent présenter des cycles courts ou longs. Et si toutefois, il a été rapporté chez la même chienne, dans 44% des cas, que la période optimale de fécondabilité est différente d'un cycle à l'autre, il est légitime de s'interroger sur la date à laquelle l'ovocyte est réellement fécondable [BUFF et SALESSE 2000].

La recherche d'une meilleure prolificité a conduit les vétérinaires à définir avec plus d'exactitude la période optimale de fécondabilité. En effet, les échecs de reproduction sont en majorité dus à une erreur dans l'estimation de la période de fécondabilité. Le schéma classique décrit dans lequel la femelle est fécondable au 12^e ou au 13^e jour du cycle est souvent pris en défaut [GUERIN et al. 1997]. Il est donc nécessaire de pratiquer un suivi de chaleurs pour juger de la période féconde d'une lice. Le suivi doit porter non seulement sur l'anamnèse et l'examen clinique, mais aussi sur de multiples examens complémentaires dont dispose le clinicien de nos jours (cf. chapitre 4) [FONTBONNE et al. 2000].

En déterminant avec précision la période optimale de fécondabilité, le praticien est à même d'apporter une réponse satisfaisante aux troubles de la fertilité directement liés à une saillie trop précoce ou trop tardive. Lorsque le nombre de saillies est limité, ou lors du traitement de la semence par des procédés tel que la réfrigération ou la congélation, la réalisation d'un suivi de chaleurs devient absolument indispensable [BUFF et SALESSE 2000].

3.2.3. Taux de fécondabilité :

Malgré la longue durée de fécondabilité des ovocytes canins, lorsque des oviductes sont rincés 5 à 10 jours après l'ovulation, on observe des ovocytes non fécondés/dégénérés qui peuvent représenter jusqu'à 50 % des ovocytes/embryons collectés [BYSTED et al. 2001, TSUTSUI et al. 2004, REYNAUD et al. 2005a]. Cette absence de fécondation, aux causes encore inconnues, pourrait être liée à la mauvaise qualité des ovocytes (zone pellucide anormale par exemple) ou à une maturation trop lente [REYNAUD et al. 2005a].

Au terme de ce chapitre, on peut dire que la chienne par la particularité de son ovulation, ne peut être classée dans le même rang que les autres femelles de mammifères domestiques. Toutes les particularités propres à sa physiologie cités jusque là doivent impérativement être prises en compte lors de l'étude de son cycle.

En effet, si les chaleurs de la chienne sont aisément repérables (grâce à l'écoulement de sang), la localisation du moment de l'ovulation ou de la période optimale de fécondabilité n'est pas de même. Toute intervention à ce niveau nécessite un suivi précis et rigoureux des chaleurs, ce que nous allons voir au cours du chapitre suivant.

CHAPITRE 4. LE SUIVI DES CHALEURS :

Le cycle sexuel de la femelle met en jeu un grand nombre d'hormones dont les variations de concentrations sanguines modifient à la fois le comportement de la chienne ainsi que l'aptitude de celle-ci à devenir gestante.

Connaître le meilleur moment pour saillir une chienne et maîtriser sa reproduction nécessite de suivre l'évolution des chaleurs. Ces hormones ainsi que leurs effets sur l'appareil génital revêtent donc un intérêt pratique dans le suivi de l'ovulation.

Nous allons voir quels sont les différents moyens décrits dans la littérature afin de déterminer la période optimale de fécondabilité.

4.1. Les marqueurs des chaleurs :

De tous temps, des critères plus ou moins subjectifs ont servi pour repérer la période optimale de fécondabilité. Ces critères peu fiables, induisaient très souvent en erreur, c'est pourquoi des techniques plus objectives ont été développées.

Durant les paragraphes suivants, on va d'abord exposer les critères subjectifs les plus couramment utilisés, par la suite seront développées les différentes techniques mises en œuvre pour cerner cette période avec le maximum de fiabilité possible.

4.1.1. Critères subjectifs :

Plusieurs critères ont été pris comme 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.

Les critères les plus couramment utilisés seront décrits au cours des paragraphes suivants.

4.1.1.1. Nombre de jours après le début de l'écoulement sanguin :

Communément, les éleveurs programment les saillies en comptant le nombre de jours depuis le début de l'écoulement de sang révélateur des chaleurs, croyant que les chiennes ovulent toujours 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.

Des études scientifiques 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 [FONTBONNE 1996c].

Plusieurs explications sont avancées à ce sujet, d'abord le terme « chaleurs » qui normalement regroupe les deux phases pro-œstrus et œstrus, est communément réduit à la simple observation des signes externes, principalement l'écoulement de sang. Pourtant, certaines chiennes ne perdent de sang qu'après plusieurs jours par rapport au début du pro-œstrus. Ainsi, les chiennes dites précoces, n'ovulent pas en réalité le cinquième jour des chaleurs (la maturation folliculaire se produit rarement en un temps aussi bref), mais une dizaine de jours après le début réel du pro-œstrus.

D'autre part, l'ovulation peut se produire physiologiquement jusqu'au 30^e jours depuis le début du pro-œstrus. Cela est bien connu dans certaines races de chiennes (comme 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 [FONTBONNE 1996c, GUERIN et FONTBONNE 1997, ENGLAND et CONCANNON 2002].

4.1.1.2. 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.

En effet, la plupart des chiennes commencent à accepter le mâle 2 à 3 jours avant l'ovulation, c'est-à-dire 5 à 6 jours minimum avant la période de fécondabilité. Les saillies effectuées dès que la chienne est consentante, et non renouvelées par la suite peuvent déboucher sur des infertilités car pratiquées trop tôt.

En plus, la durée du comportement d'œstrus peut être restreinte, très prolongés ou même intermittente. Ainsi, certaines chiennes n'acceptent le mâle qu'une demi journée sur toute la période des chaleurs, ce qui peut être difficile à repérer. D'autres par contre acceptent l'accouplement sur une longue période, qui peut dépasser une semaine, alors que les ovocytes ne sont fécondables que 48h.

Il y a mêmes des chiennes qui acceptent le mâle alors qu'elles ne sont pas prêtes et le refusent au moment optimal.

Aussi, une chienne peut être réceptive à certains mâles et pas à d'autres au même moment des chaleurs, ce comportement serait dû non pas au stade physiologique de la chienne, mais plutôt au mâle qui aurait le statu de dominé.

Donc, le fait que la chienne accepte l'accouplement ne signifie pas forcément qu'elle est en période optimale de fécondabilité [OLSON et *al.* 1991, FONTBONNE 1996c, ENGLAND et CONCANNON 2002].

4.1.1.3. Acceptation de la chienne par le mâle :

Tester la chienne en la plaçant en présence d'un mâle expérimenté, qui n'accepte de chevaucher que les chiennes prêtes, peut être un critère relativement fiable car les chiens qui effectuent assez régulièrement des saillies acquièrent une certaine expérience.

Cependant, tous les mâles sont loin de pouvoir être utilisés de cette façon. En particulier, des jeunes mâles inexpérimentés ou des chiens qui saillaient très peu et ont de ce fait une libido très insatisfaite vont être amenés à s'accoupler avec toute femelle qui leur sera présentée, même si elle n'est pas du tout dans la bonne période.

D'autre part, des mâles grands reproducteurs, qui effectuent plus d'une centaine de saillies dans l'année, sont tellement entraînés qu'ils acceptent de saillir n'importe quelle chienne, à la limite même si elle n'est pas en chaleurs. A l'inverse, les mâles dominés, mal socialisés ou inexpérimentés ne parviennent pas à saillir même au moment optimal de fécondabilité.

Donc, le fait que le mâle accepte la chienne ne signifie pas qu'elle est en période optimale de fécondabilité, ce critère ne peut être retenu que si le mâle est expérimenté, et qu'il effectue régulièrement des saillies. Toutefois, l'utilisation de ce mâle pour tester une chienne peut conduire à des saillies non désirées avec le mauvais mâle [OLSON et *al.* 1991, FONTBONNE 1996c, ENGLAND et CONCANNON 2002].

4.1.1.4. Aspect des écoulements vulvaires :

Pendant la période de l'œstrus les pertes vulvaires s'éclaircissent et se raréfient en général (cf. § 2.3.2.2.). Ce critère est bien entendu insuffisant pour déterminer la période optimale de fécondabilité, mais il est rare qu'une chienne fécondable perde encore beaucoup de sang très coloré et foncé.

A l'inverse, certaines chiennes et dans certaines races (de nombreuses chiennes Chow-chow par exemple) perdent du sang tout au long de leurs chaleurs sans aucune diminution apparente au moment optimal.

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 [FONTBONNE 1996c, GUERIN et FONTBONNE 1997].

4.1.2. Critères objectifs :

Les années 80 virent se généraliser les frottis vaginaux, avant que le premier kit de dosage de la progestérone n'apparaisse en 1991 [SAUZAY 2005]. Ces méthodes, comme d'ailleurs celles qui consistent à mesurer la résistivité du mucus vaginal ou à examiner par endoscopie les parois du vagin, sont apparues afin d'assurer un suivi plus objectif des chaleurs.

4.1.2.1. Résistivité du mucus vaginal :

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.

En effet, lors du pro-œstrus et de l'œstrus, le développement folliculaire est accompagné de l'augmentation de la résistivité du mucus depuis la valeur de base à l'anœstrus (61 à 79 Ohm) jusqu'aux valeurs maximales de 250 à 1215 Ohm. Cependant de grandes variabilités existent. De manière générale, la résistance électrique diminue à la fin de l'œstrus. L'étude de Günzel et al. en 1986 montre que la résistance électrique réagit aux œstrogènes plus précocement que l'épithélium vaginal. Le meilleur moment pour la saillie coïncide avec les 4 derniers jours des valeurs maximales de résistance.

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 [FONTBONNE 1996c, ENGLAND et CONCANNON 2002].

4.1.2.2. Endoscopie vaginale :

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 (cf. § 2.3.). 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.

Au début du pro-œstrus, les plis vaginaux sont larges et œdématiés, de couleur rose ou rose/blanchâtre, avec accumulation de fluides serosanguinolents entre les plis (cf. figure 4.1). En effet, sous l'action des œstrogènes, l'épithélium vaginal prolifère, il est à l'origine de la formation des plis, et couvre les capillaires sous-jacents qui ne deviennent plus visibles, donnant la couleur blanchâtre à la muqueuse.

A la fin du pro-œstrus/début œstrus, approximativement au moment de pic de LH, la muqueuse devient anguleuse, plus dense et pâle. Ces changements sont la conséquence d'un assèchement de la muqueuse, accompagné de la kératinisation de l'épithélium sous l'effet des œstrogènes.

Trois à quatre jours après le pic de LH, alors que le taux d'œstrogènes continu à diminuer rapidement, la muqueuse vaginale s'amincit, elle a une couleur crème à blanche, et les plis s'estompent peu à peu formant de fines crêtes.

Au début du métœstrus, la muqueuse est lisse, elle a un aspect hyperhémiee car les capillaires sont de nouveau visibles.

La période fécondable est estimée en moyenne 4 jours après le début d'amincissement de la muqueuse vaginale [ENGLAND et CONCANNON 2002].

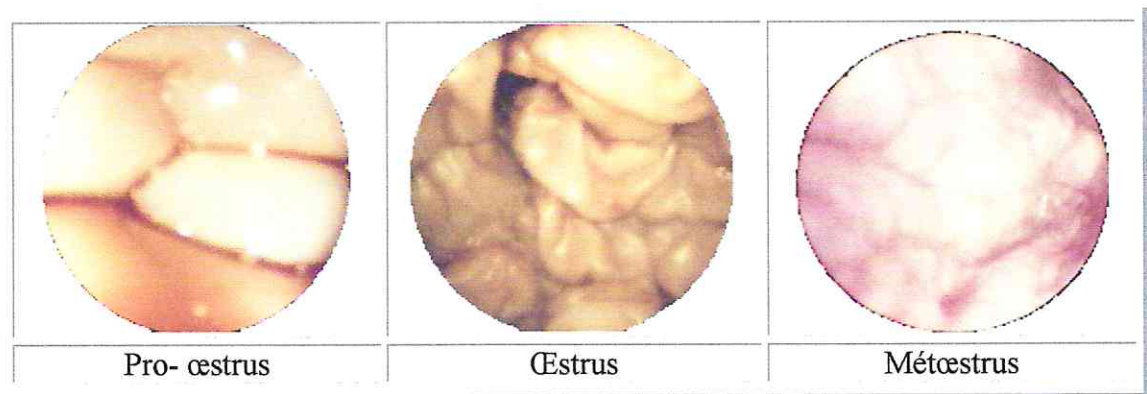


Fig. 4.1 : Aspect endoscopique de la muqueuse vaginale au cours des différentes phases du cycle œstral chez la chienne (d'après *England et Concannon 2002*).

4.1.2.3. Laparoscopie :

Des laparoscopies peuvent être réalisées à titre expérimental lors d'un suivi de chaleurs, à fréquence de une fois toutes les 48h pendant 7 à 12 jours.

Les follicules sont observés dès le début du pro-œstrus, leur développement maximum se situe entre 5 jours avant et un jour après le pic de LH. Douze heures avant l'ovulation, les follicules font saillie d'environ 2 mm sur la surface ovarienne et la bourse ovarique contient 2 à 3 ml de liquide transparent. A l'ovulation, une hémorragie est observable au point d'ovulation et le liquide de la bourse ovarique devient rose. Douze heures après l'ovulation, le point d'ovulation ainsi que la zone adjacente deviennent rouge.

Cette méthode n'est pas utilisée en pratique. Elle s'avère très coûteuse et présente pour l'animal les dangers liés à l'anesthésie, au post-opératoire et au risque d'endommager un oviducte lors de la section de la bourse. A cela s'ajoute des problèmes d'éthique et de protection de l'animal [TSUTSUI 1989].

4.1.2.4. Frottis vaginaux :

Les cellules de l'épithélium vaginal, sous l'influence des œstrogènes, se modifient de façon périodique au cours du cycle œstral [LATASTE 1892, VAISSAIRE 1977]. Le frottis vaginal est l'examen qui permet de recueillir un échantillon représentatif de ces cellules.

Lataste en 1892 a mis en évidence, chez la femelle de rongeurs (Ratte, Souris, Hamster) que les différentes phases du cycle œstral entraînent des modifications caractéristiques et constantes de l'épithélium vaginal, aisément reconnaissable par la technique des frottis vaginaux.

Par la suite, *Dufraisse* en 1952 puis *Schutte* en 1967 ont étudié les techniques de préparation, de coloration et d'examen des cellules de l'épithélium vaginal de la chienne qui subissent des modifications au cours du cycle.

Dans un premier temps, nous allons décrire le principe de l'examen cytologique vaginal. Ensuite, nous allons exposer les différentes étapes permettant l'obtention d'un frottis vaginal exploitable pour le suivi des chaleurs. Vers la fin, nous allons nous intéresser à la méthode d'interprétation de ce dernier, ainsi que toutes les applications pratique qu'il permet de mettre en œuvre.

4.1.2.4.1. 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 (cf. § 1.2). 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 [DRIANCOURT et LEVASSEUR 1991].

L'examen cytologique vaginal permet de recueillir les cellules épithéliales de surface ainsi que les cellules présentes dans la lumière vaginale. *Lataste* en 1892 a décrit la disparition complète des leucocytes polynucléaires au début du pro-œstrus et leur réapparition dès que l'ovulation s'est produite, ainsi que la présence exclusive de cellules kératinisées au moment de l'œstrus. Selon les travaux de *Dufraisse* (1952), de *Schutte* (1967) et de *Taradach* en 1980 sur des chiennes Beagle, les variations pendant le cycle concernent essentiellement l'apparition des hématies durant le pro-œstrus, ainsi que la disparition des leucocytes durant le pro-œstrus et leur réapparition dès l'entrée en métœstrus. En outre, l'augmentation de l'indice éosinophilique (voir plus loin) atteint son maximum durant l'œstrus (0.5 à 1), ce qui indiquait à l'époque le moment de l'accouplement. En revanche, ces mêmes auteurs ont constaté que les frottis vaginaux s'avèrent pratiquement inutilisables pour diagnostiquer la gestation.

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

4.1.2.4.2.1. 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. Ces méthodes invasives présentent l'inconvénient de rendre le prélèvement douloureux pour l'animal [OLSON et al. 1991].

4.1.2.4.2.1.1 Prélèvement avec une pipette :

Une pipette remplie de sérum physiologique est introduite dans la partie caudale du vagin en prenant soin d'éviter la fosse clitoridienne car les cellules fusiformes kératinisées qui s'y trouvent pourraient être prises pour des cellules épithéliales superficielles retrouvées en

période œstrale. Le liquide est injecté et réaspiré à plusieurs reprises. Puis la pipette est extraite du vagin en veillant à ne pas presser son extrémité. Il est probable que l'intégralité du sérum ne soit pas récoltée, mais il suffit d'une goutte pour obtenir une lame interprétable.

Une goutte est déposée à l'extrémité d'une lame de microscope. Cette dernière est maintenue verticalement pour permettre l'écoulement du liquide sur l'ensemble de sa longueur [PHEMISTER et al. 1973, OLSON et al. 1991, ENGLAND et CONCANNON 2002].

Cette méthode est la moins douloureuse pour l'animal. Néanmoins, le prélèvement avec une pipette peut altérer la morphologie des cellules. En plus, la quantité de cellules prélevées peut être insuffisante, et donne des pourcentages peu fiables en augmentant les indexes (voir plus loin).

4.1.2.4.2.1.2 Prélèvement avec un écouvillon :

Le prélèvement 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 (si l'écouvillon n'est pas humidifié, le coton collecte du mucus, ce qui peut gêner l'étalement du prélèvement).

L'utilisation d'un spéculum n'est pas indispensable, sauf qu'il faut prendre garde à ne pas buter dans la fosse clitoridienne. Mais comme l'aspect des cellules en région vestibulaire serait différent de celui des cellules de la région antérieure du vagin. *England et Concannon* (2002) recommandent l'utilisation du spéculum, qui garantit alors que les cellules prélevées proviennent bien de cette région.

L'introduction de l'écouvillon sur 15cm pour une chienne de taille moyenne est obligatoire. Surtout qu'au niveau de la zone caudale du vestibule, l'épithélium pourrait être moins sensible aux variations hormonales; ceci a été démontré chez la femme [SCHUTTE 1967], mais pas encore mis en évidence chez la chienne. Les manipulations dans le vagin crânial peuvent être douloureusement ressenties par certaines chiennes.

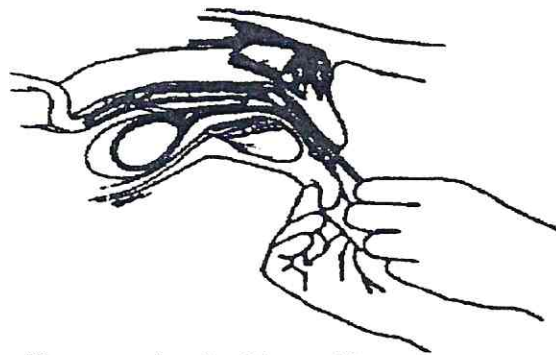


Fig. 4.2 : Technique d'écouvillonnage chez la chienne (d'après *Johnston et al.* 2001).

Le tiers postérieur du vagin est presque vertical chez la chienne (cf. § 1.4.) : au départ, l'écouvillon est donc introduit presque verticalement sur la partie dorsale du vestibule afin d'éviter tout traumatisme du méat urinaire (cf. figure 4.2). Il est ensuite basculé horizontalement et introduit délicatement le plus profondément possible. 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 [FONTBONNE 1996a, NEVEUX 1999, ENGLAND et CONCANNON 2002].

4.1.2.4.2.2. 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. L'écouvillon doit être roulé sur une lame propre sans frottement pour ne pas détériorer les cellules [NEVEUX 1999].

Deux lignes parallèles et bien séparées peuvent être étalées sur toute la longueur d'une seule lame. La superposition de deux étalements gênerait et fausserait la lecture des lames. C'est pourquoi certains auteurs préconisent d'utiliser deux lames et de ne pratiquer qu'un seul étalement par lame [NEVEUX 1999].

L'étalement doit être effectué immédiatement pour qu'il ne se dessèche pas. Il est préférable qu'il soit réalisé par le même manipulateur qui applique le même appui au cours d'un suivi. En effet, les variations des différents types cellulaires sont parfois délicates à observer et nécessitent une méthode standardisée [FONTBONNE 1996a, NEVEUX 1999].

4.1.2.4.2.3. 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 [ALLIET et LALEGERIE 1997, NEVEUX 1999].

Les solutions fixatrices (fixateurs) agissent surtout en insolubilisant les protéines et les autres constituants cellulaires. De plus, il est certain qu'ils arrêtent les processus de décomposition enzymatique post mortem des cellules et aussi qu'ils conservent in situ, les structures majeures des organites et des grosses molécules constitutive de la matière vivante sans entraîner d'altérations morphologiques évidentes [ALLIET et LALEGERIE 1997].

Des cytofixateurs sont disponibles sous forme de spray, ils présentent l'avantage de la facilité d'utilisation et de conservation. 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 et d'éther au 1/2 (mélanger un volume d'alcool à 70% ou à 100% à un volume d'éther officinal) pendant cinq minutes [NEVEUX 1999].

D'après *Alliet et Lalegerie* (1997), la fixation est le temps le plus important de la technique cytologique. En effet, alors que les stades suivants (de coloration bien sure) sont tous réversibles, on ne pourra jamais corriger une erreur résultant d'une fixation défectueuse ou mal conduite.

4.1.2.4.2.4. 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.

Plusieurs colorations sont à notre disposition pour les frottis vaginaux.

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

Appelée également technique de Wright, cette coloration et ses dérivés sont couramment utilisés, car les réactifs sont habituellement employés pour colorer les frottis sanguins.

C'est une coloration unichrome, toutes les cellules vaginales quel que soit leur degré de kératinisation prennent uniformément la teinte bleu-violet. Elles ne sont alors appréciables que par leurs seuls critères morphologiques.

C'est une méthode rapide, mais elle met surtout en valeur les noyaux et les cellules sanguines. Elle permet davantage la mise en évidence des polynucléaires que les différents types de cellules de l'épithélium, c'est la raison pour laquelle elle est utilisée de façon

générale, lors de la suspicion d'une inflammation ou d'une infection génitale [NEVEUX 1999].

Les lames colorées au MGG peuvent être conservées pendant plusieurs jours, ce qui permet d'évaluer la progression du cycle œstral en les comparant à de nouveaux frottis. Ils peuvent être conservés indéfiniment s'ils sont scellés d'une lamelle [OLSON *et al.* 1991].

Des kits de coloration MGG modifiés, tel que le kit Diff-Quick®, ont été conçus pour un usage clinique courant. Et bien que la qualité des frottis obtenue avec ces kits de commerce est moindre par rapport aux recettes de référence (cf. figure 4.3), la simplicité de leur utilisation et la rapidité d'obtention des résultats en fait un outil diagnostique pratique.

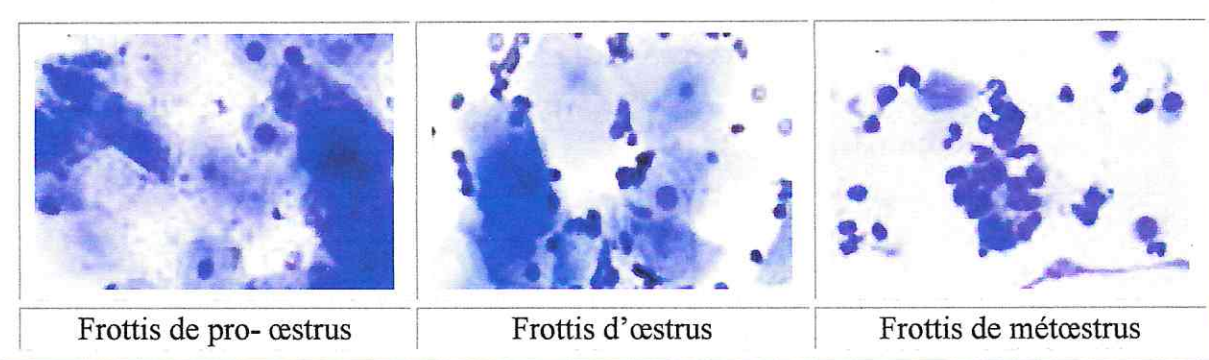


Fig. 4.3 : Frottis vaginaux de chienne aux différentes phases du cycle œstral, colorés avec la méthode May-Grünwald-Giemsa modifiée : Diff-Quick®. Les cellules se colorent uniformément bleu- violet, elles ne sont différenciées que par leurs seuls critères morphologiques (d'après *England et Concannon 2002*).

4.1.2.4.2.4.2. 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 [OLSON *et al.* 1991, NEVEUX 1999].

4.1.2.4.2.4.3. La coloration de Harris-Shorr : (cf. tableau 4.1).

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.

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

En effet, cette coloration permet d'identifier les précurseurs intra cellulaires de la kératine qui sont abondants dans les cellules épithéliales pendant la phase folliculaire de l'œstrus et qui se colorent en orange. Aussi, tous les types de cellules épithéliales vont se colorer en orange si on les laisse sécher avant de les fixer [OLSON *et al.* 1991].

Cette méthode demande plusieurs solutions, et sa mise en œuvre est un peu plus longue que les autres (environ un quart d'heure), ce qui la rend moins pratique [OLSON et *al.* 1991].

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.

Tableau 4.1 : La coloration de Harris-Shorr (d'après Schutte 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

4.1.2.4.2.4.4. La coloration de Papanicolaou : (cf. tableau 4.2).

Cette coloration pentachrome a été décrite par *George Papanicolaou* en 1942. Il s'agit de la coloration standard des frottis vaginaux chez la femme. Néanmoins elle n'a jamais été utilisée pour colorer les frottis vaginaux chez la chienne dans la littérature. Le trichrome de Harris-Shorr l'a supplanté pour effectuer une lecture tinctoriale des lames.

Les noyaux apparaissent bleu-violet, les cellules superficielles rose orangé, les cellules intermédiaires bleu-vert et les cellules plus profondes vert plus franc (cf. figure 4.4).

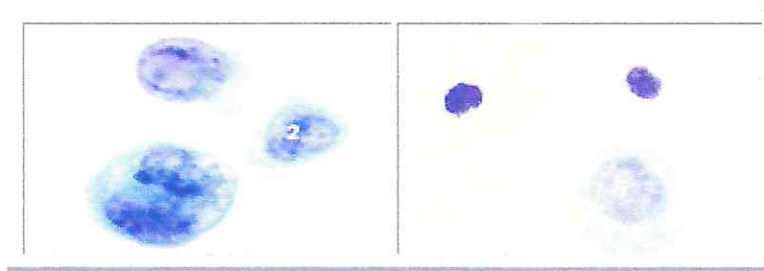


Fig. 4.4 : Frottis vaginaux pratiqués chez une femme et colorés avec la technique de Papanicolaou. 1 : cytoplasme coloré en vert (cellule parabasale), 2 : noyau coloré en bleu (d'après Heron 2006).

Tableau 4.2 : la 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

4.1.2.4.2.4.5. Fréquence de réalisation des frottis :

Un frottis unique est sans valeur, le rythme indiqué par *Bell et al.* 1973 semble favorable : trois fois par semaine pendant les trois premières semaines à partir du pro-œstrus, puis deux fois par semaine les trois semaines suivantes, et une fois par semaine lors de l'œstrus [TARADACH 1980].

Toutefois, lorsque le frottis est évocateur d'un pro-œstrus encore peu avancé, un frottis de contrôle peut n'être réalisée que cinq jours plus tard. Lorsque le frottis est évocateur de pro-œstrus, un autre frottis est réalisé deux à trois jours plus tard. Si le frottis tend vers une fin de pro-œstrus, le contrôle est réalisé au plus tard deux jours après [NEVEUX 1999, BUFF et SALESSE 2000].

4.1.2.4.3. Interprétation d'un frottis vaginal :

4.1.2.4.3.1. Lecture des lames:

La lecture des lames se fait à l'aide d'un microscope optique. Elle doit se faire 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 [TARADACH 1980, NEVEUX 1999].

4.1.2.4.3.2. Les types cellulaires retrouvés sur un frottis vaginal:

En période d'œstrus, l'épithélium vaginal n'est constitué que de deux à trois couches de cellules : les cellules basales et parabasales (cf. § 1.2.7.). Au cours des chaleurs, cet épithélium va s'accroître en épaisseur et comporter plusieurs stratifications de cellules. La connaissance des différents types cellulaires et leur identification sont utiles pour caractériser le stade du cycle œstral (cf. figure 4.5).

cellules
de la fosse
clitoridienne

cellule
superficielle
sans noyau

cellule
superficielle
à noyau
pycnotique

cellule
superficielle
avec silhouette
nucléaire

les cellules
superficielles
sont
les plus grandes
cellules
épithéliales
Les bords
des cellules
sont plats
ou pliés.

grande cellule intermédiaire :
plus grande que les cellules
parabasales et intermédiaires,
noyau d'aspect semblable,
contours anguleux,
cytoplasme acidophile
ou basophile selon le stade
des chaleurs de la chienne.

petite cellule intermédiaire :

- noyau rond,
- taille variable, (en général deux fois plus grande que les cellules parabasales),
- formes ronde, ovale ou angulaire.

cellule parabasale :

- forme ronde, - ratio,
- noyau large, - noyau cytoplasme plus élevé que les cellules intermédiaires.
- les plus petites cellules épithéliales présentent sur le frottis vaginal. cytoplasme basophile (bleu).

cellule parabasale en colonne
(cellules longues à noyaux excentrés)

cellules caractéristiques
du métœstrus

cellules lysées

globules rouges

polynucléaires

Fig. 4.5 : Les cellules d'un frottis vaginal (d'après Neveux 1999).

Lors de la lecture du frottis, on rencontre les différents types cellulaires de l'épithélium vaginal ainsi que des cellules présentes dans la lumière vaginale.

Les cellules de l'épithélium vaginal sont représentées par (cf. § 1.2.7.) : les cellules parabasales, intermédiaires (petites et grandes) et superficielles.

Les cellules qui peuvent être présentes dans la lumière vaginale :

1. **Les cellules du sang** : les érythrocytes et les leucocytes.
Les érythrocytes proviennent en général de l'utérus au moment des chaleurs, elles sont identiques aux cellules observées sur un frottis sanguin. Toutefois, elles peuvent être difficiles à distinguer pendant l'œstrus car elles peuvent se lyser suite à la modification de la composition du mucus.
Les leucocytes, principalement les polynucléaires neutrophiles (PNN), sont présents sur les frottis sans pour autant indiquer une pathologie. Ils sont généralement rencontrés lors du métœstrus.
2. **Les bactéries** : il est normale d'observer différents types de bactéries dans le vagin. Cependant, si leur nombre est très élevé conjointement avec un afflux de PNN dégénérés, il peut s'agir d'une vaginite.
3. **Les spermatozoïdes** : jusqu'à 24h après une saillie, des spermatozoïdes peuvent être observés sur le frottis. Et bien que leur présence confirme un accouplement, leur absence ne confirme pas l'inverse.
4. **Les cellules de la fosse clitoridienne** : ce sont des cellules fusiformes totalement éosinophiles. Elles sont retrouvées sur le frottis si l'écouvillonnage a mal été effectué, soit à proximité de la vulve, ou bien lors de réaction de défense de la chienne car le prélèvement au niveau de la fosse clitoridienne s'avère très douloureux.
5. **Les cellules de l'endomètre** : ce sont des cellules cuboïdes en colonne. La plupart d'entre elles ont un cytoplasme qui n'est pas intact, ce qui risque d'être interprété comme signe de dégénérescence [FONTBONNE 1996a].

4.1.2.4.3.3. Les variations de la cytologie vaginale au cours du cycle œstral :

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

4.1.2.4.3.3.1. Le pro-œstrus :

Au cours du pro-œstrus, 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 (et probablement vaginaux). Ces deux processus expliquent la présence des cellules épithéliales en voie de kératinisation, et des érythrocytes dans les frottis vaginaux [OLSON et *al.* 1991, ENGLAND et CONCANNON 2002].

1) Le pro-œstrus précoce (cf. photo 1, figure 4.6):

Le nombre de cellules augmente mais le frottis reste pauvre. Les cellules parabasales disparaissent au profit des cellules intermédiaires basophiles. On commence à percevoir une coloration acidophile du frottis traduisant le début de kératinisation des cellules [NEVEUX 1999]. Dans les deux premiers jours du pro-œstrus, il n'est pas rare d'observer la persistance sur le frottis d'un assez grand nombre de cellules parabasales qui disparaissent ensuite. Elles permettent d'identifier le tout début des chaleurs [FONTBONNE 1996a].

Toujours dans ces deux premiers jours on observe assez souvent, chez des chiennes naines et à fertilité normale, pour des raisons inconnues, la présence de leucocytes (légère vaginite physiologique due à une reprise de l'activité génitale en début de chaleurs). Associé à la présence de quelques cellules parabasales, ils donnent une image proche de celle d'un frottis de métœstrus (voir plus loin), ce qui peut induire en erreur si les commémoratifs concernant la chienne sont imprécis [FONTBONNE 1996a].

Les hématies sont abondantes, elles peuvent même être mises en évidence sur les frottis vaginaux avant que des écoulements n'aient été notés [NEVEUX 1999]. Toutefois, la présence ou l'absence de globules rouges sur le frottis vaginal n'est pas un élément très stable : il n'est pas toujours en relation avec la quantité exacte des pertes sanguines vulvaires présentées par la chienne. En effet, les hématies se fixent moins facilement sur la lame que les autres cellules. Elles ont tendance à glisser lors du trempage dans les bains successifs au cours de la coloration. On peut très bien ne pas les retrouver à l'examen microscopique (l'importance des pertes sanguines est ainsi évaluée suivant l'aspect de l'écouvillon qu'on retire des voies génitales, plutôt que de tenir compte du nombre de globules rouges à l'examen microscopique) [FONTBONNE 1996a].

Le frottis a un fond* « sale » en relation avec la présence de débris cellulaires et de mucus, qui lui fixe très bien la coloration (*le fond du frottis correspond à la zone entre les cellules vaginales).

2) Le pro-œstrus moyen (cf. photo 2, figure 4.6):

Sur les frottis de milieu de pro-œstrus, le nombre de cellules vaginales augmente encore. Le nombre de cellules intermédiaires non kératinisées diminue alors que le nombre de cellules superficielles qui présentent un noyau pycnotique augmente. Elles ne sont pas encore groupées en amas [FONTBONNE 1996a, NEVEUX 1999, ENGLAND et CONCANNON 2002].

La vitesse d'évolution du frottis est variable suivant les races et les individus. Ceci est probablement en relation avec la quantité d'œstrogènes sécrétés par les follicules et avec la durée des chaleurs. Le frottis de milieu de pro-œstrus peut donc présenter un aspect très différent d'une chienne à l'autre [FONTBONNE 1996a].

3) Le pro-œstrus tardif (cf. photo 3, figure 4.6):

Vers la fin de pro-œstrus, le frottis est riche en cellules. Les cellules vaginales sont presque exclusivement des cellules superficielles. Elles sont acidophiles, leurs contours sont anguleux et elles ont des noyaux pycnotiques ou même anucléés. Elles sont encore peu groupées en amas. De nombreux globules rouges sont présents [FONTBONNE 1996a, NEVEUX 1999]. Les leucocytes se raréfient et les bactéries sont abondantes [OLSON et al. 1991]. Le fond du frottis devient de moins en moins sale.

Les variations dans l'aspect du frottis de pro-œstrus semblent liées, selon Fontbonne (1996a), à la race plus qu'à l'individu. En effet, dans certaines races (comme les Chow-chow) et chez certains individus, les frottis vaginaux de pro-œstrus prennent un aspect caractéristique d'œstrus (cellules groupés en amas, fond du frottis propre), alors que les chiennes montrent encore des pertes sanguines vulvaires, refusent le mâle et que leur taux de progestérone ne s'est pas encore élevé au dessus du niveau de base.

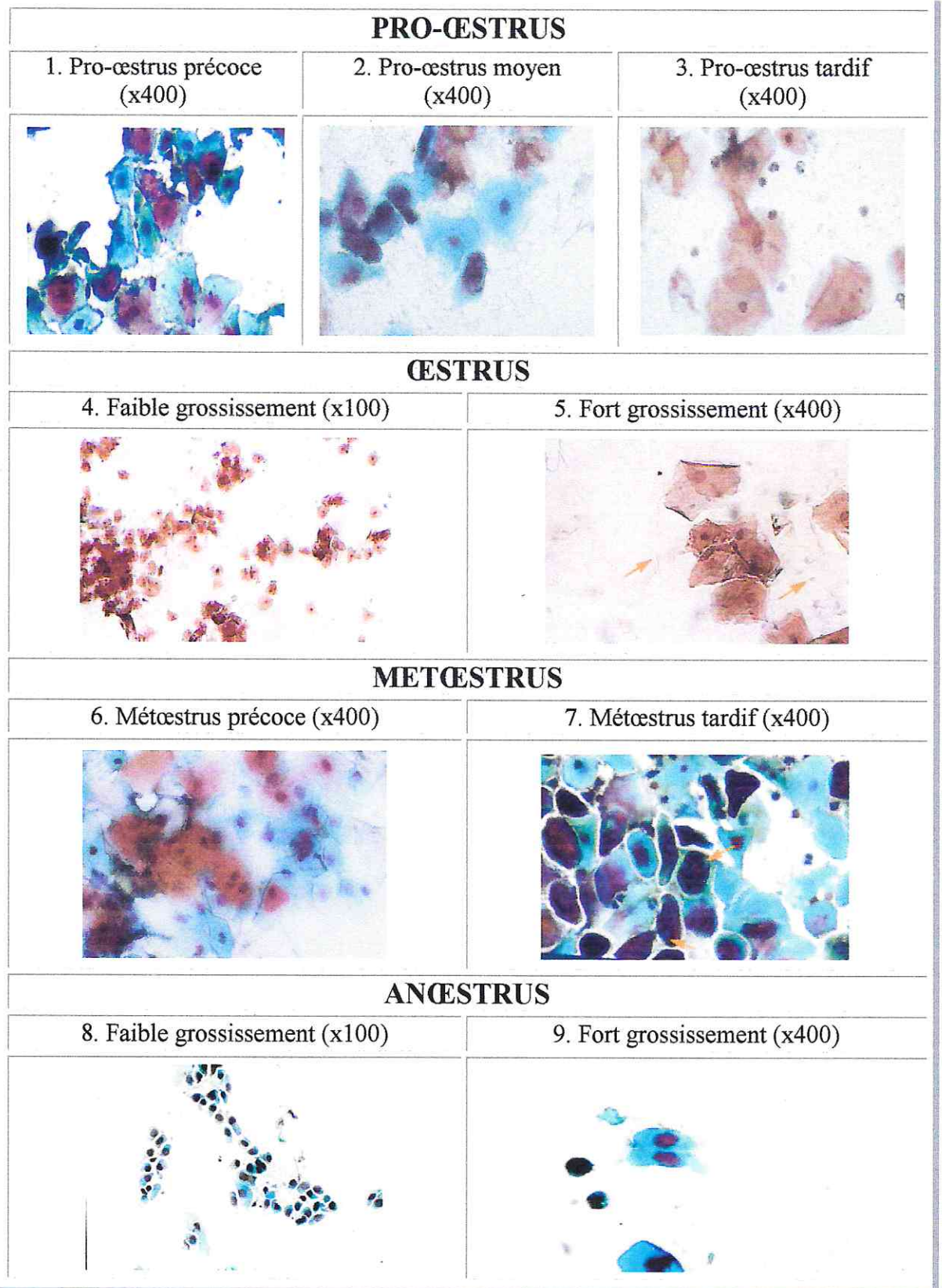


Fig. 4.6 : Photos de frottis vaginaux (colorés au Harris- Shorr) représentant les différents stades du cycle sexuel de la chienne (d'après Fontbonne et Guérin 2003).

- Les flèches sur la photo n°5 indiquent des spermatozoïdes.
- Les flèches sur la photo n°7 indiquent des polynucléaires superposés à des cellules vaginales.

4.1.2.4.3.3.2. L'œstrus (cf. photos 4 et 5, figure 4.6):

Le frottis est très riche en cellules, essentiellement des cellules superficielles entièrement kératinisées, anucléées et groupées en amas. Le frottis présente une acidophilie supérieure à 60 % et bien souvent supérieur à 80 ou 90 %. Les hématies sont absentes bien que certaines chiennes peuvent en présenter tout au long de l'œstrus. On retrouve physiologiquement de grandes quantités de bactéries sans réaction leucocytaire (les polynucléaires sont absents suite à l'épaississement maximal de la muqueuse vaginale).

Le fond du frottis est propre, c'est-à-dire que tous les petits débris que l'on observait plus tôt au cours des chaleurs entre les cellules (débris cellulaires, mucus...) ont disparu. Les cellules vaginales se détachent sur un fond limpide [OLSON et *al.* 1991, FONTBONNE 1996a, NEVEUX 1999, ENGLAND et CONCANNON 2002].

Chez certaines chiennes, les cellules superficielles restent nucléées tout au long des chaleurs (pour des raisons encore inconnues). Et dans certaines races (comme les Golden Retrievers, les Léonbergs, les Lévrier...), peut être à cause d'une sécrétion œstrogénique moindre, les frottis, même en période optimale, prennent rarement un aspect caractéristique d'œstrus (moins de 60% de cellules acidophiles peu groupés en amas, nombreuses cellules intermédiaires encore visibles). Cet aspect atypique, selon *Fontbonne* (1996a), n'est pas relié à une baisse de la fertilité.

Les cellules kératinisées ne restent pleinement groupées qu'en début d'œstrus. De façon plus générale, le frottis d'œstrus n'est « parfait » qu'à ce moment-là. Pendant la deuxième moitié de l'œstrus, l'aspect est déjà beaucoup moins caractéristique. C'est souvent lorsque le frottis est « un peu moins beau » que la chienne rentre dans en période de fertilité maximale [FONTBONNE 1996a].

Pendant toute cette phase, la cytologie vaginale demeure relativement constante. Aucune donnée cytologique ne permet d'identifier avec certitude le jour du pic de LH, de l'ovulation ou de la période optimale de fécondabilité. Par ailleurs, les frottis vaginaux sont considérés comme le miroir de l'œstrogénémie, pourtant en début d'œstrus, l'effet œstrogénique est maximal sur les frottis alors que la concentration sérique de cette hormone commence à diminuer [FELDMAN et NELSON 1996].

4.1.2.4.3.3.3. Le métœstrus :

Environ six jours après l'ovulation, précisément 8.0 ± 0.3 jour après le pic de LH, la majorité des chiennes présentent un frottis de métœstrus [ROOT KUSTRITZ 2001a]. Le passage au métœstrus est caractérisé par un changement brutal des rapports quantitatifs des types de cellules épithéliales signalés (cf. figure 4.7), accompagné de l'apparition de polynucléaires neutrophiles [OLSON et *al.* 1991].

1) Le métœstrus précoce (cf. photo 6, figure 4.6):

Sur les frottis de transition œstrus-métœstrus, les cellules kératinisées s'éparpillent, des cellules intermédiaires réapparaissent, ainsi que, rapidement après, des cellules parabasales (souvent regroupées) et des polynucléaires. Des érythrocytes peuvent réapparaître physiologiquement. Le changement de l'aspect du frottis s'installe en 12 à 24h [OLSON et *al.* 1991, FONTBONNE 1996a, NEVEUX 1999, ENGLAND et CONCANNON 2002].

La transition œstrus-métœstrus s'effectue plus ou moins rapidement suivant les chiennes, et l'aspect du frottis n'est pas toujours en liaison avec la fertilité. Certaines chiennes qui présentent encore un frottis d'œstrus (pas encore de cellules intermédiaires) ne sont déjà plus fécondables. A l'inverse, des chiennes présentaient des frottis presque entièrement de métœstrus, peuvent concevoir normalement des chiots après insémination artificielle le jour même.

Dans tous les cas, aucune chienne n'est encore fécondable lorsque les polynucléaires apparaissent sur le frottis de métœstrus [FONTBONNE 1996a].

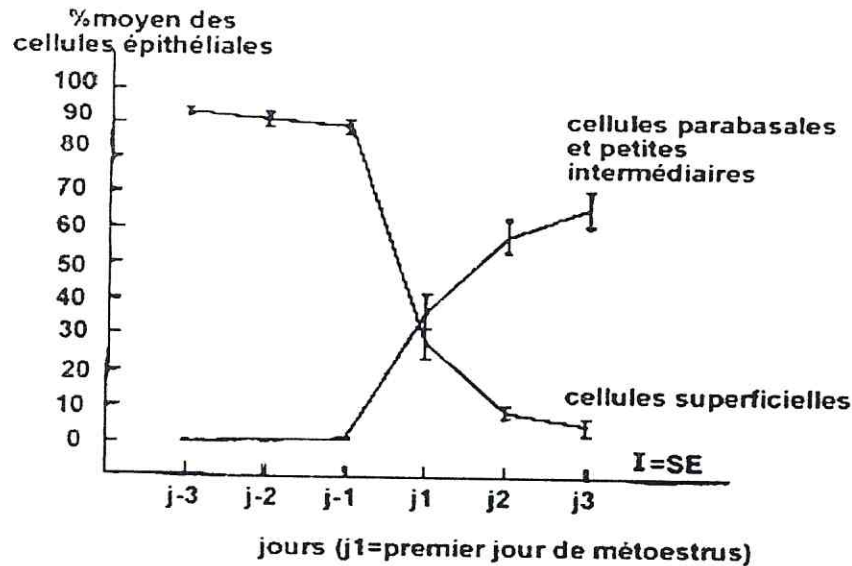


Fig. 4.7: Schéma typique de la modification des cellules épithéliales vaginales à la survenue du métœstrus (d'après Holst et Phémister 1974 in Luc 2005)

2) Le métœstrus moyen et tardif (cf. photo 7, figure 4.6):

Les cellules parabasales et intermédiaires, toutes basophiles, dominent les frottis de métœstrus. Des leucocytes sont visibles. 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 pathognomonique du métœstrus (*métœstrus cells*). Les érythrocytes sont absents.

La quantité de cellules vaginales observée sur un frottis de métœstrus est variable d'une chienne à l'autre à un moment donné, et diminue au fur et à mesure du métœstrus. La transition métœstrus-œstrus est donc progressive en ce qui concerne les frottis vaginaux.

4.1.2.4.3.3.4. L'œstrus (cf. photos 8 et 9, figure 4.6):

Le frottis d'œstrus est classiquement pauvre en cellules. La tendance est basophile. On note la présence de quelques rares cellules parabasales, parfois accolées par un de leurs cotés (on parle de cellules en colonne - cf. figure 4.5). Les polynucléaires sont rares et les hématies absentes [FONTBONNE 1996a, NEVEUX 1999].

L'aspect « classique » du frottis d'œstrus peut apparaître modifié sans causes particulières :

Le nombre de cellules parabasales est parfois très important, cela ne signifie pas que la chienne est sur le point d'entrer en chaleurs.

Des hématies peuvent se trouver sur le frottis, peut-être à cause de l'irritation causée par l'écouvillon sur des chiennes saignant facilement. Lorsqu'il est retiré des voies génitales, ce dernier n'apparaît pas teinté de sang mais on observe après étalement et coloration, des hématies sur le frottis.

On trouve parfois quelques rares cellules kératinisées acidophiles sur le frottis d'œstrus, en raison certainement de l'existence d'une desquamation physiologique du vagin ou de la spoliation du frottis par des cellules clitoridiennes. Si ces cellules sont en très faible nombre, il convient de ne pas en tenir compte [FONTBONNE 1996a].

4.1.2.4.3.4. 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.

4.1.2.4.3.4.1. L'indice éosinophile (IE) :

L'indice éosinophile représente le pourcentage de cellules réellement kératinisées (les cellules superficielles à noyau vésiculaire et anucléées, et les cellules intermédiaires kératinisées) par rapport à celles qui pourraient l'être mais ne le sont pas (les grandes cellules intermédiaires polychromatophiles et basophiles). Les petites cellules intermédiaires et les cellules parabasales qui ne subissent pas la kératinisation ne sont pas prises en compte [TARADACH 1980].

$$IE = \frac{\text{Nombre de cellules éosinophiles} \times 100}{\text{Nombre de cellules basophiles}^*}$$

*en sont exclues les petites cellules intermédiaires et les cellules parabasales qui ne subissent pas la kératinisation chez la chienne.

La difficulté majeure réside dans la différenciation entre grandes cellules intermédiaires qui peuvent subir la kératinisation et petites cellules intermédiaires qui ne la subissent pas.

La lecture de l'indice éosinophile chez la chienne est simplifiée par rapport à celle que l'on peut faire chez la femme, où l'on doit tenir compte de la présence et de l'allure des noyaux (vésiculeux ou pycnotiques).

Ici, à la lecture, on se limite à compter les cellules rouges (kératinisées) et les cellules bleues (non kératinisées) en évitant d'y inclure les petites cellules intermédiaires et les cellules parabasales [TARADACH 1980].

• Variation de l'indice éosinophile au cours du cycle œstral :

En prenant le premier jour de saignement comme premier jour du cycle, le temps pris par l'indice éosinophile pour passer des valeurs nulles le premier jour du cycle, jusqu'aux valeurs maximales varie beaucoup. Selon *Schutte* (1967), le pic de l'indice éosinophile survient dans 43% des cas le 10^e jour du cycle, et dans 98% des cas le 14^e jour du cycle. Selon *Taradach* (1980), ce pic survient entre le 8^e et le 12^e jour du cycle (cf. figure 4.8).

La valeur de ce pic est toujours supérieure à 75% selon *Taradach*, et varie de 56 à 100% selon *Schutte*. Le pic de l'indice éosinophile se localise ainsi à des jours différents pendant l'œstrus proprement dit. Il est difficile de prévoir, pour chaque individu, le moment du pic de l'indice éosinophile, chacun atteint une valeur particulière et pouvant survenir à un moment différent. Selon *Schutte*, si on veut tout de même généraliser, on peut prendre comme valeur de pic IE = 60%.

L'indice éosinophile chute brutalement le premier jour du métœstrus.

D'après les résultats expérimentaux de *Schutte*, plus de 90% des chiennes saillies le jour du pic de l'indice éosinophile étaient gestantes. Ainsi ce pic, qui survient après le pic plasmatique d'œstradiol, permet la détermination de l'œstrus proprement dit. Et si certains l'ont utilisé pour prévoir la période optimale de fécondabilité, la possibilité de dater le

moment de l'ovulation reste plus délicate. En effet les courbes obtenues présentent un caractère individuel, difficilement généralisable [TARADACH 1980].

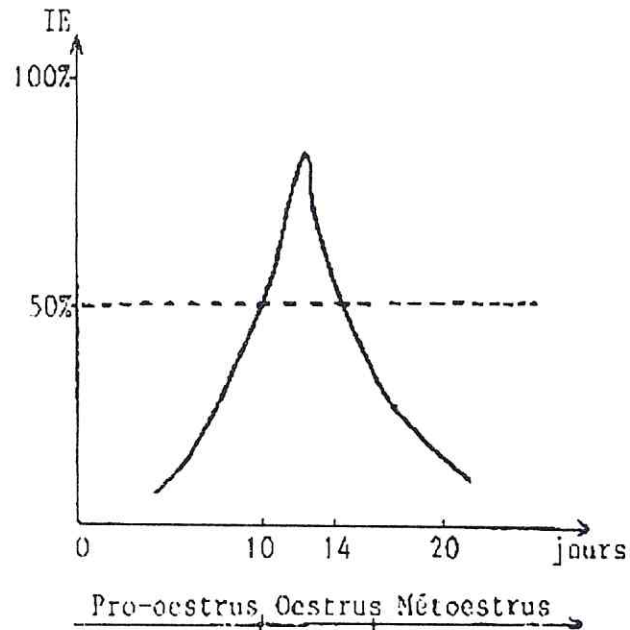


Fig. 4.8 : Courbe théorique de l'évolution de l'indice éosinophile (d'après *Taradach* 1980).

4.1.2.4.3.4.2 L'indice caryopycnotique (ICP) :

L'indice caryopycnotique représente le pourcentage des cellules superficielles avec un noyau pycnotique par rapport à celles dont le noyau est encore vésiculaire. Cette transformation nucléaire est une indication des effets des œstrogènes sur la muqueuse vaginale [SCHUTTE 1967].

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

La détermination de cet indice est difficile sur un plan technique car la morphologie du noyau doit être examinée avec soin. En plus, les renseignements qu'il peut apporter varient considérablement suivant les individus. Tout comme l'indice éosinophile, il peut être indicateur de l'œstrus, mais ne peut nullement détecter la période optimale de fécondabilité.

4.1.2.4.3.4.3 L'indice superficiel (IS) :

L'indice superficiel représente le pourcentage de cellules superficielles (cellules superficielles kératinisées et grandes cellules intermédiaires) par rapport aux cellules des couches plus profondes (cellules parabasales et petites cellules intermédiaires) [SCHUTTE 1967].

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

❖ Variation de l'indice superficiel au cours du cycle œstral :

A partir de la deuxième moitié du pro-œstrus et durant tout l'œstrus, l'indice superficiel connaît ses valeurs les plus élevées sans produire de pic, pour chuter 24 à 48h après que l'indice éosinophile atteint son pic.

A l'arrivée du métœstrus, si la chienne n'a pas été fécondée, l'indice superficiel ne montre des valeurs basales (< 10%) qu'après trois semaines. Si cette dernière a été gestante, il devient inférieur à 10% environ 4 à 5 jours après la saillie. Cette donnée semble peu exploitée lors du diagnostic de gestation.

L'indice superficiel ne présente pas de difficultés pour son calcul, sa valeur s'obtient rapidement. Mais comme il n'atteint jamais un pic défini et franc, sa valeur pratique est réduite pour déterminer la période optimale de fécondabilité [SCHUTTE 1967].

Simple à réaliser, peu onéreuse, directement accessible en clinique et offre des résultats immédiats, la réalisation de frottis vaginaux reste un examen de choix dans le suivi des chaleurs chez la chienne. En effet, elle permet de localiser l'œstrus proprement dit. De plus, elle représente le meilleur marqueur de la transition œstrus-métœstrus, ce qui revêt un grand intérêt pratique.

Toutefois, 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.

De ce fait, la cytologie vaginale, à elle seule ne suffit pas pour réaliser un suivi de chaleurs convenable. Elle nécessite toujours d'être associée à d'autres marqueurs du cycle de la chienne (cf. § 4.2). [FELDMAN ET NELSON 1996, GUERIN *et al.* 1997, NEVEUX 1999, BUFF et SALESSE 2000, ENGLAND et CONCANNON 2002].

4.1.2.5. Dosages hormonaux :

Les hormones sexuelles représentent les marqueurs les plus fiables des chaleurs chez la chienne, et bien que la variation de leur taux se traduit par différentes modifications comportementales, cliniques et histo-physiologiques au niveau du tractus génital de la femelle, la seule mesure de leur concentration dans le sang permet de recueillir des données exactes quant à leur valeur réelle.

Pour cela, au cours des sous paragraphes suivants, nous allons exposer quelques données relatives à chacune des hormones intervenant sur le cycle sexuel de la chienne, les précisions concernant chaque phases du cycle étant préalablement détaillées (cf. § 2.3).

D'autre part, pour plus de compréhension, quelques notions concernant les techniques utilisées pour les différents dosages seront brièvement décrites.

❖ Principe général des dosages hormonaux :

En général, il est à noter qu'en endocrinologie, la plupart des techniques de dosages hormonaux sont immunologiques. Elles reposent sur l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre une hormone.

Historiquement, les premières techniques étaient **radio-immunologiques** (fondés sur l'utilisation de radio-isotopes), parce que beaucoup plus sensibles. Ces techniques de référence ont progressivement été supplantées en routine par des techniques **immuno-enzymatiques** (ELISA, chimiluminescence). Ces techniques « froides » évitent la manipulation de produits radioactifs [MEUSY 1991, PRELAUD *et al.* 2002].

Différentes étapes caractérisent les dosages immunologiques (cf. fig. 4.9). Dans un premier temps, il est nécessaire de rendre antigénique l'hormone à doser, parfois en la couplant à une protéine porteuse s'il s'agit d'un haptène.

Nous utilisons dans un second temps un anticorps mono ou polyclonal pour obtenir une liaison antigène-anticorps. L'anticorps lors de la technique immunométrique, ou l'antigène au cours de la technique par compétition (cf. fig. 4.9) est marqué par un radioisotope ou une enzyme ou une substance fluorescente ou luminescente.

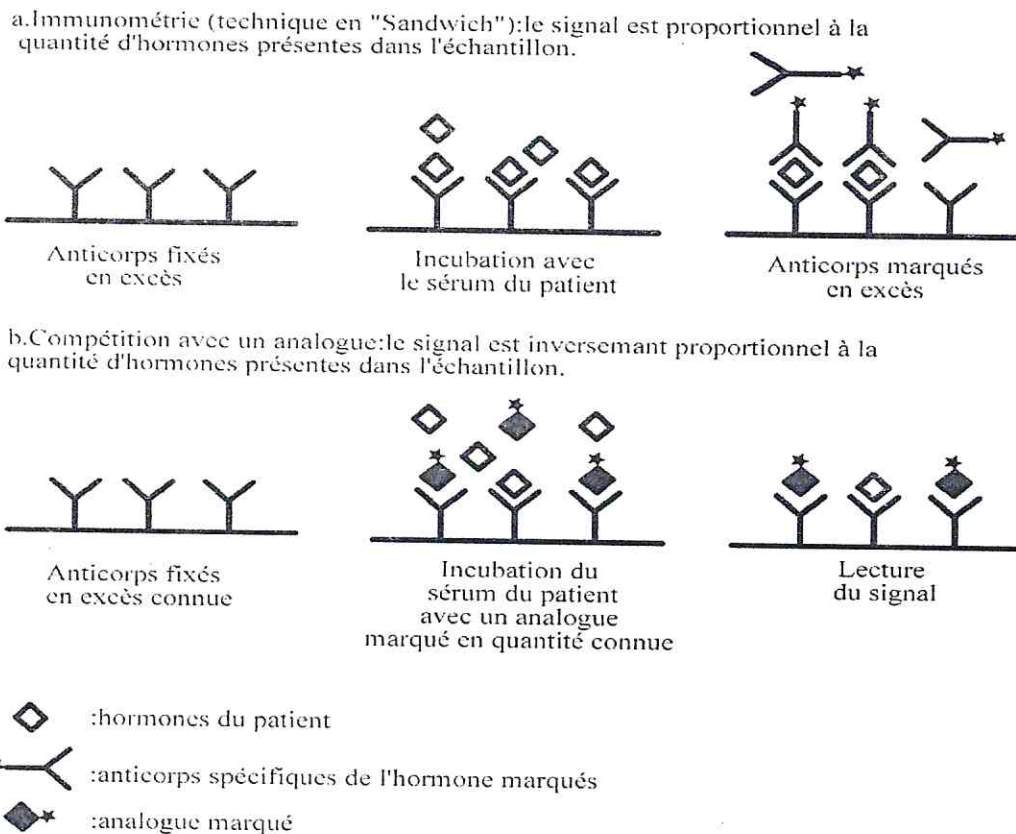


Fig. 4.9: Principe des techniques d'immunodosage (d'après Prélaud et al. 2002).

Nous étudions ensuite entre molécules liées et libres, marquées et non marquées et nous en déduisons la concentration de l'hormone dosée en comparant la valeur obtenue à une courbe d'étalonnage établie à partir de plusieurs sérums étalons. Cet étalonnage est fait soit pour une série de dosages, soit, dans certains automates, à chaque dosage. [PRELAUD et al. 2002].

Or, comme les dosages immunologiques reposent sur l'utilisation d'anticorps, ils sont spécifiques de l'hormone dosée. Les hormones ayant une structure identique chez l'homme et les carnivores peuvent ainsi être dosées par des techniques développées en médecine humaine. C'est le cas de nombreuses hormones de faible poids moléculaire tel que les stéroïdes.

En revanche, les hormones peptidiques ont une structure différente d'une espèce à l'autre. Souvent cette différence de structure est associée à une variation importante de l'antigénicité, qui limite l'usage des techniques hétérologues, développées pour l'homme ou les ovins par exemple [PRELAUD et al. 2002].

4.1.2.5.1. Dosage de FSH :

La FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) est une glycoprotéine comportant 2 sous unités. C'est une hormone hypophysaire spécifique pour chaque espèce. Sa demi-vie est plus longue que celle de la LH, son pic sérique est aussi plus tardif et moins accentué (cf. fig. 2.2).

La concentration plasmatique de FSH peut être déterminée grâce au dosage HISA (*Human Immunometric Sandwich Assay*). Cependant, il n'existe pas de dosage, en routine, par

méthode radio-immunologique (RIA). Son dosage reste donc encore difficile à réaliser [GUERIN *et al.* 1997, GIER *et al.* 2006].

4.1.2.5.2. Dosage de LH :

La LH (*Lutéinising Hormone*) est une hormone peptidique d'origine hypophysaire, possédant tout comme la FSH une spécificité d'espèce. Elle est sécrétée sous forme de décharges.

Chez la chienne, la durée de la décharge préovulatoire de LH, allant de 1 à 5 jours, est relativement longue, comparée aux autres espèces domestiques. Chez la vache par exemple, la durée de la décharge préovulatoire de LH n'excède pas les 8heurs [WILDT et CHAKRABORTY 1978, CONCANNON 1993, ONCLIN *et al.* 2002, PRELAUD *et al.* 2002, GIER *et al.* 2006].

Le pic plasmatique de LH est estimé entre 7 à 50ng/ml, il dure 24 à 40heures, d'après Root Kustritz (2001a), et 36heures d'après Guérin *et al.* (1997) et Gier *et al.* (2006), avant de revenir à son taux basal (environ 1ng/ml).

Ce pic plasmatique marque le passage du pro-œstrus à l'œstrus. L'intervalle qui le sépare de l'ovulation est relativement constant, environ 2.0 ± 0.1 jours. De ce fait, la connaissance du moment de ce pic revêt un intérêt majeur pour le suivi des chaleurs, car il représente un excellent repère pour dater l'ovulation.

Le prélèvement de sang destiné pour le dosage de la LH, d'un volume supérieur à 0.1ml, se fait sur tube sec ou hépariné. Il sera immédiatement centrifugé à 1500 tour/minute pendant 15 minutes. Mais comme le sang doit être prélevé quotidiennement, à peu près à la même heure de la journée, les prélèvements restent difficiles à mettre en pratique

Le dosage de la concentration plasmatique de LH peut se faire par la méthode quantitative RIA (*Radio-Immuno-Assay*). Le prélèvement pourra être mis sou régime du froid (conservation de 48h par réfrigération a $+4^{\circ}\text{C}$, ou bien 3 mois par congélation a -20°C), en attendant d'être acheminé vers le laboratoire [PRELAUD *et al.* 2002, GIER *et al.* 2006]. Cette méthode est précise mais présente l'inconvénient d'être longue, onéreuse et les résultats ne peuvent être obtenus immédiatement car les analyses se font en série au laboratoire. De ce fait, cette méthode de dosage n'a pas d'intérêt pratique lors des suivis de routine. Elle pourra être utilisée lors d'insémination artificielle en sperme congelé.

Le dosage de la concentration plasmatique de LH peut se faire également par méthode semi quantitative, la méthode ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) qui est à présent disponible sous forme de kit. Le prélèvement de sang ne doit pas être hémolysée, il pourra être conservé par réfrigération, mais ne peut en aucun cas être congelé. Le test peut détecter les concentrations inférieures à 1ng/ml et les concentrations qui lui sont supérieures grâce à un indicateur colore. Donc, ce test semi quantitatif, bien qu'il présente l'avantage de la simplicité d'utilisation, ne peut donner de renseignements que si le prélèvement est effectué au moment du pic de LH. Il nécessite de ce fait de réaliser des prélèvements rapprochés dans le temps, plusieurs fois par jour, ce qui alourdit le suivi des chaleurs [ROOT KUSTRITZ 2001a, ENGLAND et CONCANNON 2002, GIER *et al.* 2006].

4.1.2.5.3. Dosage des œstrogènes :

Ayant pour origine le cholestérol, le 17 β -œstradiol est une hormone stéroïde dont la concentration augmente depuis des valeurs basales (10-20pg/ml) jusqu'à atteindre des valeurs maximales estimées entre 50 et 100pg/ml, environ un à deux jours avant le pic de LH. Puis ce taux chute progressivement pour atteindre des valeurs indétectables 36h après l'ovulation [GUERIN 1998].

Le dosage de la concentration plasmatique du 17 β -œstradiol peut se faire soit par méthode RIA (*RadioImmuno Assay*), ou bien par électro-chimiluminescence. Le prélèvement,

d'un volume supérieur à 0.1 ou 0.2ml (selon la technique), est réalisé de préférence sur tube sec. Il pourra être mis sous régime du froid pour une conservation de 2 semaines par réfrigération à +4°C, ou bien 1 an par congélation à -20°C [PRELAUD et *al.* 2002].

Cependant les trousse (RIA, chimiluminescence) sont rarement adaptables au dosage de l'œstradiol chez les carnivores. En effet, comme les concentrations sériques sont très faibles (en pg/ml), leur évaluation s'avère difficile. La sensibilité de ces méthodes étant parfois plus élevée que les minima observés [PRELAUD et *al.* 2002].

Encore que le taux d'œstradiol fluctue beaucoup au cours du pro-œstrus et les valeurs maximales varient énormément suivant les individus mais également chez un même animal. De plus, ces dosages sont longs à réaliser et présentent un coût élevé.

Tous ces inconvénients font en sorte qu'il ne soit pas utilisé dans le suivi du cycle chez la chienne, les frottis vaginaux ayant une meilleure valeur informative. Le recours au dosage de l'œstradiol se fait uniquement lors de l'exploration de troubles du cycle (kyste ovarien ou tumeur sécrétante de la granulosa par exemple) [PRELAUD et *al.* 2002].

4.1.2.5.4. Dosage de la progestérone :

Chez la vache par exemple, l'état gestatif implique la transformation du corps jaune cyclique en corps jaune gestatif. Dès lors, le blocage de la cinétique hormonale au stade progestéronique revêt un intérêt majeur pour le diagnostic de gestation [DERIVAUX et ECTORS 1980].

Chez la chienne, en revanche, le métœstrus a une durée identique à celle de la gestation. L'activité lutéale du corps jaune cyclique a donc une durée pouvant atteindre la durée de la gestation [LEYMARIE et MARTAL 1991]. De ce fait, le dosage de la progestéronémie n'a aucun intérêt pour le diagnostic de la gestation [PRELAUD et *al.* 2002].

D'autre part, la progestéronémie présente une faiblesse constante en phase d'ancœstrus, suivi par un début de sécrétion par les follicules préovulatoires en phase de pro-œstrus. Cette particularité permet la détermination de la date de l'ovulation chez la chienne dans le cadre du suivi des chaleurs [PRELAUD et *al.* 2002].

En effet, l'observation de l'évolution de la progestéronémie permet de définir une courbe type dont l'aspect est relativement constant (cf. fig.4.10), 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 préovulatoire des follicules ovariens [FONTBONNE et GUERIN 2003].

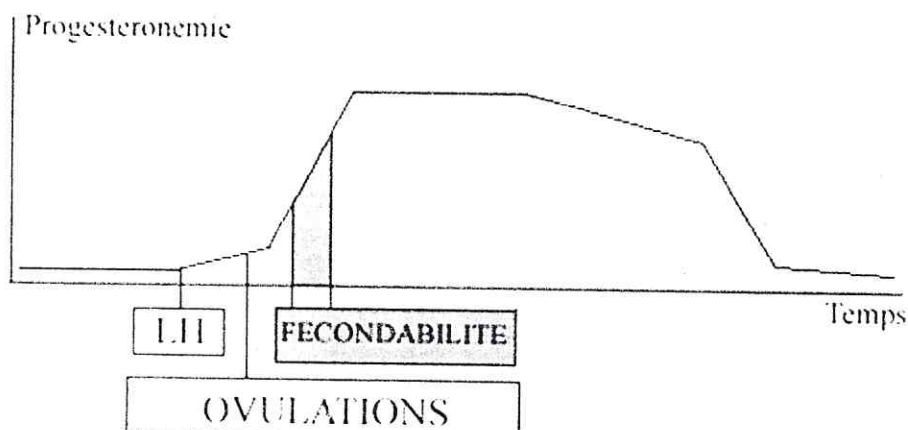


Fig. 4.10: Pic de LH, ovulations et période de fécondabilité par rapport à l'évolution de la progestéronémie (d'après Fontbonne et Guérin 2003).

La concentration plasmatique de la progestérone le jour du pic de LH, c'est-à-dire deux jours environ avant l'ovulation, est estimée entre 2.0 à 2.9ng/ml (cf. tableau 4.3). Elle atteint le jour de l'ovulation des valeurs comprises entre 4 et 10ng/ml. La période féconde se situe environ deux jours après. Le taux de progestérone dépasse alors 15ng/ml [ROOT KUSTRITZ 2001a, ENGLAND et CONCANNON 2002, FONTBONNE et GUERIN 2003]. Aussi, la progestéronémie présente des fluctuations synchrones au rythme nycthéral, il sera donc souhaitable d'effectuer les prélèvements de sang à la même heure de la journée.

Tableau 4.3: Corrélation entre la concentration plasmatique de progestérone et l'ovulation. La marge d'erreur est estimée à \pm 1jour (d'après *Root Kustritz* 2001a).

Concentration de progestérone (ng/ml)	Evénements
Inférieur à 1.0	Anœstrus ou pro- œstrus
1.0 – 1.9	Ovulation – 3jours
2.0 – 2.9	Ovulation – 2jours (pic de LH)
3.0 – 3.9	Ovulation – 1jour
4.0 – 10.0	Jour de l'ovulation
Période optimale de fécondabilité = ovulation + 2jours	
Supérieur à 10	Ovulation + 1 à 5jours

Comme tous les stéroïdes, la progestérone est une hormone assez stable. Généralement les prélèvements de sang, d'un volume supérieur à 0.2ml, sont réalisés sur tube sec ou hépariné (dans le doute toujours utiliser des tubes sec). Le froid permet leur conservation pendant 2 semaines à +4°C, et environ 1 an à -20°C [PRELAUD et *al.* 2002].

La progestéronémie peut être mesurée par plusieurs techniques. Les techniques utilisées dans les laboratoires sont des dosages quantitatifs à haute précision, toutes dérivées de trousse de dosage de progestérone humaine. Elles sont aisément adaptables au chien.

Les vétérinaires disposent également de dosages rapides semi-quantitatifs. Ils sont étalonnés de façon à pouvoir présenter une coloration pour chaque tranche de progestérone (voir plus loin). Il s'agit de technique à précision moyenne (discordance avec les techniques quantitatives dans 10 à 47% des cas) [PRELAUD et *al.* 2002].

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 peut varier (cupule plastique ou membrane cellulosique), le système de révélation également (marqueur radioactif ou enzymatique) [GUERIN et *al.* 1997].

4.1.2.5.4.1 Dosage semi quantitatif de la progestérone :

Le principe de ce dosage est basé sur la compétition entre la progestérone plasmatique et la progestérone liée à une enzyme. La cupule test contient l'anticorps monoclonal anti-progestérone qui est fixé à une phase solide. Dans un premier temps, il faut ajouter quelques gouttes de l'échantillon. La progestérone présente dans le plasma se fixe à ces anticorps monoclonaux. Après lavage de la cupule, on ajoute le conjugué qui correspond au complexe progestérone liée à l'enzyme qui va se fixer aux anticorps monoclonaux anti-progestérone restés libres. Après un nouveau lavage, on ajoute en dernier lieu un mélange extemporané de substrat et de son chromogène.

L'enzyme (souvent la peroxydase) du complexe progestérone-enzyme dégrade le substrat. Cette réaction, invisible à l'œil nu, est révélée par un chromogène qui donne une coloration à la membrane de la cupule. La couleur est d'autant plus intense que le plasma à tester est pauvre en progestérone. La lecture est donc visuelle par comparaison à un abaqué de

couleur. 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 [LEROYER et al. 2002, PRELAUD et al. 2002].

Ainsi, les dosages semi quantitatifs par méthode ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) reposent sur une appréciation visuelle colorimétrique et permettent d'apprécier les variations de concentration de l'échantillon par rapport à un ou deux témoins. La valeur exacte n'est pas connue, mais ces kits sont pratiques, ils permettent généralement la réalisation de suivi des chaleurs dans de bonnes conditions [BUFF et SALESSE 2000, TAINTURIER 2001].

4.1.2.5.4.2. Dosage quantitatif de la progestérone :

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

➤ 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.

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.

➤ 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 couplée à un anticorps ou un haptène. Comme nous venons de voir dans les kit de dosage rapide, la peroxydase (de raifort) est souvent utilisée, parce qu'elle permet l'obtention d'une coloration rapide. Les autres enzymes utilisées sont généralement la phosphatase alcaline et la β -galactosidase. La coloration est lue par un spectrophotomètre et le résultat brut est exprimé en DO (densité optique). L'activité enzymatique peut être modifiée par des anticoagulants, comme des chélates tels que l'EDTA (éthylène diméthyle tétra acétique). 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.

Il est à noter que les valeurs obtenues dépendent considérablement de la technique utilisée. Habituellement, les dosages effectués par dosage immunoenzymatique (EIA) sont légèrement élevés par rapport au dosage radioimmunologique (RIA). Les valeurs de progestéronémie répondant au pic de LH sont de 2.5 à 3ng/ml. Il est classiquement décrit que l'ovulation se produit 48h après le pic de LH. La valeur de la progestéronémie au moment de l'ovulation est, en RIA, estimée à 5.44ng/ml. Par comparaison, en EIA, l'ovulation se produit pour une valeur de la progestéronémie d'environ 10ng/ml. On peut estimer qu'une chienne est féconde lorsque la progestéronémie est de l'ordre de 20ng/ml en EIA.

Plus de 80% des courbes présentent le même tracé. Dès que la progestéronémie augmente de façon significative, l'évolution de la chronologie des événements est assez constante. L'estimation de la période optimale de fécondabilité est alors possible.

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 [GUERIN et *al.* 1997, ROOT KUSTRITZ 2001a, ENGLAND et CONCANNON 2002, FONTBONNE et GUERIN 2003].

Tableau 4.4 : Estimation du jour de l'ovulation par dosage quantitatif et semi quantitatif de la progestérone (d'après *Root Kustritz* 2001a).

Méthode de dosage de progestérone	Estimation du jour de l'ovulation
Méthode quantitative (RIA)	Les prélèvements de sang sont réalisés tout les 3-4 jours jusqu'à atteindre des valeurs entre 2 et 10ng/ml (cf. tableau 4.3).
Méthode semi quantitative (ELISA)	Les prélèvements de sang sont réalisés quotidiennement à partir du 4 ^e jour depuis le début du pro-œstrus, jusqu'à l'obtention des valeurs entre 4 et 10ng/ml.

Donc, la mesure de la progestéronémie est un témoin fiable de détection de l'ovulation chez la chienne (elle constitue aujourd'hui l'une des méthodes de référence), 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, etc.

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 réalisée 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 [BUFF et SALESSE 2000].

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 [FONTBONNE et *al.* 2000].

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 une étude conduite en l'an 2000 par le centre d'études en reproduction et élevage canin (Lyon, France) sur 49 chiennes inséminées en semence congelée et fécondées prouve qu'il est impossible de fixer un taux de référence valable universellement. La fourchette est en effet très large puisque sur l'échantillon, deux d'entre elles ont engagé une gestation à respectivement 14 et 40ng/ml [SAUZAY 2005].

Il n'existe pas un test universel d'appréciation des fonctions gonadiques. Une bonne connaissance de la physiologie sexuelle est un préalable indispensable pour maîtriser les indications et l'interprétation de ces examens [PRELAUD et *al.* 2002].

4.1.2.6. Échographie ovarienne :

L'échographie est une technique d'investigation indolore et non invasive, qui présente l'avantage de la sécurité d'emploi [MAI 1999a].

Elle permet de visualiser les contours, la structure et les rapports des organes pleins non calcifiés. Le terme « échographie » signifie littéralement « écriture d'une coupe formée d'échos ». Elle se fonde sur l'emploi des ultrasons [WOLFGANG 1994, MAI 1999a].

Les ultrasons sont produits par effet piézo-électrique, c'est-à-dire par application d'une différence de potentiel alternative à un cristal capable de se contracter et de se dilater en produisant ainsi des ondes sonores [MAI 1999a].

A l'inverse, le cristal, frappé par des ondes sonores peut aussi se contracter et se dilater, ce qui engendre une différence de potentiel entre les deux faces et un influx électrique que l'on peut mesurer. Le cristal piézo-électrique est donc à la fois émetteur et récepteur d'ultrasons. Il est contenu dans une sonde : le transducteur [MAI 1999a].

La sonde est munie d'un cristal à propriétés piézo-électriques qui émet et reçoit les ondes sonores. Après réflexion des faisceaux incidents sur des interfaces du milieu qu'ils traversent, les échos reçus sont transformés en impulsions électriques par la sonde. Celles-ci sont alors traitées électroniquement par l'appareil, et visualisés suivant différents modes [MAI 1999a].

Le recours à l'échographie pour visualiser les ovaires de la chienne a longtemps été sujet à controverses. La plupart des études décrivaient les ovaires comme rarement ou non détectables par cette méthode [WOLFGANG 1994, FONTBONNE 1996c]. L'échographie ovarienne était ainsi indiquée uniquement pour le diagnostic des tumeurs et des kystes de l'ovaire [WOLFGANG 1994].

A présent, avec un matériel plus performant, il a été démontré que les ovaires de la chienne peuvent être visualisés par échographie en mode B (voir plus loin). En s'appliquant et en effectuant des examens répétés, le développement folliculaire peut être suivi, et le moment de l'ovulation peut ainsi être détecté [ENGLAND et CONCANNON 2002, FONTBONNE 2005].

4.1.2.6.1. Anatomie échographique des ovaires de la chienne :

La connaissance préalable de l'anatomie topographique des ovaires est indispensable à la réalisation d'un examen de qualité [MAI 1999a]. Surtout que les ovaires de la chienne sont difficiles à mettre en évidence par échographie, d'une part parce qu'ils sont très petits et sont enfermés dans des bourses ovariennes qui peuvent être graisseuses, et d'autre part à cause de leur localisation superficielle (cf. chapitre 1).

Chaque ovaire forme une structure dense de 1 à 2 cm de long. Sa conformation varie au cours du cycle œstral, en fonction du nombre et de la taille des follicules et des corps jaunes qui émergent à sa surface.

Les ovaires sont situés au voisinage immédiat du pôle caudal de chaque rein. L'ovaire droit est donc plus crânial que l'ovaire gauche. Il correspond approximativement à la 3^e (à droite) et à la 4^e (à gauche) vertèbre lombaire. Il est à noter que la position des ovaires peut légèrement varier pendant l'œstrus, ils se localisent souvent plus caudalement et ventralement.

Les bourses ovariennes sont plaquées par la masse intestinale contre la paroi des flancs, d'où leur localisation superficielle. Ils s'appuient par leur face viscérale sur le duodénum descendant pour l'ovaire droit, et sur le colon descendant pour l'ovaire gauche [WOLFGANG 1994, ENGLAND et CONCANNON 2002, FONTBONNE 2005].

4.1.2.6.2. L'examen échographique :

La réalisation de l'examen échographique passe par les étapes suivantes :

4.1.2.6.2.1. Préparation de l'animal :

Chez la chienne, on recourt à l'échographie transcutanée pour tous les examens gynécologiques en appliquant la sonde contre la paroi abdominale [WOLFGANG 1994].

La présence d'air constitue une gêne potentielle à l'examen échographique. Des artefacts de réverbération externe sont produits lorsque l'air s'insinue entre la sonde et la peau de l'animal [MAI 1999b].

Il est nécessaire de placer la sonde en contact étroit avec la peau de la région à examiner [MAI 1999a]. Ceci impose la plupart du temps de tondre les poils en région abdominale soit au niveau des flancs (examen sur animal debout), ou bien en partie ventrale de l'abdomen (examen sur animal debout ou couché), et l'application d'un gel de couplage pour éliminer les bulles d'air qui s'intercalent entre la sonde et la peau.

Ainsi, l'élimination des poils améliore la qualité de l'image même chez les chiennes à pelage peu abondant [WOLFGANG 1994].

Toutefois, bien que l'examen échographique au niveau des flancs soit plus confortable pour l'examineur, la tonte à ce niveau est parfois mal perçue pour des raisons esthétiques. L'examen en région ventrale peut lui être préféré même s'il nécessite de tondre une zone bien plus large [ENGLAND, YEAGER et CONCANNON 2003, FONTBONNE 2005].

Si l'on peut s'abstenir de raser les chiennes peu velues, il faut alors presser plus fortement la sonde et appliquer une plus grande quantité de gel de contact, ce qui rend plus difficile le nettoyage de l'animal après l'examen [WOLFGANG 1994].

Chez les animaux gras, la qualité des images n'est souvent pas satisfaisante en dépit du rasage [WOLFGANG 1994, ENGLAND et CONCANNON 2002, FONTBONNE 2005].

4.1.2.6.2.2. La contention :

L'examen échographique des ovaires se fait de préférence sur animal debout, ou même avec la chienne couchée dorso-latéralement (cf. fig. 4.11), la sonde dans ce cas devra être positionnée au dessus de la paroi abdominale en région ventro-latérale [ENGLAND, YEAGER et CONCANNON 2003, FONTBONNE 2005].

Aucune sédation n'est nécessaire. Une respiration forcée ou un halètement intense peuvent entraîner une forte instabilité de l'image et compliquer l'interprétation. On peut réduire ou supprimer passagèrement les mouvements respiratoires en fermant la gueule ou en obstruant brièvement les naseaux de la chienne [WOLFGANG 1994].



Fig. 4.11: Examen échographique des ovaires de la chienne dans les différentes positions possible (d'après Fontbonne 2005).

4.1.2.6.2.3. Le choix de la sonde :

Sachant que les ovaires sont plaqués contre la paroi abdominale latérale, les sondes qui retranscrivent une image des organes superficielles avec un pouvoir de résolution élevé sont les mieux adaptées. En effet, l'utilisation de sondes de haute fréquence (>7MHz) est conseillé

afin d'obtenir une bonne résolution. Une fréquence de 5 ou 7.5MHz, choisie selon la taille de l'animal, peut néanmoins assurer un examen complet des ovaires [MAI 1999a].

Les sondes sectorielles sont souvent utilisées en médecine canine, et conviennent parfaitement à l'examen des ovaires chez la chienne [WOLFGANG 1994, MAI 1999a].

4.1.2.6.2.4. La recherche des images :

Elle s'effectue en observant l'écran et en mobilisant la sonde sur la région à échographier, afin de reconnaître les différentes coupes anatomiques que la sonde restitue, la situation, la morphologie et l'échostructure des ovaires. L'appareil est réglé afin d'affiner l'examen.

L'échographie transcutanée de l'abdomen offre aux ultrasons une incidence ventro-dorsale. Il faut se rappeler dans l'examen de l'image que sa partie proche de la sonde correspond à la partie inférieure de l'abdomen, et sa partie éloignée de la sonde aux portions dorsales du corps (cf. fig. 4.12). Les images obtenues dans ce cas sont ainsi « renversées » par rapport aux images obtenues par échographie transrectale chez la jument et la vache par exemple.

Dans l'échographie transrectale l'appareil génital est proche de la sonde et la vessie généralement plus éloignée. A l'inverse, dans l'échographie transcutanée des carnivores, la vessie est proche de la sonde et l'appareil génital est en bas de l'image [WOLFGANG 1994].

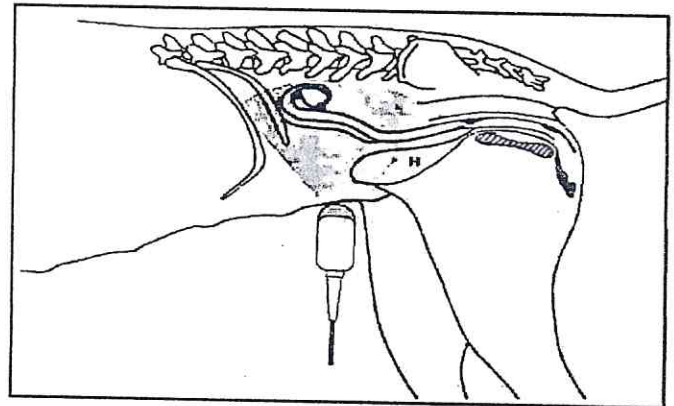


Fig. 4.12: Echographie sur une chienne debout utilisant une sonde sectorielle. H représente la vessie, localisé au dessous de l'utérus (d'après Wolfgang 1994).

L'examen échographique des organes génitaux internes doit se faire d'arrière en avant. Nous devons d'abord rechercher la vessie dans le bassin. Elle apparaît nettement comme un organe creux anéchogène (voir plus loin) et sert de point de repère. Pour l'échographie, il est avantageux que la vessie soit pleine car elle facilite l'examen en jouant le rôle de fenêtre acoustique [WOLFGANG 1994, MAI 1999a].

4.1.2.6.2.5. La lecture des images échographiques :

Quelques notions de sémiologie échographique doivent être rappelées afin de pouvoir faire la lecture des images échographiques des ovaires de la chienne

4.1.2.6.2.5.1. Rappels de sémiologie échographique :

L'image échographique résulte de l'analyse des échos qui reviennent à la sonde. Selon la modalité d'analyse des échos captés par le transducteur, on distingue les modes A (Amplitude), B (Brillance) et TM (Temps Mouvement).

En mode B le plan balayé par le faisceau ultrasonore est représenté sur un moniteur de télévision sous la forme d'une multitude de points. L'intensité de chaque point est proportionnelle à l'amplitude de l'écho correspondant. On obtient sur l'écran une image en deux dimensions, noire et blanc avec toute l'échelle des gris. C'est le mode le plus utilisé.

Les images des structures rencontrées en mode B sont :

Les structure liquidiennes (urine, sang, liquide folliculaire...) étant d'excellent transmetteurs sonores, ils apparaîtront comme des zones sans écho: anéchogènes (de couleur noire).

Le tissu mou est caractérisé par la répartition homogène des échos, qui apparaissent dans une zone de gris. Le parenchyme de chaque organe présente une échogénicité caractéristique, basée sur sa densité tissulaire et identifiée par l'intensité et la répartition des échos. Pour des réglages identiques, des parenchymes apparaîtront dans un ordre d'échogénicité croissante (les reins sont plus échogènes que le foie par exemple). Les masses graisseuses sont les tissus les plus échogènes, faciles à identifier car ils entraînent une atténuation franche en profondeur.

Les structures solides sont des formations denses (os, cartilage), qui réfléchissent quasiment toute l'énergie sonore. Leur surface apparaît hyperéchogène sur l'écran (de couleur blanche), suivie d'une zone dépourvue d'échos qui correspond à la forte atténuation du faisceau sonore.

Les gaz se comportent sur le plan sémiologique comme des solides et ne transmettent pas l'onde sonore.

Interfaces et parois : l'interface est une séparation entre deux structures, non matérialisée par une paroi histologique. Elle se traduit par une ligne échogène entre deux tissus d'échogénicité différentes, qui n'est visible que si le faisceau d'onde lui est parallèle. La paroi histologique est matérialisée sur l'écran par une ligne échogène semblable à l'interface, mais restera visible également si le faisceau ne lui est pas perpendiculaire.

4.1.2.6.2.5.2. Aspect échographique des ovaires de la chienne :

En fin d'œstrus, les ovaires de la chienne apparaissent hypoéchogènes, ils tendent à augmenter de taille et de petits follicules sphériques de 1 à 2mm remplis de liquide peuvent être observés. Cette situation peut se maintenir pendant 30 jours ou plus avant le début du pro-œstrus [ENGLAND, YEAGER et CONCANNON 2003].

Le nombre et la taille des follicules cavitaires augmente au cours du pro-œstrus (cf. photo 1, fig. 4.13), et les follicules ont un aspect anéchogène (noire) et sphérique, ils deviennent tout à fait évidents 5 jours avant l'ovulation. A ce moment là, le diamètre des follicules augmente pour atteindre la taille maximale, environ un jour après le pic de LH. Les plus grands follicules atteignent à ce moment là 8 à 9 mm (même jusqu'à 13mm) de diamètre, leur paroi devient plus irrégulière et ils deviennent saillants au dessus du stroma ovarien.

Plusieurs ou même tous les follicules qui apparaissaient jusque là anéchogènes sur les ovaires, sont typiquement remplacés par des structures hypoéchogènes ou échogènes au moment de l'ovulation, et semblent disparaître (cf. photo 2, fig. 4.13). Ce changement d'échogénicité est évident pendant un à deux jours, il peut être mis en évidence si les ovaires sont examinés quotidiennement [FONTBONNE 2004].

C'est le changement d'échogénicité des fluides folliculaires au moment de l'ovulation, accompagné de la diminution de la taille des follicules qui est à l'origine de ce changement. Cependant si l'ovulation n'a pas pu être constaté à l'échographie chez la chienne, ceci serait dû au fait que les follicules ne s'affaissent pas après leur rupture.

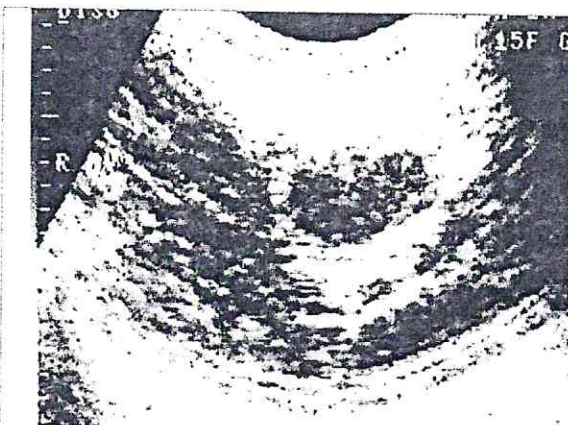
Encore que cette apparence échogène n'est que transitoire. Les corps jaunes s'installent rapidement, et comme ils contiennent des cavités remplies de liquides, des structures anéchogènes réapparaissent de nouveau 24 à 48h après l'ovulation (cf. photo 3, fig. 4.13). Ainsi, l'aspect échographique des follicules préovulatoires et des corps jaunes est sensiblement identique, à la différence des follicules, les corps jaunes sont entourés par des parois épaisses, et qui se développent au fur et mesure de leur formation [ENGLAND, YEAGER et CONCANNON 2003, FONTBONNE 2004].

PHOTO 01 : ECHOGRAPHIE OVARIENNE EN PHASE FOLLICULAIRE



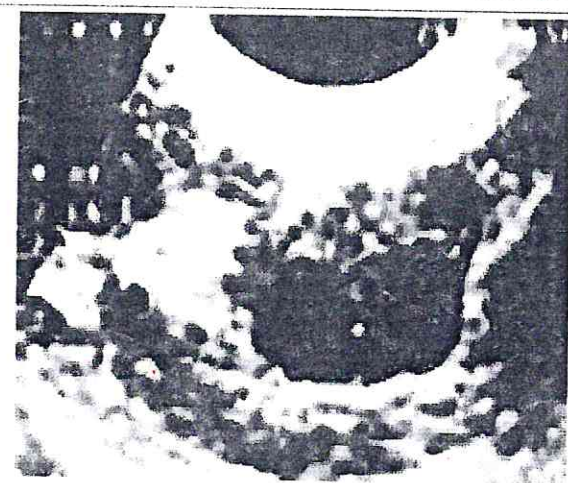
Ovaire droit d'une chienne Beagle examiné un jour après le pic de LH. L'ovaire apparaît sur un plan longitudinal. Trois larges follicules préovulatoires apparaissent sous forme de sphères anéchogènes à parois fines. Un des follicules est mesurée au niveau de son plus large diamètre par un compas électronique (x - x), il mesure 6mm un jour avant l'ovulation. L'échelle à gauche est graduée tous les 2mm.

PHOTO 02 : ECHOGRAPHIE OVARIENNE JUSTE APRES L'OVULATION



Ovaire droit (plan longitudinal) d'une chienne Beagle obtenue 2.5j après le pic de LH et juste après l'ovulation qui a eu lieu 2j après le pic de LH. Cet ovaire 0.5j après l'ovulation ne présente pas de follicule anéchogène distinct visible. Les dimensions de l'ovaire ont légèrement diminué comparés à ses dimensions un jour avant l'ovulation. L'échelle à gauche est graduée tous les 2mm.

PHOTO 03 : ECHOGRAPHIE OVARIENNE EN PHASE LUTEALE



Ovaire droit (plan longitudinal) d'une chienne Beagle 6j après le pic de LH et 4j après l'ovulation. L'ovaire contient au total 2 grandes, 2 moyennes et 2 petites structures anéchogènes avec des parois de diamètres différents. La petite structure anéchogène en bas de l'image mesure 4mm à son plus large diamètre, elle est considérée comme follicule non ovulé. Les autres structures anéchogènes ont des cavités fluides, elles représentent les corps jaunes en formation.

Fig. 4.13 : Photos d'échographies trans-abdominales en mode B d'ovaires de chienne avant et après l'ovulation (d'après *England, Yeager et Concannon 2003*).

Actuellement, l'utilisation de l'échographie ovarienne est sous-exploitée en pratique quant à la détermination de la période optimale de fécondabilité. Pourtant, cette technique est très séduisante car indolore, elle ne nécessite pas l'anesthésie de l'animal, et aucune conséquence biologique néfaste n'a à ce jour été mise en évidence sur les tissus échographiés.

Avec un matériel performant, elle pourrait permettre d'identifier avec plus de précision le moment de l'ovulation et de programmer des inséminations dans un délai de deux à quatre jours. D'après *Fontbonne et al.* (2004), c'est la seule méthode qui permet de voir en temps réel ce qui se passe dans les ovaires (troubles de l'ovulation, existence de kystes) et autorise le comptage des follicules sur une chienne âgée pour laquelle on peut décider, le cas échéant, de ne pas saillir [ENGLAND et CONCANNON 2002, ENGLAND, YEAGER et CONCANNON 2003, FONTBONNE et al. 2004, SAUZAY 2005, FONTBONNE 2005 et 2006].

4.2. Les protocoles de suivi des chaleurs :

Si la chienne accepte souvent l'accouplement pendant une longue période, pouvant aller jusqu'à une dizaine de jours, sa période de fertilité est plus brève. Le comportement d'œstrus n'est donc pas un bon indicateur du choix du moment de la saillie ou de l'insémination.

Expérimentalement, il a même été démontré, grâce à l'utilisation de colorants radio-opaques infusés dans le vagin, que le col utérin de la chienne reste ouvert au maximum six jours après le pic de LH, et qu'il peut être fermé à des moments où la chienne accepte les mâles. En d'autres termes, l'accouplement peut avoir lieu sur une longue période, mais les spermatozoïdes ne seraient capables de pénétrer dans l'utérus que pendant une période restreinte de l'œstrus [FONTBONNE et al. 2000].

Les tests complémentaires tels que les frottis vaginaux et l'examen endoscopique des parois vaginales sont intéressants pour mieux repérer la période péri-ovulatoire, mais ne sont pas suffisamment précis pour déterminer avec certitude la période de fécondabilité.

Les dosages de la progestérone plasmatique représentent actuellement l'examen de choix pour déterminer la période optimale de fécondabilité. Cependant, en plus de leur coût élevé, les taux de progestéronémie au moment optimal sont très variables selon les individus. Il n'est donc pas possible de déterminer cette période à l'aide des seuls dosages de la progestérone.

Lors d'un suivi de chaleurs, plusieurs éléments doivent être pris en compte, l'anamnèse et l'examen clinique de la chienne comptent autant que les examens complémentaires [FONTBONNE et al. 2000].

Il est clair donc que la mise en évidence de la période optimale de fécondabilité n'est pas une mission facile. D'une part, la chienne présente une variabilité physiologique liée à la longueur du pro-œstrus et de l'œstrus, et d'autre part aucun examen n'est suffisamment spécifique, les chercheurs sont conduits à varier les tests mais aucune association d'examens ne semble avoir montré de réelle supériorité par rapport aux autres. Il faut donc chercher surtout à cumuler les indices [FONTBONNE et al. 2000, ENGLAND et CONCANNON 2002].

Déterminer le début de l'œstrus ne permet pas de dater la période optimale de fécondabilité. Toutefois, l'intervalle qui sépare le pic de LH de l'ovulation, ainsi que l'intervalle qui sépare l'ovulation du début de la période de fécondabilité sont relativement constants dans l'espèce canine (cf. tableau 4.5). De là sont nés différents protocoles de suivi des chaleurs combinant à la fois divers examens complémentaires, tout en essayant de tirer le maximum de données de chacun d'entre eux séparément [FONTBONNE et al. 2000, ENGLAND et CONCANNON 2002].

Tableau 4.5 : Tableau récapitulatif des principaux événements se produisant pendant le pro-œstrus et l'œstrus de la chienne (d'après *England* et *Concannon* 2002).

Modifications cliniques et physiologiques par rapport au statu de fertilité de la chienne	Jours par rapport au pic de LH
Début d'augmentation de l'œstrogénémie.	J-40 à J-6
Début d'observation des signes de pro-œstrus (turgescence de la vulve, écoulement sérosanguinolent).	J-28 à J-3
Augmentation de l'œdème, de la kératinisation et de l'hyperplasie vaginale.	-
Augmentation de la turgescence vulvaire.	-
Pic de l'indice éosinophile sur les frottis vaginaux.	J-10 à J-3
L'hyperplasie vaginale et la kératinisation atteignent leur maximum.	J-3 à J0
Turgescence vulvaire et œstrogénémie maximales.	J-3 à J-1
Début de la période fertile.	J-3
Diminution de l'œstrogénémie.	J-2 à J0
Pic de LH. Augmentation de la progestérone jusqu'à 0.9 à 3ng/ml.	J0
Diminution de la turgescence vulvaire. Diminution de l'œdème vaginal et apparition des plis.	J0 à J1
Début du comportement d'œstrus (depuis J-3 jusqu'à J+7) en moyenne J0 à J1.	Variable
Ovulation (s) + progestéronémie = 2 à 8ng/ml.	J2
Accentuation des plis vaginaux.	J3 à J6
Maturation ovocytaire dans l'oviducte.	J4 à J5
Début de la période de fécondabilité.	J4 à J5
Les plis vaginaux atteignent le maximum de plicature.	J3 à J5
Pic de desquamation des cellules épithéliales.	J4 à J6
Aplatissement des plis de la muqueuse vaginale.	J5 à J6
Augmentation de la progestérone jusqu'à 8 ou 20ng/ml.	J6
Fin de la période optimale de fertilité.	J6
Diminution de l'indice éosinophile.	J7 à J10
Fin de la période de fécondabilité et de fertilité.	J7 à J10
Réapparition des leucocytes dans les frottis vaginaux.	J7 à J10
Fin de l'œstrus cytologique, premier jour de métœstrus.	J7 à J10
Arrêt des écoulements sérosanguinolents.	variable
Fin du comportement d'œstrus (en moyenne le 9 ^e jour).	variable
Implantation.	J21 à J22
Diagnostic de gestation par échographie des battements cardiaques des fœtus.	J25 à J28
Parturition.	J64 à J66

Ainsi, de multiples combinaisons entre les marqueurs des chaleurs sont retrouvées dans la littérature. Néanmoins, suivant l'objectif à atteindre, tous les protocoles s'inscrivent dans l'une des optiques suivantes :

Soit que le protocole est à visé clinique, dans un contexte de suivi de la reproduction en clientèle ou en élevage canin [PHEMISTER *et al.* 1973, FONTBONNE 1996, GUERIN *et al.* 1997, FONTBONNE et GUERIN 2003]. Dans ce cas, le protocole doit répondre aux exigences de la pratique; c'est-à-dire la simplicité d'utilisation et la rapidité d'obtention des résultats avec un minimum de frais. A l'examen clinique sont combinés les frottis vaginaux et le dosage de la progestérone (voir plus loin). Là, on remarque surtout l'utilisation des kits de commerce pour les frottis vaginaux (tel que Diff-Quick® et Diagnœstrus®), et les kits de dosage semi-quantitatif de la progestérone (tel que Ovulation-test®) [TAINTURIER 2001].

Soit que le protocole est à visé expérimentale, dans le cadre de la recherche relative aux biotechnologies de la reproduction chez les canidés domestiques et sauvages [DOLF *et al.* 2000, REYNAUD *et al.* 2004b, CHASTANT-MAILLARD *et al.* 2005, DURRANT *et al.* 2006], ou celle permettant d'approfondir les recherches fondamentales sur les affections héréditaires homologues entre l'homme et le chien [ANDRE et GALIBERT 2005, CONCANNON 2005]. Dans ce cas, le protocole exige la précision et l'exactitude dans la détermination du moment de l'ovulation. Les techniques les plus précises, tel que le dosage quantitatif de LH ou l'échographie ovarienne, sont employés en plus du des frottis vaginaux et du dosage de la progestérone. Ici, la coloration des frottis vaginaux se fait par les techniques de référence, et la progestéronémie est mesurée par un dosage quantitatif.

Les deux sous paragraphes suivants décrivent des exemples de protocoles utilisés à des fins cliniques pour le premier, et à des fins de recherche pour le second.

❁ Protocoles de suivi de chaleurs à visé clinique :

Prenons par exemple le Centre d'Etudes en Reproduction Canine Assistée (CERCA, France). Les frottis vaginaux et le dosage de la progestérone sont systématiquement employés en parallèle afin de déterminer la date de la saillie ou de l'insémination artificielle. Le personnel applique théoriquement le protocole suivant [GUERIN *et al.* 1997, BARONE 2006] :

Lors de la première visite, les commémoratifs sont prélevés. En considérant le premier jour des écoulements vulvaires comme le premier jour des chaleurs, un frottis vaginal est effectué vers le 5^e ou 6^e jour des chaleurs. Le frottis est réalisé par écouvillonnage profond du vagin. Les cellules sont étalées sur lame puis colorés par la technique de Harris-Shorr, afin d'évaluer par un examen microscopique le degré de kératinisation des cellules. La taille et la forme des cellules, l'aspect de leur noyau, la présence d'hématies ou de polynucléaires et l'indice éosinophile sont notées [GUERIN *et al.* 1997, LUC 2005, BARONE 2006].

En fonction de l'aspect du frottis évoquant un pro-œstrus ou un œstrus, ils procèdent soit à un nouveau frottis 2 à 5 jours plus tard, soit à un dosage de la progestéronémie (cf. fig. 4. 14). Cependant, celui-ci a tendance à se généraliser et est effectué quasi systématiquement, sans tenir compte du frottis vaginal [BARONE 2006]. En effet, le dosage de la progestérone est considéré comme la méthode la plus précise pour détecter le moment de l'accouplement. D'ailleurs, en cas de discordance entre le frottis vaginal et le dosage de la progestérone, c'est ce dernier qui prime [FONTBONNE et GUERIN 2003].

Le prélèvement sanguin est effectué sur tube hépariné en vue du dosage de la progestéronémie plasmatique réalisé dans la journée. Le CERCA emploie un test d'électrochimiluminescence qui s'utilise sur un analyseur automate Elecsys (Roche diagnostics, Meylan, France). Son domaine de mesure est compris entre 0.030ng/ml et 60.00ng/ml. Cet automate est capable de réaliser une analyse en 18 minutes seulement [BARONE 2006].

Les chiennes sont examinées de 48h en 48h jusqu'à ce que le taux de progestérone dépasse 6ng/ml, valeur prise comme témoin de l'ovulation. Les saillies ou inséminations sont pratiquées deux jours après l'obtention de cette valeur et répétées, dans la mesure du possible, 48h plus tard [BARONE 2006].

Les chiennes dont la progestéronémie n'atteint pas la valeur de 6ng/ml alors que l'indice éosinophile a chuté sont considérés comme n'ayant pas ovulés [GUERIN et al. 1997].

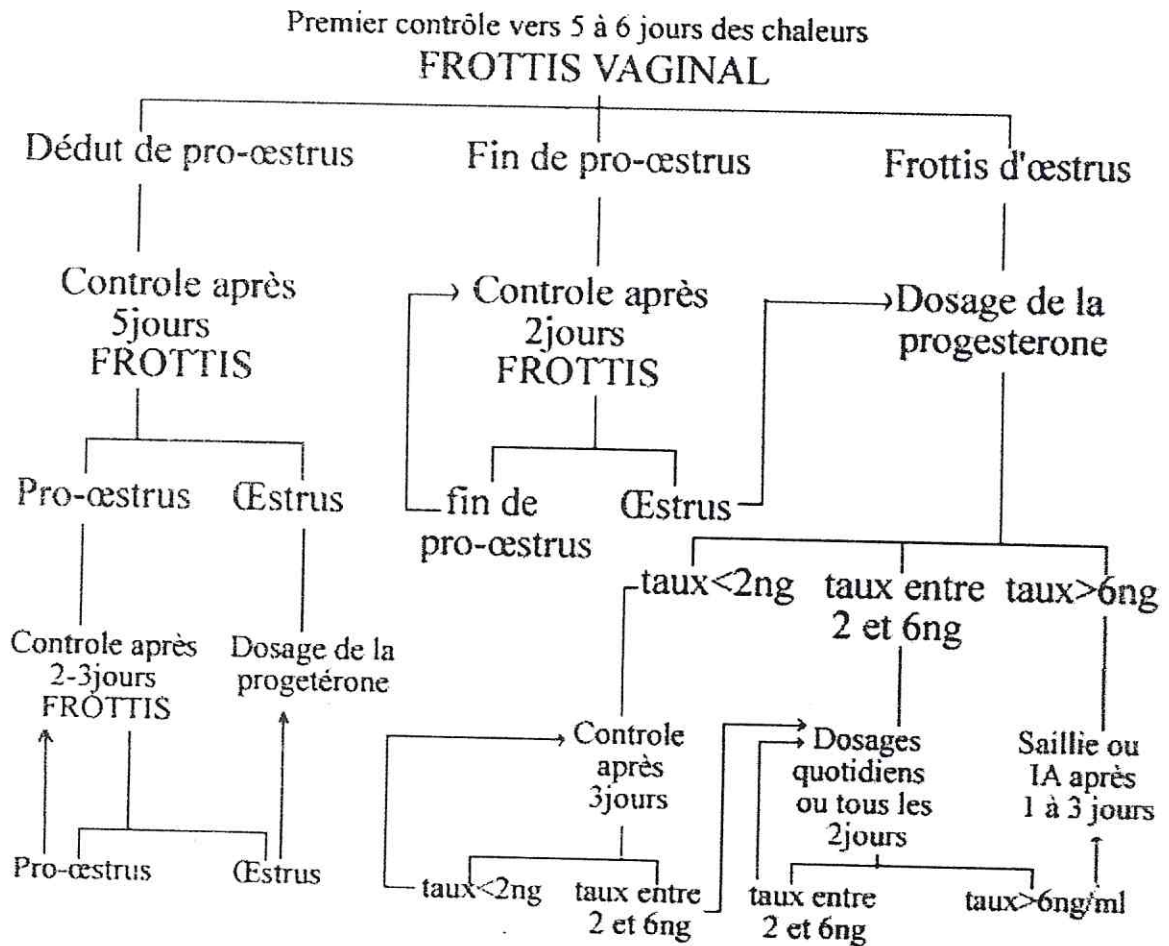


Fig. 4.14: Protocole de suivi de chaleurs utilisé au CERCA (d'après Fontbonne 1996a).

❖ **Protocoles expérimentaux de suivi des chaleurs :**

Prenons par exemple le protocole expérimental employé par Reynaud et al. (2005b) dans le cadre de l'étude *in vivo* de la reprise de la méiose, de la fécondation et du développement embryonnaire chez la chienne.

Les cinquante chiennes en expérimentation étaient soumises à un suivi hebdomadaire par frottis vaginaux. Le début des chaleurs était déterminé par l'observation des écoulements sanguins à la vulve. Durant les chaleurs, le taux de progestérone sérique était mesuré quotidiennement. Le dosage était effectué à l'aide du kit Elecsys (Roche Diagnostics, Meylan, France). Une fois que la progestéronémie commence à augmenter au-dessus de 2ng/ml, deux à trois échographies ovariennes (échographe HDI 3500, sonde de 7.5MHz, ATL, Phillips Systèmes Médicaux, Suresnes, France) étaient réalisées quotidiennement jusqu'à constatation de l'ovulation [REYNAUD et al. 2005b].

4.3. Les perspectives d'avenir :

Sur le plan de la reproduction, la chienne est une espèce particulière, rappelons-le, par son endocrinologie, sa physiologie ovarienne, sa maturation ovocytaire et son développement embryonnaire.

Durant ces trente dernières années, les recherches concernant la physiologie de la reproduction chez la chienne étaient surtout centrés sur les aspects endocriniens et les avancées cliniques. Les recherches actuelles visent maintenant à améliorer les connaissances fondamentales, notamment celles concernant les mécanismes de l'ovulation et de la maturation ovocytaire [REYNAUD et *al.* 2005a].

Dans le cadre du suivi des chaleurs, la compréhension du phénomène de l'ovulation permet de cerner le moment où elle se produit. L'adaptation de l'échographie ovarienne à l'espèce canine a permis de suivre directement, en temps réel et sans danger pour la chienne, les remaniements folliculaires aboutissant à l'expulsion des ovocytes.

La possibilité de renouvellement illimité de cet examen, la lecture immédiate des images échographiques et donc des résultats, ainsi que tous les renseignements apportés par ce marqueur du cycle de la chienne, en font l'outil diagnostique le plus prometteur dans l'avenir.

Et si l'échographie ovarienne est déjà systématiquement utilisée au cours des protocoles expérimentaux de suivi des chaleurs [DUMASY 2001, ENGLAND et CONCANNON 2002, REYNAUD et *al.* 2005b], certains auteurs parlent de vulgarisation de cette technique en pratique courante. Un protocole s'appuyant sur des frottis vaginaux jusqu'à indication de l'entrée en œstrus, puis dosage de la progestérone jusqu'à augmentation de cette dernière (au delà de 2ng/ml), ensuite deux échographies quotidiennes (à défaut au moins une) jusqu'à constatation de l'ovulation, est entrevu comme protocole d'avenir [FONTBONNE et *al.* 2004, SAUZAY 2005].

CHAPITRE 5. LA MAITRISE DU CYCLE ŒSTRAL :

La connaissance de la physiologie sexuelle de l'espèce canine, donc la maîtrise de sa reproduction, est très en retard par rapport aux autres espèces d'animaux domestiques. En effet, chez un grand nombre d'espèces domestiques, les biotechnologies de la reproduction en sont à leur quatrième génération. Le transfert embryonnaire et la production d'embryons *in vitro* sont maîtrisés et le clonage a déjà été réalisé, même si les rendements sont variables selon les espèces. Chez le chien, la technique de reproduction la plus avancée est une biotechnologie de première génération « l'insémination artificielle en semence congelée » [FONTBONNE et al. 2000, CHASTANT- MAILLARD et al. 2005].

Plusieurs raisons peuvent expliquer ce retard de l'espèce canine. Tout d'abord, les implications économiques sont moindres, comparativement aux ruminants, ce qui explique le peu d'intérêt des chercheurs. L'espèce canine présente en outre de nombreux obstacles physiologiques : le cycle est particulièrement long (environ six mois) et la physiologie de l'ovocyte est différente de celle des autres mammifères. En particulier l'ovulation a lieu en présence d'un taux déjà élevé de progestérone car le follicule subit une lutéinisation préovulatoire. L'ovulation libère en outre chez la chienne des ovocytes diploïdes, donc encore immatures et non fécondables (alors qu'ils sont directement haploïdes chez les autres mammifères), quarante huit à soixante heures sont nécessaires pour qu'ils deviennent haploïdes et fécondables [CHASTANT- MAILLARD et al. 2005].

Le matériel biologique nécessaire aux expériences est rare. Chez les espèces consommées pour leur viande, l'abattoir permet de collecter de nombreux ovaires, ce qui n'est évidemment pas le cas chez la chienne. Toutes ces difficultés concourent à ce que peu d'équipes dans le monde travaillent à la mise au point de nouvelles biotechnologies de la reproduction dans l'espèce canine [CHASTANT- MAILLARD et al. 2005].

L'intérêt récemment apparu est à corréler à l'importance sociétale croissante prise par le chien, ainsi qu'à la volonté de sauvegarde des canidés en voie de disparition (lycaon, loup rouge, loup mexicain, fennec, coyote, certains renards, certaines ourses, etc.) pour lesquels le chien domestique représente un modèle [DOLF et al. 2000, CHASTANT- MAILLARD et al. 2005, DURRANT et al. 2006].

Ainsi que les intérêts mutuels en médecine vétérinaire et humaine de la génétique canine quant aux recherches menées sur l'héritabilité ou les maladies d'origine génétique, pour lesquels les chiennes qui appartiennent à des colonies sont retenues comme modèle expérimental. En effet, le chien développe des affections spontanées analogues à celles de l'Homme (sur le plan clinique et physiologique), au contraire de la souris chez qui les modèles, bien souvent induits, ne sont pas les « vrais » analogues des maladies humaines [ANDRE et GALIBERT 2005, CONCANNON 2005].

Néanmoins, la maîtrise de la reproduction chez la chienne nécessite la mise en place d'un suivi de l'ovulation. Ce dernier s'inscrit comme une étape préliminaire quel qu'en soit l'objectif à atteindre.

5.1. L'induction des chaleurs :

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 inter-œstral anormalement prolongé est observé (plus de 10 mois), non seulement en provoquant l'œstrus, mais surtout en induisant une ovulation, suivie d'une fécondation et d'une gestation qui aboutit à la naissance de chiots en bonne santé. Un second objectif 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 la mise en œuvre des différentes biotechnologies de la reproduction tel que le transfert embryonnaire. Cependant, il n'existe pas actuellement de protocole fiable, simple et économique permettant d'induire des chaleurs et des ovulations fertiles, à un instant donné précis [BUFF 2000, CHAFFAUX et BAZILE 2001, KUTZLER 2005].

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 (*Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*) et la hCG (*Human Chorionic Gonadotropin*) dépasse rarement les 50%, et le pourcentage de gestations obtenues est généralement d'environ 20 à 30% [BUFF 2000, KUTZLER 2005]. L'utilisation de la FSH seule donne des résultats moins satisfaisants que la PMSG. L'association du diéthylstilbestrol à la FSH semble améliorer les résultats, avec 70% d'inductions, 46% d'ovulations mais seulement 20% de gestations [BOUCHARD et GROSS 1993, BUFF 2000].

L'administration de GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) ou d'agonistes de GnRH est possible lorsque le fonctionnement de l'axe hypophyse-ovaire est conservé. Ce traitement a permis d'obtenir 37 à 85% de gestations chez les chiennes traitées [BUFF 2000]. Cependant, le même traitement administré chez des renardes en fin d'œstrus provoque des chaleurs synchronisées mais à fertilité nulle [CHAFFAUX et BAZILE 2001, KUTZLER 2005].

Plus récemment, l'utilisation d'inhibiteurs de la prolactine à effet dopaminergique (bromocriptine, métergoline, cabergoline) a ouvert une nouvelle possibilité d'induction de l'œstrus. L'administration prolongée de bromocriptine par voie orale a permis d'obtenir une réduction de la durée de l'inter-œstrus par interruption précoce de la phase lutéale et de l'œstrus. Après trois à quatre mois de traitement en moyenne, un taux de 62% de gestation a été observé. La cabergoline administrée par voie orale pendant 7 à 10 jours à des chiennes vivant en chenil a permis d'obtenir des taux de gestation de 93 à 100% [BUFF 2000].

La mise en œuvre d'un protocole d'induction de l'œstrus ne devrait jamais être dissociée de la réalisation d'un suivi convenable de l'ovulation, de même, lorsque une ovulation est confirmée, mais que l'on observe un refus de l'accouplement, il convient de recourir à l'insémination artificielle.

5.2. La synchronisation des chaleurs :

L'indication majeure de la synchronisation des chaleurs chez la chienne, s'incère dans le cadre des programmes de transfert embryonnaire [KUTZLER 2005].

Un protocole de synchronisation a été établi par combinaison entre FSH et LH mais sans succès. L'utilisation conjointe de diéthylstilbestrol a permis d'induire des chaleurs fertiles mais non synchronisées [FONTBONNE 1995, KUTZLER 2005].

De même, la prolactine participe dans la détermination de la durée de l'œstrus, probablement en influençant la sécrétion des gonadotrophines et/ou la réponse ovarienne à leur égard. Cependant, l'effet des anti-prolactines varie considérablement suivant le stade du cycle auquel le traitement débute. Plus le traitement est entrepris tardivement dans l'œstrus,

plus rapidement surviennent les chaleurs. Pour un groupe de femelles, les œstrus sont donc difficilement synchronisables par ce type de traitement [CHAFFAUX et BAZILE 2001, KUTZLER 2005, CHASTANT- MAILLARD *et al.* 2005].

5.3. La superovulation :

La chienne ne répond pas ou mal aux traitements hormonaux de superovulation classiquement utilisés (FSH). Il est donc difficile d'augmenter le nombre de descendants par femelle [CHASTANT- MAILLARD *et al.* 2005].

5.4. L'insémination artificielle (IA) :

La première insémination artificielle de chienne à l'aide de semence fraîche a été réalisée en Italie en 1787 par l'abbé *Spallanzani*. Par la suite, il a fallu attendre le développement de la cynophilie dans les années 1970 pour voir apparaître aux Etats-Unis la première portée de chiots nés à partir d'insémination artificielle en sperme congelé. Ce n'est cependant que depuis une vingtaine d'années que les indications exactes et les services rendus par cette technique de reproduction assistée ont été précisés [FONTBONNE 1995, TAINTURIER *et al.* 2003].

En effet, l'insémination artificielle s'avère très utile voire indispensable en cas d'hypofertilité mâle, ou d'impossibilité de réalisation d'une saillie quand la femelle est dominante ou agressive.

Elle autorise la prévention contre la diffusion de maladies vénériennes infectieuses contagieuses comme la vaginite, la balanoposthite et la séropositivité à l'herpès virose canine.

Elle permet également de répondre à des indications zoologiques, voire génétiques en permettant une meilleure exploitation des étalons à potentiel génétique élevé dans le cadre de la sélection et de l'amélioration génétique des races. Ainsi que la reproduction de races de chiens à très faibles effectifs, voire à des races en voie d'extinction.

L'insémination artificielle peut être réalisée soit à l'aide de semence fraîchement prélevée, ou bien après conditionnement sous régime du froid qui permet sa conservation.

En effet, la semence réfrigérée peut être conservée pendant 48h ou même plus, et la semence congelée peut être conservée pour une durée quasi illimitée.

Suivant le type de semence utilisée (fraîche, réfrigérée ou congelée), plusieurs méthodes d'insémination existent. L'insémination à l'aide de semence fraîche ou réfrigérée donne d'assez bons résultats en général une fois déposés au fond du vagin de la chienne (cf. tableau 5.1). La semence congelée nécessite par contre d'être déposée dans l'utérus de cette dernière.

Tableau 5.1 : Fertilité et prolificité après insémination artificielle (IA) intra vaginale ou intra utérine à l'aide de semence fraîche, réfrigérée ou congelée chez la chienne (d'après *Linde-Forsberg* 2001).

Type de semence	% des mises bas		Nombre de chiots	
	IA Intra-vaginale	IA Intra-utérine	IA Intra-vaginale	IA Intra-utérine
Fraîche	47.8	65.2	5.8 ± 2.8	6.5 ± 2.5
Réfrigérée	45.1	65.6	5.8 ± 3.0	6.4 ± 3.2
Congelée	34.6	52.0	4.7 ± 2.6	5.0 ± 3.2

Le moment de l'insémination artificielle est différent en fonction du mode d'insémination choisi (cf. tableau 5.2). Un suivi rigoureux des chaleurs permet de préciser la période optimale de fécondabilité pour chaque technique. Surtout lors de l'utilisation

d'insémination artificielle en semence congelée dont la durée de vie du sperme (après décongélation) est considérablement raccourci (environ 12 à 24h contre 48h pour la semence réfrigérée et 3 à 7 jours pour la semence fraîche) [TAINTURIER *et al.* 2003].

Tableau 5.2 : Le moment optimal pour l'insémination suivant la méthode utilisée (d'après England et Concannon 2002).

Méthode d'insémination	Moment optimal pour l'insémination
IA en semence fraîche	3 à 6 jours après le pic de LH (1 à 4 jours après l'ovulation).
IA en semence réfrigérée	4 à 6 jours après le pic de LH (2 à 4 jours après l'ovulation).
IA en semence congelée	5 à 6 jours après le pic de LH (3 à 4 jours après l'ovulation).

Quelque soit le type d'insémination (en semence fraîche, réfrigérée ou congelée), on retrouve trois étapes clés : le suivi des chaleurs de la chienne et la détermination du moment de l'ovulation, le prélèvement et l'examen de la semence du mâle (éventuellement sa congélation à -196°C) et l'insémination proprement dite [BADINAND 1990, TAINURIER *et al.* 2003].

5.4. Le transfert embryonnaire :

Chez la chienne, le transfert d'embryon est encore à un stade expérimental. Le peu d'essais réalisés ont porté sur un nombre restreint de femelles (au mieux une dizaine) selon des modalités variées (stade de l'embryon, transfert dans l'oviducte ou dans l'utérus, etc.). Le rendement des collectes effectuées par rinçage de l'utérus ou des oviductes est faible, 30 à 40% des embryons formés sont récupérés. Néanmoins, 90% des embryons collectés sont viables [CHASTANT- MAILLARD *et al.* 2005].

L'étude la plus porteuse d'espoirs est celle de Tsutsui *et al.* (2001), le transfert d'embryons collectés du stade huit cellules au stade blastocyste (huit à onze jours après l'ovulation) dans l'utérus de 21 femelles receveuses ont permis un taux de gestation de 57%. Environ la moitié des embryons transférés chez les femelles gestantes ont donné naissance à des chiots.

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 (comme c'est le cas dans beaucoup d'espèces), la technique autorisera les échanges et la conservation de matériel génétique. Elle rendrait aussi possible le diagnostic de tares génétiques (diagnostic pré-implantatoire ou DPI). Cette technique existe pour l'embryon humain. Chez le chien, les gènes responsables de plusieurs tares sont connus et recherchés chez l'adulte, ils pourraient donc l'être chez l'embryon [CHASTANT- MAILLARD *et al.* 2005].

5.5. La récolte d'ovocytes :

La récolte d'ovocytes avant l'ovulation, donc directement au sein de l'ovaire n'est faisable qu'après une ovariectomie et ne présente donc un intérêt qu'immédiatement après la mort d'une chienne, ou éventuellement avant un traitement stérilisant (chimio ou radiothérapie) afin d'obtenir une portée supplémentaire. Cette solution ne peut être retenue pour les chiennes saines qui doivent rester des reproductrices à long terme.

Chez les bovins, il est possible de collecter des ovocytes directement dans l'ovaire par ponction folliculaire sous contrôle échographique ou, moins couramment, endoscopique (*Ovum Pick-Up* ou OPU). Les vaches peuvent être ainsi prélevées pendant plusieurs mois sans conséquences pour leur fertilité ultérieure.

Chez la chienne, cette technique n'a jamais été décrite. Des considérations anatomiques et physiologiques rendent sa réalisation plus difficile que chez les grands animaux. En effet, la chienne présente des follicules de petite taille (au maximum 7mm de diamètre contre 2cm chez la vache), et les follicules ne sont ponctionnables que pendant environ une semaine seulement sur toute la durée d'un cycle (six mois), sans possibilité hormonale d'augmenter le nombre de follicules (superovulation) [CHASTANT- MAILLARD *et al.* 2005].

5.6. La maturation in vitro (MIV) :

Du point de vue zootechnique, la technique de MIV permet non seulement d'obtenir un grand nombre de descendants d'une femelle et de diffuser plus largement son potentiel génétique, mais aussi de raccourcir l'intervalle entre générations, les ovocytes pouvant être ponctionnés sur l'animal prépubère. Si la technique de la MIV a été mise au point dans de nombreuses espèces animales, la chienne fait exception.

Les taux de MIV, de 10 à 20% en moyenne, sont beaucoup plus faibles que ceux de 80 à 90% obtenus chez les bovins. La maturation in vitro, plus lente, est obtenue en 48 à 96heurs de culture au lieu de 24heurs chez les bovins. La plupart des ovocytes canins mis en culture ne l'entament même pas, et environ 25% dégèrent [YAMADA *et al.* 1992, HEWITT *et al.* 1998, VIARIS DE LESEGNO *et al.* 2005, CHASTANT MAILLARD *et al.* 2005].

Les raisons de ce faible taux de maturation et les facteurs responsables du délai de la reprise de la méiose sont encore inconnus. La mise au point de la MIV chez la chienne permettrait pourtant d'accroître les connaissances fondamentales et d'approfondir les connaissances cliniques; elle est le point de passage obligé pour le développement d'autres biotechnologies de la reproduction, telles que la production d'embryons *in vitro*. Les applications qui en découlent 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).

5.7. La fécondation in vitro (FIV) :

Alors que les taux de fécondation atteints chez les bovins sont de l'ordre de 80 à 90%, ils sont très faibles chez la chienne, entre 10 et 20%. Un fort taux de polyspermie est en outre constaté, plus d'un spermatozoïde pénètre l'ovocyte, ce qui est incompatible avec le développement embryonnaire.

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 (six à huit jours chez les bovins, deux à six jours chez l'homme) sont ensuite transférés dans l'utérus de femelles receveuses. Le cycle de celle-ci doit être synchrone avec l'âge de l'embryon transféré.

Trente pour cent d'embryons correctement développés (stade blastocyste) sont couramment obtenus chez la vache de J6 à J8 et leur transfert donne lieu à 50% de naissances. Chez la chienne, la réalisation de telles manipulations reste du domaine de la recherche et aucune des étapes n'est au point. Ainsi, *Otoi et al.* en 2000 ont obtenu un blastocyste (J9) à partir de 217 ovocytes en maturation. Après la mise en maturation de 169 ovocytes, leur

fécondation *in vitro* puis le transfert de 90 embryons chez une seule receveuse. *England et al.* en 2001 ont obtenu une gestation de trois conceptus, qui sont morts après vingt et un jours.

La technique d'ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*) est couramment employée chez l'homme pour traiter l'infertilité (en alternative à la fécondation *in vitro* simple). Dans l'espèce canine cette technique a été décrite une seule fois. 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 [CHASTANT- MAILLARD *et al.* 2005].

5.8. Le clonage :

Le clonage fait actuellement appel à la technique de transfert nucléaire à partir de cellules somatiques prélevées chez un individu adulte.

Des naissances ont ainsi déjà été obtenues chez plusieurs espèces (bovin, porc, chèvre, souris, lapin, rat, mule, cheval, chat), à la suite de la brebis *Dolly*. Les rendements sont faibles, puisqu'en moyenne 100 à 400 embryons doivent être reconstitués pour obtenir la naissance d'un individu.

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%) [CHASTANT- MAILLARD *et al.* 2005].

Les particularités anatomophysiologiques de la chienne ont participé à son retard en matière de biotechnologies de la reproduction.

Nous venons de voir que plusieurs protocoles d'induction et de synchronisation des chaleurs ont été mis au point. Cependant, leurs résultats demeurent variables. Seul un suivi rigoureux des chaleurs permet 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.

D'autre part, nous venons de voir que les techniques d'insémination artificielles provoquent la réduction de la durée de vie des spermatozoïdes. Ce qui réduit la durée de la période de fertilité de la chienne qui, dans le cas d'insémination artificielle en semence congelée, se rapproche étroitement de la durée de la période de fécondabilité. Dans ce cas encore, un suivi précis des chaleurs s'impose.

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 approprié des chaleurs.

Pour cela, dans notre étude, nous avons choisi de mettre en application, durant la partie expérimentale, un protocole de suivi de chaleurs. Nous avons choisi d'expérimenter certaines méthodes de référence, afin de réaliser un suivi de chaleurs, le plus objectif possible. Le mode opératoire, les résultats et les conclusions ressortis seront exposés durant la deuxième partie de ce travail.

**II. ETUDE
EXPERIMENTALE**

II.1.Objectifs :

Le suivi des chaleurs chez la chienne a pour objectif de localiser la période optimale de fécondité dans le temps.

Nous avons suivi seize chiennes durant la période de l'expérimentation, en appliquant deux marqueurs fiables des chaleurs, à savoir l'examen du frottis vaginal et la mesure de la progestérone plasmatique. Nous avons essayé de localiser le moment des ovulations et la période optimale de fécondabilité pour toutes les chiennes entrées en chaleurs.

Nous avons apprécié les résultats fournis par chacun des deux marqueurs indépendamment de l'autre dans le but d'évaluer leur efficacité. Alors que l'examen du frottis vaginal représente l'avantage d'être moins onéreux, son manque de précision a conduit, tel que décrit dans la littérature, à l'associer au dosage de la progestérone plasmatique. Cette association est sensée être alternative et complémentaire.

Dans notre étude, nous avons essayé de pousser l'exploitation des frottis vaginaux par la recherche de critères permettant d'évaluer la progestéronémie en dessous de certains seuils, dans le but de limiter les dosages de la progestérone, et donc, de limiter les frais.

II.2. Animaux, matériel et méthode :

II.2.1. Le lieu d'expérimentation (CFC/GN) :

L'expérimentation a été réalisée au niveau du Centre de Formation Cynotechnique de la Gendarmerie Nationale (CFC/GN), situé au niveau de la forêt de Bainem à Alger.

Le CFC/GN est un centre spécialisé de la Gendarmerie Nationale, chargée de la formation dans le domaine de la cynotechnie ou l'emploi militaire des chiens.

Pour chaque chienne, le CFC/GN a créé un dossier sur lequel étaient mentionnées le nom et la race de la chienne, sa date et son lieu de naissance, sa provenance ainsi que son pedigree si ce dernier était disponible. A chaque chienne correspondait un numéro d'immatriculation propre au centre ainsi qu'un numéro de tatouage.

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 accompagnés 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.

Aucun protocole de suivi des chaleurs n'a été appliqué jusqu'ici au niveau du centre. Les saillies étaient programmées suite à la seule observation des écoulements sanguins. Une à deux saillies étaient effectuées douze à quatorze jours après le début de l'écoulement sanguin. Un dénombrement des fœtus par radiographie était réalisé peu avant la date présumée de mise bas. Les chiennes gravides étaient ensuite suivies durant la mise bas, et jusqu'au sevrage des chiots.

II.2.2.Les animaux :

Parmi l'effectif du CFC/GN, nous avons sélectionné 16 chiennes pour le suivi des chaleurs (cf. annexe 01) selon certains critères.

Nous avons choisis les chiennes qui ont un format moyen (taille au garrot entre 55 et 60cm), en bon état d'embonpoint, et ne présentant aucune atteinte pathologique décelable cliniquement. Les chiennes naines ainsi que celles présentant une maladie quelconque étaient écartées.

Aucune sélection en fonction de la race n'a été établie. L'effectif réuni de ce fait plusieurs races de chiennes dont une chienne Berger de l'Atlas, dix Berger Allemand, deux

Berger Belge Malinois, une Azawakh, une Doberman, et une chienne de type corniaud (cf. figure II.1).

L'âge moyen étant de 4 ans et demi, avec pour les plus jeunes chiennes 03 ans et la plus âgée 07 ans. Par ailleurs, nous avons exclus les jeunes chiennes qui n'ont jamais présentées de chaleurs ainsi que les chiennes âgées de plus de 7 ans.

Fig. II.1: Photos de quelques unes des chiennes en expérimentation.



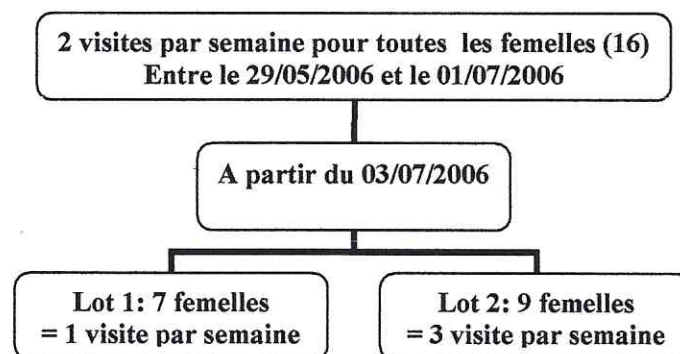
II.2.3. Le suivi de chaleurs :

Le suivi des chiennes a été réalisé au cours de 36 visites, s'étalant durant la période entre le 29/05/2006 et le 30/08/2006. Les chiennes sélectionnées pour l'expérimentation ont été maintenues au CFC/GN durant toute cette période. Nous avons demandé aux maîtres chiens de noter toutes les manifestations sexuelles perceptibles sur les chiennes. C'est-à-dire les écoulements vulvaires et le comportement vis-à-vis des mâles.

Durant la période du 29/05/2006 jusqu'au 01/07/2006, nous avons soumis toutes les chiennes en expérimentation à deux visites par semaine (le dimanche et le mardi).

Durant la période du 03/07/2006 jusqu'au 30/08/2006, nous avons partagé les chiennes en expérimentation en deux lots (cf. figure II.2). Le premier lot comporte les femelles qui ont présentées leurs chaleurs durant la période entre le 29/05/2006 et le 01/07/2006 (au nombre de sept). Nous avons continué à suivre ces femelles à titre indicatif avec une fréquence d'une visite par semaine (tout les samedi). Le second lot comprend les femelles qui n'ont pas présentées leurs chaleurs durant la même période (au nombre de neuf). Nous avons soumis ces chiennes à trois visites par semaines (les samedi, lundi et mercredi).

Fig. II.2: Déroulement du suivi des chaleurs durant la période d'expérimentation.



Chaque visite comporte un examen gynécologique, accompagné d'un frottis vaginal et d'un prélèvement de sang destiné à la mesure de la progestérone plasmatique. Toutefois, durant les quatre premières visites, nous avons manqué de faire les prélèvements de sang.

Toutes les visites se sont tenues au niveau de la clinique du CFC/GN aux mêmes moments de la journée (entre 09h00 et 12h00). Nous avons attribués à chaque chienne un

numéro propre à notre expérimentation. La numérotation de 01 à 16 s'est faite par ordre alphabétique. Durant chaque visite, les chiennes étaient convoquées suivant leur numéro d'ordre. C'est ainsi que, par exemple, la chienne n°1 (ARINA) était toujours examinée à 9h00.

Chaque chienne nous était présentée pour chaque visite en compagnie de son maître chien qui assurait sa contention (les chiennes dangereuses devaient en plus être muselées). Une anamnèse nous permettait de recueillir les informations recherchées.

Nous avons mentionnés sur des imprimés spécialement conçus pour le suivi des chaleurs le nom de la chienne, la date, l'heure et les commémoratifs (l'état de tuméfaction de la vulve, la nature de l'écoulement vulvaire, la présence ou l'absence du signe d'amantea, la date de la saillie ainsi que tout autre signe pouvant être recueilli par l'examen externe ou l'anamnèse).

Ces mêmes imprimés servaient à l'exploitation des frottis vaginaux, ce qui nous a permis de recueillir toutes les données nécessaires pour chaque chienne et durant chaque visite sur la même fiche (cf. annexe 02).

Chaque fiche est numérotée suivant le numéro de passage accompagné du numéro de la chienne, ainsi la fiche numéro 01.13 correspond à la première visite (le 29/05/2006) de la treizième chienne (NEBRASKA).

II.2.3.1. Examen gynécologique :

Les examens gynécologiques ont été réalisés au niveau de la salle de consultation de la clinique du CFC/GN. Ils ont nécessité une source de lumière, une paire de gants en latex et parfois un spéculum.

Nous avons procédé d'abord à l'inspection de l'aspect externe de la vulve, toute modification de taille était mentionnée. Soit que la vulve présentait une taille normale, soit qu'elle présentait une tuméfaction. Pour certaines femelles, la région périnéale était fournie en poils, ce qui a nécessité un petit toilettage (cf. figure II.3). Les lèvres vulvaires étaient écartées avec le pouce et l'index afin d'apprécier la couleur de la muqueuse vaginale. Cette dernière pouvait être normale, pâle ou congestionnée.

L'écoulement vulvaire, quant il se manifestait, était apprécié en fonction de sa couleur, de son aspect (séreux, muqueux ou sanguinolent) et de son odeur (normale ou nauséabonde).



Fig. II.3: Inspection de la vulve et du périnée (à gauche), et de la muqueuse vaginale (à droite) chez la chienne.

L'anamnèse nous permettait de recueillir des informations au près du personnel tel que le début de l'écoulement vulvaire, la nature du comportement sexuel de la chienne en faveur d'une attraction avec acceptation ou refus du mâle, ou même une indifférence totale (cf. annexe 02).

II.2.3.2. Examen cytologique (frottis vaginaux) :

La réalisation des prélèvements a nécessité une source de lumière, des écouvillons en coton stériles à usage unique de 15cm, du sérum physiologique pour humidifier le coton de l'écouvillon, des lames propres dégraissées à l'alcool et étiquetées, des boîtes de pétri étiquetées, des gants en latex et une solution de fixateur (alcool éther ½).

Les prélèvements étaient réalisés sur animal debout. Le coton de l'écouvillon était humidifié avec du sérum physiologique, ensuite l'écouvillon était introduit au niveau de la commissure inférieure de la vulve puis enfoncé profondément (cf. figure II.4). Après 2 à 3 mouvements rotatoires, l'écouvillon était retiré délicatement des voies génitales de la chienne.



Fig. II.4 : Prélèvement pour frottis vaginal chez une chienne par écouvillonnage profond du vagin.

Immédiatement après, nous avons procédé à l'étalement sur une lame propre, dégraissée à l'alcool, séché et étiqueté au préalable. Le coton de l'écouvillon était enroulé délicatement afin d'obtenir deux larges bandes parallèles sur la même lame (cf. figure II.5).



Fig. II.5: Prélèvement pour frottis vaginal chez une chienne - étalement de l'écouvillon sur une lame.

Une fois l'étalement réalisé, nous avons fixé les lames en les plongeant dans un bain de fixateur à base d'alcool-éther ½ durant 5mn. Ensuite nous avons coloré les lames par la méthode de Harris-Shorr. Cette dernière a nécessité le colorant de Harris, le colorant de Schorr, de l'eau distillée, de l'alcool absolu, de l'alcool à 95°, de l'alcool à 70°, de l'alcool à 50° et de l'alcool ammoniacal ainsi que quatorze récipients.

L'observation des lames a été réalisé à l'aide d'un microscope photonique binoculaire du modèle Motic®, muni d'un oculaire d'un grossissement de 10 et de quatre objectifs de grandissements 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. D'autres données ont été notées même si elles n'ont pas été prises en compte pour les résultats finaux.

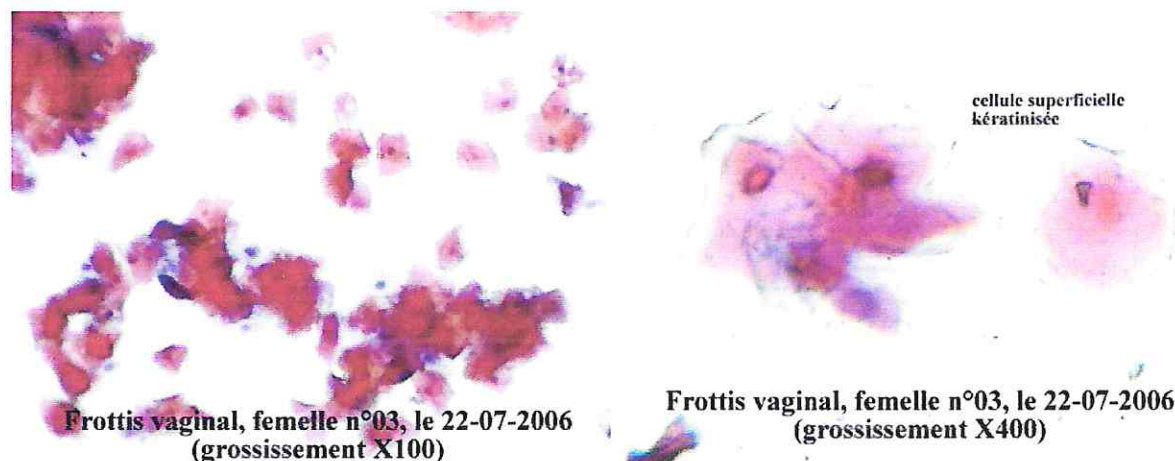


Fig. II.6 : Observation d'un frottis vaginal sous microscope optique à faible grossissement (10x10 à gauche) et à fort grossissement (10x40 à droite).

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 (cf. figure II.6). Nous avons placés le champ du microscope sur les « queues » de frottis où les cellules forment moins d'amas. Néanmoins, nous avons pris garde à ce que les portions prises en compte soient représentatives de l'ensemble de la lame qui avait été appréciée à faible grossissement. Toutes les cellules d'un même champ étaient comptabilisées. Puis la lame était déplacée de telle façon à avoir un autre champ pour la lecture.

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.

L'identification des types cellulaires présents sur un frottis vaginal a été réalisée suivant la description de la littérature.

II.2.3.3. Examen endocrinologique (dosage de la progestérone) :

Les prélèvements sanguins ont nécessités un garrot, du coton et de l'alcool pour la désinfection, des vacutenaires accompagnés de tubes héparinés sous vide avec leurs aiguilles, une centrifugeuse, des pipettes pasteur stériles à usage unique, des tubes eppendorf®, un conditionnement étiqueté et un congélateur type ménager.

Nous avons prélevés le sang au niveau de la veine radiale gauche le plus souvent, après rasage et désinfection à l'alcool. La formation d'hématome quelquefois nous incitait à changer le lieu de prélèvement. Nous avons ensuite recueillis le sang dans les tubes héparinés. Puis nous l'avons centrifugé pendant 15 minutes à 4 500 tours par minute et on a déposé le plasma après séparation dans les tubes eppendorf®. Ensuite nous avons mis les tubes eppendorf® dans le congélateur à -20°C en attendant d'être acheminés vers le laboratoire de zootechnie du centre de recherches nucléaires de Draria (C. R. N. D.).

A partir du quatrième passage, pour chaque frottis sanguin correspond un prélèvement de plasma, ce qui fait un total de 380 échantillons. Cependant, nous avons sélectionnés seulement 100 prélèvements, correspondant aux périodes des chaleurs, pour être analysés au laboratoire du C. N. R. D.

Les dosages étaient réalisés à posteriori, par analyse radio-immunologique (RIA) *in vitro* de la progestérone plasmatique, par le biais du kit RIA PROGESTERONE IM 1188, Immunotech®, Marseille, France.

II.2.4. Saisie et traitement des données :

Les renseignements concernant l'identification des chiennes ont été recueilli dans les dossiers du CFC/GN. Les informations recueillies au cours du suivi des chaleurs ont d'abord été mentionnées sur les imprimés (le modèle de fiche analytique est présenté en annexe 02). Par la suite, les paramètres recherchés ont été traités à l'aide de tableaux dans le logiciel EXCEL de Microsoft®.

II.3. Résultats :

II.3.1. Étude clinique :

L'examen gynécologique permet de mettre en évidence des manifestations cliniques d'œstrus relativement frustes. L'étude clinique a porté essentiellement sur l'état de tuméfaction et l'œdème de la vulve, ainsi que la nature de l'écoulement vulvaire.

II.3.1.1. Nombre de cas :

Nous avons suivi seize chiennes (cf. annexe 01) durant la période de l'expérimentation (du 29/05/2006 au 30/08/2006), seulement douze d'entre elles ont présenté leurs chaleurs durant cette période (cf. tableau II.1). Les chiennes n°1, 5, 8 et 9 n'ont pas présenté de chaleurs.

Toutefois, les chiennes n°10, 13 et 16 étaient déjà en chaleurs le premier jour de l'expérimentation (le 29/05/2006), nous n'avons pas pu déterminer le premier jour de leurs chaleurs.

II.3.1.2. Durée des chaleurs :

Nous avons considéré le premier jour de l'apparition de l'écoulement de sang comme étant le premier jour des chaleurs.

La durée moyenne des chaleurs était de 18,5 jours (cf. tableau II.1), avec 9 jours de durée minimale rapportée pour la chienne n°4, et 28 jours de durée maximale rapportée pour la chienne n°3.

Tableau II.1 : Durée des chaleurs et expression des signes externes pour les 9 femelles entrés en chaleurs.

N° de femelle	02	03	04	06	07	11	12	14	15
Durée des chaleurs (J)	16	28	9	16	10	10	26	27	25
Écoulement de sang	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tuméfaction vulvaire	+	+	+	+	-	+	+	-	+

(+): manifestation du signe clinique. (-): absence du signe clinique.

II.3.1.3. Expression des signes externes :

Parmi les signes externes appréciables lors du suivi des chaleurs, nous avons choisi d'étudier les deux signes les plus expressifs, à savoir les modifications de la taille de la vulve, et les écoulements vulvaires.

Nous aurions souhaité étudier le comportement des chiennes vis-à-vis des mâles dans le but d'apprécier la transition pro-œstrus - œstrus ainsi que la transition œstrus - métœstrus. Mais, dans l'impossibilité d'examiner les chiennes en continu, nous n'avons pas pu étudier ce critère. D'autre part, il est à noter que nous n'avons rencontré aucun cas de chaleurs atypiques (chaleurs disjointes, exagérés, ou discrètes).

▪ **Tuméfaction de la vulve :**

L'état de tuméfaction vulvaire est un critère subjectif, qui dépend de l'appréciation de l'examineur. Et comme nous devons examiner 16 chiennes par jour, nous avons redouté des confusions. Pour ces raisons, nous avons pris des photos de la vulve et du périnée au cours de chaque visite et pour chaque chienne (cf. annexe 05), afin de rendre l'examen un peu moins subjectif.

Les photos prises pour chaque chienne permettaient de voir l'évolution de la tuméfaction vulvaire au cours des chaleurs.

Pour 77.8% des cas, la modification de la taille vulvaire était significative, l'appréciation de ce critère était donc aisée. Par contre, pour 22.2% des cas, la taille de la vulve demeurait inchangée au cours des chaleurs par rapport aux périodes de repos.

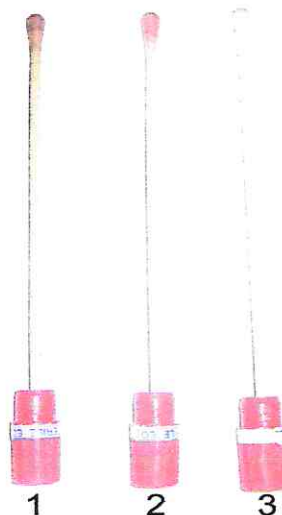
▪ **Écoulements de sang :**

Toutes les chiennes en expérimentation qui ont présentées des chaleurs (au nombre de 12) ont présentées un écoulement sanguin continu, sans aucune interruption jusqu'à la fin des chaleurs, et qui s'est poursuivi durant les premiers jours du métœstrus.

Durant les chaleurs, les chiennes présentaient un écoulement de sang en nature, avec une couleur rouge vif (cf. figure II.7), de consistance filante, et avec une odeur de sang caractéristique. La quantité appréciée était variable d'une chienne à l'autre. La région du périnée était souillée.

Durant les premiers jours du métœstrus, l'écoulement sanguin présentait des modifications de consistance, de couleur et d'odeur. Le sang devenait plus épais, avec une couleur qui vire vers le marron, et présentait une odeur désagréable et suffisamment forte pour être sentie depuis une distance d'environ un à deux mètres de la chienne.

Fig. II.7: Couleur de l'écoulement vulvaire par appréciation de l'écouvillon. 1: écoulement de couleur marron (métœstrus), 2: écoulement de couleur rouge vif (pro-œstrus). 3: écoulement de couleur blanche (ancestrus).



II.3.2. Etude des frottis vaginaux :

II.3.2.1. Nombre de cas :

Nous avons réalisé des frottis vaginaux pour toutes les chiennes en expérimentation indépendamment de leur stade physiologique, la fréquence de réalisation des frottis vaginaux ainsi que la méthode employée sont décrites durant le paragraphe II.2.3.2, ces examens ont permis l'obtention de 427 lames au total (cf. annexe 03). Néanmoins, nous n'avons pu faire un suivi cytologique complet des chaleurs que pour les neuf chiennes qui ont présentés leur chaleurs durant notre période expérimentale (du 29-05-2006 au 31-08-2006). Ce qui correspond à un total de 84 lames de chaleurs. Les autres lames correspondaient à des frottis d'œstrus ou de métœstrus.

II.3.2.2. Etude des courbes individuelles du taux d'éosinophilie :

II.3.2.2.1. Durée de persistance du frottis d'œstrus:

La figure II.8 illustre le pourcentage de chiennes présentant un frottis kératinisé à 90-100% durant 0 à 11 jours des chaleurs. Pour 37.5 % des chiennes, la durée d'apparition du frottis typique d'œstrus est de 1 jour.

Néanmoins, nous avons observé des frottis caractéristiques d'œstrus durant une période de 6 et 7 jours avec un maximum de 11 jours, ce qui dépasse largement la durée de la période de fécondabilité chez la chienne.

Aussi, 12.5% des chiennes n'ont pas atteint la valeur de 90% de cellules éosinophiles durant leurs chaleurs.

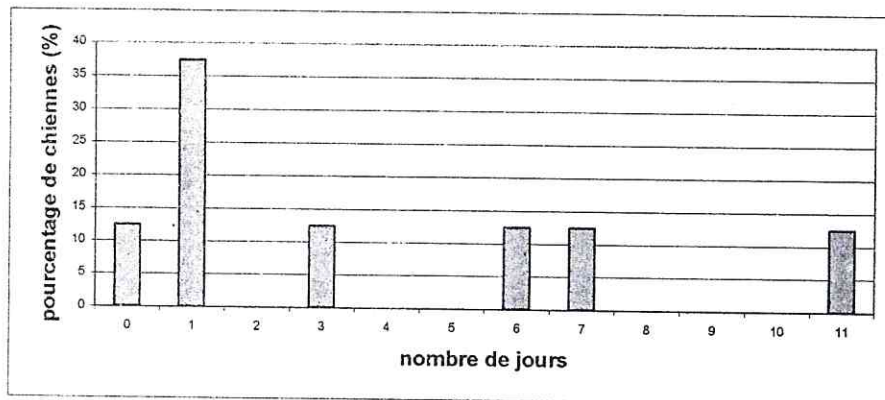


Fig. II.8: Pourcentage de chiennes présentant un frottis d'œstrus durant 0 à 11 jours des chaleurs.

II.3.2.2.2. Valeur du pic d'éosinophilie au cours des chaleurs:

La figure II.9 illustre les taux maximum d'éosinophilie observés sur les frottis des chiennes en chaleurs. Pour 62.5% des chiennes, le frottis typique d'œstrus est kératinisé à 100%. En prenant comme limite inférieure du taux d'éosinophilie 60%, toutes les chiennes qui ont présenté leurs chaleurs, ont présenté des frottis caractéristiques d'œstrus.

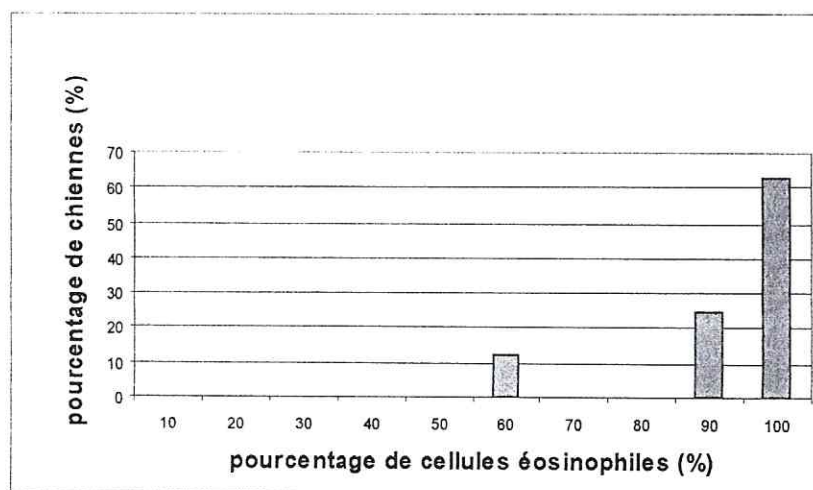


Fig. II.9: Pourcentage de chiennes présentant un taux maximum d'éosinophilie donné au cours des chaleurs.

II.3.2.2.3. Moment du pic du taux d'éosinophilie par rapport au pic de LH :

Nous avons calculé le pourcentage de cellules éosinophiles par rapport au nombre total de cellules épithéliales présentes sur les lames de frottis vaginaux (cf. annexe 03). Nous avons pris comme point de repère le pic de LH en se référant à la progestéronémie entre 2 et 2.9ng/ml [ROOT KUSTRITZ 2001, ENGLAND et CONCANNON 2002, FONTBONNE et GUERIN 2003].

Sur les 9 femelles, 33.3% d'entre elles ont présentés un pic d'éosinophilie le jour du pic de LH. 11.1% de femelles ont présentés le pic d'éosinophilie 2j après le pic de LH, soit le jour présumé de l'ovulation. 11.1% ont présentés leur pic d'éosinophilie 2j avant le pic de LH. Et 22.2% ont présentés leurs pic d'éosinophilie a respectivement J3 et J5.

Néanmoins, pour 2 femelles nous n'avons pas pu effectuer cette comparaison car elles présentaient des courbes d'éosinophile particulières.

II.3.2.2.4. Courbes d'évolution de l'éosinophilie à caractère particulier :

Sur les 9 femelles suivies pour leurs chaleurs, 2 d'entre elles ont présentés des courbes d'évolution du taux d'éosinophilie à caractère particulier, soit 22.2% de l'effectif.

La majorité des chiennes ont présentés des courbes habituelles, c'est à dire que l'augmentation du taux de cellules éosinophiles s'est faite en forme de pic unique, durant l'œstrus (aux alentours du pic de LH).

Les courbes particulières sont représentées par une courbe présentant deux pics pour la première. Et un plateau à 100% maintenu durant 7jours du pro-œstrus pour la seconde.

II.3.2.2.4.1. Présence de deux pics d'éosinophilie – courbe de la femelle n°12 :

La figure II.10 présente la courbe d'évolution du taux d'éosinophilie de la femelle n°12. Le pourcentage de cellules éosinophiles a atteint sa valeur maximale (100%) 4jours avant le pic de LH. Cette valeur a diminué brutalement pour atteindre la valeur de 27% de cellules éosinophiles 2j avant le pic de LH.

L'éosinophilie a augmenté de nouveau pour atteindre 92% le jour du pic de LH. Elle a atteint la valeur de 100% le jour présumé de l'ovulation, et s'est maintenu durant 3jours.

La régression du taux d'éosinophilie s'est faite de manière progressive, elle était de 64% le 10^e jour après le pic de LH.

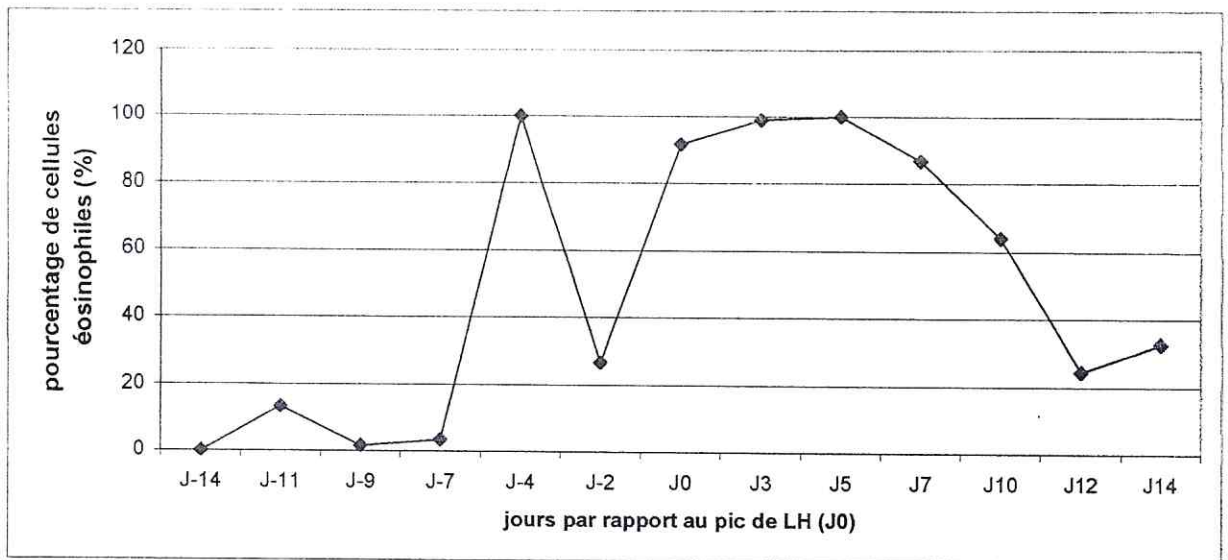


Fig. II.10: Evolution de l'éosinophilie, courbe individuelle de la femelle n°12, J0 représente le jour du pic de LH.

II.3.2.2.4.2. Présence d'un plateau d'éosinophilie – courbe de la femelle n°02 :

La figure II.11 présente la courbe d'évolution du taux d'éosinophilie de la femelle n°02. Le pourcentage de cellules éosinophiles a atteint sa valeur maximale (100%) 7 jours avant le pic de LH. Cette valeur s'est maintenue en plateau jusqu'au jour du pic de LH sans aucune variation notable. Comme nous ne disposons pas de plus de données relatives à la période d'après l'ovulation (J2), nous ne pouvons pas préciser le temps de maintien du plateau au delà de 9 jours.

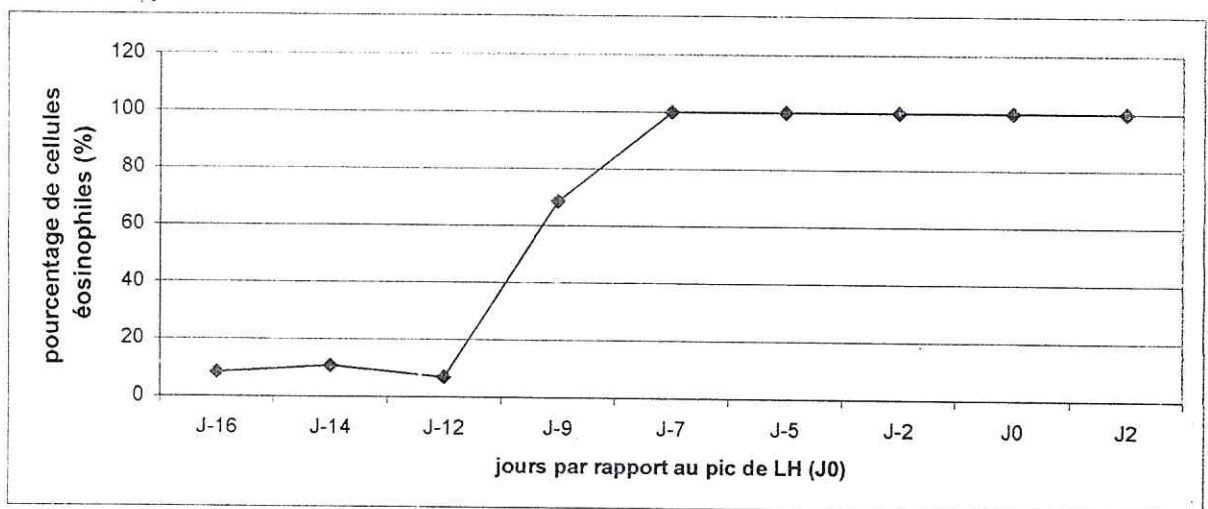
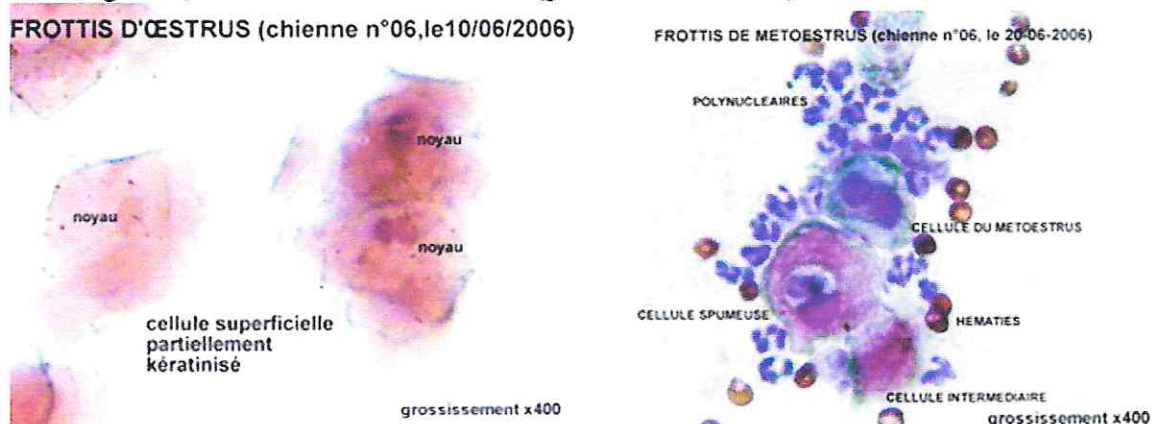


Fig. II.11: Evolution de l'éosinophilie, courbe individuelle de la femelle n°02, J0 représente le jour du pic de LH.

II.3.2.3. Étude de la transition œstrus – métœstrus:

Nous avons noté pour toutes les femelles entrées en chaleurs un changement brutal de l'aspect du frottis lors de la transition œstrus – métœstrus, par chute brutale du taux d'éosinophilie et apparition des polynucléaires neutrophiles (PNN) sur la lame (cf. fig II.12).

Fig. II.12: Transition cytologique œstrus – métœstrus, frottis vaginaux de la femelle n°06. Frottis d'œstrus à gauche, frottis de métœstrus à droite (grossissement 10x40).



II.3.3. Etude des courbes de la progestérone :

II.3.3.1. Nombre de cas :

Sur les seize chiennes en expérimentation, douze d'entre elles ont présentées leurs chaleurs durant la période du 29/05/2006 au 30/08/2006. Cependant, nous n'avons pu tracer les courbes de progestéronémie que pour neuf (09) chiennes. Les chiennes numéro 02, 03, 04, 06, 07, 11, 12, 14 et 15.

Parmi les 380 échantillons de plasma prélevés durant les visites effectuées lors du suivi, que nous avons conditionnés en tubes eppendorf® et congelés à -20°C. Comme nous disposions d'une seule trousse de dosage, nous avons sélectionné 100 échantillons de plasmas, afin de les envoyer au laboratoire du C. R. N. D. pour le dosage quantitatif par méthode RIA de la progestéronémie. Cependant, le kit de dosage n'a pu doser que 88 échantillons (cf. annexe 03), correspondant aux 9 chiennes cités ci dessus. Cependant, 4 prélèvements ont été effectués après la date du 31-08-2006, ils ont dus être écartés car ils n'avaient pas de lames correspondantes. Ce qui fait un total de 84 échantillons (cf. annexe 03).

Quoique, pour la chienne n°10, deux échantillons ont été dosés, nous ne les avons pas pris en compte pour l'étude car ils n'ont pas permis de tracer une courbe.

Le choix des échantillons sélectionnés a été effectué par suite de l'analyse des frottis vaginaux, dans le but de bien recouvrir la période des chaleurs.

II.3.3.2. Confirmation de l'ovulation :

Durant la partie bibliographique, nous avons estimé que l'ovulation est confirmée chez les seules chiennes pour lesquelles la progestéronémie dépasse les 5 à 10ng/ml [BUFF et SALESSE 2000, FONTBONNE et al. 2000]. Selon cette approche, nous avons confirmé l'ovulation pour les neuf chiennes de notre expérimentation, pour lesquels nous avons dosé la progestéronémie. Ainsi, nous n'avons mentionné aucun cas de chaleurs anovulatoires.

II.3.3.3. Moments de l'augmentation de la progestéronémie au cours des chaleurs :

Dans 78% des cas, les courbes de progestéronémie commencent à un niveau basal non nul, puis s'élèvent progressivement. Le passage à la valeur de 2ng/ml déterminant le pic de

LH, s'effectue vers le 12^e jour en moyenne, et jusqu'au 20^e jour pour la femelle n°03. Nous avons toutefois noté une valeur de 2.39ng/ml le premier jour des chaleurs pour la femelle n°11. Et une valeur dépassant les 2ng/ml (exactement 10.62ng/ml) le premier jour des chaleurs pour la femelle n°07.

Le passage vers les valeurs indiquant le moment de l'ovulation, soit entre 4 et 10ng/ml, s'effectue en moyenne vers le 14^e jour, avec un maximum le 23^e jour pour la femelle n°03.

II.3.3.4. Durée du passage de la progestéronémie de 2 vers 4 à 10ng/ml :

Nous remarquons que pour 55% des chiennes la progestéronémie passe de 2 vers 4 à 10ng/ml en 2 à 3jours. D'autre part nous remarquons que, pour 45% des chiennes, la progestéronémie passe de 2 à 10ng/ml et plus en moins de 2jours.

II.3.3.5. Etude des courbes individuelles de progestéronémie:

II.3.3.5.1. Courbes à évolution habituelle :

Nous avons défini les courbes à évolution habituelle, conformément à ce qui est rapporté dans la littérature, comme étant des tracés présentant une élévation de la progestéronémie du niveau basal <1ng/ml jusqu'à 2ng/ml en 2jours environ, puis un passage de 2 vers 4 à 10ng/ml en 2 à 3jours également. Les tracés présentent toujours une évolution croissante, aucune valeur de progestéronémie suivant une autre valeur dans le temps ne lui est inférieure.

Sur les neuf chiennes suivies, huit d'entre elles ont présentés des courbes typiques sensiblement conformes à ce qui a été décrit dans la littérature. A titre d'exemple, nous allons étudier la courbe d'une des femelles.

La figure II.13 illustre l'évolution de la progestéronémie au cours des chaleurs pour la femelle n°14. Une augmentation de la progestéronémie a été observée depuis son niveau basal (0.32ng/ml) pour atteindre la valeur de 2.12ng/ml après 2jours, ce qui correspond théoriquement au pic de LH. Trois jours plus tard, la progestéronémie atteint la valeur de 4.92ng/ml qui correspond au taux observé lors de l'ovulation. Le taux de la progestéronémie présente une évolution croissante par la suite.

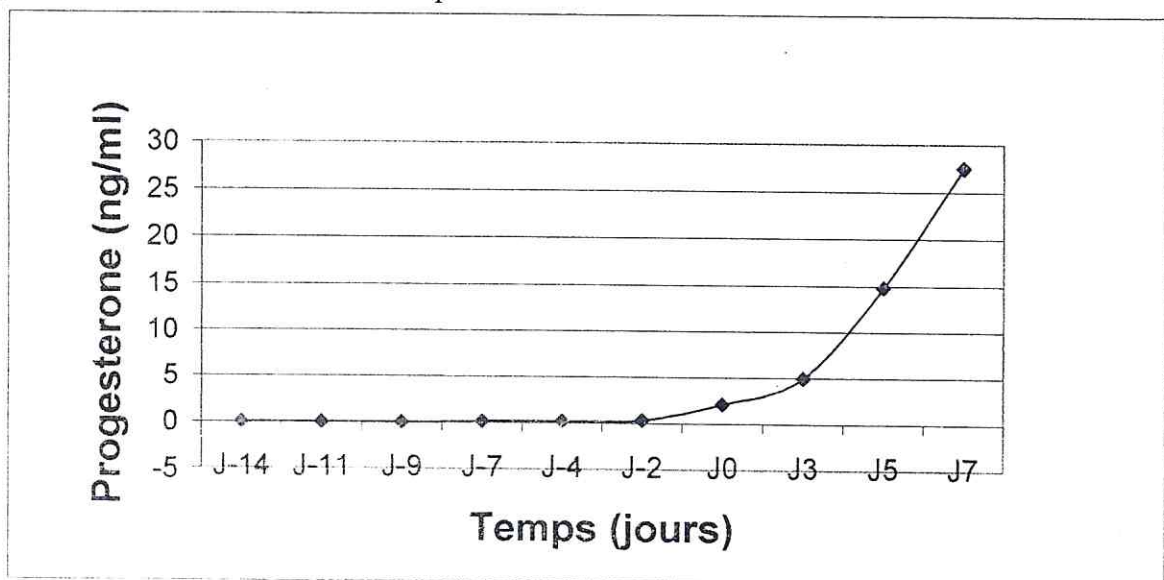


Fig. II.13: Courbe individuelle de la progestéronémie, femelle n°14. J0 représente le jour du pic de LH.

II.3.3.5.2. Courbes atypiques :

La figure II.14 illustre l'évolution de la progestéronémie au cours des chaleurs pour la femelle n°12. Une particularité est signalée sur cette courbe. Il s'agit d'une légère augmentation de la progestéronémie (1.01ng/ml) 7jours avant le jours supposé du pic de LH. Le niveau basal étant considéré dans la littérature comme étant non nul mais inférieur à 1ng/ml.

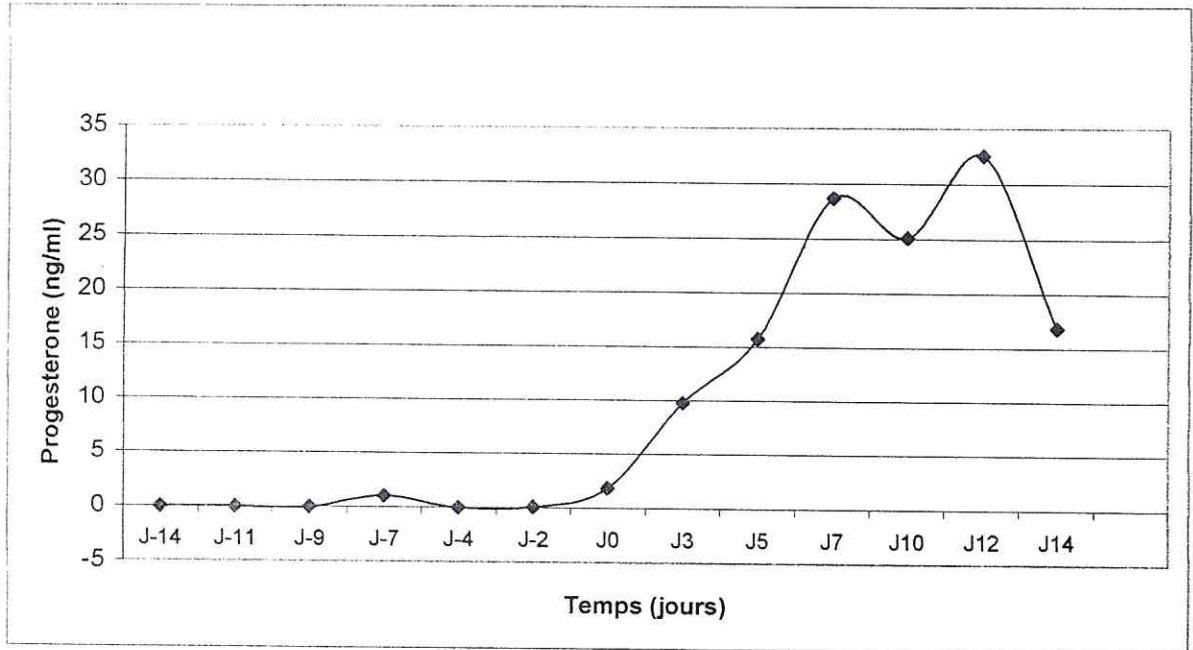


Fig. II.14: Courbe individuelle de la progestéronémie, femelle n°12. J0 représente le jour du pic de LH.

II.3.4. Etude statistique :

L'étude statistique a comme objet l'aide à la décision et la validation d'hypothèses. Bien entendu, dans de telles situations, le recours à des arguments subjectifs sera toujours inévitable; les tests statistiques (dans notre cas le test du chi-2) vont cependant réduire la part de subjectivité, les choix seront ainsi facilités et plus transparents [FALISSARD 1998].

II.3.4.1. Analyse statistique-Les résultats du test de chi-deux (χ^2) :

Le test du chi-deux (χ^2) a été utilisé pour comparer l'évolution du taux d'éosinophilie par rapport aux intervalles de progestérone plasmatique.

Pour un degré de liberté d.d.l = 25, La valeur du χ^2 expérimental est 22,22 (cf. annexe 4). La table de la loi de χ^2 montre que pour un degré de liberté d.d.l = 25 et une probabilité $p = 0,05$, le χ^2 doit être égal ou supérieur à la valeur de 37,65.

Donc, le χ^2 n'est pas significatif, L'hypothèse d'indépendance (H_0) n'est pas rejetée.

Avec un degré de liberté d.d.l = 3, la valeur du χ^2 est 4,99. A cette valeur ($p > 0,05$), l'hypothèse d'indépendance (H_0) ne peut être rejetée, la table de la loi de χ^2 nous indique que ($p > 0,05$) la probabilité pour que le hasard puisse expliquer la dépendance entre les deux séries statistiques est très importante L'hypothèse d'indépendance (H_0) est retenue.

II.3.4.2. Evolution des différentes classes cellulaires en fonction de la progestéronémie :

II.3.4.2.1. Constitution des classes de progestéronémie :

Afin de rechercher des critères cytologiques permettant d'évaluer la progestéronémie en dessous de certains seuils, nous étions dans l'obligation de créer des classes de progestéronémie pour étudier les variations des taux des types cellulaires retrouvés sur le frottis pour chaque intervalle de progestéronémie. Un tri à plat a permis de définir 8 classes de progestéronémie. Les effectifs des différentes classes sont représentés sur la figure II.15.

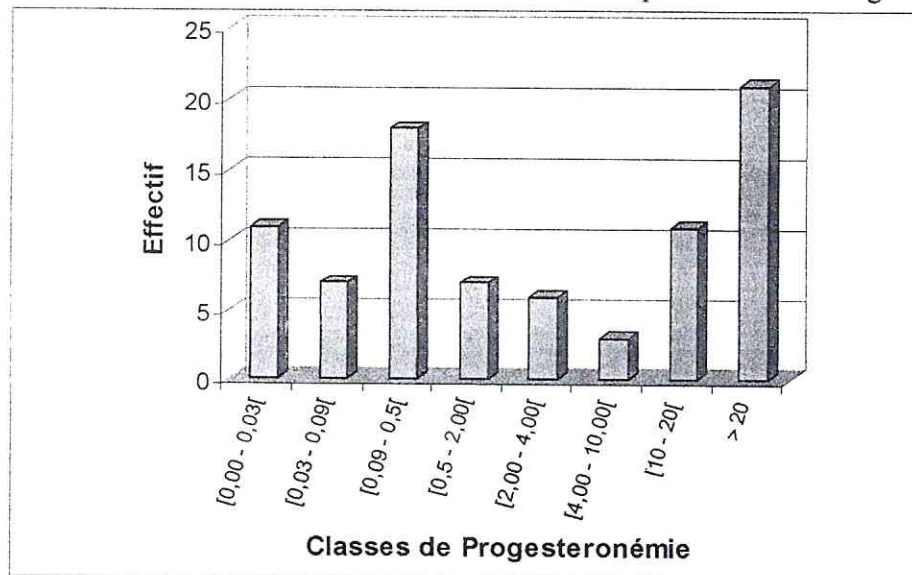


Fig. II.15: Effectifs des différentes classes de progestéronémie.

II.3.4.2.2. Les pourcentages des classes cellulaires en fonction de la progestéronémie :

Le tableau II.2 représente les nombres de cellules de chacune des trois classes étudiés, retrouvés sur le frottis vaginal en fonction du taux de progestérone plasmatique. Ce tri nous a permis d'étudier l'évolution de chaque type cellulaire par rapport à la progestéronémie.

Tableau II.2 : Tableau regroupant le pourcentage des trois classes cellulaires étudiées en fonction de la progestéronémie pour 84 échantillons (frottis vaginaux).

Progesterone	Nombre de cellules basophiles	Nombre de cellules polycromatophiles	Nombre de cellules acidophiles
[0,00 - 0,03[24,36	19,72	9,91
[0,03 - 0,09[35,71	29,43	6,86
[0,09 - 0,50[11,78	5,61	43,39
[0,50 - 2,00[7,28	8,28	40,71
[2,00 - 4,00[0,16	4	51,67
[4,00 - 10,00[0	0,33	70,33
[10,00 - 20,00[6,54	8,45	40,45
> 20	13,38	19,04	17,05

La figure II.16 représente l'ensemble des données relatives à l'évolution des taux cellulaires étudiés, par rapport à l'évolution du taux de progestérone plasmatique.

L'analyse de l'évolution de chaque type cellulaire par rapport à la progestéronémie sera exposé au cours des sous paragraphes qui vont suivre.

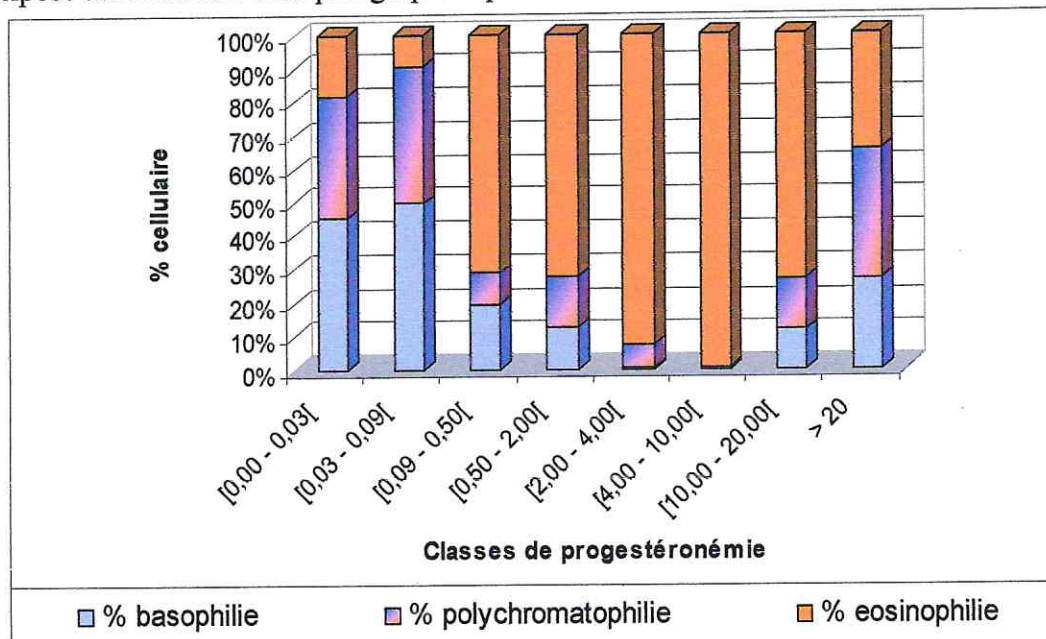


Fig. II.16: Evolution des pourcentages (%) des types cellulaires en fonction de la progestéronémie (ng/ml) pour les 84 échantillons sélectionnés.

II.3.4.2.2.1. Les cellules basophiles : (cf. figure II.17)

Lorsque la progestéronémie est basale (<0.03ng/ml), le pourcentage moyen de cellules basophiles par rapport au nombre total de cellules est de 24.36% (cf. fig. II.17). La basophilie connaît un pic (35.71%) pour une progestéronémie comprise entre 0.03 et 0.09ng/ml.

Cette valeur décroît régulièrement pour être inférieure à 5% quand la progestéronémie est supérieure à 2ng/ml (cf. fig. II.17). Une diminution spectaculaire (0.16%) est observée pour un taux de progestérone entre 2 et 4ng/ml. Ainsi que des valeurs nulles (0%) pour une progestéronémie comprise entre 4 et 10ng/ml.

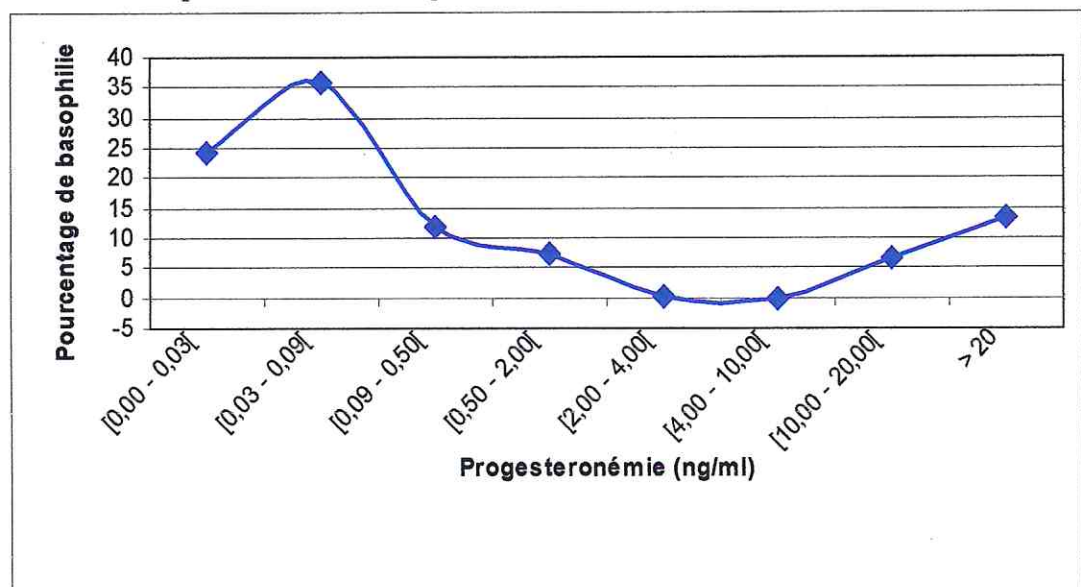


Fig. II.17: Evolution du taux de la basophilie en fonction de la progestéronémie (84 échantillons).

II.3.4.2.2. Les cellules polychromatophiles : (cf. figure II.18)

Ce type cellulaire connaît une évolution décroissante en général par rapport à l'élévation de la progestéronémie, mais moins caractéristique par rapport aux cellules basophiles à cause des fluctuations présentées par la courbe. En effet, lorsque la progestéronémie est entre 0.5 et 2ng/ml, le taux de cellules polychromatophiles par rapport au nombre total de cellules connaît une légère augmentation (de 5.61% à 8.28%).

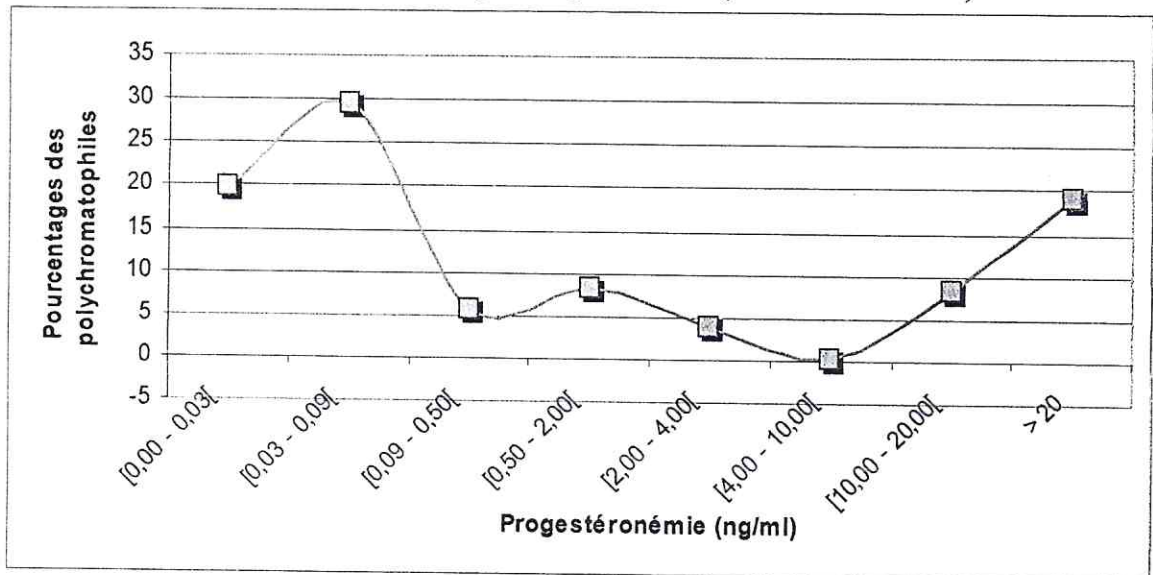


Fig. II.18: Evolution du taux de polychromatophilie en fonction de la progestéronémie (84 échantillons).

D'autre part, on note des valeurs de polychromatophilie inférieures aux valeurs de basophilie pour une progestéronémie inférieure à 0.5ng/ml. Cependant, la valeur minimale de polychromatophilie est de 0.33% pour une progestéronémie entre 4 et 10ng/ml. Le tracé ne connaît donc pas de valeur nulle.

II.3.4.2.2.3. Les cellules éosinophiles (acidophiles) :

L'évolution du taux de cellules éosinophiles par rapport au nombre total de cellules est proportionnelle à l'évolution du taux de progestéronémie (cf. figure II.19).

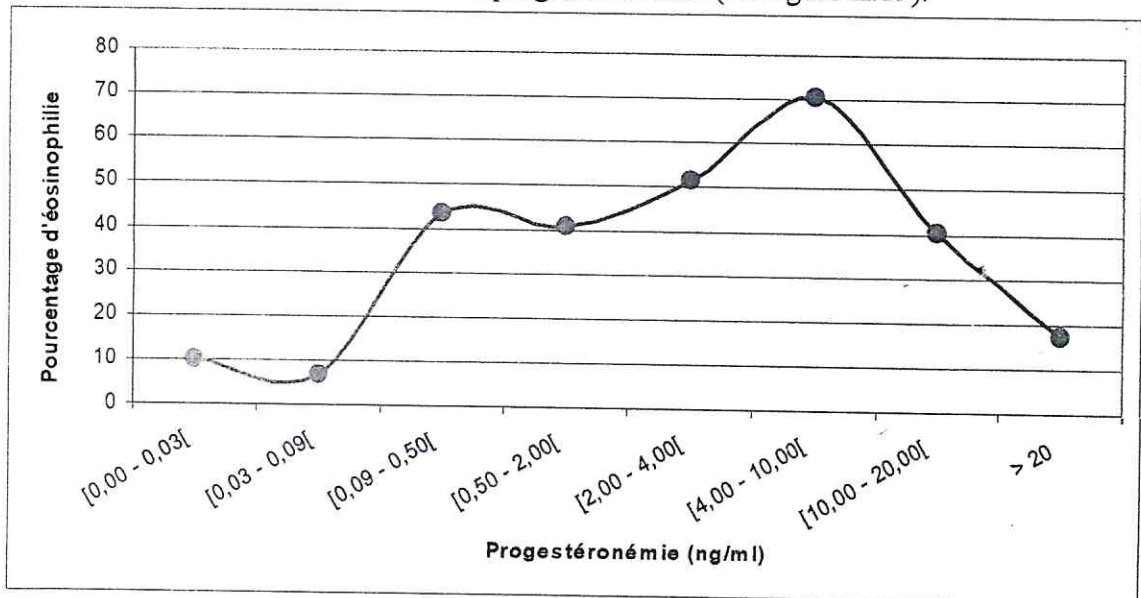


Fig. II.19: Evolution du taux d'éosinophilie en fonction de la progestéronémie (84 échantillons).

En début de chaleurs, alors que la progestéronémie est à son niveau basal, les cellules éosinophiles sont déjà présentes (6.86%). Puis les pourcentages augmentent progressivement.

Pour une progestéronémie entre 4 et 10ng/ml, le taux d'éosinophilie atteint 70.33%. Ce qui nous permet de constater qu'une baisse des taux de cellules basophiles (0%) était liée avec un pic de celui des cellules éosinophiles et inversement.

II.3.4.3. Corrélation entre le taux de progestérone et les pourcentages cellulaires:

Nous remarquons que l'évolution des trois types 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. Les valeurs situées en dessous de 10 ng/ml de progestéronémie correspondent à un effectif de 52 frottis.

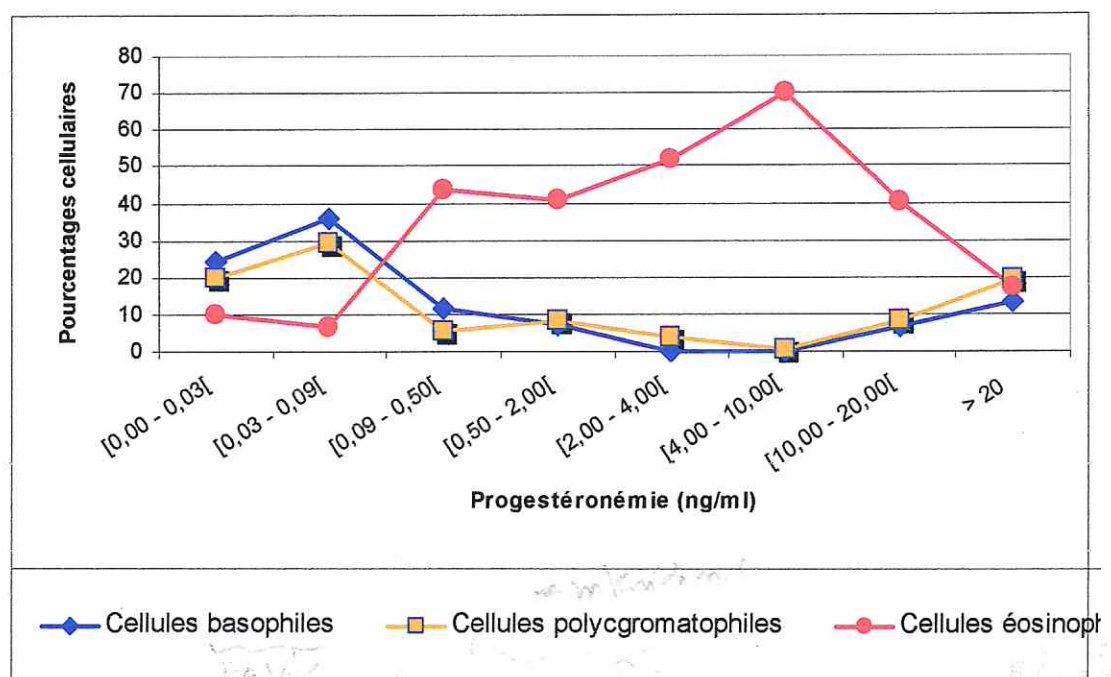


Fig. II.20: Evolution des pourcentages (%) des types cellulaires en fonction de la progestéronémie (ng/ml) pour les 84 échantillons sélectionnés.

II.4. Discussion :

II.4.1. Comparaison avec la littérature :

L'évolution des différents types cellulaires correspond bien à ce qui a été décrit dans la littérature. Nous avons pris le dosage de la progestérone plasmatique comme repère du pic de LH (progestéronémie à 2ng/ml), et de l'ovulation (progestéronémie entre 4 et 10ng/ml) conformément à ce qui a été décrit dans la littérature [ROOT KUSTRITZ 2001a, ENGLAND et CONCANNON 2002, FONTBONNE et GUERIN 2003].

II.4.1.1. Durée des chaleurs :

Nous avons notés une durée moyenne des chaleurs de 18.5jours. Cette valeur est légèrement supérieure à la moyenne retenue par *Vaissaire* (1977) d'environ 16jours, par *Fontbonne* (1996c) d'environ 17jours et par *Chaffaux et Bazile* (2001) d'environ 17.5jour. Et elle est légèrement inférieure à celle retenue par *Olson et al.* (1991) de 20.5jours.

Donc, nous pouvons conclure que la durée moyenne des chaleurs que nous avons noté, est très raisonnable, car elle se rapproche étroitement de ce qui a été retenu par la majorité des auteurs.

II.4.1.2. Profil des courbes d'éosinophilie :

Toutes les chiennes en expérimentation ont présentés des frottis caractéristiques d'œstrus, avec des lames très riches en cellules superficielles groupées en amas, et une acidophilie supérieure à 60%. Cette valeur du pic, se rapproche beaucoup plus des observations de *Schutte* en 1967 (supérieur à 56%) plutôt qu'aux observations de *Taradache* en 1980 (supérieur à 75%).

Dans 62.5% des cas, le frottis typique d'œstrus est kératinisé à 100%. Ces valeurs rejoignent les observations de *Olson et al.* 1991, *Fontbonne* 1996a, *Neveux* 1999 et *England et Concannon* 2002.

Les profils des courbes d'éosinophilie étaient conforme à la description de la littérature dans 77.8% des cas. La majorité des frottis type d'œstrus ont été conservés durant 6 à 7 jours et jusqu'à 11 jours (acidophilie entre 90 et 100%), ce qui n'a pas permis de localiser le pic de LH, l'ovulation ou la période de fécondabilité. Dans seulement 37.5% des cas, le pic d'éosinophilie a coïncidé avec le pic de LH, ce qui demeure faible. De plus, 12.5% des cas n'ont pas présenté de frottis type d'œstrus.

La survenue des pics a été notée à des moments variables durant les chaleurs, s'étalant entre 2 jours avant et 5 jours après le pic de LH. Ce qui définit un intervalle de 7 jours. Cette valeur est supérieure à l'intervalle de 4 jours rapporté par *Schutte* 1967 et *Taradache* 1980.

II.4.1.3. Profil des courbes de progestéronémie :

Le profil général des courbes de progestéronémie était en général constant pour les 8 chiennes sur un total de 9 courbes étudiées, soit 88.8%. Ce résultat est supérieur à celui de l'espèce canine qui est, d'après *Guerin et al.* (1997) près de 80%, et très voisin du résultat obtenu par *Baron* en 2006 d'environ 88.3%.

Cette étude nous confirme que sur notre population, certes trop réduite pour généraliser, la plupart des chiennes présentent une évolution de leur taux de progestérone au cours du temps conforme aux courbes standards de l'espèce canine.

Seulement une chienne a présenté une courbe atypique sur 9 courbes étudiées soit 11.1%. Il est à noter que l'élévation de la progestéronémie 7 jours avant le jour supposé du pic de LH a été notée pour un seul échantillon. Dans ce cas, nous ne pouvons pas exclure le risque d'erreur émanant du dosage de la progestéronémie par confusion de flacon, ou bien lors du report des données.

II.4.1.4. Moment de l'ovulation :

Selon la majorité des auteurs, l'ovulation a lieu habituellement 48h après le pic de LH. La concentration plasmatique de la progestérone le jour du pic de LH, c'est-à-dire 2j environ avant l'ovulation, tel que décrite dans la littérature, est estimé entre 2.0 et 2.9ng/ml. Elle atteint le jour de l'ovulation des valeurs comprises entre 4 et 10ng/ml [*PHÉMISTER et al.* 1973, *VAISSAIRE* 1977, *WILDT et al.* 1981, *CONCANNON* 1983, *OLSON et al.* 1991, *FONTBONNE et al.* 2000, *LOROYER et al.* 2002].

Dans notre étude, nous avons considéré le moment de l'ovulation en fonction du taux de la progestéronémie entre 4 et 10ng/ml.

Nous avons également considéré, tel que décrit dans la littérature, que le pic de LH se produit à un taux de progestéronémie entre 2.0 et 2.9ng/ml. ainsi, nous avons noté que le pic de LH a eu lieu en moyenne 12j après le début des chaleurs.

Nous remarquons que pour 55% des cas la progestéronémie passe de 2 vers 4 à 10ng/ml en 2 à 3jours, et dans 45% des cas, la progestéronémie passe de 2 à 10ng/ml voire plus en moins de 2jours. Ces valeurs se rapprochent de ce qui est décrit dans la littérature, à savoir, l'intervalle pic de LH - ovulations d'environ 30 à 48h [ENGLAND et CONCANNON 2002]. Cependant, la confirmation de l'ovulation ne peut être certaine qu'après échographie ovarienne, ou bien dans le cas d'une gestation avérée.

II.4.1.5. Localisation de la période de fécondabilité :

La localisation de la période de fécondabilité ne peut être effectuée que par estimation. D'après *England et Concannon* (2002) elle est localisée entre 4jours et 7jours après le pic de LH. La période de fertilité entre 3jours avant et 7jours après le pic de LH.

Le tableau II.3, regroupe les dates du pic de LH, de l'ovulation et des estimations de la période de fécondabilité et de la période fertile pour les 9 chiennes suivies durant leurs chaleurs.

Tableau II.3 : Estimations de la période de fécondabilité et de la période de fertilité par rapport au pic de LH et au jour de l'ovulation pour les 9 chiennes qui ont présentés leurs chaleurs.

Numéro de la chienne	Pic de LH	ovulations	Période de fécondabilité	Période de fertilité
02	28-08-2006	30-08-2006	Entre le 01-09-2006 et le 04-09-2006	Entre le 25-08-2006 et le 04-09-2006
03	15-07-2006	17-07-2006	Entre le 19-07-2006 et le 22-07-2006	Entre le 12-07-2006 et le 22-07-2006
04	01-07-2006	03-07-2006	Entre le 05-07-2006 et le 08-07-2006	Entre le 28-06-2006 et le 08-07-2006
06	14-06-2006	17-06-2006	Entre le 18-06-2006 et le 21-06-2006	Entre le 11-06-2006 et le 21-06-2006
07	11-06-2006	13-06-2006	Entre le 15-06-2006 et le 18-06-2006	Entre le 08-06-2006 et le 18-06-2006
11	13-06-2006	17-06-2006	Entre le 17-06-2006 et le 20-06-2006	Entre le 10-06-2006 et le 20-06-2006
12	16-08-2006	19-08-2006	Entre le 20-06-2006 et le 23-06-2006	Entre le 13-08-2006 et le 23-06-2006
14	26-08-2006	28-08-2006	Entre le 30-08-2006 et le 33-08-2006	Entre le 23-08-2006 et le 33-08-2006
15	26-08-2006	29-08-2006	Entre le 31-08-2006 et le 34-08-2006	Entre le 24-08-2006 et le 34-08-2006

II.4.1.6. Les résultats statistiques :

Le résultat du test du χ^2 , qui permet d'établir la corrélation entre les critères cytologiques et le dosage de la progestérone plasmatique, n'a pas été significatif, c'est-à-dire que l'hypothèse d'indépendance (H_0) des paramètres cytologiques par rapport à la progestéronémie n'a pas été rejetée. D'autre part, la probabilité pour que le hasard puisse expliquer la dépendance entre ces deux paramètres est très importante. L'hypothèse d'indépendance est de ce fait retenue.

Ce résultat, non significatif ne rejoint pas les résultats obtenu lors du travail de *Luc* 2005, qui a rejeté l'hypothèse d'indépendance entre le pourcentage en cellules parabasales et intermédiaires basophiles et la progestéronémie. Nos résultats peuvent être expliqués par le nombre réduit d'échantillons (84 valeurs pour chaque paramètre).

II.4.2. Difficultés rencontrées :

Au niveau du CFC/GN, aucun protocole de suivi de chaleurs n'a été instauré avant notre expérimentation. Nous avons été de ce fait confrontés à un manque de données relatives au déroulement des chaleurs préalables des femelles.

Nous avons réalisé un suivi de chaleurs au cours de visites espacées dans le temps. Au début, nous avons soumis les chiennes à deux visites par semaine, et par la suite, nous avons rajouté une journée pour avoir trois prélèvements par semaine. Ce qui correspond à des intervalles de 48h à 72h entre deux prélèvements.

Cet espacement des prélèvements était à l'origine de carences en données, notamment concernant le passage de la progestéronémie aux valeurs seuils.

Entre deux visites, nous avons pu recueillir des informations auprès du personnel, tel que le comportement des chiennes vis-à-vis des mâles. Cependant, les données étaient relativement subjectives et incertaines.

En 2004, une hypothèse a été émise quant aux prédispositions génétiques de certaines races, notamment la race Berger Allemand, à certaines particularités concernant la survenue des chaleurs [GÜNZEL et al. 2004]. Notre étude a porté sur un effectif réduit, représenté par un nombre restreint de femelles, appartenant à des races de chiens différentes. Les résultats ne peuvent ainsi être généralisés à l'ensemble de la population canine. A l'avenir, des études menées sur des populations plus conséquentes pourraient sans doute consolider nos résultats.

II.4.3. Évaluation des marqueurs du cycle utilisés:

II.4.3.1. Etude clinique :

Nous avons pu constater la tuméfaction de la vulve dans 77.8% des cas. Cependant, son appréciation demeure relative à l'observateur. L'utilisation de ce paramètre ne peut avoir qu'une valeur indicative.

Aussi, nous avons noté la présence d'un écoulement de sang pour la totalité de l'effectif. Ce paramètre très facile à mettre en évidence, ne nous a pas aidé pour localiser la période de l'œstrus, car il s'est continué depuis le pro-œstrus et jusqu'au métœstrus sans interruption aucune et ce pour toutes les femelles. Donc, son utilisation a permis uniquement de repérer le début des chaleurs.

II.4.3.2. Etude des frottis vaginaux :

Nous avons noté des pics du taux d'éosinophilie de plus de 60% pour toutes les courbes étudiées. Cependant, la durée de maintien de ce pic était très variable d'un animal à l'autre. S'étalant entre 1 et 11 jours. Ces données n'ont pas permis de localiser avec précision le pic de LH (seulement 11.1% des cas), l'ovulation ou la période fertile. Son indication est donc limitée à la localisation d'œstrus vrais.

Néanmoins, l'apparition des PNN sur le frottis vaginal déterminant la fin de l'œstrus et le début du métœstrus, est un critère très utile pour repérer la fin de la période de fertilité chez la chienne.

II.4.3.3. Etude des mesures de la progestérone plasmatique :

Le dosage de la progestéronémie à lui seul permet de déterminer le jour du pic de LH et de l'ovulation. Les périodes de fécondabilité et de fertilité étaient estimées avec aisance. Cependant, chaque dosage a un certain coût. Si l'on compte 3 dosages minimum pour le suivi des chaleurs, le suivi deviendrait onéreux. Pour cette raison, le dosage de la progestérone n'est pas utilisé seul, mais en association avec d'autres paramètres, notamment cytologiques, beaucoup moins coûteux.

De plus, comme nous avons utilisé une méthode de dosage quantitatif, très précise (méthode RIA), les résultats du dosage de la progestéronémie ont été obtenus bien ultérieurement par rapport à l'expérimentation, une fois qu'on a atteint le nombre d'échantillons mesurables par une trousse de dosage (100 échantillons). Du point de vue scientifique, la précision des résultats a permis un suivi rigoureux des chaleurs en minimisant les doutes. Cependant, de point de vue pratique, l'obtention des résultats tardifs, s'est traduite par leur non utilisation pour les prises de décisions des saillies.

II.4.4. Biais :

Les femelles n°02, 12, 14 et 15 ont subi un traitement d'induction à la bromocriptine (Parlodel® Novartis). Le traitement d'induction pourrait être à l'origine de modifications des chaleurs de ces femelles, en faveur d'une amplification ou bien d'une atténuation des différents critères étudiés. Ceci pourrait représenter l'unique biais de cette étude.

II.5. Recommandations :

Pour une institution tel que le CFC/GN, il est fortement recommandé de réaliser un suivi de chaleurs pour les femelles destinées à la reproduction. Deux à trois jours après l'apparition des premiers signes des chaleurs, à savoir l'écoulement de sang, des frottis vaginaux devront être réalisés à un intervalle de 2 à 4 jours, jusqu'à l'augmentation du taux d'éosinophilie à plus de 60%. La mesure de la progestéronémie par des dosages semi quantitatifs est fortement recommandée pour repérer la période optimale de fécondabilité.

Les données relatives à chaque suivi devront être répertoriées dans les dossiers des femelles, afin de faciliter leur consultation au cours des examens ultérieurs.

Nous recommandons l'application du suivi des chaleurs pour la clientèle canine au niveau de la clinique du département vétérinaire à l'université de Blida. Les services rendus par cette pratique ne sont pas négligeables pour les propriétaires désireux de faire reproduire leurs femelles.

D'autre part, et à des fins scientifiques, la réalisation des suivis de chaleurs pourra permettre d'accroître nos connaissances dans ce domaine, afin de promouvoir cette discipline et d'envisager, plus tard, l'application des techniques de maîtrise de la reproduction telle que l'insémination artificielle.

De plus, la création d'une base de données regroupant tous les suivis réalisés au niveau de la clinique, pourrait permettre la maîtrise de la croissance de la population canine de la région, et d'autre part, la réalisation d'études rétrospectives qui permettraient de caractériser les particularités de la population canine autochtone.

CONCLUSION

Ce travail représente une étape simple, mais indispensable, pour la maîtrise du cycle œstral de la chienne. En effet, mener à bien un suivi de chaleurs chez la chienne, en s'appuyant sur des critères suffisamment objectifs pour repérer la période optimale de fécondabilité, représente une étape préliminaire indispensable quelle qu'en soit la technique de maîtrise du cycle à envisager.

Dans notre étude, et pour cerner la période optimale de fécondabilité nous avons, parmi les méthodes de suivi de chaleurs existantes, opté pour la méthode des frottis vaginaux associée au dosage de la progestérone plasmatique. L'examen des frottis vaginaux, est une méthode fiable à précision limitée, elle exige néanmoins la préparation minutieuse des prélèvements, et la connaissance préalable des types cellulaires présents sur les lames. Son coût abordable favorise son utilisation en pratique. Le dosage de la progestérone plasmatique offre le plus de précision pour déterminer la période optimale de fécondabilité. Son usage en pratique est cependant limité par son coût élevé.

En attendant l'application de l'échographie ovarienne à l'espèce canine, la réalisation des frottis vaginaux et des dosages de la progestérone plasmatique constituent, actuellement, l'alternative la plus fiable pour déterminer la période optimale de fécondabilité chez la chienne.

Cette étude, a permis de mettre en œuvre une approche méthodologique du sujet, avec une partie bibliographique qui dresse un état des connaissances actuelles, et qui présente les motivations qui ont poussé les auteurs à s'intéresser aux chaleurs de la chienne, et à mettre en œuvre différentes méthodes pour localiser sa période optimale de fécondabilité. La partie expérimentale est sous forme d'analyse descriptive. Elle met en œuvre la période des chaleurs, et évalue les méthodes utilisées pour déterminer la période optimale de fécondabilité chez la chienne.

En outre, cette étude a pu intéresser le centre de formation cynotechnique de la gendarmerie nationale, dans la mesure où elle permet d'améliorer la gestion des chaleurs afin d'accroître le nombre des portées, en programmant les saillies à un moment bien précis, avec un mâle bien choisi.

Sur le plan scientifique, cette étude s'insère beaucoup plus dans un cadre de sensibilisation aux particularités du cycle œstral de la chienne. La connaissance de la physiologie de la reproduction, et des problèmes posés par ses particularités représente la première étape vers sa maîtrise. Surtout que de telles techniques pourraient rendre service à l'étude des carnivores sauvages autochtones en voie de disparition, tel que le « Renard roux » dont quelques spécimens sont encore retrouvés dans la forêt de *Chrèa (Blida)*. Dans un tel cadre, cette étude revêt toute son importance.

BIBLIOGRAPHIE

A

ALLIET J., LALEGERIE P. (1997)

Cytobiologie
Ellipses, Paris, 860p.

ALTMAN P. L. (1962)

Growth, 1 vol
Biol. Handbooks, Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 540p.

ANDERSEN A. C., SIMPSON M. E. (1973)

The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle)
Geron-X Inc., California, 290p.

ANDERSON W. D., ANDERSON B. G. (1994)

Atlas of canine anatomy
Lea and Febiger, Philadelphia, p.774-779

ANDRÉ C., GALIBERT F. (2005)

La génétique canine : intérêt en médecine vétérinaire et humaine
Bull. Acad. Vét. France, tome 158, supplément au n°4
In: [<http://www.academie-veterinaire-france.fr>] (consulté le 22-11-2005)

ARON M., GRASSE F. (1966)

Biologie animale, 8^e édition.
Masson, Paris, 1421p.

B

BADINAND F. (1990)

Préparation, conditionnement, conservation et utilisation de la semence du chien en insémination artificielle.
Elev. Insemin. n°239, p.3-15.

BARONE R. (1986)

Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 01, ostéologie, 2^e édition.
Vigot, Paris, 761p.

BARONE R. (1990)

Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 04, splanchnologie II, 2^e édition.
Vigot, Paris, p.425-435.

BARON F. (2006)

Etude de la période pré ovulatoire chez la chienne Berger Allemand
Thèse Doct. Vét., Alfort, 83p.
In: [<http://theses.vet-alfort.fr>] (consulté le 20-07-2006)

BEIJERINK N. J., DIELEMAN S. J., KOOISTRA H. S., OKKENS A. C. (2003)

Low doses of bromocriptine shorten the interoestrus interval in the bitch without lowering plasma prolactin concentration
Theriogenology, vol.60, p.1379-1386

BELL E. T., BAILEY J. B., CHRISTIE D. W. (1973)

Studies on vaginal cytology during the canine oestrous cycle
Res. Vet. Sci., n°14, p.173-179.

BOUCHARD G. F., GROSS S. (1993)

Œstrus induction in the bitch with the synthetic oestrogen diethylstilbestrol
J. Reprod. Fertil., n°47, p.515-521

BOURDELLE E., BRESSOU C. (1953)*Carnivores, chien et chat*

Baillière, 502p.

BOYD J. S., RENTON J. P., HARVEY M. J., NICKSON D. A., ECKERSALL P. D., FERGUSON J. M. (1993)

Problems associated with ultrasonography of the canine ovary around the time of ovulation

J.Reprod.Fertil., n°47, p.101-105**BRION A. (1973)**

Vade-mecum vétérinaire

Vigot, 832p.

BUFF S., SALESS. H. (2000)

Suivi des chaleurs chez une chienne

Le point vétérinaire, n°208, p.65-58**BUFF S. (2001)**

Protocoles d'induction de l'œstrus chez la chienne

Le point vétérinaire, n°212, p.2-7.**BURDAS K. D. (1994)***Anatomy of the dog, An illustrated text, 3rd edition*

Mosby-Wolfe, Hanovre, p.28

BYSTED B. V., DIELEMAN S. J., HYTTTEL P., GREVE T. (2001)

Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in the dog.

J.Reprod.Fertil., n°57, p.181-186**C****CANIVENC R. (1970)**

Neuroendocrinologie.

Colloque C. N. R. S., n°927, p223-233.

CHAFFAUX S., BAZILE C. (2001)

La reproduction du chat et du chien

In: **THIBAUT C., LEVASSEUR M. C.***La reproduction chez les mammifères et l'homme*

INRA éd, Paris, p.825-837

CHASTANT-MAILLARD S., FONTBONNE A., MARSELOO N., VIARIS DE LESEGNO C., THOUMIRE S., REYNAUD K. (2005)

Reproduction assistée chez le chien

Le point vétérinaire, n°259, p.46-49**CHELLAT R., IDIR M. (2003)**

Suivi du cycle œstral chez la chienne par la méthode des frottis vaginaux comparatif a la vache

Thèse Doct. Vét., Blida, 60p.

CONCANNON P. W., WHALEY S., LEIN D., WISSLER R. (1983)

Canine gestation length: Variation related to time of mating end fertile life of sperm.

Amer. J. Vet. Res., n°44, p.1819-1821**CONCANNON P.W., DIGREGORIO G.B. (1986)**

Canine vaginal cytology

In: **BRUKE T. J.***Small animal reproduction and fertility. A clinical approach to diagnosis and treatment*

Lea & Febiger, Philadelphia, p.96-111

CONCANNON P. W. (1993)

Biology of gonadotrophin secretion in adult and prépubertal female dogs
J. Reprod. Fertil., n°47, p.3-27

CONCANNON P. W. (2000)

Canine pregnancy: prediction parturition and timing events of gestation

In: CONCANNON P. W., ENGLAND G., VERSTEGEN J., LINDE-FORSBERG C.

Recent Advances in Small Animal Reproduction

International Veterinary Information Service, Ithaca NY; A1202.0500

In: [<http://www.ivis.org>] (consulté le 12-02-2006)

CONCANNON P. W., ROMAGNOLI S. (2003)

Clinical use of progestins in bitches and queens: a review

In: CONCANNON P. W., ENGLAND G., VERSTEGEN J., LINDE-FORSBERG C.

Recent Advances in Small Animal Reproduction

International Veterinary Information Service, Ithaca NY; A1206.0903

In: [<http://www.ivis.org>] (consulté le 12-02-2006)

CONCANNON P. W. (2004)

Reproduction: Artificial insemination

In: World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings

In: [<http://www.ivis.org>] (consulté le 12-02-2006)

CONCANNON P. W. (2005)

Estrus induction in dogs: Approaches, Protocols and Applications

In: 30th World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings, Mexico city, Mexico.

In: [<http://www.vin.com/proceedings/proceedings.plx>] (consulté le 16-11-2006)

CONCANNON P. W., TEMPLE M., MONTANEZ A., NEWTON L. (2006)

Effects of dose and duration of continuous GnRH-agonist treatment on induction of estrus in beagle dogs: Competing and concurrent up-regulation and down-regulation of LH release

In: [<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the>] (consulté le 27-07-2006)

CORREA J. E. (2002)

Canine breeding and reproduction

Proceeding of a conference on: Extension Animal Scientist; Associate Professor; Food and Animal Sciences, Alabama, November 2002

In: [<http://www.vetcontact.com/presentations/show.php>] (consulté le 05-04-2006)

D**DERIVAUX J. (1971)**

Reproduction chez les animaux domestiques, tome 1 et 2.

Dérouaux, Liège,p.

DERIVAUX J., ECTORS F. (1980)

Physiopathologie de la gestation et obstétrique vétérinaire

Le point vétérinaire, Maison Alfort, 273p.

DIVISION D'HISTOLOGIE (2006)

Epithélium de revêtement (en ligne).

Université de Fribourg (Suisse). Département de médecine.

In : [<http://www.unifr.ch/histologie/elearningfree/francais/epithel/epithel03.html>] (consulté le 20-04-2006)

DOLF G., SCHLAPFER J., GAILLARD C., RANDI E., LUCCHINI V., BREITENMOSER U., STAHLBERGER-SAITBEKOVA N. (2000)

Differentiation of the Italian Wolf and the domestic dog based on microsatellite analysis

Genet. Sel. Evol., n°32, p.533-541

In: [<http://www.edpsciences.org>] (consulté le 22-11-2006)

DRIANCOURT M. A., LEVASSEUR M. C. (1991)

Cycles estriens et cycles menstruels

In: **THIBAUT C., LEVASSEUR M. C.**

La reproduction chez les mammifères et l'homme

INRA éd, Paris, p.680-698

DRIANCOURT M. A., GOUGEON A., ROYERE D., THIBAUT C. (1991)

La fonction ovarienne.

In: **THIBAUT C., LEVASSEUR M. C.**

La reproduction chez les mammifères et l'homme

INRA éd, Paris, p.273-298

DUFRAISSE H. E. P. (1952)

Essai de coloration des frottis vaginaux chez la chienne.

Thèse Doct. Vét., Toulouse, n°7.

DUMASY M. (2001)

Analyse in vivo de la fécondation dans l'espèce canine: dosages hormonaux, suivi échographique de l'ovulation et immunocytochimie sur ovocytes.

Thèse Doct. Vét., Alfort, 127p.

In: [<http://theses.vet-alfort.fr>] (consulté le 05-04-2006)

DURRANT B. S., RAVIDA N., SPADY T., CHENG A. (2006)

New technologies for the study of carnivore reproduction

In: [<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the>] (consulté le 27-07-2006)

E

ENGLAND G., CONCANNON P.W. (2002)

Determination of the Optimal Breeding Time in the Bitch: Basic Considerations

In: **CONCANNON P. W., ENGLAND G., VERSTEGEN J., LINDE-FORSBERG C.**

Recent Advances in Small Animal Reproduction

International Veterinary Information Service, Ithaca NY; A1231.0602

In: [<http://www.ivis.org>] (consulté le 12-02-2006)

ENGLAND C., CONCANNON P.W., YEAGER A. (2003)

Ultrasound imaging of the reproductive tract of the bitch

In: **CONCANNON P. W., ENGLAND G., VERSTEGEN J., LINDE-FORSBERG C.**

Recent Advances in Small Animal Reproduction,

International Veterinary Information Service, Ithaca NY; A1203.0703

In: [<http://www.ivis.org>] (consulté le 12-02-2006)

ENGALND G.C.W., BURGESS C.M., FREEMAN S.L., SMITH S.C., PACEY A.A. (2006)

Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch

In: [<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the>] (consulté le 27-07-2006)

F

FALLISARD B. (1998)

Comprendre et utiliser les statistiques dans les sciences de la vie, 2^e édition.

Masson, Paris, 332p.

FELDMAN E. C., NELSON R. W. (1996)

Canine and feline endocrinology and reproduction, 2nd edition

WB Saunders, Philadelphia, 785p.

FONTAINE M., CADORE J.-L. (1995)

Vade-mecum du vétérinaire, 16^e édition

Vigot, Paris, 1672p.

FONTBONNE A. (1995)

Insémination artificielle dans l'espèce canine
Encyclopédie vétérinaire, Paris, reproduction 09000, 7p.

FONTBONNE A. (1996a)

Les pièges des frottis vaginaux chez la chienne
Le point vétérinaire, n°176, p.19-25

FONTBONNE A. (1996b)

Reproduction-canine
Le point vétérinaire, numéro spécial: "affections héréditaires et congénitales des carnivores domestiques", p.214-220.

FONTBONNE A. (1996c)

Faire reproduire son chien ou sa chienne: les clefs d'une pratique réussie
Maradi, Martisserre, 304p.

FONTBONNE A. (1997)

Technique d'insémination intra-utérine par voie transcervicale chez la chienne
Le point vétérinaire, n°186, p.59-61

FONTBONNE A., BUFF S., GARNIER F. (2000)

Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelle dans l'espèce canine
Le point vétérinaire, n°209, p.27-33

FONTBONNE A., GUERIN C. (2003)

Les frottis vaginaux et le suivi du cycle œstral chez les carnivores
Intervet, Angers, 11p. + annexes.

FONTBONNE A., REYNAUD K., MARSELOO N., DUMASY M., CHASTANT-MAILLARD S. (2004)

In vivo meiotic resumption, fertilisation and early embryonic development in the bitch
Proceeding of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, Brésil, 4-6 août 2004, p144-146 [courrier électronique à Karine REYNAUD] [en ligne] kreynaud@vet-alfort.fr (le 15-11-2006)

FONTBONNE A. (2005)

Proceeding of a conference on: investigating and managing infertility in the bitch
ESAVS courses, Birmingham, Grande-Bretagne, 10 avril 2005, 251p.
In: [<http://www.vetcontact.com/presentations/show.php>] (consulté le 05-04-2006)

FONTBONNE A. (2006)

L'infertilité dans l'espèce canine: Démarche diagnostique du vétérinaire.
Cours [en ligne] de l'U. P. Reproduction animale, T1 Pro, animaux de compagnie, Alfort, 263p.
In: [http://cours.vet-alfort.fr/fichier/afontbonne/r_cours_230/infertilite_fichiers/frame.htm] (consulté le 05-04-2006).

G**GIER J., KOOISTRA H. S., DJAJADININGRAT-LAANEN S. C., DIELEMAN S., OKKENS A. C. (2004)**

Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicular stimulating hormone, 17 β -œstradiol and progesterone during the follicular, ovulatory and early luteal phase in the bitch
Proceeding of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, Brésil, 4-6 août 2004, p201-202 [courrier électronique à Karine REYNAUD] [en ligne] kreynaud@vet-alfort.fr (le 15-11-2006)

GIER J., KOOISTRA H. S., DJAJADININGRAT-LAANEN S. C., DIELEMAN S., OKKENS A. C. (2006)

Differential regulation of the secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone around the time of ovulation in the bitch
In: [<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the>] (consulté le 27-07-2006)

GIROD C., CZYBA J. C. (1969)

Cours sur la biologie de la reproduction. Fascicule n°1

Simep. Lyon, 252p.

GOBELLO C., CONCANNON P. W., VERSTEGEN J. (2001)

Canine pseudopregnancy

In: **CONCANNON P. W., ENGLAND G., VERSTEGEN J., LINDE-FORSBERG C.**

Recent Advances in Small Animal Reproduction,

International Veterinary Information Service, Ithaca NY; A1215.0801

In: [<http://www.ivis.org>] (consulté le 12-02-2006)

GOBELLO C., COLOMBANI M., SCAGLIA H., DELASOTA R. L., GOYA R. G. (2002)

Heterogeneity of circulating prolactin in the bitch

Reprod. Nutr. Dev., INRA éditions, vol.41, p.505-511

GRAU H., WALTER P. (1975)

Précis d'histologie et d'anatomie microscopique des animaux domestiques

Vigot, Paris, 188p.

GUERIN C., PETIT C., BADINAND F. (1997)

Fécondité chez la chienne après saillie ou insémination artificielle : étude sur 202 chiennes.

Le point vétérinaire, n°180, p.51-56

GUERIN C. (1998)

Détermination du moment de l'ovulation chez la chienne, implications pour la saillie ou l'insémination artificielle.

Rec. Med. Vet., n°174, p117-123

GÜNZEL A. R., KOIVISTO P., FUGNER J. A. (1986)

Electrical resistance of vaginal secretion in the bitch

Theriogenology, n°25, p.559-570

GÜNZEL A. R., ZABEL S. BUNCK C. F. (2004)

An investigation on the luteal phase and pregnancy in normal and short cycling German Shepherd dogs

Proceeding of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, Brésil, 4-6 août 2004, p41-43 [courrier électronique à Karine REYNAUD] [en ligne] kreynaud@vet-alfort.fr (le 15-11-2006)

GUYANT L. (1988)

Canine vaginal cytology.

Vet. Tech., n°9, p.513-523

H

HADBI F., AMRANI F. (2003)

Suivi du cycle œstral de la chienne par les frottis vaginaux, étude comparative avec la brebis.

Thèse Doct. Vét., Blida, 82p+annexes.

HAY M. A., KING W. A., GARTLEY C. J., GOODROWE K. L. (1994)

Influence of spermatozoa on in vitro nuclear maturation of canine ova.

Biol. Reprod., n°50, p.145

HAY M.A., KING W.A., GARTLEY C.J., GOODROWE K.L. (2000)

Correlation of periovulatory serum and fecal progestins in the domestic dog

The Canadian Journal of Veterinary Research, n°64, p.59-63

In: [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>] (consulté le 26-11-2006)

HEAPE W. (1900)

The sexual season of mammals and the relationship of "pro-estrus" to menstruation, Part I.

Quart. J. Microbiol. Sci., n°44, p.1-70

HERON J. F. (2006)

Cytologie de Papanicolaou : Centre Régional François Baclesse, Faculté de Médecine de Caen.

In : [www.oncoprof.net/Generale2000/g04_Diagnostic/Histologie] (consulté le 02-11-2006)

HEWITT D. A., ENGLAND G. C., (1997)

Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches
J. Reprod. Fertil., n°51, p.83-91.

HEWITT D. A., WATSON P. F., ENGLAND G. C. (1998)

Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitches' oocytes
Theriogenology, n°49, p.1083-1101

HOFFMANN B., BÜSGES F., ENGEL E., KOWALEWSKI M. P., PAPA P. (2004)

Regulation of Corpus Luteum-function in the Bitch
Reproduction in Domestic Animals, n°39 (4), P.232-240
In: [http://www.vetcontact.com/en/art.php?a=411] (consulté le 01-12-2006)

HOLST P. A., PHEMISTER R. D. (1974)

Onset of diestrus in the beagle bitch: definition and significance.
Am. J. Vet. Res., n°35, p.401-406

HOSSEIN M. S., KIM M. K., JANG G., FIBRIANT O., JOO OH H., KIM H. J. KANG S. K., CHUN LEE B. (2006)

Influence of season and parity on the recovery of in vivo canine oocytes by flushing fallopian tubes
In: [http://www.elsevier.com/locate/anireprosci] (consulté le 27-07-2006)

J

JOHNSTON S. D., OLSON P. N. S., ROOT KUSTRITZ M. V. (2001)

Canine and feline theriogenology
WB Saunders, Philadelphia, p.16-41

JONES G. E., BROWNSTONE A. D., BOYNS A. R., (1976)

Isolation of canine prolactin by polyacrylamide gel electrophoresis
Acta. Endocrinol., n°82, p691.

K

KLEIN M., MAYER G. (1993)

Reproduction. In : *Physiologie. Les grandes fonctions.*
Flammarion, Paris, p.721-830

KUTZLER M. A. (2005)

Induction and synchronization of estrus in dogs
Theriogenology, vol.64, p.766-775
[courrier électronique à Michelle A. KUTZLER] [en ligne] michelle.kutzler@oregonstate.edu (le 13-02-2006)

L

LAROUSSE (1966)

Encyclopédie Larousse en couleurs, tome deux.
Librairie Larousse, Paris, p.615.

LATASTE F. (1892)

C. R. Soc. Biol., n°44, p765-769.

LEE W. M., KOOISTRA H. S., Mol J. A., DIELEMAN S. J., SCHAEFERS-OKKENS A. C. (2006)

Ovariectomy during the luteal phase influences secretion of prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the bitch
Theriogenology, vol.66, p.484-490

In: [<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the>] (consulté le 27-07-2006)

LEE S. R., KIM M. O., KIM S. H., KIM B. S., YOO D. H., PARK Y. S., PARK Y. B., HA J. H., RYOO Z. Y. (2006)

Effect of conditioned medium of mouse embryonic fibroblasts produced from EC-SOD transgenic mice in nuclear maturation of canine oocytes *in vitro*

Animal Reproduction Science, article in presse.

In: [<http://www.elsevier.com/locate/anireprosci>] (consulté le 27-07-2006)

LEROYER C., TAINURIER D., DARDENNE N., DESTRUMELLE S., BENCHARIF D. (2002)

Prévisions de la mise bas chez la chienne par dosage de la progestérone

Med. Vet., vol. 153, n°7, p.467-476

LESBOUYRIES G. (1949)

Reproduction des mammifères domestiques et Sexualité. 1 vol.

Vigot, Paris, 712p.

LEVASSEUR M. C. (1983)

Utero-ovarian relationships in placental mammals: role of uterus and embryo in the regulation of progesterone secretion in the corpus luteum. A review.

Reprod. Nutr. Develop., n°23, p.793-816

LEYMARIE P., MARTAL J. (1991)

Du corps jaune cyclique au corps jaune gestatif

In: **THIBAUT C., LEVASSEUR M. C.**

La reproduction chez les mammifères et l'homme

INRA éd, Paris, p.403-421

LINDE C., KARLSSON I. (1984)

The correlation between the cytology of the vaginal smear, and the time of ovulation in the bitch

J. small Anim. Pract., n°25, p.77-82

LUC A. (2005)

Interet de l'interprétation des frottis vaginaux chez la chienne en début de proestrus lors du suivi des chaleurs: étude expérimentale.

Thèse Doct. Vét., Alfort, 157p. +annexes

In: [<http://theses.vet-alfort.fr>] (consulté le 05-04-2006)

LUZ M. R. BRTAN C. M. BINELLI M. LOPES M. D. (2004)

In vitro prostaglandine F2-Alfa (PGF2- α) production from endometrium, corpus luteum and placenta explants of bitches.

Proceeding of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, Brésil, 4-6 août 2004, p35-36 [courrier électronique à Karine REYNAUD] [en ligne] kreynaud@vet-alfort.fr (le 15-11-2006)

M

MAHI C. A., YANAGIMACHI R. (1976)

Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*.

J. Exp.Zool., n°196, p.189-196.

MAI W. (1999a)

L'image échographique: formation et qualité

Le point vétérinaire, n°201, p.71-76

MAI W. (1999b)

Les artefactes de l'image échographique

Le point vétérinaire, n°202, p.49-53

MAILLET M., CHIARASINI D. (s.d.)

Histologie. Collection PCEM.

Bréal éditeurs, Montreuil, 222p.

MARSELOO N., FONTBONNE A., BASSU G., RIVIERE S., LEBLANC B., RAULT D., BOIOURGE V., CHASTANT MAILLARD S. (2004)

Comparaison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches.

Proceeding of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, Brésil, 4-6 août 2004, p75-77 [courrier électronique à Karine REYNAUD] [en ligne] kreynaud@vet-alfort.fr (le 15-11-2006)

MARSHALL F. H., RUNCIMAN J. G. (1914)

On the ovarian factor concerned in the occurrence of œstrus

J. Physiol., n°49(1-2), p.17-22

In: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov] (consulté le 26-11-2006)

MARSHALL F. H., WOOD W. A. (1923)

On the ovarian factor concerned in the occurrence of œstrus

J. Physiol., n°58(1), p.74-80

In: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov] (consulté le 26-11-2006)

MARTI J. A. (2002)

Vaginal cytology in the Bitch and Queen: Scientific presentation.

In: World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings

In: [http://www.ivis.org] (consulté le 12-02-2006)

McDONALD L. E. (1969)

Reproductive patterns in dogs

In: *Veterinary Endocrinology and Reproduction, 2nd edition*

Lea & Febiger, Philadelphia, p.377.

McDOUGALL K., HAY M. A., GOODROWE K. L., GARTLEY C. J., KING W. A. (1997)

Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches.

J.Reprod. Fertil., n°51, p.25-31.

METCALFE S. (1999)

Assisted reproduction in the bitch.

MSc Thesis, Monash University, Clayton, Australie.

MEUSY N. (1991)

Annexe: Dosages d'hormones et de médiateurs intervenant dans la reproduction.

In: **THIBAUT C., LEVASSEUR M. C.**

La reproduction chez les mammifères et l'homme

INRA éd, Paris, p.153-157

MEYERS-WALLEN V. N. (2001)

Relevance of the canine genome project to veterinary medical practice

In: **CONCANNON P. W., ENGLAND G., VERSTEGEN J., LINDE-FORSBERG C.**

Recent Advances in Small Animal Reproduction,

International Veterinary Information Service, Ithaca NY; A1218.060

In: [http://www.ivis.org] (consulté le 12-02-2006)

MORAILLON R., LEGEAY Y., FOURRIER P., LAPEIRE C. (1998)

Dictionnaire pratique de thérapeutique canine et féline, 4^e édition.

Masson, Paris, 569p.

N

NETT T. M., AKBAR A. M., PHEMISTER R. D. (1975)

Levels of luteinizing hormone, estradiol and progesterone in serums during the estrous cycle and pregnancy in the Beagle bitch.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., n°148, p.134.

NEVEUX M. (1999)

Les frottis vaginaux chez la chienne
Le point vétérinaire, n°202, p.37-44

NIZYAN'SKI W. (2006)

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, p.470-483
In: [<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the>] (consulté le 27-07-2006)

NO'THLING J.O., DE CRAMER K. G. M., GERBER D., KAMMER V.R. (2006)

Luteal and follicular count in bitches: Assessment by means of magnetic resonance imaging
In: [<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the>] (consulté le 27-07-2006)

O

OLSON P. N., THOMAS T. N., HUSTED P. W., NETT T. M. (1991)

Bilan clinique de la stérilité chez la chienne

In : **FORD R. B.**

Conduite diagnostique en médecine des carnivores domestiques
Masson, Paris, 709p.

ONCLIN K., VERSTEGEN J. P. (2004)

The role of corpus luteum in pregnancy and anoestrus regulation in the bitch
Proceeding of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, Brésil, 4-6 août 2004, p290-292 [courrier électronique à Karine REYNAUD] [en ligne] kreynaud@vet-alfort.fr (le 15-11-2006)

ONCLIN K., MURPHY B., VERSTEGEN J. P. (2002)

Comparisons of oestradiol, LH and FSH patterns in pregnant and non pregnant beagle bitches
Theriogenology, vol. 57, p.1957

OTOI T., FUJII M., TANAKA M., OOKA A., SUZUKI T. (2000)

Oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration
Theriogenology, vol. 54, p.535-542

OTOI T., SHIN T., KRAEMER D. C., WESTHUSIN M. E. (2004)

Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization
Reprod. Nutr. Dev., n° 44, p.631-637
In: [<http://www.edpsciences.org>] (consulté le 22-11-2006)

P

PAPANICOLAOU G. N. (1942)

A new procedure for staining vaginal smears
Science, n°95, p.438-439

PAPANICOLAOU - COLORATION [en ligne].

In: [<http://www.anapath.necker.fr/site/CYT/txt/cytpap.html>] (consulté le 16-10-2006)

PHEMISTER R. D., HOLST P. A., SPANO J. S., HOPWOOD M. L. (1973)

Time of ovulation in the Beagle bitch
Biology of Reproduction, n°8, p.74-82

PINEDA M. H., KAINER R. A., FAULKNER L. C. (1973)

Dorsal median post cervical fold in the canine vagina.
Am. J. Vet. Res., n°34, p.1487-1491.

PRELAUD P., ROSENBERG D., DEFORNEL P. (2002)

Testes hormonaux: Explorations fonctionnelles en endocrinologie des carnivores domestiques.
Masson, Paris, p3-18 et 145-166

R

REIMERS T. J., PHEMISTER R. D., NISWENDER G. D. (1978)

Radioimmunological measurement of follicle stimulating hormone and prolactin in the dog
Biol. Reprod., n°19, p.673.

REYNAUD K., FONTBONNE A., MARSELOO N., VIARIS DE LESEGNO C., THOUMIRE S., CHASTANT-MAILLARD S. (2005a)

Maturation ovocytaire, fécondation et développement embryonnaire chez la chienne.
Bull. Acad. Vét. France, n°2, p.167-172

REYNAUD K., FONTBONNE A., MARSELOO N., THOUMIRE S., CHEBROUT M., VIARIS DE LESEGNO C., CHASTANT-MAILLARD S. (2005b)

In vivo meiotic resumption, fertilisation and early embryonic development in the bitch
Reproduction, n°130, p.193-201

In: [<http://www.vetcontact.com/en/art.php>] (consulté le 01-12-2006)

RIBEIRO A. P. C., VICENTE W. R. R., APPARY´CIO M., GADELHA C. R. F., ALVES A. E., COVIZZI G. J. (2006)

Uterine leucocyte infiltration after artificial insemination in bitches

In: [<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the>] (consulté le 27-07-2006)

ROOT KUSTRITZ M. V. (2001a)

Use of Commercial Luteinizing Hormone and Progesterone Assay Kits in Canine Breeding Management

In: **CONCANNON P. W., ENGLAND G., VERSTEGEN J., LINDE-FORSBERG C.**

Recent Advances in Small Animal Reproduction,

International Veterinary Information Service, Ithaca NY; A1221.0501

In: [<http://www.ivis.org>] (consulté le 12-02-2006)

ROOT KUSTRITZ M. V. (2001b)

Use of Supplemental Progesterone in Management of Canine Pregnancy

In: **CONCANNON P. W., ENGLAND G., VERSTEGEN J., LINDE-FORSBERG C.**

Recent Advances in Small Animal Reproduction

International Veterinary Information Service, Ithaca NY; A1220.0401

In: [<http://www.ivis.org>] (consulté le 12-02-2006)

ROOT KUSTRITZ M. V. (2006)

Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract

Theriogenology, n°66, p.567-574

In: [<http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the>] (consulté le 27-07-2006)

S

SAINT-DIZIER M., RENARD J. P., CHASTANT-MAILLARD S. (2001)

Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes.

Reproduction, n°121, p.97-105

SAINT-DIZIER M., REYNAUD K., CHASTANT-MAILLARD S. (2004)

Chromatin, microtubules, and kinases activities during meiotic resumption in bitch oocytes.

Mol. Reprod. Dev., n°68, p.205-212.

SAUZAY D. (2005)

L'apport de l'échographie ovarienne

In: [<http://www.aniwa.com>] (consulté le 10-02-2005)

SHORR E. (1940)

A new technique for staining vaginal smears
Science, n°91, p.321-322

SCHUTTE A. P. (1967)

Canine vaginal cytology
J. small Anim. Pract., n°8, p.301-318

SCHIMAZU Y., NAITO K. (1996)

Both male and female pronuclei formation in canine oocytes inseminated at germinal vesicle stage.
J.Mamm.Ova Res., n°13, p.122-124

SMITH W. C., REESE W. C. Jr., (1968)

Characteristics of a Beagle colony, 1-Estrous cycle
Lab. Anim. Care., n°18, p.602.

SMITH R. M. (2005)

Preparing the Mastiff Bitch and Dog for Breeding
in: Westminster Veterinary Emergency/Trauma Center

SOKOLOWSKI JH. (1973)

Reproductive Features and patterns in the bitch
J. Am. An. Hosp. Assoc., n°9, P.71-81

SONGSASEN N., WILDT D. E. (2006)

Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog,
Anim. Reprod. Sci., article in press, 21p.

In : [<http://www.elsevier.com/locate/anireprosci>] (consulté le 18-11-2006)

SZÖLLÖSI D. (1991)

Maturation de l'ovocyte.

In: THIBAUT C., LEVASSEUR M. C.

La reproduction chez les mammifères et l'homme
INRA éd, Paris, p.299-314

T**TAINTURIER D. (2001)**

Intérêts d'un test rapide de dosage de la progestérone (ovulation-test®) chez la chienne
Vet repro, BVT, 1p.

TAINTURIER D., BENCHARIF D., GUINTARD C. (2003)

Insémination artificielle intra-utérine en sperme congelé chez la chienne; technique opératoire scandinave: le cathétérisme du col en aveugle

Prat Méd Chir Anim Comp, n°38, p.237-242

TANGUY DEZAUX C. M. M. (2004)

Etude du rôle de l'AMPC dans la reprise de la méiose ovocytaire chez la chienne

Thèse Doct. Vét, Alfort, 70p. +annexes

In: [<http://theses.vet-alfort.fr>] (consulté le 05-04-2006)

TARADACH C. (1980)

Frottis vaginaux chez la chienne beagle : détermination de la période d'ovulation à l'aide de l'indice éosinophile
Med. Vet., vol. 131, n°11, p.775-782

TELFER E., GOSDEN R. G. (1987)

A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*).

J. Reprod. Fertil., n°81, p.137-147.

TESORIERO J. V. (1981)

Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog.
J.Morphol., n°168, p.171-179

TSUTSUI T. (1975)

Studies on the reproduction in the dog
Jpn. J. Anim. Reprod., n°21, p.98-101

TSUTSUI T., EJIMA H. (1988)

Experimental induction of superfecundation in the dog
Jpn. J. Vet. Sci., n°50, p.581-583

TSUTSUI T. (1989)

Gamete physiology and timing of ovulation and fertilisation in dog
J. Reprod. Fertil., n°39, p.269-275

TSUTSUI T., HORI T., OKAZAKI H. (2001)

Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing.
J. Vet. Med. Sci., n°63, p.401-405

TSUTSUI T., HORI T., ENDO S., HAYAMA A., KAWAKAMI E. (2004)

Intrauterine transfer of early canine embryos
Proceeding of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, Brésil, 4-6 août 2004, p275-277 [courrier électronique à Karine REYNAUD] [en ligne] kreynaud@vet-alfort.fr (le 15-11-2006)

V**VAISSAIRE J-P. (1977)**

Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire
Maloine, Paris, 457p.

VAN DER STRICHT (1923)

Etude comparée des ovules de mammifères aux différentes périodes d'ovogenèse.
Arch. Biol., n°33, p.229-300.

VAUGHAN L. (1996)

Reproduction in the bitch
Irish Vet. J., n°49, p.626-628

VERSTEGEN G. (2002)

Estrous control in the bitch: Scientific presentation.
In: World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings
In: [<http://www.biolreprod.org>] (consulté le 23-03-2006)

VIARIS DE LESEGNO C., TANGUY - DEZAUX C., CHEBROUT M., REYNAUD K., CHASTANT - MAILLARD S. (2005)

Maturation ovocytaire *in vitro* chez la chienne
Bull. Acad. Vét. France, n°2, p.173-180

VOLKMANN D. H., LAMB S. V., SCHANBACHER B. J., SALERNO V. S., KRETZ C. M., HANSEN B. S., VINCENT S. E. (2004a)

The effect of storage time and temperature and anticoagulant on canine blood progesterone concentration
Proceeding of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, Brésil, 4-6 août 2004, p78-80 [courrier électronique à Karine REYNAUD] [en ligne] kreynaud@vet-alfort.fr (le 15-11-2006)

VOLKMANN D. H., KUTZLER M. A., WHEELER R., KREKELER N. (2004b)

The use of Desloreline implants for the synchronization of estrus in diestrus bitches.

Proceeding of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, Brésil, 4-6 août 2004, p52-54 [courrier électronique à Karine REYNAUD] [en ligne] kreynaud@vet-alfort.fr (le 15-11-2006)

W

WILDT D. E., CHAKRABORTY P. N. (1978)

Relationship of reproductive behaviour, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch
Biol. Reprod., n°18, p.561.

WILDT D. E., SEAGER W. J., CHAKRABORTY P. N. (1981)

Behavioural, ovarian and endocrine relationships in the pubertal bitch
J. Am. Sci., n°53, p.182.

WOLFGANG K. (1994)

Atlas de diagnostics échographiques : Examen gynécologique et reproduction (équim, bovin, ovin, caprin, porcin, chien et chat), traduit de l'allemand par LAPEIRE C.
Maloine, Paris, 255p.

Y

YAMADA S., SHIMAZU Y., KAWAJI H., NAKAZAWA M., NAITO K., TOYODA Y. (1992)

Maturation, fertilisation, and development of the dog oocytes *in vitro*
Biol. Reprod., n°46, p.853-858.

ANNEXES

Annexe 1: Identification des femelles en expérimentation.

N°	Nom	Tatouage	Matricule	Race	Age	Née le
01	ARINA	FN.749I	2120805	Berger Allemand	6 ANS	28-10-2000
02	BONA01	GN.821	2210821	Berger Allemand	4 ANS	31-01-2002
03	BONA02	GN.822	2210822	Berger Allemand	4 ANS	31-01-2002
04	CHARLOTTE	GN.837	2110837	Berger Allemand	5 ANS	20-03-2001
05	DATCHA	BAT.85	ND	Berger de l'Atlas	5 ANS	25-04-2001
06	DOUSHKA	BBM.54	ND	Berger belge malinois croisé	3 ANS	19-06-2003
07	IRA01	GN.827	2210827	Berger Allemand	4 ANS	08-02-2002
08	IRA02	GN.828	2210828	Berger Allemand	4 ANS	08-02-2002
09	LISA	BA.245	ND	Berger Allemand	4 ANS	08-08-2002
10	LORA02	GN.818	2110818	Berger Allemand	5 ANS	21-11-2001
11	LYSA	/	ND	Berger belge malinois	4 ANS	17-12-2002
12	MITCHA	DA-5738	9920801	Berger Allemand	7 ANS	14-04-1999
13	NEBRASKA	GI-8113	2020801	Berger Allemand	6 ANS	04-12-2000
14	RYM	AZAW 5	ND	Azawakh	5 ANS	03-02-2001
15	VENUS	COR 44	ND	Corniaud	5 ANS	04-06-2001
16	XAVA	DOB 99	ND	Doberman	3 ANS	12-03-2003

Annexe 2: Modèle de fiche d'exploitation pour frottis vaginal.

Numéro du frottis	Date et heure	Nom de la chienne		
01.10	Le 29/05/2006 à 11h25	LORA 02		
COMMEMORATIFS				
Etat de la vulve	Atrophié	Normale	Tuméfié X	
Nature de l'écoulement	Tarie	Séreux	Muqueux	Sanguinolent X
Signe d'Amantea	Positif		Négatif	
Autres signes				
Date de saillie/...../.....	Suspicion	Gestation	
Couleur de l'écouvillon	Blanc	Rose	Rouge X	Marron
OBSERVATION AU MICROSCOPE GROSSISSEMENT X 40				
Fond du frottis	Claire X	Granuleux	Muqueux	
Richesse en cellules	Très riche X	Riche	Pauvre	Très pauvre
Répartition des cellules	Dispersés	En amas X	Isolés	
Tendance tinctoriale	Basophile	Acidophile X	Mixte	
Réussite de la coloration	Mauvaise		Bonne X	
Nature des artefacts				
OBSERVATION AU MICROSCOPE GROSSISSEMENT X 100 ET/OU X 400				
Mucus	Absent X	Peu abondant	Abondant	
Cellules Superficielles entièrement kératinisés				3
Cellules Superficielles partiellement kératinisés				28
Cellules parabasales				0
Cellules parabasales en colonne				0
Cellules intermédiaires basophiles				0
Cellules intermédiaires polychromatophiles				0
Cellules du metœstrus				0
Cellules lysées				0
Hématies				0
Polynucléaires				0
Cellules de la fosse clitoridienne				1
Cellules néoplasiques				0
Spermatozoïdes				0
Bactéries				0
LES INDICES CYTOLOGIQUES				
Indice éosinophile				100%
Pourcentage d'acidophilie (%)				100%
Pourcentage de basophilie (%)				0%
DIAGNOSTIC CYTOLOGIQUE				
<i>Frottis très riche en cellules exclusivement superficielles acidophiles, disposées en amas, avec un fond de frottis limpide, un indice éosinophile de 100% et absence de polynucléaires. On conclut à un frottis d'œstrus. (œstrus cytologique).</i>				
DOSAGE DE LA PROGESTERONE				
				26.19 ng/ml.

Annexe 3: Base de données initiale regroupant les paramètres étudiés pour les 88 échantillons sélectionnés.

N° de femelle	Paramètre	PARAMETRES CELLULAIRES ETUDIES						PROGESTERONE PLASMATIQUE (ng/ml)
		EOSINOPHILIE		BASOPHILIE		POLYCHROMATOPHILIE		
		DATE	nombre	pourcentage	nombre	pourcentage	nombre	
2	12/08/2006	11,00	8,33	77,00	58,33	44,00	33,33	0,06
2	14/08/2006	14,00	10,69	105,00	80,15	12,00	9,16	0,04
2	16/08/2006	6,00	6,90	29,00	33,33	52,00	59,77	0,12
2	19/08/2006	72,00	68,57	25,00	23,81	8,00	7,62	0,13
2	21/08/2006	54,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
2	23/08/2006	78,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23
2	26/08/2006	67,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29
2	28/08/2006	50,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,93
2	30/08/2006	106,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,99
2	02/09/2006	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14,88
2	27/09/2006	ND	ND	ND	ND	ND	ND	17,17
3	24/06/2006	1,00	2,50	27,00	67,50	12,00	30,00	0,02
3	27/06/2006	0,00	0,00	20,00	34,48	38,00	65,52	0,05
3	01/07/2006	11,00	36,67	4,00	13,33	15,00	50,00	0,01
3	03/07/2006	4,00	12,12	16,00	48,48	13,00	39,39	0,04
3	06/07/2006	20,00	76,92	4,00	15,38	12,00	7,69	0,09
3	08/07/2006	30,00	93,75	0,00	0,00	2,00	6,25	0,09
3	10/07/2006	49,00	87,50	7,00	12,50	0,00	0,00	0,24
3	12/07/2006	80,00	86,96	8,00	8,70	4,00	4,35	0,31
3	15/07/2006	44,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,84
3	17/07/2006	37,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,12
3	20/07/2006	36,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	17,23
3	22/07/2006	43,00	95,56	0,00	2,22	0,00	2,22	26,29
3	24/07/2006	3,00	5,77	10,00	19,23	35,00	67,31	15,55
4	13/06/2006	0,00	0,00	32,00	100,00	0,00	0,00	0,19
4	17/06/2006	0,00	0,00	59,00	98,33	1,00	1,67	0,28
4	20/06/2006	0,00	0,00	38,00	90,48	3,00	7,14	0,16
4	24/06/2006	28,00	87,50	1,00	3,13	2,00	6,25	0,73
4	27/06/2006	27,00	87,10	0,00	0,00	3,00	9,68	0,86
4	01/07/2006	31,00	96,88	0,00	0,00	1,00	3,13	2,68
4	15/07/2006	1,00	1,27	7,00	8,86	68,00	86,08	26,38
4	22/07/2006	1,00	3,33	20,00	66,67	7,00	23,33	29,04
6	13/06/2006	49,00	96,08	10,00	0,00	2,00	3,92	0,53
6	17/06/2006	41,00	91,11	1,00	2,22	3,00	6,67	10,53
6	20/06/2006	32,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,43
6	24/06/2006	17,00	44,74	0,00	0,00	21,00	55,26	47,34
6	27/06/2006	0,00	0,00	5,00	18,52	22,00	81,48	29,66

6	01/07/2006	2,00	3,77	26,00	49,06	25,00	47,17	21,76
6	12/07/2006	1,00	2,00	13,00	26,00	36,00	72,00	25,13
7	13/06/2006	13,00	61,90	0,00	0,00	8,00	38,10	10,62
7	17/06/2006	4,00	10,81	20,00	54,05	11,00	29,73	19,25
7	20/06/2006	0,00	0,00	15,00	48,39	16,00	51,61	25,44
7	24/06/2006	4,00	10,00	23,00	57,50	12,00	30,00	20,59
7	27/06/2006	1,00	2,56	35,00	89,74	2,00	5,13	21,87
7	01/07/2006	4,00	10,81	15,00	40,54	18,00	48,65	23,32
10	13/06/2006	17,00	3,23	0,00	96,77	34,00	0,00	26,19
10	17/06/2006	0,00	11,43	5,00	85,71	7,00	2,86	30,67
11	13/06/2006	39,00	88,12	0,00	0,00	9,00	11,88	2,39
11	17/06/2006	89,00	90,35	0,00	0,00	12,00	9,65	18,06
11	20/06/2006	103,00	3,03	0,00	75,76	11,00	18,18	22,20
11	24/06/2006	1,00	3,45	25,00	48,28	6,00	27,59	30,51
11	27/06/2006	1,00	5,41	14,00	43,24	8,00	45,95	41,00
11	01/07/2006	2,00	9,30	16,00	69,77	17,00	20,93	28,34
11	15/07/2006	4,00	23,53	30,00	76,47	9,00	0,00	37,34
12	02/08/2006	0,00	0,00	15,00	33,33	30,00	66,67	0,00
12	05/08/2006	16,00	13,33	55,00	45,83	49,00	40,83	0,00
12	07/08/2006	1,00	1,64	14,00	22,95	46,00	75,41	0,00
12	09/08/2006	3,00	3,45	40,00	45,98	44,00	50,57	1,01
12	12/08/2006	71,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	14/08/2006	15,00	26,79	0,00	0,00	41,00	73,21	0,08
12	16/08/2006	65,00	91,55	0,00	0,00	6,00	8,45	1,85
12	19/08/2006	98,00	98,99	0,00	0,00	1,00	1,01	9,78
12	21/08/2006	65,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15,73
12	23/08/2006	72,00	86,75	0,00	0,00	11,00	13,25	28,70
12	26/08/2006	59,00	64,13	5,00	5,43	23,00	25,00	25,11
12	28/08/2006	25,00	24,51	27,00	26,47	47,00	46,08	32,57
12	30/08/2006	25,00	32,89	39,00	51,32	12,00	15,79	16,82
12	02/09/2006	ND	ND	ND	ND	ND	ND	35,37
14	12/08/2006	1,00	2,44	31,00	75,61	9,00	21,95	0,00
14	14/08/2006	5,00	10,42	33,00	68,75	10,00	20,83	0,01
14	16/08/2006	3,00	5,88	37,00	72,55	11,00	21,57	0,01
14	19/08/2006	76,00	91,57	4,00	4,82	3,00	3,61	0,16
14	21/08/2006	61,00	91,04	5,00	7,46	1,00	1,49	0,18
14	23/08/2006	67,00	98,53	1,00	1,47	0,00	0,00	0,32
14	26/08/2006	47,00	97,92	1,00	2,08	0,00	0,00	2,12
14	28/08/2006	76,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,92
14	30/08/2006	62,00	88,57	2,00	2,86	6,00	8,57	14,82
14	02/09/2006	ND	ND	ND	ND	ND	ND	27,49
15	09/08/2006	0,00	0,00	35,00	92,11	3,00	7,89	0,02

15	12/08/2006	0,00	0,00	17,00	34,69	32,00	65,31	0,02
15	14/08/2006	0,00	0,00	23,00	52,27	21,00	47,73	0,03
15	16/08/2006	4,00	8,00	9,00	18,00	37,00	74,00	0,03
15	19/08/2006	43,00	89,58	0,00	0,00	5,00	10,42	0,12
15	21/08/2006	35,00	92,11	0,00	0,00	3,00	7,89	0,13
15	23/08/2006	43,00	86,00	0,00	0,00	7,00	14,00	0,15
15	26/08/2006	63,00	98,44	0,00	0,00	1,00	1,56	1,61
15	28/08/2006	43,00	75,44	0,00	0,00	14,00	24,56	3,00
15	30/08/2006	75,00	92,59	0,00	0,00	6,00	7,41	15,29

Annexe 4: Test du chi-2 (χ^2).

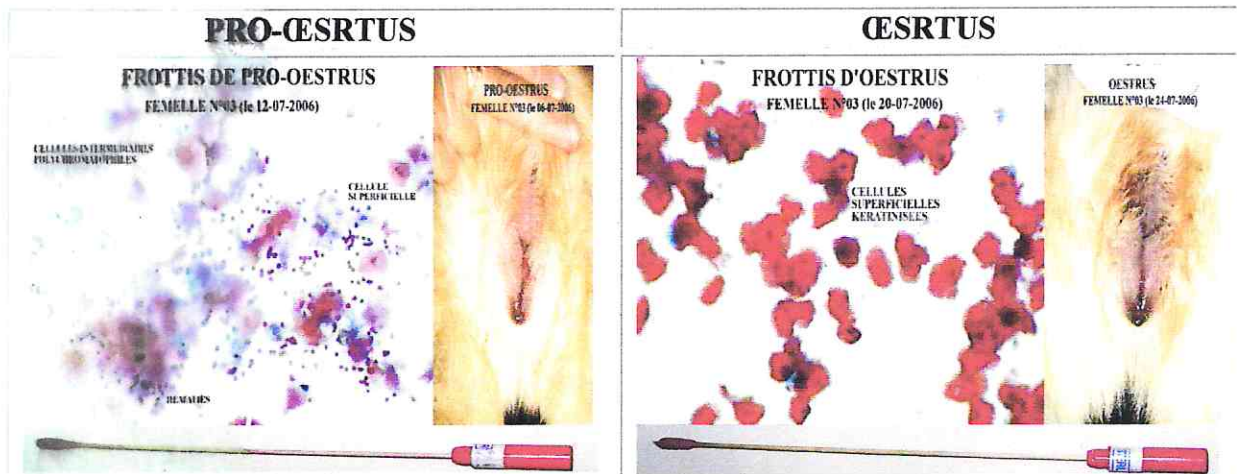
Intervalles(P4)	0	0 - 20	20 - 40	40 - 60	60 - 80	80 - 100	
0	1	3	0	0	0	1	5
]0 - 2[7	9	1	1	2	18	38
[2 - 10[1	1	1	0	1	5	9
[10 - 20[1	6	0	0	0	6	13
[20 - 30]	3	7	1	0	2	3	16
[30-50[1	1	1	1	0	3	7
	14	27	4	2	5	36	
							88
ddl = (6-1) (6-1) = 5x5=25°							

1	0,0525974	1,40075758	0,22727273	0,11363636	0,28409091	0,53434343	2,61269841
2	0,1507177	0,60645933	0,3062201	0,0215311	0,01172249	0,38755981	1,48421053
3	0,13023088	1,12350355	0,85353535	0,20454545	0,46691919	0,47194164	3,25067607
4	0,5516983	1,01427739	0,59090909	0,29545455	0,73863636	0,08741259	3,27838828
5	0,08116883	0,89057239	0,10227273	0,36363636	1,30909091	1,92045455	4,66719577
6	0,01159555	0,61333574	1,46103896	4,44480519	0,39772727	0,00649351	6,93499622
	0,97800867	5,64890598	3,54124896	5,44360902	3,20818713	3,40820552	
							22,2281653 (NS)

Annexe 5: Étude du cycle œstral de la femelle n°03 par application des frottis vaginaux et du dosage de la progestérone plasmatique.

Le tableau ci-dessous représente des photos du périnée, de l'écouvillon et du frottis vaginal correspondant à chacune des quatre phases du cycle de la chienne n°03 (BONA02).

Les frottis vaginaux prélevés sur la chienne n°03, étaient colorés par la technique de Harris-Schorr. Les photos ont été prises à l'aide d'une camera motic® adaptable au microscope du même modèle.



COURBE D'ÉVOLUTION DE LA PROGESTÉRONÉMIE DURANT LES QUATRE PHASES DU CYCLE DE LA FEMELLE N°03

