

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة ابن خلدون تيارت

UNIVERSITE IBN KHALDOUN – TIARET

معهد علوم البيطرة

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

قسم الصحة الحيوانية

DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de docteur en médecine vétérinaire

Présenté par : -Benzaidi Youcef

-Youcef Mustapha Djaouad

Thème

Importance du suivie du cycle œstral chez la chienne par
examen cytologique

Soutenu le : 24/06/2024

Jury :

Grade

-Président : Dr. CHIKHAOUI Mira

PROFESSEUR

-Encadrant: Dr. SLIMANI Khaled Mabrouk

MCB

-Examineur: Dr. AYAD Mohamed Amine

MCA

Année universitaire : 2023/ 2024

Remerciements

"Je remercie Dieu chaque jour pour la personne que je suis devenue, pour les leçons apprises et les bénédictions reçues."

- Au Président du Jury **PROFESSEUR Chikhaoui Mira** pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce mémoire et que vous êtes rendue disponible pour ma soutenance. Sincères remerciements.

-À l'examineur de ce mémoire **Dr AYAD Mohamed Amine** nous avoir fait l'honneur d'accepter l'évaluation de ce mémoire. Sincères remerciements.

-À mon encadrant **Dr SLIMANI Khaled Mabrouk** je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour votre dévouement et vos efforts inlassables pour nous enseigner et nous guider sur le chemin qui mène à devenir de bons docteurs. Votre passion pour l'enseignement et votre expertise ont été une source d'inspiration constante pour moi et pour tous ceux que vous avez encadrés.

Grâce à votre mentorat attentif et vos conseils avisés, j'ai non seulement acquis des connaissances essentielles, mais j'ai également développé une compréhension plus profonde de ma vocation. Votre capacité à nous pousser à exceller tout en nous soutenant dans les défis est vraiment admirable.

Votre influence positive ne se limite pas à nos compétences académiques ; elle s'étend à notre développement personnel et professionnel. Vous avez façonné nos valeurs et nos perspectives, et nous avons la chance d'avoir été guidés par quelqu'un d'aussi dévoué et compétent que vous.

Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour nous. Votre impact dans nos vies restera gravé dans nos cœurs et dans nos carrières.

-Nos remerciements s'adressent également **Dr. Benssghieur. F** pour ses conseils et sa collaboration pour la réalisation de ce travail.

Dédicaces

À mes chers parents, frères et sœurs,

Je tiens aujourd'hui à vous exprimer ma profonde gratitude pour votre soutien indéfectible tout au long de mon parcours. Votre amour, vos encouragements et votre présence ont été des piliers essentiels qui m'ont permis d'atteindre mes objectifs.

À travers les hauts et les bas, vous avez toujours été là pour me guider, m'encourager et m'inspirer à donner le meilleur de moi-même. Chaque succès que j'ai connu est le reflet de vos sacrifices, de votre soutien inconditionnel et de vos précieux conseils.

À mes parents, je vous remercie pour avoir été mes premiers enseignants, mes modèles de persévérance et de dévouement. Votre amour désintéressé et votre foi en moi m'ont donné la force de poursuivre mes rêves.

À mes frères et sœurs, je vous remercie pour les liens indéfectibles que nous avons tissés, pour votre camaraderie et votre soutien mutuel à chaque étape de notre vie ensemble.

Que ce message soit le témoignage de ma reconnaissance éternelle pour tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour moi. Je suis profondément reconnaissant(e) de vous avoir comme famille et je suis fier/fière de partager chaque réussite avec vous.

Avec tout mon amour et ma gratitude sincère,

À mes chers collègues et à toute l'équipe de la clinique,

Je tiens à prendre un moment pour exprimer ma profonde gratitude envers chacun d'entre vous. Travailler avec une équipe aussi dévouée et compétente a été une expérience enrichissante et inspirante.

Votre professionnalisme, votre expertise et votre esprit d'équipe sont des qualités qui font de notre environnement de travail un lieu où l'excellence médicale et le bien-être des patients sont toujours prioritaires. Chaque jour passé à vos côtés m'a permis de grandir professionnellement et personnellement.

Table des matières

Résumé

Introduction	1
Première partie :	3
1. Rappels sur le cycle œstral chez la chienne.	3
1. Le cycle de reproduction	4
1.1. La puberté :	4
1.2. L'intervalle interœstral :	4
1.3. Les différentes phases du cycle œstral :	4
a. L'anœstrus :	4
b. Le proœstrus :	4
c. L'œstrus :	5
d. Le metoœstrus ou dioœstrus :	5
1.4. Endocrinologie de la reproduction :	5
1.4.1 Profil hormonal du cycle :	7
a. L'anœstrus :	7
b. Le pro-œstrus :	7
c. L'œstrus :	8
d. Le metœstrus :	9
1.4.2 Récapitulatif des événements biologiques se produisant pendant les chaleurs :	11
a. La phase folliculaire :	11
b. L'ovulation et la maturation ovocytaire :	12
1.4.3 La phase lutéale :	13
a. Particularités chez la chienne de la phase lutéale :	13
b. Particularités de la lutéolyse chez la chienne :	14
Deuxième partie	15
2. Particularité De Cycle Œstrale Chez La Chienne Sur Le Plan Cytologique.....	15
2.1 Observation microscopique :	16
a. Types cellulaires :	16
b. Cellules parabasales :	16

c. Cellules intermédiaires :	17
d. Petites cellules intermédiaires :	17
e. Grandes cellules intermédiaires :	18
f. Cellules superficielles :	19
2.1.2 Autres cellules vaginales :	20
a. Cellules « metoestrales » :	20
b. Cellules spumeuses ou « foam cells » :	21
c. Les cellules superficielles avec des corps cytoplasmiques :	21
d. Cellules épithéliales contenant des grains de mélanine :	21
e. Cellules néoplasiques :	21
2.1.3 Autres populations cellulaires :	22
a. Erythrocytes :	22
b. Leucocytes :	22
c. Cellules de la fosse clitoridienne :	22
d. Spermatozoïdes :	22
e. Bactéries :	23
2.2 Variations de la cytologie vaginale au cours du cycle Œstral :	23
a. Durant le proestrus précoce :	23
b. Durant le proestrus moyen :	23
c. Durant le proestrus tardif :	24
d. Durant l'Œstrus :	25
e. Durant le metoestrus précoce :	27
f. Durant le metoestrus moyen et tardif :	28
g. Durant l'anœstrus :	29
Troisième partie :	31
3. Moyen de détection des chaleurs et de l'ovulation chez la chienne (technique, cytologique et hormonal)	31
3.1. Détermination de la date d'ovulation :	32
a. Indications	32
3.2 Cytologie :	33
3.2.1 Cytologie vaginale :	33
3.2.2 Méthode de prélèvement :	33
a. Prélèvement avec une pipette :	33

b. Ecouvillonnage :	34
3.2.3 Fixation du prélèvement :	37
3.3 Différentes techniques de coloration :	37
a. Coloration de May-Grünwald-Giemsa :	37
b. Bleu de méthylène :	38
c. Coloration de HarrisShorr :	39
d. Coloration de Papanicolaou :	40
3.4 Observation microscopique :	41
3.5 Index cytologiques :	42
3.5.1 Index éosinophile (IE) :	42
a. Variations de l'IE au cours du cycle œstral :	42
a.1. Durant l'anœstrus :	42
a.2. Durant le proœstrus :	42
a.3. Durant l'œstrus :	43
a.4. Durant le métoœstrus :	43
b. Avantages et inconvénients l'index éosinophile :	44
3.5.2 Index carypyncotique (ICP) :	44
a. Variation au cours du cycle œstral :	45
b. Avantages et les inconvénients de L'index carypyncotique (ICP) :	45
3.5.3 Index superficiel (IS) :	45
a. Variations au cours du cycle œstral :	45
b. Avantages et les inconvénients L'index superficiel (IS) :	46
3.6 Interprétation et détermination de la phase du cycle sexuel :	46
4. Les dosages Hormonaux :	47
4.1. Dosage de l'œstradiol :	47
4.2. Dosage de LH :	47
4.3. Dosage de la progestérone plasmatique :	49
5. Evolution de la progestéronémie au cours du cycle Selon différents auteurs on observe la progression suivante :	50
6. Réalisation pratique :	51
7. Intérêts et limites :	52
Partie expérimentale.....	54
Chapitre I : Matériels et méthode.....	55

MATERIELS ET METHODE :	56
1. Lieu et durée d'étude :	56
2. Présentation de cas :	56
3. Protocole expérimental :	58
4. Matériel et méthode :	59
5.1. Matériels :	59
5.1.1. Matériels utilise pour le frottis vaginal :	59
5.1.2. Colorant :	60
5.1.3. Microscope :	61
5.2. Méthodes :	62
5.2.1. Examen clinique :	62
Résultats et discussion	66
1. Résultats :	67
1.1 Présentation des cas cliniques :	73
2.Discussion :	90
3.Conclusion	94

Liste des figures

Figure 1 : Evolution hormonale (LH, progestérone et œstradiol) au cours du cycle sexuel chez la chienne gestante d'après (Fontbonne et al.2000).....	7
Figure 2 : représentation schématique de la courbe de progestérone chez une chienne gestante et non gestante d'après (Baron F.2006).....	11
Figure 3 : Cellules parabasales au grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr.....	17
Figure 4: petites cellules intermédiaires au grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr (Mialot, 1984). 18	
Figure 5: Petites cellules intermédiaires au grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr (Mialot, 1984).18	
Figure 6 : Les cellules du frottis vaginal (Neveux, 1999).....	19
Figure 7 : Cellules superficielles kératinisées anucléés au grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr (Mialot, 1984).....	20
Figure 8 : Cellules metoestrales au grossissement x1000, coloré avec la méthode HarrisShorr (Mialot, 1984).....	21
Figure 9 : Frottis de proestrus débutant grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr (Alain Fontbonne, 1996).....	23
Figure 10 : Frottis de proestrus moyen grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr (cliché Alain Fontbonne, 1996).....	24
Figure 11 : Frottis de proestrus tardif grossissement x100, coloré avec la méthode HarrisShorr (cliché Alain Fontbonne ,1996).....	25
Figure 12 : Frottis d'œstrus grossissement x100, coloré avec la méthode HarrisShorr (cliché Alain Fontbonne, 1996).	26
Figure 13 : Frottis de début de metoestrus grossissement x100, coloré avec la méthode HarrisShorr (cliché Alain Fontbonne, 1996).....	28
Figure 14 : Frottis de metoestrus grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr (cliché Alain Fontbonne, 1996).....	29
Figure 15: Frottis d'ancestrus grossissement x100, coloré avec la méthode HarrisShorr (cliché Alain Fontbonne, 1996).....	30
Figure 16: Rappels anatomiques et technique de prélèvement (Johnston et al. 2001).	35
Figure 17: Technique de prélèvement par écouvillonnage (Bowen, 2000).....	35
Figure 18 : schéma des différentes couches de l'épithélium vaginal de la chienne (Dumon, 2009).	37
Figure 19: Frottis vaginal de chienne coloré avec la méthode Diff-Quick ® (Bowen, 2000).	38
Figure 20: Frottis vaginal au grossissement 1000 pratiqué chez une chienne et coloré avec la technique de Papanicolaou. Coloration verte du cytoplasme (cellule parabasale), coloration bleutée du noyau. (Heron, 2004).	41
Figure 21: Correspondance entre le pic de LH et le début de l'augmentation du taux de Progestérone (BARON F. et al.2006).	50
Figure 22 : La fiche d'examen clinique , consacrée au profil de reproduction d'une chienne berger belge reçus au niveau du service de pathologies des carnivores domestiques.	56
Figure 23: lames (CITOGLAS. REF217102 boîte de 50 PCS).	59

Figure 24 : Ecouvillon stérile (Plastic Tipped Applicators).....	59
Figure 25 : kit RAL555 (RAL DIAGNOSTICS).....	60
Figure 26: lecture de la lame sous microscope optique OPTIKA B-350.....	61
Figure 27 : lecture de la lame sous microscope optique KERN OPTICS.	61
Figure 28 : Une chienne de race Chihuahua de 11 ans placée en position debout pour réalisation d'un écouvillon vaginale.....	63
Figure 29 : prélèvement de l'échantillon avec réalisation d'un écouvillon vaginale chez une chienne berger belge malinois de 3 ans.	64
Figure 30 : étalement de l'écouvillon sur une lame de microscope.	64
Figure 31 : présentation d'un écouvillon.....	64
Figure 32 : (2) éosine-ral555.....	65
Figure 33 : (1) fix-ral555	65
Figure 34 : (3) bleu-ral555	65
Figure 35 : interprétation des résultats de frottis vaginale chez une chienne staff American de 1 ans et détermination la phase du cycle (proestrus moyen), sous microscope KERN OPTICS, au grossissement x40.....	65
Figures 36 : Vue d'un frottis vaginal d'Œstrus, coloré au KIT RAL 555, au grossissement x40, fond propre, hématies absentes ou rares, cellules superficielles kératinisées majoritaires.....	72
Figures 37 : Vue d'un frottis vaginal d'Œstrus, coloré KIT RAL 555, au grossissement x10, frottis riche en cellules, fond propre, rares globules rouges, cellules superficielles kératinisées majoritaires, présence d'amas de cellules kératinisées anucléées, indice éosinophilique $\geq 80\%$	73
Figures 38 : Vue d'un frottis vaginal d'Œstrus, coloré KIT RAL 555, au grossissement x10, frottis riche en cellules, fond propre, rares globules rouges, cellules superficielles kératinisées majoritaires, présence d'amas de cellules kératinisées anucléées, indice éosinophilique 100%.....	75
Figures 39 : Vue d'un frottis vaginal de proestrus moyen (milieu), coloré KIT RAL 555, au grossissement x40, riche en cellules, fond sale, cellules grandes intermédiaires majoritaires.....	76
Figures 40 : Vue d'un frottis vaginal de proestrus (milieu), coloré au KIT RAL 555, au grossissement x10, riche en cellules, fond sale, cellules grandes intermédiaires majoritaires, indice éosinophilique $> 40\%$	77
Figures 41 : Vue d'un frottis vaginal de proestrus précoce (début), coloré au KIT RAL 555, au grossissement x40, fond sale, pauvre en cellules, quelques cellules intermédiaires moyenne et quelques globules rouges.....	78
Figure 42 : Vue d'un frottis vaginal de proestrus tardif (fin), coloré KIR RAL555, au grossissement x10, riche en cellules, fond propre, cellules superficielles kératinisées et cellules grandes intermédiaires majoritaires. Indice éosinophile 70%.....	79
Figure 43 : Vue d'un frottis vaginal de proestrus tardif (fin de proestrus), coloré KIR RAL555, au grossissement x40, riche en cellules, fond propre, cellules superficielles kératinisées et cellules grandes intermédiaires majoritaires.....	80
Figure 44 : Vue d'un frottis vaginal d'anœstrus, coloré au KIT RAL555, au grossissement x10, frottis pauvre en cellules ; cellules parabasales majoritaires, mucus. Indice éosinophilique $\geq 10\%$	81

- Figure 45** : Vue d'un frottis vaginal de metoestrus, coloré au KIT RAL555, au grossissement x10, cellules petites intermédiaires majoritaires et présence de cellules intermédiaires avec leucocytes superposés (cercles), fond propre, nombreux leucocytes (polynucléaires neutrophiles), mucus, indice éosinophilique < 20%.....82
- Figure 46** : Vue d'un frottis vaginal de metoestrus, coloré au KIT RAL555, au grossissement x10, cellules petites intermédiaires majoritaires et présence de cellules intermédiaires avec leucocytes superposés (cercles), fond sale, nombreux leucocytes (polynucléaires neutrophiles), mucus, indice éosinophilique < 20%.....84
- Figure 47** : Vue d'un frottis vaginal de metoestrus tardif, coloré au KIT RAL555, au grossissement x40, quelques cellules petites intermédiaires et présence de plusieurs amas de cellules parabasales superposés (cercles), fond sale, mucus, indice éosinophilique < 20%.....85
- Figure 48** : Vue d'un frottis vaginal d'anœstrus, coloré au KIT RAL555, au grossissement x10, présence des cellules parabasales, frottis pauvre en cellules, fond propre, indice éosinophilique <10%.....86
- Figure 49** : Vue d'un frottis vaginal d'anœstrus, coloré au KIT RAL555, au grossissement x40, présence des cellules parabasales, fond propre.....87
- Figure 50** : Vue de frottis vaginale de la chienne Liza berger allemand, coloré au KIT RAL555, au grossissement x40, frottis sale, une forte infiltration des polynucléaires neutrophiles, présence de quelque cellule épithéliale parabasale, présence des cellules épithéliales d'origine cancéreuse ressemblable a des cellules parabasales mais avec un grand noyau et une anisocytose et anisocaryose marquée.....89

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux événements du cycle sexuel de la chienne.....	6
Tableau 2 : coloration Diff-Quick ®.....	38
Tableau 3 : Coloration de Harris 3 Shorr.....	39
Tableau 4 : La coloration de Papanicolaou.....	40
Tableau 5 : Valeurs du pic de LH selon les auteurs.....	49
Tableau 6 : Présentation des cas canines et de différentes races, sexes et âge.....	58
Tableau 7 : résultats cytologiques des chiennes après réalisations des frottis vaginaux.....	72

Liste des abréviations

CJ : corps jaune

FSH: Folliculo Stimulating Hormone

GnRH: Gonadotropine Releasing Hormone

LH : Hormone Lutéinisante

MII : Métaphase 2

PNN : Les polynucléaires neutrophiles

IE : Index Eosinophilique

ICP : Index carypyncnotique

IS : Index superficiel

EIA : Immunoenzymologie

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

RIM : Immuno- Migration Rapide

P4 : progestérone

RIA : Radio-immunologie

ECLIA : Electrochimiluminescence

IA : Insémination artificielle

TPR : Température, pouls, respiration

Résumé :

Cette étude porte sur la cytologie des frottis vaginal chez les chiennes du point de vue diagnostic des chaleurs et anomalies de reproduction, réalisée sur des cas cliniques canins consultés au service de pathologies des carnivores de l'Institut des Sciences Vétérinaire de Tiaret de l'année 2023-2024. Sur un effectif de 30 chiennes de races différentes, les différentes phases du cycle œstral ont été bien mis en évidence grâce à l'examen cytologique du frottis vaginal chez la majorité des cas avec précision, certaines chiennes faisant parti de cette étude ont présenté également des signes d'infection du tractus génitale et ceci a été bien mis en évidence grâce à l'examen cytologique. Les différentes populations cellulaires observées à l'examen microscopique ont été spécifiques à chacune des phases du cycle, nos résultats indiquent que l'examen cytologique dans le suivi de la reproduction chez la chienne est d'une utilité importante pour le clinicien sur le plan facilité d'exécution et exactitude d'orientation ainsi que pour les propriétaires ces derniers ont tendance de se baser uniquement sur les signes cliniques des chaleurs pour la mise en reproduction de leur chienne.

Abstract:

This study focuses on vaginal smear cytology in female dogs for the diagnostic perspective of estrus and reproductive abnormalities, conducted on clinical cases of canines consulted at the Carnivore Pathology Service of the Veterinary Sciences Institute of Tiaret during the academic year 2023-2024. Out of a total of 30 dogs of different breeds, the different phases of the estrous cycle were clearly delineated using cytological examination of vaginal smears in the majority of cases with precision. Some dogs in this study also presented signs of genital tract infection, which were well demonstrated through cytological examination. The different cellular populations observed under the microscope were specific to each phase of the cycle, and our results indicate that cytological examination in monitoring reproduction in female dogs is of significant utility for the clinician in terms of ease of execution and accuracy of guidance. Additionally, dog owners tend to rely solely on clinical signs of estrus for breeding their dogs.

ملخص:

حالات على أجريت الإنجابية، والتشوهات الحرارية تشخيص نظر وجهة من الكليات لدى المهبلية المسحات سيتولوجيا على الدراسة هذه تركز 30 من مكونة عينة في 2023-2024 لسنة تيارت لولاية البيطرية العلوم بمعهد اللحوم أكلة أمراض بقسم مراجعتها تمت للكلاب سريرية بدقة، الحالات معظم في المهبلية للطاخة الخلوي الفحص بفضل بوضوح النشوية للدورة المختلفة المراحل توضيح تم مختلفة، سلالات من كلبة الفحص خلال من بوضوح ذلك ظهر وقد التناسلي الجهاز إصابة وجود على علامة الدراسة هذه في المشاركة الكلاب إناث بعض أظهرت كما إلى نتائجنا وتشير الدورة، مراحل من مرحلة بكل خاصة المجهرية الفحص في ملاحظتها تمت التي المختلفة الخلايا مجموعات كانت. الخلوي الأخير هذا أصحاب يميل وكذلك التوجيه ودقة التنفيذ سهولة حيث من للطبيب كبيرة فائدة له الكليات في التكاثر مراقبة في الخلوي الفحص أن كلبتهم لتربية للحرارة السريرية العلامات على فقط الاعتماد إلى.

Introduction

La détermination du jour de l'ovulation est un objectif important dans le suivi des chaleurs chez la chienne ; ainsi la cytologie est intéressante dans la détermination de la phase du cycle, mais demeure insuffisante dans le diagnostic de l'ovulation et nécessite d'être combinée aux dosages de la progestérone et/ou à l'échographie des ovaires, Dans un cadre médical l'échographie des ovaires et la cytologie vaginale offrent la possibilité de dépistage d'éventuelles infections génitales ou des anomalies ovariennes (kystes, tumeurs) qui se répercute sur le cycle œstral de la chienne (Fontbonne A. et al,2000).

Le suivi des chaleurs tous comme le suivi de la gestation par l'usage de ces techniques, permet au clinicien de planifier une insémination artificielle, un transfère embryonnaire, un suivi de la gestation et une assistance médicale ou chirurgicale le jour prévu de la mise bas.

Pour les propriétaires la possibilité de gérer la mise en reproduction leurs chiennes.

Cette étude concerne l'importance du suivie de cycle œstrale chez la chienne par examen cytologique, en suivant le cycle œstral de chaque chienne individuellement et la planification de la reproduction. En étudiant des cas cliniques consultés au niveau du service de pathologies des carnivores de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret durant la période allant du mois de septembre 2023 jusqu'au mois de mai 2024, les l'objectifs sont :

- Visualisez les modifications cellulaires de la muqueuse vaginale par l'examen cytologique durant le cycle œstral chez la chienne.
- Déterminer les changements pathologiques qui peuvent survenir durant le cycle œstral chez la chienne par la lecture de frottis vaginaux.
- Répondre à la question suivante : l'examen cytologique au cours du cycle œstral est-il suffisant pour le diagnostic de ces différentes phases du cycle ainsi que pour la détermination du moment de l'ovulation chez la chienne.

Partie bibliographique

Première partie :
1. Rappels sur le cycle œstral chez la chienne.

1. Le cycle de reproduction

1.1. La puberté :

Chez la chienne, la puberté apparaît entre 6 et 24 mois avec une moyenne située entre 6 et 12 mois, âges auxquels les chiennes ont atteint les deux tiers de leur poids adulte. Elle est en général plus tardive chez les chiennes de grandes races. (Davidson et al, 2006).

Les premières chaleurs, et parfois même les secondes, ont un aspect clinique modifié. Il n'est pas rare d'observer des chaleurs incomplètes, ovulatoires ou non. Ces « fausses chaleurs » se présentent sous la forme d'un développement vulvaire et de pertes dont la durée n'excède pas une semaine. En général, après un maximum de trois périodes de chaleurs qui s'enchaînent à intervalles rapprochés d'une semaine à deux mois, un cycle ovulatoire normal est observé. Ces chaleurs sont qualifiées de disjointes ou également appelées en anglais « split-heats ». (Fontbonne A. et al,2000).

Des chaleurs dites « silencieuses » peuvent également survenir. Elles sont nommées ainsi car il y a peu voire aucune manifestation clinique, ainsi le propriétaire n'observant rien peut croire à un retard de puberté (Müller E. *et al*,1991), ce qui est rare chez la chienne à moins que cette dernière présente un trouble nutritionnel ou ait été traitée de façon abusive avec des antimycosiques ou des stéroïdes. (Müller E. *et al*,1991).

1.2. L'intervalle interœstral :

Cet intervalle se nomme également interœstrus, il correspond à la phase séparant deux périodes de chaleurs successives. Il regroupe le dioestrus et l'anœstrus. L'interœstrus dure en moyenne 7 mois (environ 31 semaines) mais peut varier de 4,5 à 13 mois voire plus. (England G. et al,2002).

1.3. Les différentes phases du cycle œstral :

a. L'anœstrus :

L'anœstrus, ou phase de repos sexuel apparent, est une période longue et obligatoire marquée par une inactivité ovarienne, une involution utérine et une réparation de l'endomètre. La vulve est petite et il n'y a pas de pertes vulvaires. D'un point de vue comportemental la chienne n'a aucun intérêt sexuel pour les mâles. Cette phase dure de 2 à 8 mois selon (Fontbonne A. et al,2000) Et 1 à 6 mois selon (Blendiger K. et al,2007).

b. Le præstrus :

C'est la période d'imprégnation oestrogénique et de croissance folliculaire caractérisée par des manifestations comportementales et génitales. Elle débute par des écoulements séro- hémorragiques à hémorragiques d'origine utérine à la commissure inférieure de la vulve. Cette dernière s'œdématie et devient turgescente. La chienne attire les mâles mais refuse l'accouplement par un comportement agressif ou joueur. La durée du præstrus varie de 3 jours à 3 semaines avec une moyenne de 9 jours selon

(Blendiger K. et al,2007), et de 6 à 11 jours avec un intervalle pouvant s'étendre de 2-3jours à 25 jours selon (Marti J.et al,2002).

c. L'œstrus :

C'est pendant cette phase qu'ont lieu l'ovulation et la fécondation. L'ovulation se produit 48 à 72 heures après le début de l'œstrus. (Guerin C.et al,1998) Ou 12 jours après le début du pro-œstrus mais cela varie beaucoup et peut aller de 5 à 27 jours après le début des chaleurs. (Romagnoli S.et al,2006).

L'œstrus comportemental dure en moyenne 7 jours avec un intervalle allant de 3 jours à 3 semaines selon (Blendiger K.et al,2007).

Selon (Verstegen et al,1998). Il peut débuter de 5 jours avant à 3jours après l'ovulation.

Les chaleurs regroupent les phases de pro-œstrus et d'œstrus.

d. Le metoestrus ou dioestrus :

Cette période, appelée phase lutéale, regroupe la fin de la mise en route du corps jaune (Metoestrus) et la phase d'état de celui-ci (dioestrus), les deux étant le plus souvent confondues chez la chienne. (Fontbonne A.et al,2000).

Le dioestrus est caractérisé par une activité importante des corps jaunes qui sécrètent la progestérone à un taux élevé, que la chienne ait été ou non fécondé.

Il débute par l'arrêt de l'acceptation du mâle. Sa fin est plus difficile à définir, en général on prend comme critère la reconstitution complète de l'endomètre, 2 à 3 mois lors d'absence de gestation. (Blendiger K.et al,2007) La vulve reprend un aspect semblable à ce qui peut être observé en anœstrus.

Cette phase dure en moyenne 75 jours avec un intervalle allant de 60 à 90 jours (Chaffaux S.et al,1998) et peut aller jusqu'à 110-140 jours selon (Marsan.et al,1993).

1.4. Endocrinologie de la reproduction :

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

Tableau 1 : Principaux événements du cycle sexuel de la chienne. (Fontbonne,2000).

Modifications		Chaleurs			
		Phases			
		Pro-œstrus (7 à 10 jours)	Œstrus (5 à 10 jours)	Metœstrus (60 à 120 jours)	Anœstrus (longueur variable)
Anatomiques	Cliniques et comportementales	<ul style="list-style-type: none"> • Vulve augmentée de volume • Pertes vulvaires sanguines • Attraction des mâles • Refus de l'accouplement 	<ul style="list-style-type: none"> • Vulve œdématiée • Pertes vulvaires réduites • Attraction des mâles • Réflexe de posture et acceptation du mâle 	<ul style="list-style-type: none"> • Nidation, Gestation • Mise bas et lactation où • Pseudo gestation Durée de vie du corps jaune 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de signe extérieur • Période optimale pour les interventions de convenances
	Ovaire	<ul style="list-style-type: none"> • Croissance folliculaire rapide 	<ul style="list-style-type: none"> • Ovulation puis • Développement du CJ 	<ul style="list-style-type: none"> • CJ sécrétant puis régressant 	<ul style="list-style-type: none"> • Croissance Folliculaire lente
	Utérus	<ul style="list-style-type: none"> • Congestion • Augmentation des glandes 	<ul style="list-style-type: none"> • Prolifération de l'endomètre 	<ul style="list-style-type: none"> • Nidation, gestation • Phase sécrétoire de l'endomètre, puis desquamation et restauration 	<ul style="list-style-type: none"> • Phase de repos
	Muqueuse vaginale	<ul style="list-style-type: none"> • Rouge, œdématiée • Présence de plis • Sécrétions fluides 	<ul style="list-style-type: none"> • Rougeâtre, moins œdématiée • Plis profonds et serrés • Dessèchement de la surface 	<ul style="list-style-type: none"> • Rose • Plis séparés, peu profonds • Surface à reflets humides 	<ul style="list-style-type: none"> • Lisse (rose) • Plis effacés • Modérément humide

1.4.1 Profil hormonal du cycle :

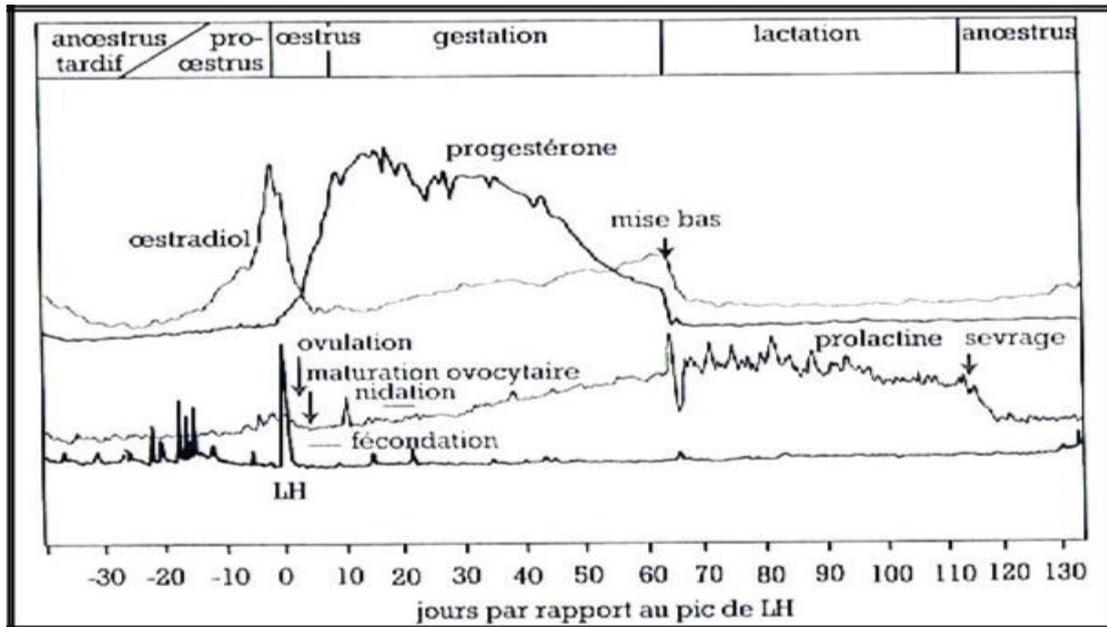


Figure 1 : Evolution hormonale (LH, progestérone et œstradiol) au cours du cycle sexuel chez la chienne gestante d'après (Fontbonne et al.2000).

a. L'œstrus :

Les concentrations d'œstradiol sont basales pendant l'œstrus. Le taux de progestérone n'est jamais basal avant J130-J160 du cycle (J0 étant le pic de LH). Les valeurs les plus basses, entre 10 et 50 pg/ml, sont observées en milieu et fin d'œstrus.

La concentration en FSH est variable mais plus élevée que dans d'autres étapes du cycle, sauf pendant le pic pré-ovulatoire de GnRH. La LH présente une concentration variable mais basse en moyenne avec des pulses tous les moins de 8 à 12H. (Verstegen J. et al, 2002).

b. Le pro-œstrus :

• En début de pro-œstrus :

Juste avant le début du pro-œstrus, il y a une augmentation des fréquences pulsatiles de LH et de FSH. Les intervalles entre les pulses sont de 1-2 heures voire moins. Il en résulte une augmentation importante de la concentration moyenne de LH.

L'origine de ces changements est sans doute une augmentation de la fréquence pulsatile et de la magnitude des pics de GnRH et possiblement un changement de sensibilité de l'hypophyse vis-à-vis de cette hormone.

L'augmentation des concentrations de LH et surtout de FSH provoque la stimulation d'une « Cohorte » de follicules ovariens qui se développent en follicules pro-œstraux sécrétant des œstrogènes. La chienne est de nouveau en chaleurs.

• Pendant le pro-œstrus :

Le développement rapide des follicules ovariens provoque l'élévation progressive de la concentration d'œstradiol circulante. Ceci a pour effet un déclin concomitant des taux de LH et de FSH (effet inhibiteur de l'œstradiol).

- En fin de pro-œstrus :

L'augmentation du relargage d'œstradiol aboutit à un pic qui prépare l'hypophyse et l'hypothalamus à une décharge massive de LH et de FSH. Le taux d'œstradiol passe d'une valeur basale située entre 2 et 10 pg/ml à une valeur située entre 50 et 120 pg/ml selon (Goodman M. et al, 2001), entre 30 et 70 pg/ml selon (Fontbonne A. et al, 2000).

Cette augmentation se fait sur une période de 10 à 14 jours. Le pic a lieu 2 à 3 jours avant le début de l'œstrus. (Goodman M. et al, 2001).

Les follicules ont atteint un plafond, ils combinent un métabolisme et une clairance élevés de l'œstradiol. Il en résulte un déclin de son taux. Cette baisse de sécrétion d'œstradiol provoque un pic de GnRH et un pic de LH présumés concomitants. (Concannon P.W, 2005).

La progestéronémie augmente 24 à 48 heures avant le pic de LH, au moment de la chute du taux d'œstradiol. Cette sécrétion pré-ovulatoire de progestérone semble déterminante pour le déclenchement du pic de LH. Concannon a démontré que si la montée de la progestéronémie ne se fait pas et que le ratio Progestérone/œstradiol reste inchangé alors le pic de LH ne se produit pas et il n'y a pas d'ovulation. (Verstegen J. et al, 2002).

Le pic de LH débute lorsque le taux de progestérone passe rapidement de valeurs basales, inférieures à 1 nmol/L, à des valeurs comprises entre 3 et 6 nmol/L. (Fontbonne A. et al, 2000)

Cette augmentation rapide de la concentration de progestérone ne peut être dissociée chronologiquement de l'augmentation du taux de LH. (Concannon P.W, 2005).

c. L'œstrus :

- La phase pré-ovulatoire :

Le pic de LH est responsable de la croissance terminale rapide et de la lutéinisation des follicules pré-ovulatoires. Ainsi, sous son influence, des follicules de 3-4 mm de diamètre sécrétant des œstrogènes sont transformés en follicules de 8-9 mm de diamètres sécrétant de la progestérone. Ce pic déclenche aussi l'ovulation. Il est souvent considéré comme le point central du cycle de la chienne, à partir duquel les événements sont datés (J0), il marque le début de l'œstrus endocrinologique alors que l'œstrus comportemental apparaît en moyenne à J1 avec des variations pouvant aller de J-3 à J+4 du cycle. (Concannon P.W, 2005).

La durée de la décharge ovulante semble varier de 1 à 3 jours selon (Concannon P. W, 2005), de 24 à 96h selon (Chaffaux S. et al, 1998), dure en moyenne 3,3 jours selon (Fontbonne A. et al, 2000), et 36 +/- 5 heures d'après (De gier. et al, 2006) Son taux sérique varie de 10 à 22 ng/ml selon (Fontbonne A. et al, 2000) et est en moyenne de 18,7 +/- 5,8 ng/ml selon (De gier. et al, 2006).

Le pic de FSH précède également l'ovulation et dure trois fois plus longtemps que le pic de LH. Il s'étend sur 110+/-8 heures. Le métabolisme et la clairance de cette hormone sont plus lents. (Concannon P.W,2005).

- La phase ovulatoire :

Le pic pré-ovulatoire de LH déclenche l'ovulation 30 à 48 heures plus tard, cela peut dépasser 96h dans certains cas. (De gier.et al,2006).

On considère que l'ovulation a eu lieu lorsque le taux circulant de progestérone dépasse 5 à 10 ng/ml. (Fontbonne A.et al,2000).

Lors de l'ovulation les ovocytes n'ont pas encore achevé leur maturation, ils ne sont donc pas immédiatement fécondables car bloqués en prophase de la première division méiotique. La phase de maturation ovocytaire dure 48 heures.

- La phase post-ovulatoire :

Les concentrations de LH et de FSH retrouvent progressivement leurs valeurs basales. Le taux d'œstradiol décroît et atteint un niveau basal entre le 6^{ième} et le 11^{ième} jour de l'œstrus endocrinologique, moment où débute le metœstrus cytologique.

La progestéronémie augmente rapidement avec l'installation des corps jaunes, et atteint des valeurs comprises entre 10 et 25 ng/ml au cours des 48 heures suivant l'ovulation, moment où l'ovocyte devient mature. (Romagnoli S.et al,2006).

d. Le metœstrus :

Que la chienne soit gestante ou non, le corps jaune sécrète de la progestérone à des taux élevés. Le taux circulant atteint un maximum entre le 15^{ième} et le 30^{ième} jour suivant le pic LH avec des valeurs variant de 15 à 90 ng/ml selon (Goodman M.et al,2001) et de 15 à 80 ng/ml selon (Blendiger K. et al,2007), puis décline jusqu'à atteindre un taux inférieur à 1 ng/ml à J60-J70 post pic LH ce qui marque la fin du diœstrus. (Goodman M.et al,2001) (Blendiger K. et al,2007).

Les profils hormonaux d'une chienne gestante et d'une chienne non gestante sont très proches, cependant il existe quelques différences.

- Lors de gestation : (Voir Figure 1)

- Après son pic, la progestéronémie chute légèrement.
- Cependant une légère remontée se produit entre le 25^{ième} et le 40^{ième} jour (post LH). Puis le taux de progestérone diminue lentement et atteint, au dernier tiers de la gestation, un plateau de 4 à 16 ng/ml pendant 1 à 2 semaines. Enfin la concentration chute brutalement dans les 24 à 36 heures avant le part et atteint des valeurs inférieures à 2ng/ml 12 à 24 heures avant la parturition. (Goodman M.et al,2001).

Cet effondrement est indispensable au déclenchement du part car il permet l'augmentation du nombre de récepteurs à l'ocytocine dans le muscle utérin.

Le taux d'œstradiol, devenu très faible au moment du pic de LH, remonte après le 25^{ième} ou 30^{ième} jour de gestation contribuant à la phase de croissance et de différenciation des acini mammaires (mammogénèse) et, plus tard à la préparation du part.

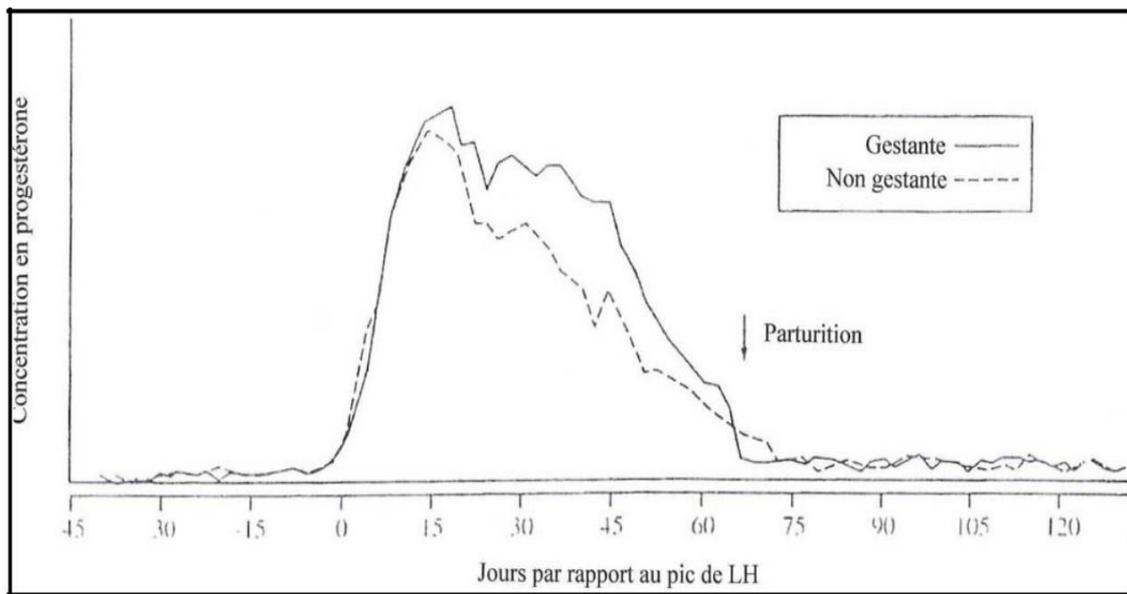
La Relaxine, produite par le placenta de la chienne, est détectable 19 à 28 jours après le pic de LH. Sa sécrétion présente un pic à 4-6ng/ml entre le 40^{ième} et le 50^{ième} jour de gestation puis diminue avant terme. Elle devient indétectable 1 à 6 semaines après la parturition. (Romagnoli S.et al,2006) (Fontbonne A.et al,2000).

Le taux de prolactine augmente dès le deuxième tiers de la gestation et devient significativement élevé entre le 30^{ième} et le 35^{ième} jour après le pic de LH. La prolactinémie présente un pic lors de la parturition et reste élevée pendant la lactation jusqu'au sevrage des chiots. Les valeurs de prolactinémie montent à environ 40 ng/ml lors de la dernière semaine de gestation et atteignent approximativement 100ng/ml 1 à 2 jours avant le part puis le taux dépasse 100ng/ml 1 à 2 jours après la parturition. La prolactinémie s'élève en réponse à la succion exercée par les chiots. (Romagnoli S.et al,2006).

Lors de non gestation :

La progestéronémie ne présente pas de remontée après son pic, elle diminue progressivement à partir du deuxième tiers du metœstrus jusqu'à J50-J80 après le pic de LH. (Romagnoli S.et al,2006). (Voir figure 1).

La prolactinémie reste basse pendant la deuxième moitié du metœstrus, ≤ 2 ng/ml, sauf lors de pseudo-gestation. En effet, certaines chiennes présentent lors de cette phase des modifications cliniques similaires à celles observées chez une chienne gestante, cela peut aller jusqu'à l'apparition d'une lactation de pseudo-gestation deux mois après les chaleurs.



Le cycle hormonal de la chienne se traduit par :

- Un pic pré-ovulatoire de LH, 48h avant l'ovulation
- Une lutéinisation pré-ovulatoire des follicules avec production de progestérone avant l'ovulation
- Une croissance en plateau de la progestérone, suite à l'ovulation. Chez la chienne l'augmentation de la progestéronémie traduit l'ovulation et non la gestation.

Figure 2 : représentation schématique de la courbe de progestérone chez une chienne gestante et non gestante d'après (Baron F.2006).

1.4.2 Récapitulatif des événements biologiques se produisant pendant les chaleurs :

a. La phase folliculaire :

Pendant la phase d'imprégnation oestrogénique, l'appareil génital est préparé à la saillie et à la gestation. Comme nous l'avons vu précédemment, les œstrogènes agissent à différents niveaux :

- Ils sont responsables de la synthèse de phéromones sexuelles qui attirent les mâles.
- L'utérus est congestionné et œdématié. Les pertes séro- hémorragiques vulvaires proviennent de la diapédèse des érythrocytes de l'endomètre vers la lumière utérine. La paroi utérine s'hyperplasia et les glandes utérines se développent. Les œstrogènes favorisent également la motricité utérine et l'ouverture du col.
- Le vagin et la vulve présentent aussi une congestion, un œdème et une hyperplasie. La stratification de l'épithélium s'accompagne d'une kératinisation des couches cellulaires les plus superficielles. Ceci contribue à la protection mécanique de la muqueuse vaginale lors de l'accouplement.

- Les follicules mûrissent et font saillis à la surface de l'ovaire. Leur croissance est asynchrone, leur taille diffère au moment de l'ovulation. Seuls les follicules arrivés à terme s'ouvriront lors de l'ovulation.

b. L'ovulation et la maturation ovocytaire :

Selon une étude de (Marseloo N. et al, 2004), l'ovulation complète semble se dérouler en moins de 24 heures voire en 12 heures chez certaines chiennes. Lors de cette étude aucune différence concernant le moment de l'ovulation n'a été observée entre l'ovaire droit et l'ovaire gauche.

Les ovocytes sont expulsés sous forme d'ovocytes primaires bloqués en prophase de la première division méiotique, ils sont donc immatures. Ils doivent compléter leur méiose dans l'oviducte. Cette phase de maturation dure de 48 à 72 heures. (Goodman M. et al, 2001)

Les ovocytes ne restent viables que 2 à 3 jours. Ainsi la période fertile débute 4 à 5 jours après le pic de LH et s'achève 6 à 8 jours après le pic de LH au moment où les ovocytes dégénèrent. (Concannon P.W, 2005).

(Reynaud K. et al.). Ont réalisé une étude dont le but était de dater depuis l'ovulation, le plus précisément possible, la maturation ovocytaire, la fécondation et les premières divisions embryonnaires chez la chienne.

Cette étude a été faite sur 50 chiennes de différentes races âgées de 8 mois à 9 ans. L'ovulation a été mise en évidence par échographie. Les chiennes furent inséminées artificiellement tous les jours de un jour avant l'ovulation à l'ovariectomie.

Cette dernière fut réalisée et les ovocytes prélevés 15 à 136 heures après l'ovulation afin de pouvoir visualiser tous les stades de développement de l'ovocyte et de l'embryon. Les auteurs ont pu récolter 287 ovocytes/embryons. (Reynaud K. et al, 2004) (Reynaud K. et al, 2005).

Il résulte de cette étude que :

Le stade de vésicule germinative, stade auquel est expulsé l'ovocyte lors de l'ovulation, est présent jusqu'à 44 heures après l'ovulation voire plus longtemps dans certains cas. Aucune pénétration de spermatozoïdes ne fût observée à ce stade.

-Les premiers ovocytes au stade métaphase 1 furent observés entre 44 et 48 heures et, les premiers stades de métaphase 2 apparaissent 54 heures après l'ovulation.

-La présence de spermatozoïdes et d'ovocytes au stade MII dans l'oviducte entre 54 et 83 heures après l'ovulation n'a résulté en une fécondation que dans 10% des cas (une chienne sur dix) suggérant le besoin d'un temps de présence minimum dans l'oviducte avant la fécondation.

-La fécondation a lieu dans la partie distale de l'oviducte à partir de 90 heures, avec des ovocytes au stade métaphase 2. La pénétration d'ovocytes immatures par les spermatozoïdes reste exceptionnelle (3 ovocytes au stade métaphase 1, 72 heures après ovulation).

1.4.3 La phase lutéale :

Il s'agit de la phase de synthèse de progestérone par le corps jaune. Ce dernier est une glande endocrine transitoire dont la vie peut être décomposée en 3 ou 4 phases chez la chienne.

(Voir Encadré 1).

Encadré 1 : La vie du corps jaunes chez la chienne d'après (Verstegen J.et al,2002).

Phase d'installation autonome :

S'étend de J-2 avant le pic de LH, lors des premières lutéinisations, à J20-25 après le pic de LH. Le corps est relativement autonome et ne dépend que partiellement des diverses lutéotropines.

Phase d'hormono-dépendante :

Le corps jaune y est dépendant des facteurs lutéotropes et lutéolytiques.

Phase de réduction d'activité ou initiale de dégénérescence :

S'étend d'environ J50 après le pic de LH à la parturition ou à la fin du diœstrus non gestant. Les sécrétions de progestérones sont réduites et l'activité fonctionnelle du corps jaunes décline. Cette phase se termine lorsque les taux plasmatiques de progestérone sont de nouveaux en dessous Du seuil de maintien de la gestation soit 1-2 ng/ml.

Phase de régression et dégénérescence lutéale :

S'étend de la fin du diœstrus à environ 140-150 jours après le pic de LH. Elle se caractérise par une dégénérescence cellulaire et un arrêt progressif de la sécrétion de progestérone.

a. Particularités chez la chienne de la phase lutéale :

Chez la chienne, 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 (Lennoz & Rolland, 1975).

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 (Lennoz & Rolland, 1975).

Il n'y a pas de corrélation entre le nombre de corps jaunes présents au niveau des ovaires et le nombre d'embryons. Ainsi, (Sokolowski,1971), a montré, au cours d'une étude portant sur le maintien de la gestation chez des chiennes ovariectomisées à l'aide d'une supplémentation préalable en progestagènes (acétate de médroxyprogestérone, à 100 mg par animal, que :

- sur 9 chiennes étudiées entre les 30 et 40 -ème jours de gestation, il y avait 55 corps jaunes, et 45 embryons (perte de 18%)
- sur 7 chiennes étudiées entre les 42 et 56 -ème jours de gestation, il y avait 49 corps jaunes, et

36 fœtus viables (perte de 26,5%). D'autre part, le taux plasmatique en progestérone apparaît être indépendant du nombre de fœtus ou du nombre de corps jaunes fonctionnels.

b. Particularités de la lutéolyse chez la chienne :

La lutéolyse débute chez la chienne par une diminution de taille et de poids du corps jaune dès le 56ème jour de la gestation (Lennoz & Rolland, 1975).

Les mécanismes lutéolytiques semblent être différents en cas de gestation ou de non gestation. En cas de pseudo-gestation, on pense à un processus de vieillissement spontané et progressif des cellules lutéales au sein du corps jaune.

En cas de gestation, la lutéolyse est brutale, conduisant à une chute rapide de la progestéronémie (Lennoz & Rolland, 1975).

Une activité lutéolytique a été attribuée à la prolactine, mais il semble que le pic prolactinique péri-partum est consécutif à la chute du taux plasmatique de la progestérone et non l'inverse (Heraud, 1997).

Pour de nombreux auteurs, ce facteur lutéolytique est la prostaglandine F2a (Dettle *et al.* 1988). Lors des expériences menées par Dettle *et al.* (1988), la lutéolyse a également été induite par la dexaméthasone et la bromocriptine.

Deuxième partie

2. Particularité De Cycle Œstrale Chez La Chienne Sur Le Plan Cytologique

2.1 Observation microscopique :

La lecture de la lame se fait en deux temps, un faible grossissement (x40 ou x100) permet d'apprécier globalement la richesse en cellules ainsi que leur répartition (dispersées, en amas ou isolées), la réussite de la coloration. On peut déjà observer l'éventuelle présence de mucus, de polynucléaires neutrophiles, de spermatozoïdes.

Cette première visualisation donne également la tendance tinctoriale du frottis (globalement basophile, acidophile, ou « mixte »).

Puis un fort grossissement (x400) nous donne des informations beaucoup plus précises sur les types cellulaires rencontrés. La morphologie et la couleur de la cellule, la taille et l'aspect du noyau sont des informations primordiales pour reconnaître le type cellulaire rencontré (Neveux et al, 1999 ; Johnston et al, 2001).

a. Types cellulaires :

L'épithélium vaginal est de type stratifié pavimenteux non kératinisé ou épithélium malpighien une couche de cellules germinatives repose sur une lame basale. Depuis cette couche vers la lumière utérine, on trouve successivement des cellules parabasales, des cellules intermédiaires (issues de la différenciation des cellules parabasales), puis des cellules superficielles (Schutte, 1967).

Les cellules de l'épithélium vaginal. Les affinités tinctoriales des cellules seront décrites en fonction de la coloration de Harris Shorr.

b. Cellules parabasales :

Ce sont les plus petites cellules épithéliales observées sur un frottis. Leur diamètre est de 10 à 20 µm (Concannon & Digregorio, 1987 ; Johnston et al, 2001).

En effet, les cellules de la couche germinative ne sont que très rarement visualisées, leur forme est généralement ronde et uniforme (Olson et al. 1984 ; Schutte, 1967 ; Vaughan, 1996). On peut néanmoins les observer en colonne (c'est-à-dire que le cytoplasme est étiré et que le noyau est excentré) (Neveux, 1999).

Leur noyau est rond et volumineux, et le cytoplasme peu abondant ; le rapport nucléocytoplasmique est donc élevé (Olson *et al.* 1984 ; Guyant, 1988 ; Feldman & Nelson 1996 ; Vaughan, 1996 ; Johnston *et al.* 2001) (Figure 3).

Il fixe bien les colorants. Il peut certaines fois apparaître éosinophile (Concannon & Digregorio 1987). L'ensemble de la cellule est basophile (bleuté). (Neveux, 1999).

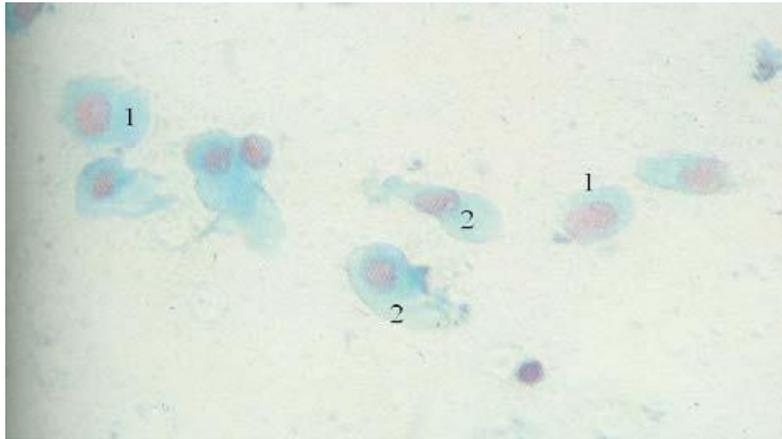


Figure 3 : Cellules parabasales au grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr (Mialot, 1984).

(1) : cellules parabasales rondes ; (2) cellules parabasales allongées

c. Cellules intermédiaires :

Ces cellules subissent la première étape qui conduit à la mort cellulaire. Il existe de très grandes variations de taille et de forme car elles représentent toutes les étapes de maturation entre l'état parabasal et l'état « superficiel » (Vaughan, 1996). Ceci explique que deux sous- types ont été définis.

d. Petites cellules intermédiaires :

Ce sont les cellules en croissance. Elles assurent la transition entre les parabasales sphériques et les cellules plus larges, plus anguleuses qu'elles deviendront au fur et à mesure qu'elles s'éloigneront des couches les plus profondes (Concannon & Digregorio, 1987 ; Feldman & Nelson, 1996). Leur diamètre est supérieur à 20µm (Johnston *et al.* 2001).

Leur forme varie de rond à anguleux. La plupart sont ellipsoïdes (Concannon & Digregorio 1987 ; Johnston *et al.* 2001) (Figure 4).

Le noyau est encore bien rond et bien visible. Son diamètre représente de 30 à 35 % de celui de la cellule (Schutte, 1967 ; Concannon & Digregorio, 1987).

La coloration cytoplasmique reste basophile. Le noyau peut commencer à prendre une légère teinte acidophile (Concannon & Digregorio, 1987).

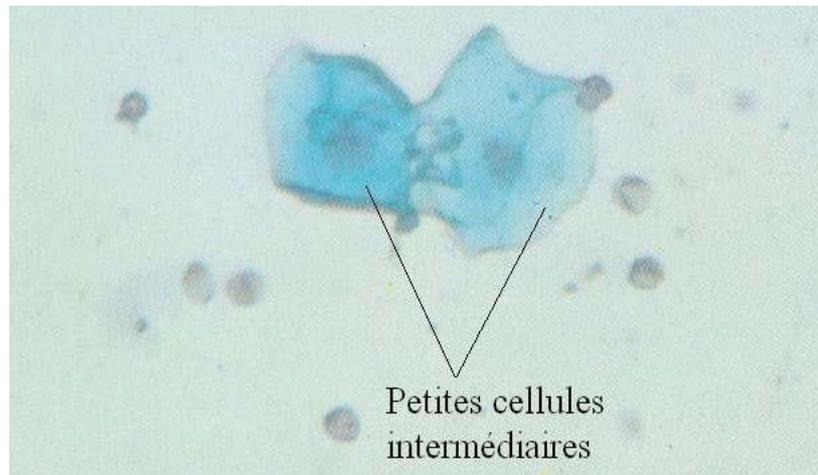


Figure 4: petites cellules intermédiaires au grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr (Mialot, 1984).

e. Grandes cellules intermédiaires :

Elles représentent l'étape intermédiaire entre les plus grandes des petites cellules intermédiaires, d'aspect globalement régulier, et les cellules superficielles, squameuses et irrégulières (Concannon & Digregorio 1987) (Figure 5). Leur diamètre est supérieur à 30µm (Johnston *et al.* 2001).

Elles sont plates. Leur contour est anguleux (Johnston *et al.* 2001 ; Concannon & Digregorio, 1987).

Le noyau est de taille normale, visible et encore fonctionnel (Johnston *et al.* 2001). En effet, elles représentent « la frontière » entre les couches cellulaires qui ont accès aux nutriments et celles trop éloignées de la lame basale pour pouvoir assurer une fonction nucléaire correcte

Le diamètre nucléaire représente moins de 35%, et peut ne correspondre qu'à 15% du diamètre cellulaire (Concannon & Digregorio 1987).

Leur cytoplasme peut afficher soit une basophilie, soit une acidophilie (soit les deux). Le noyau, lui est toujours acidophile (figure 5) (Concannon & Digregorio 1987).

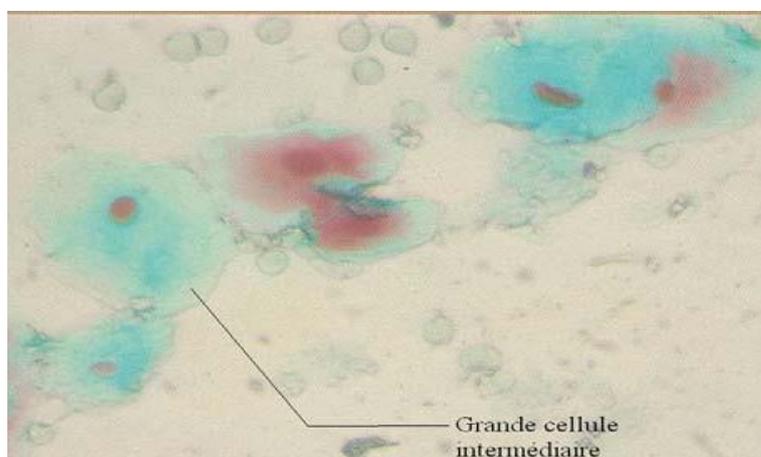


Figure 5: Petites cellules intermédiaires au grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr (Mialot, 1984).



Figure 6 : Les cellules du frottis vaginal (Neveux, 1999).

f. Cellules superficielles :

Elles sont nommées ainsi en raison de leur position au sein de l'épithélium vaginal (figure 6) (Johnston et al. 2001). Il s'agit des plus grandes des cellules vaginales ; leur diamètre est compris entre 30 et 75 μm (Concannon & Digregorio ,1987). Les bords cellulaires sont irréguliers, anguleux et plissés (Olson et al. 1984 ; Concannon & Digregorio ,1987).

Elles peuvent présenter un aspect de « corn-flakes » (Vaughan, 1996). Au contraire de ces dernières, le noyau est pycnotique, absent, ou on ne peut distinguer que sa silhouette (Schutte,1967 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Vaughan, 1996 ; Johnston et al. 2001) (figure 7).

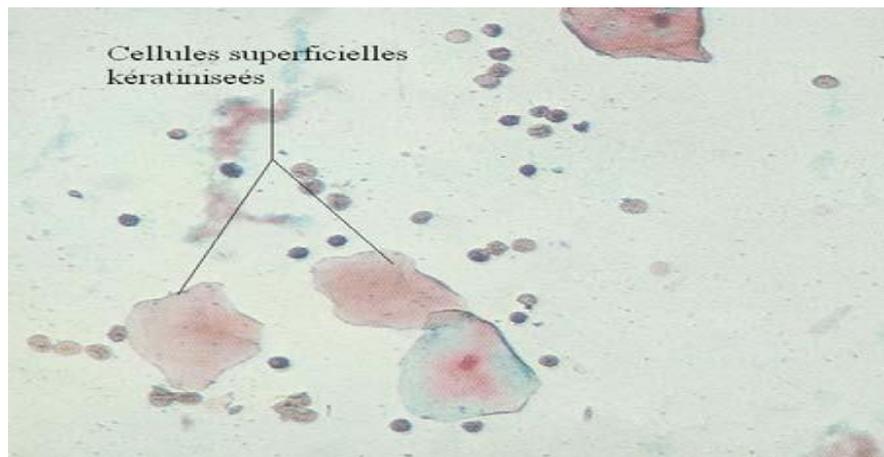


Figure 7 : Cellules superficielles kératinisées anuclées au grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr (Mialot, 1984).

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 (Guyant, 1988 ; Johnston *et al.* 2001). Les cellules ne possédant pas de noyau sont également appelées squames (figure 7) (Concannon & Digregorio 1987 ; Guyant, 1988 ; Johnston, *et al.* 2001).

La maturation peut s'arrêter au stade où les cellules superficielles présentent encore un noyau, même si le pic oestrogénique est atteint. Chez certaines chiennes, on a émis l'hypothèse que ce phénomène, était associé à un refus de l'accouplement ou des problèmes de fertilité (Feldman & Nelson, 1996).

L'ensemble de ces cellules est complètement acidophile. L'intensité de la coloration croît en fonction du stade de dégénérescence. Globalement plus la cellule est sénescente, plus l'acidophilie sera marquée (Johnston *et al.* 2001). Néanmoins certaines squames ne prennent absolument aucune coloration et apparaissent donc transparents. (Concannon & Digregorio, 1987).

Ces cellules offrent une protection à l'épithélium vaginal lors de l'accouplement (Guyant, 1988).

2.1.2 Autres cellules vaginales :

a. Cellules « metoestrales » :

Il s'agit de cellules parabasales modifiées qui contiennent un ou plusieurs polynucléaires neutrophiles dans leur cytoplasme (figure 8) (Olson *et al.* 1984 ; Guyant, 1988 ; Feldman & Nelson, 1996 ; Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001). Elles reflètent la propriété de phagocytose de l'épithélium vaginal. Comme leur nom l'indique, elles sont présentes lors de la phase lutéale du cycle

sexuel. Cependant elles peuvent être observées dès que des polynucléaires neutrophiles sont présents. (En début de proestrus, ou en cas de vaginite) (Johnston *et al.* 2001).

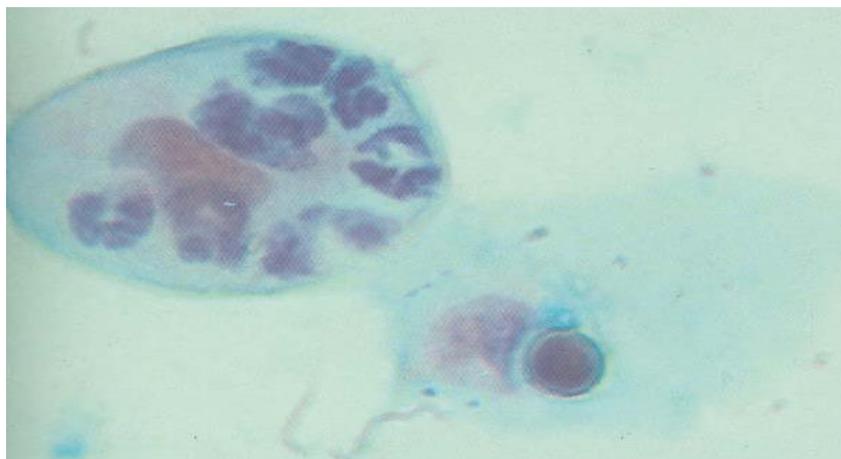


Figure 8 : Cellules metoestrales au grossissement x1000, coloré avec la méthode HarrisShorr (Mialot, 1984).

b. Cellules spumeuses ou « foam cells » :

Ce sont des cellules parabasales ou intermédiaires qui contiennent des vacuoles cytoplasmiques. Leur origine et leur signification sont inconnues (Olson *et al.* 1984 ; Johnston, 1988 ; Guyant, 1988 ; Feldman & Nelson, 1996 ; Johnston *et al.* 2001).

c. Les cellules superficielles avec des corps cytoplasmiques :

Ces cellules sont fréquemment rencontrées chez des chiennes en œstrus. L'origine et la signification des inclusions cytoplasmiques est inconnue (Olson *et al.* 1984 ; Johnston *et al.* 2001).

Les corps cytoplasmiques peuvent être aisément distingués des bactéries.

Bien que les bactéries puissent adhérer aux cellules superficielles, elles sont plus petites et sont souvent observées en position extracellulaire (Johnston *et al.* 2001).

d. Cellules épithéliales contenant des grains de mélanine :

Elles peuvent être observées sur des frottis issus de chiennes possédant un épithélium pigmenté (Par exemple, les labradors noirs). Elles ne doivent pas être confondues avec des cellules cancéreuses de mélanome. (Olson *et al.* 1984 ; Johnston *et al.* 2001).

e. Cellules néoplasiques :

Les cellules anormales peuvent s'exfolier et donc être présentes au sein d'un frottis vaginal.

Les types tumoraux les plus fréquemment rencontrés lors d'un frottis sont : les carcinomes à cellules transitionnelles, les tumeurs vénériennes, les carcinomes à cellules squameuses, les métastases d'adénocarcinomes mammaires et les lymphosarcomes (Guyant, 1988 ; Johnston *et al.* 2001).

2.1.3 Autres populations cellulaires :

a. Erythrocytes :

Ces cellules ont une double origine. Elles proviennent tout d'abord de l'utérus et également issues du vagin, puisque des hématies ont été observées sur des frottis de chiennes en proestrus qui avaient été auparavant hystérectomisées (Holst, 1986 ; Johnston *et al.* 2001).

L'aspect de ces cellules est similaire à celui observé sur un frottis sanguin. Elles sont arrondies, ou avec des bords légèrement crénelés, semi transparentes.

Pendant l'œstrus, les hématies sont souvent plus difficiles à distinguer. Il n'en subsiste que des fragments cellulaires, ce qui semble suggérer une lyse cellulaire due à changement dans la composition du mucus vaginal (Concannon & Digregorio, 1987).

b. Leucocytes :

Ils sont présents dans les frottis, sans que cela soit un signe pathologique. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont les cellules issues de la lignée blanche qui sont le plus fréquemment observées. Les lymphocytes et les polynucléaires éosinophiles ne sont que très rarement rencontrés (Johnston *et al.* 2001).

Les PNN sont généralement rencontrés lors du metoestrus. En effet, lors de l'œstrus, l'épaississement de la muqueuse vaginale empêche toute diapédèse. Cependant, si des PNN sont observés sur un frottis provenant de chiennes en période d'œstrus, une métrite ou une vaginite doivent être envisagées. (Johnston *et al.* 2001).

c. Cellules de la fosse clitoridienne :

Les cellules de la fosse clitoridienne peuvent être observées si le prélèvement a été mal effectué ; c'est-à-dire dans la fosse clitoridienne au lieu du vestibule ou du plafond vaginal. Ces cellules totalement éosinophiles, très abondantes pendant l'ancestrus et l'œstrus, peuvent être confondues avec des cellules squameuses (Roszel, 1977 ; Olson *et al.* 1984 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Guyant, 1988 ; Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001).

d. Spermatozoïdes :

On peut les observer lorsque la chienne a été accouplée. Bien que leur présence confirme un accouplement, leur absence n'élimine pas l'inverse. En effet dans une étude, seuls 65% des frottis obtenus 24 heures après un accouplement présentaient des spermatozoïdes (Johnston *et al.* 2001).

e. Bactéries :

Le vagin n'est pas une « chambre » stérile, et il est normal d'y observer différents types de bactéries. Leur quantité est très variable ; Si un grand nombre de micro-organismes est visualisé conjointement avec des PNN dégénérés, il peut s'agir d'un signe de vaginite (Holst,1986).

Les espèces bactériennes les plus fréquemment rencontrées sont : *Escherichia coli*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus canis*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus epidermitis*, *Corynebacterium spp.*, *Klebsiella aerobacter* et *Bacillus spp.* (Platt & Simpson, 1974; Hirsch & Wiger, 1977; Ling & Ruby, 1978; Baba *et al.* 1983).

2.2 Variations de la cytologie vaginale au cours du cycle Œstral :

a. Durant le proestrus précoce :

Il s'agit d'un frottis pauci cellulaire (Johnston *et al.* 2001). On visualise des cellules parabasales, des petites et grandes cellules intermédiaires (Feldman & Nelson, 1996). Les PNN et les bactéries sont présents en quantité variable (Feldman & Nelson, 1996). Le proestrus est communément déterminé par la présence en grand nombre d'érythrocytes (Feldman & Nelson, 1996) (figure 9). Le fond du frottis est souvent granuleux ou « sale ».

Ceci est dû au fait que les sécrétions muqueuses cervicales et vaginales fixent très bien la coloration (Feldman & Nelson, 1996).

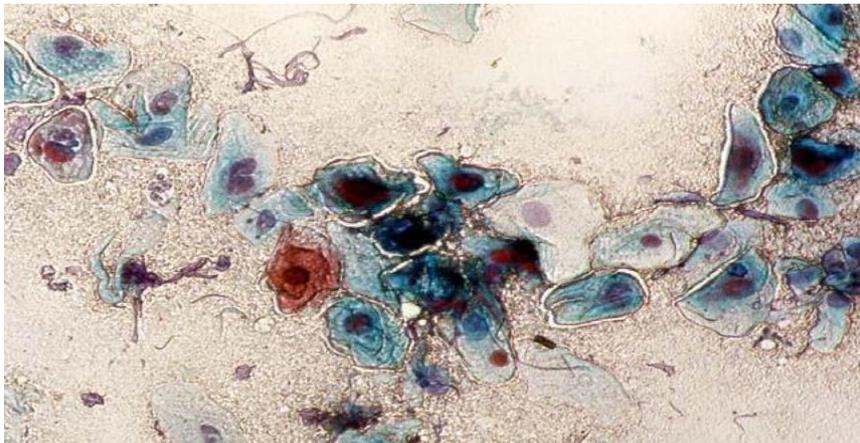


Figure 9 : Frottis de proestrus débutant grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr (Alain Fontbonne, 1996).

b. Durant le proestrus moyen :

Les premiers effets de l'élévation sérique en estrogènes sur le tractus génital sont visualisés (Feldman & Nelson 1996).

Le frottis est riche en cellules ; la kératinisation cellulaire débute. La proportion en cellules parabasales et petites intermédiaires diminue progressivement, au profit de celle en cellules superficielles nucléées et anucléées (figure 10) (Feldman & Nelson, 1996 ; Johnston *et al.* 2001).

La proportion en cellules parabasales par rapport au nombre total de cellules vaginales est de 5 à 30% en début de proestrus ; elle passe à moins de 5% quatre à cinq jours avant le pic de LH (Johnston *et al.* 2001).

Il y a une disparition des PNN. En effet l'épaississement brutal de la muqueuse vaginale empêche la diapédèse des neutrophiles. Ils ne seront plus visualisables jusqu'au metoestrus (Feldman & Nelson 1996) (figures 5).

La quantité d'hématie commence à décroître (Feldman & Nelson 1996 ; Johnston *et al.* 2001). Le fond du frottis est variable. Il peut être soit muqueux soit propre (Roszel, 1977 ; Feldman & Nelson, 1996).

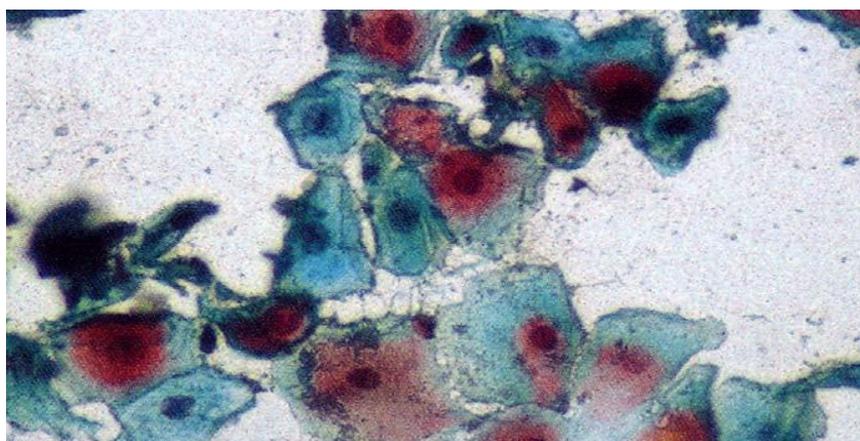


Figure 10 : Frottis de proestrus moyen grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr (cliché Alain Fontbonne, 1996).

c. Durant le proestrus tardif :

Le frottis est riche en cellules (Roszel, 1977). Plus de 80% des cellules vaginales sont des cellules superficielles qui présentent un noyau vésiculaire, pycnotique, ou alors pas de noyau du tout (Feldman et Nelson 1996).

Elles forment souvent de larges amas (Roszel, 1977). Le frottis vaginal ne contient plus de PNN (Feldman & Nelson 1996).

La présence d'hématies est variable (Feldman & Nelson 1996) (figure 11).

Le fond du frottis est propre (Roszel, 1977). Il n'y a pas de différence majeure entre le proestrus tardif et l'œstrus. En effet les 1 à 8 derniers jours avant la fin proestrus sont typiques de l'œstrus.

Généralement durant 4 à 5 jours les deux phases ne peuvent être différenciées uniquement sur la base de la cytologie vaginale (Feldman & Nelson 1996).

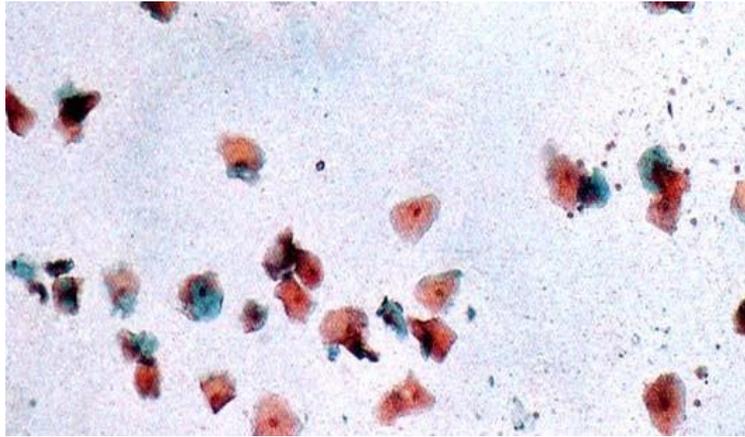


Figure 11 : Frottis de proestrus tardif grossissement x100, coloré avec la méthode HarrisShorr (cliché Alain Fontbonne ,1996).

d. Durant l'Œstrus :

Pendant toute cette phase et la période tardive de celle qui la précédait (10 à 14 jours), la cytologie vaginale demeure relativement constante (Holst, 1986). Aucune donnée cytologique ne permet d'identifier avec certitude le jour du pic de LH, de l'ovulation ou de la fertilisation.

Par ailleurs, les frottis vaginaux sont considérés comme le miroir de l'oestrogénémie (Feldman & Nelson, 1996). Pourtant en début d'œstrus, l'effet oestrogénique est maximal sur les frottis alors que la concentration sérique de ces stéroïdes commence à diminuer (Feldman & Nelson, 1996).

Le frottis est riche en cellules ; la kératinisation maximale survient de 5 à 6 jours avant jusqu'à 2 à 3 jours après le pic de LH et environ 2 jours après le pic d'estrogènes (Concannon, 1986 ; Mestre *et al.* 1990).

Théoriquement à la survenue de l'œstrus (et pendant toute cette phase) et du pic de LH, le frottis vaginal est entièrement kératinisé et présente 100% de cellules anucléées (Feldman & Nelson, 1996).

En pratique, un fait aussi simple et prévisible ne peut être constaté chez l'ensemble des chiennes. Généralement pendant l'œstrus, le pourcentage en cellules superficielles n'est jamais inférieur à 60% et est compris entre 80 et 100% (Feldman & Nelson, 1996) (figure 12).

La kératinisation maximale peut être représentée par des « frottis-types » suivants :

- Environ 100% de cellules anucléés,
- Un pourcentage important des cellules kératinisées contenant un noyau dense et bien discernable,
- La présence parmi les cellules superficielles, des grandes cellules intermédiaires (Concannon, 1986 ; Concannon & Digregorio, 1987).

Cependant l'aspect tinctorial du frottis à cette période est très acidophile (figure 12).

Le dernier jour précédant la survenue du metoestrus, les cellules superficielles sont regroupées en amas, leur membrane cytoplasmique est difficilement discernable, la coloration cytoplasmique

irrégulière et elles prennent un aspect flétri (Holst & Phemister, 1974 ; Olson *et al.* 1984 ; Concannon & Digregorio, 1987).

Les PNN sont absents, très rares ou présentant des formes dégénératives (Schutte, 1967 ; Olson *et al.* 1984 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Guyant, 1988 ; Feldman & Nelson, 1996 ; Baker & Lumdsen, 2001) ; ceci est dû à l'épaississement maximal de la muqueuse vaginale (Guyant, 1988).

Néanmoins il a été rapporté, qu'à la fin de l'œstrus (7.7 +/- 3.1 jours après le pic de LH) des petits amas de leucocytes pouvaient être visualisés à nouveau sur les frottis (England, 1992). Il s'agit du premier des effets visualisables du déclin de l'activité des estrogènes sur le vagin (Roszel, 1977).

Le nombre de bactéries présentes sur le frottis est maximal durant cette phase (baba *et al.* 1983) Elles peuvent adhérer à la surface des cellules épithéliales superficielles. En l'absence de neutrophiles, une quantité très importante en micro-organismes doit être considérée comme normale. (Johnston *et al.* 2001).

La quantité d'érythrocytes varie en fonction des individus, elle peut être de très abondante à très faible et cela malgré des écoulements vulvaires toujours présents. Les modifications du mucus vaginal pourraient provoquer leur lyse (Concannon & Digregorio, 1987). Leur absence est constatée chez certaines femelles. (Concannon & Digregorio, 1987). Cependant la plupart des chiennes présentent encore des cellules sanguines sur leurs frottis.

Durant toute cette période, le fond du frottis est propre (Schutte, 1967 ; Roszel, 1977 ; Olson *et al.* 1984 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Wright & Parry, 1989 ; Feldman & Nelson, 1996 ; Johnston *et al.* 2001).

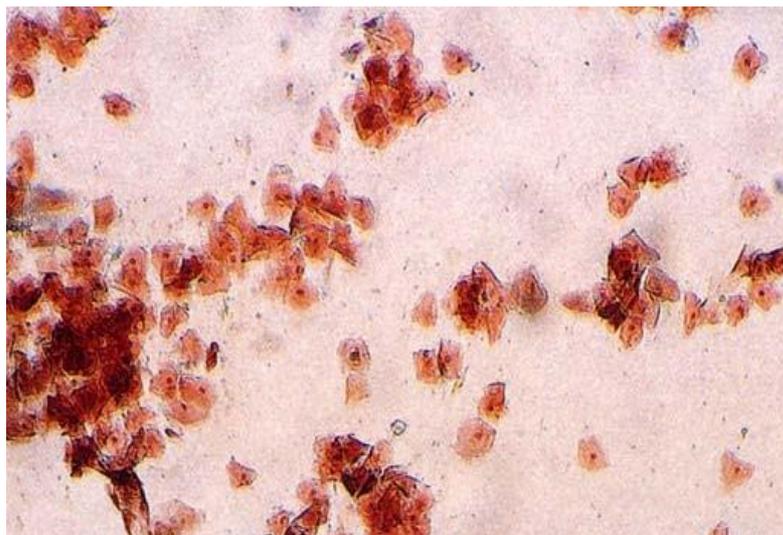


Figure 12 : Frottis d'œstrus grossissement x100, coloré avec la méthode HarrisShorr (cliché Alain Fontbonne, 1996).

e. Durant le metoestrus précoce :

Cette phase du cycle est marquée, dès son premier jour, par des changements cytologiques brutaux qui sont corrélés avec le retour, un à deux jours auparavant, de la concentration en œstrogènes à des valeurs basales (Holst & Phemister, 1974 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Feldman & Nelson, 1996 ; Johnston *et al.* 2001) ; Le frottis est riche en cellules (Feldman & Nelson, 1996).

La survenue du metoestrus cytologique correspond au jour où le pourcentage en cellules kératinisées diminue d'au moins 20% . Le premier jour cette chute est souvent supérieure à 50%. De façon corollaire, le nombre de cellules des couches profondes de l'épithélium augmente et représentent au moins plus de 10 % (et souvent plus de 50%) des cellules du frottis (Holst & Phemister, 1974).

A cet instant l'aspect des cellules superficielles se modifie : elles apparaissent pliées, leur contour s'estompant (Holst & Phemister, 1974).

En trois jours, la proportion des cellules parabasales et des petites cellules intermédiaires peut représenter jusqu'à 95% des cellules épithéliales (Concannon & Digregorio, 1987 ; Feldman & Nelson, 1996).

Dans une étude, les petites cellules vaginales (parabasales et petites intermédiaires) représentaient 63.8 +/- 12.5 % et les grandes cellules intermédiaires ainsi que les superficielles 36.7 +/- 12.8% (Dore, 1978).

On observe simultanément une augmentation du nombre des grandes cellules intermédiaires, dans le cas où ces dernières auraient été rares ou absentes pendant l'œstrus (Concannon & Digregorio, 1987), la coloration est à prédominance basophile (figure 13).

Occasionnellement des cellules spumeuses et/ou des cellules metoestrales sont visualisées (Schutte, 1967; Roszel, 1977; Post, 1985; Johnston, 1988; Feldman & Nelson, 1996; Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001). Elles pourraient être un bon moyen pour « dater » un frottis ; malheureusement il en a été observé à d'autres phases du cycle (Feldman & Nelson, 1996).

Les leucocytes réapparaissent en nombre variable au moment de la modification des types cellulaires du frottis (Schutte, 1967 ; Roszel, 1977 ; Olson *et al.* 1984 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001), ils sont observés dans les 3 premiers jours du metoestrus (Holst & Phemister, 1974). Chez les individus pour lesquels ces cellules étaient déjà présentes en fin d'œstrus, leur quantité est plus importante (Dore, 1978).

Des bactéries sont toujours présentes, mais en quantité moins importante que lors de l'œstrus (Baba *et al.* 1983). Cependant, aucune étude n'a étudié la variation du nombre de microorganismes pendant le metoestrus.

Les hématies sont encore visualisables durant les 18 premiers jours du metoestrus (Olson *et al.* 1984 ; Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001).

Dans une étude, 33% des chiennes présentaient encore un grand nombre de ces cellules (de 10 par champs microscopique à une telle quantité que les autres cellules sont masquées).

Le fond du frottis est sale, contenant de grands amas de débris cellulaires (Feldman & Nelson, 1996 ; Neveux, 1999).

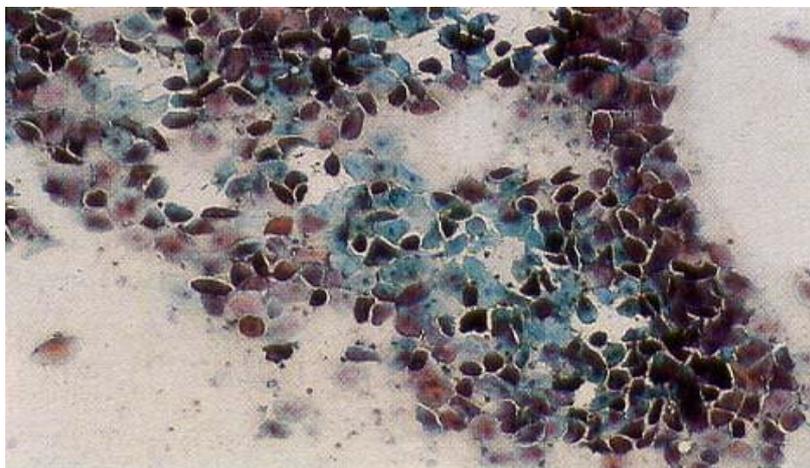


Figure 13 : Frottis de début de metoestrus grossissement x100, coloré avec la méthode HarrisShorr (cliché Alain Fontbonne, 1996).

f. Durant le metoestrus moyen et tardif :

A la suite des modifications majeures intervenues lors des premiers jours, la cytologie vaginale ressemble à celle de l'œstrus (Feldman & Nelson, 1996 ; Johnston *et al.* 2001).

Les petites cellules vaginales (parabasales et petites intermédiaires) sont prédominantes (figure 14).

Dans l'étude de M.A. Dore, elles représentent $83 \pm 11\%$ des cellules contre $16.7 \pm 11.8\%$ pour

Les grandes cellules intermédiaires et les cellules superficielles (Dore, 1978). Les cellules parabasales apparaissent cuboïdes et en colonne (Dore, 1978).

Le frottis est basophile. Après le pic de leucocytes précédemment observés, ces cellules continuent à être présentes, mais il a été remarqué qu'entre les jours 19 et 60 du metoestrus leur quantité diminuait. Durant le reste du metoestrus, la présence des érythrocytes est rare et aléatoire (figure 14). Le fond du frottis tend à devenir propre (Feldman & Nelson, 1996).

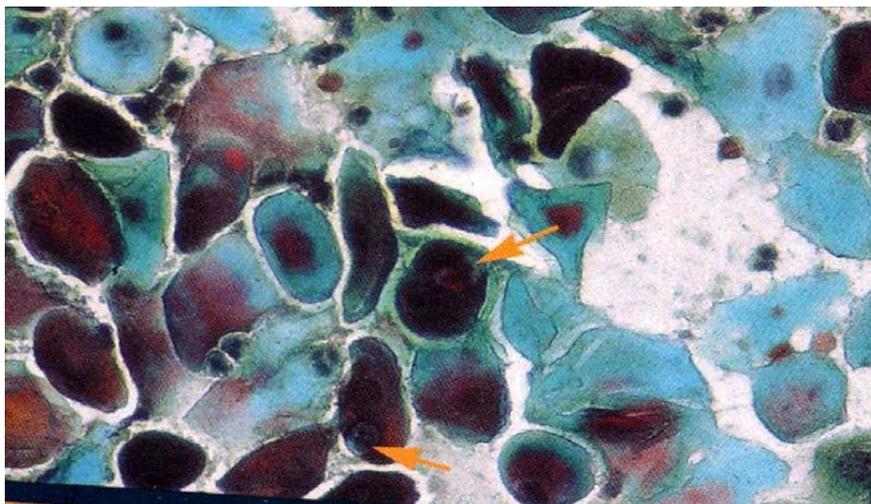


Figure 14 : Frottis de metoestrus grossissement x400, coloré avec la méthode HarrisShorr (cliché Alain Fontbonne, 1996).

g. Durant l'anœstrus :

Il s'agit d'un frottis pauci cellulaire (Post, 1985 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Neveux, 1999). Les cellules parabasales et petites intermédiaires sont prédominantes (Roszel, 1977 ; Olson *et al.* 1984 ; Post, 1985 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Guyant, 1988 ; Feldman & Nelson, 1996 ; Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001) (figure 15).

Les cellules intermédiaires présentent des granules cytoplasmiques (Roszel, 1977).

Les cellules adhèrent à des amas ou des traînées de mucus (Concannon & Digregorio, 1987).

Les cellules superficielles, pliées, et les squames proviennent du cycle précédent (Concannon & Digregorio, 1987).

Le frottis est basophile mais est très peu marqué tinctorialement (Concannon & Digregorio, 1987).

Pendant l'anœstrus, la quantité de leucocytes est très variable entre les individus. Cependant la plupart des frottis présentent des PNN isolés. Le fond du frottis est sale (Feldman & Nelson, 1996 ; Neveux, 1999).

Les bactéries sont présentes (Olson *et al.* 1984 ; Guyant, 1988 ; Johnston *et al.* 2001), mais en quantité bien inférieure aux autres phases du cycle (Baba *et al.* 1982).



Figure 15: Frottis d'anœstrus grossissement x100, coloré avec la méthode HarrisShorr (cliché Alain Fontbonne, 1996).

Troisième partie :

**3.Moyen de détection des chaleurs et de l'ovulation chez la chienne
(technique, cytologique et hormonal)**

3.1. Détermination de la date d'ovulation :

Il est difficile de prédéterminer un jour précis pour l'ovulation sans faire d'examen clinique et de dosages hormonaux. En effet, la durée du pro-œstrus est variable selon les femelles et même si la chienne moyenne ovule à J12 après le début du pro-œstrus, cela est loin d'être le cas de beaucoup d'autres. Certaines peuvent ovuler à J5 et d'autres à J30. Donc l'accouplement à J12 ou J14 qui est fréquemment pratiqué en élevage ne donne souvent pas de résultats. (England G. Concannon P.W.2001).

La détermination de la date d'ovulation est donc importante et permet ainsi d'optimiser la reproduction d'une chienne afin de dépasser le taux de fertilité naturelle. (Badinand F., Petit C.1998).

a. Indications

Il existe de nombreuses indications pour le suivi des chaleurs :

Certaines chiennes présentent une infertilité apparente due à un mauvais suivi ou à une ovulation se produisant trop précocement ou trop tardivement dans le cycle œstral. Cela peut résulter en une saillie ou une insémination réalisée au mauvais moment.

D'autres lices peuvent présenter des cycles anormaux comme par exemple des chaleurs disjointes ou silencieuses. La plupart de ces chiennes ont la capacité d'ovuler normalement mais il est difficile de détecter le moment de l'ovulation sans avoir recours à des dosages hormonaux.

Certaines races sont peu fertiles, pour celles-ci le suivi des chaleurs est indispensable afin d'améliorer les résultats.

L'insémination artificielle est une indication pour le suivi des chaleurs surtout si une semence congelée ou réfrigérée est employée. La longévité d'un sperme congelé ou réfrigéré est moindre que celle d'un sperme frais, il est donc important que l'insémination ait lieu pendant la période fertile.

L'utilisation d'étalons ou de lices peu fertiles ou désintéressés nécessite aussi une bonne détermination de la date d'ovulation.

La date de parturition peut être prédite en connaissant la date du pic de LH. (Badinand F., Petit C.1998).

Un bon suivi et donc une connaissance du moment optimal pour l'accouplement est utile pour les éleveurs qui organisent des saillies ou des inséminations à l'étranger ou dans des élevages très éloignées.

Connaître la date d'ovulation est également important dans le suivi de la gestation. Cela permet de prévoir à quel moment effectuer le diagnostic de gestation et réaliser le suivi du développement embryonnaire. (Durrant B.S., Ravida N., Spady T.2006).

Enfin, les techniques de reproduction assistée progressent de plus en plus, ainsi la synchronisation des chaleurs et le transfert embryonnaires requièrent une connaissance précise de la date d'ovulation, de l'âge gestationnel et de la date de parturition. (Farstad W.2000) (Kim Y.H., Travis A.J., Meyers-Wallen V. N.2007).

3.2 Cytologie :

3.2.1 Cytologie vaginale :

C'est une méthode simple de détermination du stade du cycle œstral chez la chienne. Elle est basée sur le fait que l'épithélium vaginal subit des transformations sous l'effet des variations hormonales. Les œstrogènes induisent une prolifération de l'épithélium vaginal, ce qui permet probablement de protéger la muqueuse pendant l'accouplement. (Goodman M.2001).

Ces modifications de la muqueuse vaginale peuvent être mises en évidence à l'aide d'un frottis vaginal et d'une coloration permettant de différencier les types cellulaires.

3.2.2 Méthode de prélèvement :

Plusieurs méthodes pour le prélèvement des cellules vaginales exfoliées sont possibles. Le prélèvement doit être rapide, facile, avec un minimum d'inconfort pour la chienne, praticable à toutes les phases du cycle et permettant d'obtenir un échantillon cellulaire viable (Feldman & Nelson, 1996 ; Neveux 1999 ; Johnston *et al.* 2001).

a. Prélèvement avec une pipette :

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

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

Une goutte du produit de récolte 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 la longueur. Puis l'excédent est essuyé (Holst, 1986 ; Roszel, 1977 ; Guyant, 1988 ; Olson *et al.* 1984 ; England, 1992 ; Baker & Lumsden, 2001).

Cette technique est la moins douloureuse pour l'animal. Néanmoins, le prélèvement avec une pipette peut altérer la morphologie des cellules. La quantité des cellules prélevées peut être insuffisante. Il

tend à minorer les comptages cellulaires, ce qui entraîne des pourcentages peu fiables et augmente les index (Evans & Savage, 1970 ; Guyant, 1988 ; Olson *et al.* 1984).

b. Ecouvillonnage :

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

Précédemment certains écouvillonnages étaient effectués avec des « abaisse-langue » coupés en quatre, polis et humidifiés avec du sérum physiologique. Ce matériel, outre son manque d'asepsie, rendait l'examen douloureux pour l'animal. On a également utilisé des spatules en métal (Evans & Savage, 1970).

L'écouvillon stérile doit être humidifié avec du sérum physiologique stérile. Cela peut ne pas être nécessaire si la chienne présente des écoulements vaginaux suffisants (pendant le proestrus ou l'œstrus) (Johnston *et al.* 2001). Néanmoins, lorsqu'on utilise du matériel non humidifié, le coton collecte les cellules mais également du mucus, ce qui peut gêner l'étalement du prélèvement.

Les lèvres vulvaires peuvent être écartées manuellement avec le pouce et l'index. L'écouvillon est introduit au niveau de la commissure dorsale de la vulve (figures 16,17). Puis il est orienté crânio-dorsalement en direction de la colonne vertébrale. Une fois passée au-dessus de l'arcade ischiatique, l'instrument est dirigé crânialement sur une quinzaine de centimètres. Au contact de la muqueuse du vestibule ou de la partie caudale du vagin, l'écouvillon subit une rotation. Le mouvement doit être imprimé avec une force suffisante pour assurer un bon contact avec la muqueuse vaginale. Puis l'écouvillon est extrait délicatement des voies génitales (Roszel, 1977 ; Johnston, 1988 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Neveux, 1999).

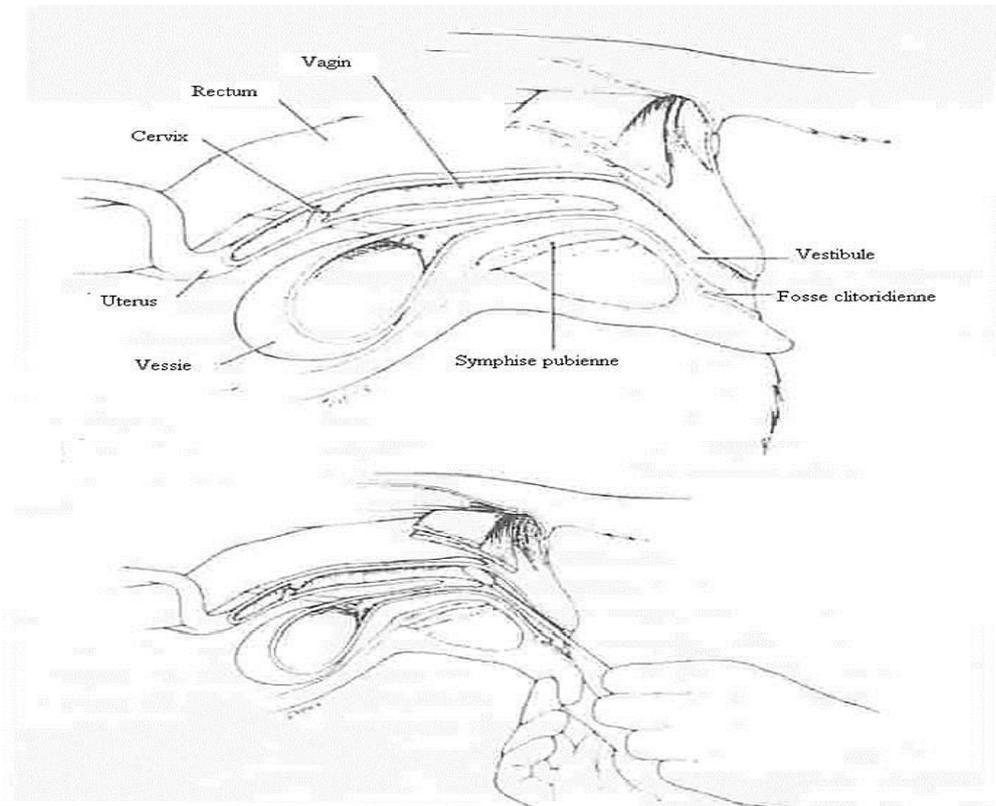


Figure 16: Rappels anatomiques et technique de prélèvement (Johnston et al. 2001).

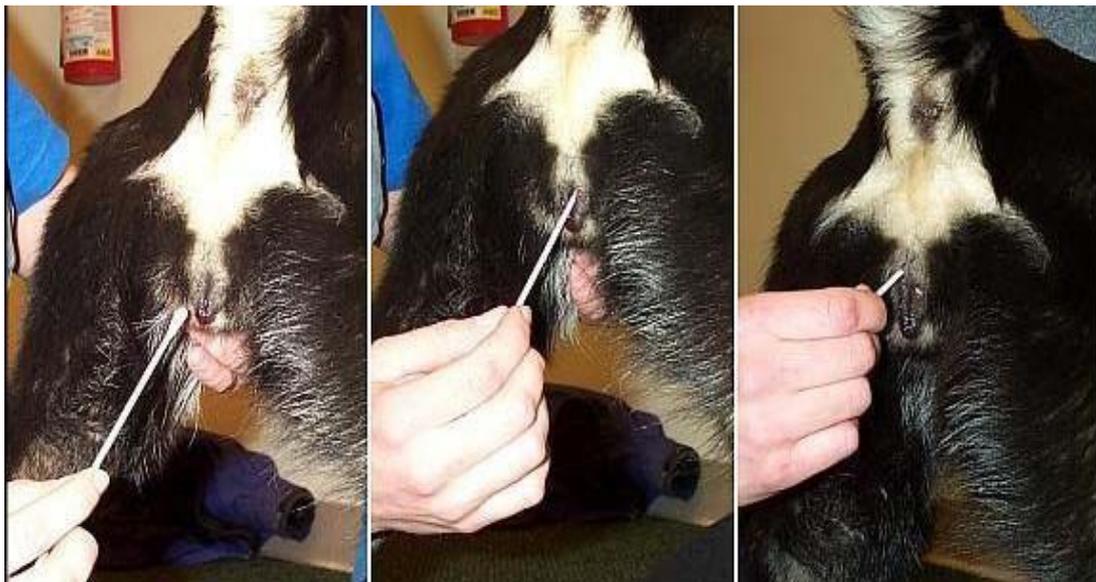


Figure 17: Technique de prélèvement par écouvillonnage (Bowen, 2000).

Certaines précautions sont nécessaires pour éviter des erreurs. En dirigeant caudalement l'écouvillon, on évite d'effectuer un prélèvement dans la fosse clitoridienne. En effet, des cellules fusiformes kératinisées sont fréquemment prélevées dans cette zone et peuvent être confondues avec des cellules superficielles kératinisées observées lors de l'œstrus pour un œil non averti (Johnston *et al.* 2001 ; Olson *et al.* 1984).

L'introduction sur 15 cm (pour une chienne de format moyen) est obligatoire. Les manipulations dans le vagin crânial peuvent être douloureusement ressenties par certaines femelles (Schutte, 1967). Au niveau de la zone caudale du vestibule, l'épithélium pourrait être moins sensible aux variations hormonales ; ceci a été montré chez la femme (Schutte, 1967), mais pas encore mis en évidence chez la chienne.

Le prélèvement sur la partie dorsale du vestibule ou du vagin évite tout traumatisme du méat urétral (Johnston *et al.* 2001).

Certains auteurs ont conseillé l'utilisation de spéculums. Ils évitent tout contact de l'écouvillon avec la muqueuse de la fosse clitoridienne et du vestibule caudal, ce qui assure de prélever dans la zone souhaitée. Il n'y a également aucun risque de léser le méat urinaire (Concannon & Digregorio, 1987 ; Holst, 1986 ; Mialot, 1984 ; Neveux, 1999 ; Fayrer-Hosken, 1996). Cependant ils sont rarement nécessaires en pratique courante.

L'étalement sur une lame de microscope doit être effectué rapidement, afin d'éviter le dessèchement du prélèvement (Concannon & Digregorio, 1987 ; Holst, 1986). Le but est de transférer un matériel représentatif du prélèvement et non l'ensemble de ce dernier.

L'écouvillon est roulé sur une lame propre sans frottement pour ne pas détériorer les cellules (Johnston *et al.* 2001).

Généralement deux à trois lignes parallèles, bien séparées, peuvent être étalées sur toute la longueur d'une seule lame (Concannon & Digregorio, 1987 ; Bowen, 2000). Cependant, la superposition de deux étalements gênerait et fausserait la lecture du frottis. C'est pourquoi certains auteurs préconisent d'utiliser deux lames et de ne pratiquer qu'un seul étalement par lame (Mialot, 1984 ; Roszel, 1977 ; Guyant, 1988 ; Neveux, 1999).

Il est préférable que l'étalement soit toujours réalisé par le même manipulateur qui applique le même appui de l'écouvillon sur la lame. En effet, les variations des différents types cellulaires sont parfois délicates à observer et nécessitent une méthode standardisée (Neveux, 1999).

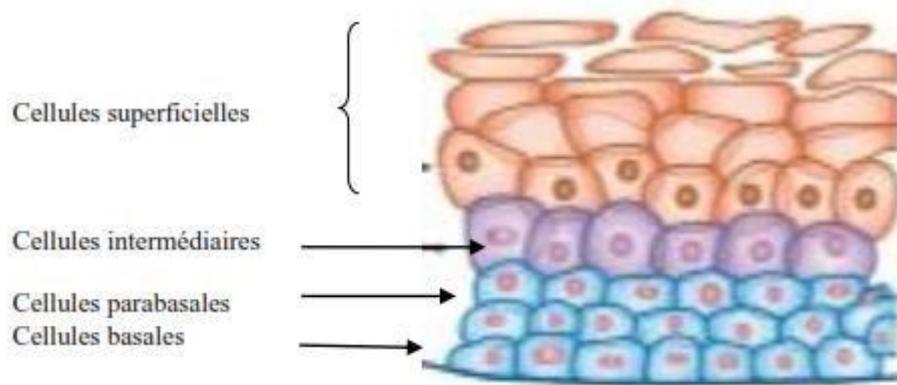


Figure 18 : schéma des différentes couches de l'épithélium vaginal de la chienne (Dumon, 2009).

3.2.3 Fixation du prélèvement :

Le frottis doit être fixé immédiatement (dans les quelques secondes qui suivent l'étalement sur la lame), alors qu'il est encore humide. En effet, si l'air sèche les lames, les cellules peuvent se distordre (Roszel, 1977 ; Concannon & Digregorio 1987 ; Neveux, 1999).

La lame est plongée dans un bain de fixateur, qui peut être une solution de méthanol à 95%

(Holst, 1986 ; Olson *et al.* 1984), un mélange à parts égales d'éthanol à 100° et d'éther (Schutte, 1967 ; Neveux, 1999), ou des solutions industrielles préparées à cet effet.

Des cytofixateurs sont disponibles sous forme de spray. Cette technique peut être préférée du fait de son efficacité et de sa facilité d'utilisation et de conservation du fixateur (Concannon & Digregorio, 1987 ; Johnston *et al.* 2001 ; Neveux, 1999).

3.3 Différentes techniques de coloration :

Le praticien doit choisir une technique de coloration qui soit à la fois la plus simple à effectuer, se conservant bien, et qui doit éviter les erreurs de lecture en donnant des résultats constants (Feldman & Nelson, 1996). Plusieurs techniques sont à notre disposition.

a. Coloration de May-Grünwald-Giemsa :

Cette technique et ses dérivés (Diff-Quick®) sont également couramment utilisés (Olson *et al.* 1984 ; Concannon & Digregorio 1987 ; Guyant, 1988 ; Wright & Parry, 1989 ; Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001). En effet de nombreux praticiens possèdent les réactifs dont ils se servent pour colorer les frottis sanguins (tableau 2).

Tableau 2 : coloration Diff-Quick ® (Bowen, 2000).

Ordre de passage	Produits	Temps
1	Méthanol	10 passages
2	Solution 1	10 passages
3	Solution 2	10 passages

Les cellules vaginales, quel que soit leur degré de kératinisation apparaissent uniformément bleu-violet. Elles ne sont alors appréciables que par leurs seuls critères morphologiques (Concannon & Digregorio, 1987 ; Wright & Parry 1989 ; Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001). Cette technique permet une très bonne visualisation des polynucléaires neutrophiles et des hématies (Neveux, 1999) (figure 18,19). Les avantages de cette technique résident dans son faible coût et dans sa rapidité d'exécution (Olson *et al.* 1984 ; Concannon & Digregorio, 1987).

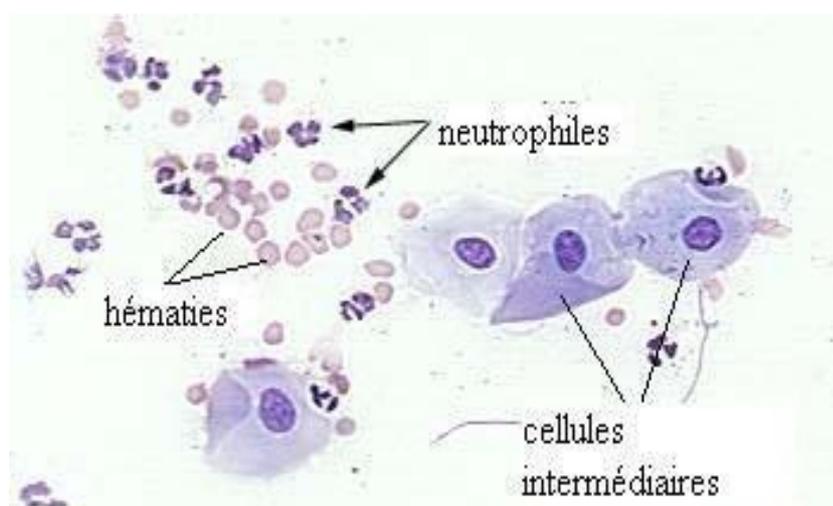


Figure 19: Frottis vaginal de chienne coloré avec la méthode Diff-Quick ® (Bowen, 2000).

b. Bleu de méthylène :

Le bleu de méthylène n'est presque plus utilisé à l'heure actuelle. On pratique cette technique en plaçant une goutte de solution de colorant sur la lame, puis une lamelle est apposée. C'est une coloration rapide et peu coûteuse, grâce à laquelle la visualisation de la morphologie cellulaire est bonne. Cependant elle ne permet pas la conservation des lames. En outre, elle ne met pas en évidence les affinités tinctoriales, et ne colore pas les hématies, ce qui rend parfois l'interprétation difficile (Simmons, 1970 ; Olson *et al.* 1984 ; Guyant, 1988 ; Feldman & Nelson, 1996 ; Neveux ,1999 ; Johnston *et al.* 2001).

c. Coloration de HarrisShorr :

Cette coloration trichrome a été mise au point par Ephraïm Shorr en 1940 (Shorr 1940 ; Shorr ,1941). Elle connaît de nombreuses variantes qui ont permis d'augmenter son efficacité et de faciliter sa mise en pratique (Roszel, 1977 ; Oettlé & Weldhagen, 1982 ; Guyant, 1988 ; Neveux, 1999) (tableau 3).

Tableau 3 : Coloration de Harris 3 Shorr (Neveux, 1999).

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

L'intérêt de cette technique est la coloration orangée des précurseurs cytoplasmiques de la kératine (Olson *et al.* 1984). La lecture est aisée, car les cellules sont différenciées selon leur affinité tinctoriale. Les cellules basophiles apparaissent bleues, et les cellules acidophiles rouges orangées (Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001).

Dans le suivi du cycle sexuel chez la chienne, la coloration de Harris Shorr est la coloration de choix. Les cellules acidophiles deviennent rouge orange alors que la kératinisation progresse. Les désavantages sont sa durée de mise en œuvre (une quinzaine de minute), ce qui en fait l'une des techniques les plus longues ainsi que le grand nombre de récipients de produits mis à disposition (Feldman & Nelson, 1996). Cependant, il existe comme alternative des kits simplifiés de coloration tels que le Diagnoestrus RAL®.

d. Coloration de Papanicolaou :

Cette coloration pentachrome a été décrite par Georges Papanicolaou en 1942 (Papanicolaou, 1942). De même que le thrichrome de Harris Shorr, elle a subi de nombreuses modifications (Schutte, 1967) (tableau 4).

Tableau 4 : La coloration de Papanicolaou(D'après cours d'anatomie pathologique du CHU Necker).

Ordre de passage	Produits	Temps
1	Alcool à 70°	Plonger 10 fois
2	Alcool à 50°	Plonger 10 fois
3	Eau distillée	Plonger 10 fois
4	Héματοxyline 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	Orange G 6 (1)	5 minutes
11	Alcool à 95°	30 secondes
12	Alcool à 95°	30secondes
13	EA 50 (2)	5 minutes
14	Alcool à 95°	30 secondes
15	Alcool à 95°	30 secondes
16	Alcool absolu	30 secondes
17	Xylène	2 passages

Les noyaux apparaissent bleu-violet, les cellules superficielles rose-orangé, les cellules intermédiaires bleu-vert, et les cellules plus profondes vertes plus franches (Papanicolaou, 1942) (Figure 20).

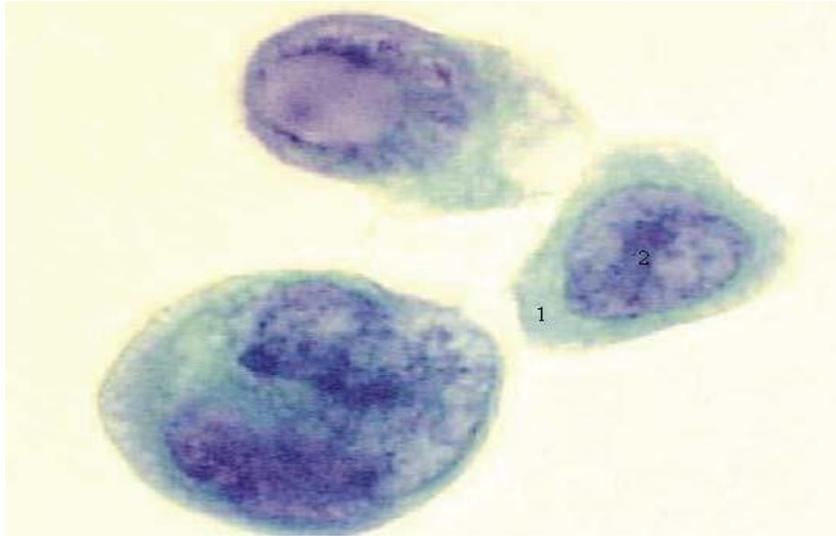


Figure 20: Frottis vaginal au grossissement 1000 pratiqué chez une chienne et coloré avec la technique de Papanicolaou. Coloration verte du cytoplasme (cellule parabasale), coloration bleutée du noyau. (Heron, 2004).

Il s'agit de la coloration standard des frottis vaginaux chez la chienne. Néanmoins nous ne l'avons jamais vu 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

3.4 Observation microscopique :

La lecture de la lame se fait en deux temps, un faible grossissement (x40 ou x100) permet d'apprécier globalement la richesse en cellules ainsi que leur répartition (dispersées, en amas ou isolées), la réussite de la coloration. On peut déjà observer l'éventuelle présence de mucus, de polynucléaires neutrophiles, de spermatozoïdes. Cette première visualisation donne également la tendance tinctoriale du frottis (globalement basophile, acidophile, ou « mixte »).

Puis un fort grossissement (x400) nous donne des informations beaucoup plus précises sur les types cellulaires rencontrés. La morphologie et la couleur de la cellule, la taille et l'aspect du noyau sont des informations primordiales pour reconnaître le type cellulaire rencontré (Simmons, 1970 ; Neveux ,1999 ; Johnston *et al.* 2001).

3.5 Index cytologiques :

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

3.5.1 Index éosinophile (IE) :

L'IE est basé sur la réaction de coloration éosinophilique ; cette dernière dépend du dépôt de précurseurs de la kératine dans le cytoplasme des cellules issues des couches superficielles de l'épithélium vaginal. Chez la chienne, cette réaction est limitée aux cellules les plus superficielles ; seules les cellules superficielles avec un noyau pycnotique ou les squames sont compilées.

Cependant chez la chienne cette réaction se produit au sein des cellules se trouvant dans les couches plus intermédiaires. Par conséquent les vraies cellules superficielles mais également les cellules intermédiaires kératinisées sont prises en compte (Schutte, 1967).

Il s'agit du pourcentage de cellules réellement kératinisées (i.e. squames, cellules superficielles nucléées et de grandes cellules intermédiaires kératinisées) par rapport à celles qui pourraient l'être mais ne le sont pas (i.e. grandes cellules intermédiaires polychromatophiles et basophiles). Ne sont pas prises en compte les petites cellules intermédiaires et les cellules parabasales (Schutte, 1967 ; Taradach, 1980 ; Mialot, 1984 ; Post, 1985 ; Wright & Parry, 1989).

L'IE est calculé par la relation suivante :
$$IE = \frac{\text{nombre de cellules acidophiles}}{\text{nombre de cellules basophiles}} \times 100$$

a. Variations de l'IE au cours du cycle œstral :

a.1. Durant l'œstrus :

Le frottis est pauvre en cellules, la coloration est basophile. L'indice éosinophilique (IE) est inférieur à 10% (Guerin & Fontbonne, 1997). Les cellules parabasales provenant de la membrane basale de la muqueuse sont rondes, de petite taille et pourvues d'un noyau rond et volumineux (Fontbonne, 2000). Les cellules intermédiaires, produites par la division cellulaire, sont plus larges ; leur nombre augmente à l'approche du proœstrus. Les neutrophiles sont présents en quantité faible à modérée. Les érythrocytes sont en général absents.

a.2. Durant le proœstrus :

En début de proœstrus, le nombre de cellules augmente : les cellules parabasales disparaissent en un à deux jours au profit des cellules intermédiaires basophiles, qui sont des cellules de grande taille, polygonales et possédant un noyau proportionnellement plus petit.

L'IE est alors inférieur ou égal à 30%. La kératinisation des cellules se traduit par un début de coloration acidophile du frottis. Le frottis prend un aspect sale du fait de la présence de débris cellulaires et de mucus. En milieu de proœstrus, le frottis est sale et riche en cellules : le nombre de cellules intermédiaires non kératinisées diminue, celui de cellules superficielles à noyau pycnotique augmente (IE = 50%) (Guerin & Fontbonne, 1997).

En fin de proœstrus, le frottis est assez propre, riche en cellules : les cellules sont surtout des cellules superficielles kératinisées à aspect anguleux et corné, à noyau pycnotique ou anucléées (IE supérieur ou égal à 70%). Les neutrophiles, présents en faible nombre au début, diminuent progressivement et sont absents en fin de proœstrus (Guerin & Fontbonne, 1997).

Les érythrocytes sont nombreux durant toute cette période, traduisant les pertes vulvaires hémorragiques ; ils peuvent être lysés sur certains frottis (Guerin & Fontbonne, 1997).

a.3. Durant l'œstrus :

En début d'œstrus, la kératinisation est maximale ; 60 à 90% des cellules sont anguleuses et prennent un aspect en feuille morte ou en pétale de maïs ; elles possèdent un noyau pycnotique ou sont anucléées ; ces cellules dites superficielles ont tendance à se regrouper en amas : ce sont des squames (IE supérieur ou égal à 80%).

Cet aspect en amas est caractéristique du frottis vaginal en période d'œstrus ; il persiste quatre à cinq jours, puis les cellules se dispersent (Guerin & Fontbonne, 1997).

Jusqu'à la fin de l'œstrus, les neutrophiles sont absents. Le fond du frottis est propre : les cellules vaginales se détachent sur un fond limpide. Les érythrocytes peuvent être absents, en faible quantité ou nombreux : ils n'ont en fait aucune signification clinique (Guerin & Fontbonne, 1997).

En fin d'œstrus, le frottis est plus ou moins propre, riche en cellules ; la réapparition des cellules intermédiaires puis parabasales (IE = 50%) coïncide avec l'afflux massif des polynucléaires neutrophiles et l'apparition de mucus et de débris cellulaires. Le changement d'aspect du frottis s'installe en 12 à 24 heures (Fontbonne, 1996).

a.4. Durant le métoœstrus :

L'épithélium et la lamina propria sont envahis par des leucocytes polymorpho-nucléaires. En 24 à 48 heures, les cellules disparaissent et sont remplacées par de nombreuses cellules intermédiaires puis parabasales, basophiles (IE inférieur ou égal à 20%).

Les cellules parabasales peuvent être regroupées en amas en début de métoœstrus uniquement. Les débris cellulaires sont nombreux. Les neutrophiles affluent en nombre à la fin de l'œstrus, puis leur nombre diminue lors du métoœstrus mais ils sont toujours présents. Leur fonction étant

d'éliminer tous les débris cellulaires accumulés pendant les chaleurs, leur visualisation certifie que la chienne n'est plus fécondable (Fontbonne, 1996).

b. Avantages et inconvénients l'index éosinophile :

Même si cet index est uniquement un marqueur de l'effet des estrogènes sur la muqueuse vaginale, certains l'ont utilisé pour prévoir la période optimale de fécondité. En effet, sa valeur maximale est atteinte entre le 8^{ème} et le 14^{ème} jour du cycle œstral, ce qui correspond à la période de l'œstrus. Schutte (1967) a constaté que plus de 90% des chiennes accouplées lorsque l'IE était maximal étaient gestantes par la suite.

Si l'interprétation des frottis chez la chienne, avec l'IE, facilite la détermination de l'œstrus proprement dit, il est plus délicat de dater exactement le moment de l'ovulation. En effet, les valeurs de l'IE présentent un caractère individuel, difficilement généralisable (Taradach, 1980). D'après Schutte (1967) 89% des chiennes ont atteint ce pic au 14^{ème} jour du cycle, seules 43 % des chiennes l'avaient atteint au 10^{ème} jour (le jour de l'apparition des pertes vulvaires étant le premier jour du cycle). D'après Taradach (1980), ce pic survient entre le 8^{ème} et le 12^{ème} jour du cycle. Par ailleurs, les valeurs au pic sont très variables entre les individus. Selon l'étude de Schutte (1967) elles étaient comprises entre 56 et 100%, et selon celle de Taradach (1980) elles étaient toujours supérieures à 75%.

Ce pic ne correspond pas au moment de l'ovulation mais au moment où la kératinisation est maximale (2 à 3 jours après le pic d'estrogènes) (Mialot, 1984).

Le premier jour du metoestrus, l'IE chute de façon marquée (d'au moins 10 à 20%) (Post, 1985 ; Wright & Parry, 1989). Ceci correspond à la réapparition des grandes cellules intermédiaires. Puis durant la suite du metoestrus et l'anœstrus, la valeur de l'indice est basse, inférieure à moins de 10% (Wright & Parry, 1989).

3.5.2 Index carypnotique (ICP) :

L'ICP se base sur la quantité en cellules superficielles présentant un noyau pycnotique. Cette transformation nucléaire est une indication des effets des estrogènes sur la muqueuse vaginale (Schutte, 1967).

Il s'agit du pourcentage de cellules superficielles avec un noyau pycnotique par rapport à celles dont le noyau est encore vésiculaire (Schutte, 1967 ; Post, 1985 ; Wright & Parry, 1989).

$$ICP = \frac{\text{nombre de cellules superficielles à noyau pycnotique}}{\text{nombre de cellules superficielles à noyau vésiculaires}} \times 100$$

a. Variation au cours du cycle œstral :

C'est pendant l'œstrus que l'ICP connaît son niveau le plus élevé. Cependant la valeur du pourcentage relevé au pic, ainsi que le jour de sa survenue varient énormément entre les individus (Post, 1985 ; Wright & Parry, 1989). Il a même été relevé des pics survenant durant le proestrus (Schutte, 1967). A la survenue du metoestrus l'ICP chute brutalement, puis il devient basal pendant la suite du metoestrus et l'anœstrus (Post, 1985).

b. Avantages et les inconvénients de L'index caryopycnotique (ICP) :

Les avantages de l'ICP sont limités. Il varie globalement comme l'IE et peut être un indicateur de l'œstrus mais pas un moyen sûr de détecter la période optimale d'accouplement (Schutte, 1967).

Par ailleurs, cet index est assez difficile à déterminer sur un plan technique. L'architecture du noyau doit être examinée soigneusement.

Un noyau en phase de pycnose se contracte, est coloré de façon plus intense ; la morphologie nucléaire « normale » est plus difficile à discerner. Une telle procédure appliquée à plusieurs dizaines de cellules d'une lame est très longue (Schutte, 1967).

3.5.3 Index superficiel (IS) :

L'IS mesure la proportion entre les cellules des couches superficielles de l'épithélium vaginal (squames, cellules superficielles, grandes cellules intermédiaires) et aux cellules des couches plus profondes (cellules parabasales et petites cellules intermédiaires) (Schutte, 1967 ; Post, 1985 ; Wright & Parry, 1989).

$$IS = \frac{\text{nombre de cellules des couches superficielles}}{\text{nombre de cellules des couches plus profondes}} \times 10$$

a. Variations au cours du cycle œstral :

Les valeurs les plus élevées (plus de 70%) sont obtenues pendant la deuxième moitié du proestrus. Elles restent importantes durant tout l'œstrus, sans qu'un pic se produise. Une chute caractéristique de l'IS se produit 24 à 48 heures après que l'IE ait atteint son pic (Schutte, 1967).

Pendant le metoestrus, si la chienne n'a pas été fécondée, l'IS ne montre des valeurs basales (<10%) que jusqu'à 3 semaines après le début de cette phase. Si la femelle est gestante l'IS devient inférieur à 10%, 4 à 5 jours après le coït (Schutte, 1967). Pendant l'anœstrus l'IS est

quasiment nul. La plupart des chiennes présentent un IS plus élevé juste avant le début du proestrus (Schutte, 1967).

b. Avantages et les inconvénients L'index superficiel (IS) :

Le calcul de l'IS est assez rapide, car il tient compte de la morphologie cellulaire (Schutte, 1967). Comme il a été indiqué précédemment. Schutte (1967) a montré qu'il existait une différence notable en début de metoestrus entre les femelles gestantes ou non. Cette donnée semble peu exploitée lors du diagnostic de gestation. Il n'en est fait aucune mention dans la littérature que nous avons compulsée. Puisque l'IS n'atteint jamais un pic défini et franc, sa valeur pratique est réduite pour déterminer la période de fécondité maximale lors des suivis de gestation (Schutte, 1967).

3.6 Interprétation et détermination de la phase du cycle sexuel :

Le premier frottis vaginal est réalisé environ 5 jours après le début des chaleurs. Ensuite, en fonction du contenu cellulaire, le frottis vaginal sera répété tous les 2-3 jours : l'absence de neutrophiles et une majorité de cellules épithéliales kératinisées, ainsi que la présence de nombreuses bactéries, sont une indication de saillie sous 48 heures (Guerin *et al.* 1996).

Le frottis vaginal d'œstrus commence à être obtenu sur des chiennes avant l'ovulation et cet aspect caractéristique du frottis dépasse en durée les 48 heures optimales de la période fécondante. Ainsi selon Guerin *et al.* (1996), un frottis vaginal typique d'œstrus peut être observé neuf jours avant la période féconde, et seulement 34,7% des chiennes de l'étude avaient un frottis vaginal typique durant moins de deux jours avant saillie ou insémination.

Chez certaines races, les images cellulaires obtenues ne sont jamais caractéristiques d'un œstrus. Dans d'autres races, les images évoquant un frottis d'œstrus sont souvent obtenues très précocement au cours des chaleurs, alors que la chienne est loin d'être prête (Fontbonne, 1996).

Pour Guerin *et al.* (1996), le premier jour d'œstrus présente un index éosinophilique de 20 à 50% ; il est supérieur à 50% le deuxième jour ; lorsque cet index atteint 90%, l'insémination est réalisée le jour même.

Pour Hewitt & England (2000), le moment est optimal pour la saillie lorsque l'IE atteint 80%. Selon eux, il y a généralement au cours des chaleurs deux pics de kératinisation, et les saillies couronnées de succès tendent à se situer au second pic.

Selon Guerin *et al.* (1996), il est fréquent d'observer des chiennes fécondables dont le frottis n'atteint pas un index éosinophilique maximum (souvent inférieur à 80%). Trente-huit à 57% des chiennes, selon que la limite d'IE soit fixée à 90 ou 95%, révèlent un frottis non caractéristique d'œstrus au moment de la saillie.

Dans de tels cas, se fier au frottis peut être une source d'erreurs et d'échec de la saillie, il est ainsi nécessaire de coupler la réalisation de frottis à des dosages de la progestéronémie réguliers.

4. Les dosages Hormonaux :

4.1. Dosage de l'œstradiol :

Les œstrogènes sont sécrétés de façon accrue lors du pro-œstrus, notamment le 17- β -œstradiol. Mais la montée de son taux se fait en « dents de scie », ce qui rend difficile l'appréciation de la maturation folliculaire grâce à un dosage isolé. Des dosages quotidiens sont donc nécessaires, ceux-ci se font en général par une méthode radio-immunologique disponible dans de nombreux laboratoires.

L'œstradiol augmente depuis un niveau de base (10 à 20 pg/ml) jusqu'à 50 à 100 pg/ml durant le pro-œstrus. (Guerin C.1998) Le maximum est atteint 1 à 2 jours avant le pic de LH selon Guérin (Guerin C.1998), mais d'après l'étude de (De gier J, *et al.*2006) le pic d'œstradiol peut coïncider avec celui de LH (3 chiennes) ou peut apparaître 4 à 16 heures avant comme 4 heures après (une chienne). Puis le taux chute rapidement pour atteindre des valeurs indétectables 80 heures après la décharge ovulante. (De gier J, *et al.*2006).

Cette méthode suppose de détecter avec précision le pic d'œstrogène et d'en déduire ainsi le pic de LH puis la date de l'ovulation. Or l'importance du pic d'œstrogènes peut varier d'une chienne à l'autre, et la réalisation de dosages quotidiens est laborieuse et pratiquement infaisable en pratique. De plus, le frottis vaginal, plus simple à réaliser et souvent plus facile à interpréter pour un praticien, offre une image assez fidèle de la maturation folliculaire. (Fontbonne A, *et al.*2000) Ce dosage n'est donc pas utilisé en pratique.

4.2. Dosage de LH :

Puisque le pic de LH induit la rupture des follicules pré-ovulatoire, 48h plus tard, le dosage de cette hormone semble être l'examen complémentaire de choix pour détecter l'ovulation.

Contrairement à d'autres espèces, le pic de LH est long puisqu'il dure en moyenne 3,3 jours selon Fontbonne *et al.* (Fontbonne A, *et al.*2000) et 36 +/- 5 heures d'après l'étude de De Gier

(De Gier J, *et al.*2006). Le niveau de base de cette hormone est de l'ordre de 1,4 +/- 0,1 ng/ml, le pic qui est net varie de 7,5 à 45 ng/ml. (Guerin C.1998).

Dans l'étude de De Gier *et al.* (De Gier J, *et al.*2006), la concentration plasmatique moyenne de LH est de 18,7 +/- 5,8 ng/ml.

Le dosage est réalisable par l'emploi de méthodes radio-immunologiques ou immunenzymatiques (Reprokit®, Sanofi).

En pratique, seul le dosage EIA est utilisable. La LH plasmatique est mise en évidence par un système d'anticorps et un couplage à la peroxydase. L'intensité colorée obtenue est proportionnelle à la concentration de l'hormone. Le jour du pic de LH, on obtient une forte coloration, facilement détectée à l'œil nu. En dehors du pic, la coloration est insignifiante. En pratique, il faut effectuer des prélèvements sanguins quotidiens (voire deux ou trois prélèvements par jour), comparer les intensités colorées obtenues avec des prélèvements successifs et s'assurer de la fin du pic par un retour au niveau de base (absence de coloration). Le moment du pic de LH correspond au jour du prélèvement donnant la plus forte coloration. (Guerin C.1998).

C'est une méthode fiable et précise, seulement les kits de dosages sont indisponibles dans de nombreux pays, nécessitant de recourir à des dosages radio-immunologiques longs et coûteux. Il existe un kit ELISA disponible (Status-LH, Synbiotics Corps, San Diego, CA) qui donne de bons résultats mais celui-ci nécessite également des dosages quotidiens ce qui est peu réalisable en pratique. (Goodman M.2001).

Il existe également depuis peu chez Synbiotics Europe, le WITNESS® LH qui est un test semi-quantitatif de réalisation simple fondé sur la technique d'Immuno- Migration Rapide (R.I.M.).

Ce dernier doit être utilisé conjointement avec un dosage de la progestérone plasmatique afin d'identifier l'augmentation de LH pré-ovulatoire, et ainsi la période d'ovulation. (Mises à jour du Dictionnaire des médicaments vétérinaires 2007).

Tableau 5 : Valeurs du pic de LH selon les auteurs

Noms de(s) auteurs	Valeur de LH (en ng/ml)
Fontbonne (2008)	4,85 ± 1,96
Badinand (1993)	6,9 à 14,8
Concannon (1977)	7,3 ± 1,0
Wildt (1978)	8 à 50
Guérin (1997)	10 à 22
Wallace (1992)	14,68 à 13,99
Nishiyama (1999)	15,77 ± 7,66
De Gier (2006)	18,7 ± 5,8
Mellin (1976)	25,3
Hayer (1993)	25,7 ± 26,5
Phemister (1973)	29,1 ± 0,8

4.3. Dosage de la progestérone plasmatique :

L'une des grandes caractéristiques du cycle de la chienne est la lutéinisation des follicules pré-ovulatoires. En effet, le taux de progestérone plasmatique commence à s'élever rapidement, depuis des valeurs basales, deux jours avant l'ovulation, au moment du pic de LH. (Voir Figure 21) Cette augmentation rapide est distincte et détectable par une série de dosages du taux de progestérone plasmatique. Ceci permet d'anticiper l'ovulation sur un à deux jours. Si on continue ces mesures, l'ovulation peut être confirmée et la période de fécondation détectée.

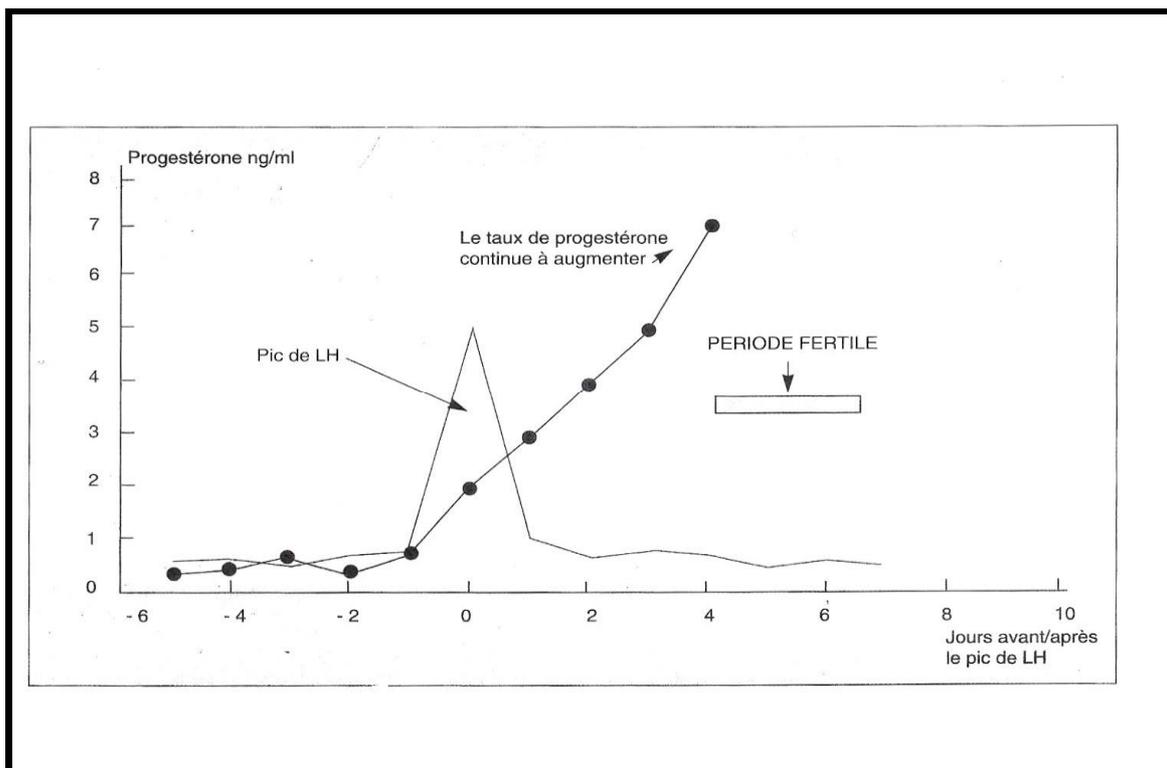


Figure 21: Correspondance entre le pic de LH et le début de l'augmentation du taux de Progéstérone (BARON F. et al. 2006).

5. Evolution de la progestéronémie au cours du cycle Selon différents auteurs on observe la progression suivante :

Jusqu'au milieu du pro-œstrus : P4 basale se situe entre $<0,2$ ng/ml et $0,3-0,6$ ng/ml selon Concannon (Concannon P.W. 2005.), entre 0 et 1 ng/ml selon Goodman (Goodman M. 2001).

En fin de pro-œstrus :

Pendant les 140 à 40 heures précédant le pic de LH, la progestéronémie plasmatique moyenne est de $2,2 \pm 1,0$ ng/ml selon une étude effectuée par (De Gier J. et al. 2006).

Pendant les premières 12-24 heures du pic de LH, P4 passe rapidement de $0,3-0,6$ ng/ml à $0,9-3,0$ ng/ml selon Concannon (Concannon P.W. 2005.).

La valeur de P4 indiquant la décharge pré-ovulatoire de LH est supérieure à 1 ng/ml selon Arbeiter *et al.* (1991), comprise entre 2,0 et 3,0 ng/ml selon Romagnoli *et al.* (2006) et est égale à $2,02 \pm 0,18$ ng/ml selon Kutzler *et al.* (2003).

Entre le pic de LH (J0) et l'ovulation (J2) : P4 est variable mais augmente entre 2 et 5 ng/ml. (CONCANNON P.W. 2005)

Au moment de l'ovulation :

Selon Arbeiter *et al.* Et Fontbonne *et al.*, l'expulsion des ovocytes s'est produite lorsque le taux circulant de progestérone dépasse 5 à 10 ng/ml. (Arbeiter K., Dobretsberger M., Müller E.1991) (Fontbonne A., Buff S., Garnier F.2000)

Cette valeur se situe entre 4,0 et 10,0 ng/ml selon Romagnoli (2006), entre 1,0 et 8,0 ng/ml selon Goodman (Goodman M. 2001).

Récemment, Marseloo *et al.* Ont montré sur 35 chiennes de races différentes que le taux de progestérone plasmatique au moment de l'ovulation est à peu près constant : 6,25 +/- 1,55 ng/ml. (Marseloo N., Fontbonne A., Bassu G.2004)

Deux jours après l'ovulation (J4): P4 se situe entre 3 et 8 ng/ml selon Concannon (Concannon P.W.2005), entre 10 et 25 ng/ml selon Romagnoli (Romagnoli S. 2006).

A J6: P4 se situe entre 6 et 12 ng/ml selon Concannon (Concannon P. W2005.), alors que selon Goodman

(Goodman M. 2001.) la valeur de la progestéronémie en fin de période fertile varie entre 4,0 et 20,0 ng/ml.

De 15 à 30 jours après la libération de LH : P4 est comprise entre 15 et 90 ng/ml. (Chaffaux S., Bosse Ph. *Biologie de la reproduction du chat et du chien.*)

Durant le dernier tiers de la gestation : la progestéronémie est comprise entre 4 et 16 ng/ml. (Chaffaux S., Bosse Ph. *Biologie de la reproduction du chat et du chien.*)

6. Réalisation pratique :

Les prélèvements sanguins sont réalisés tous les deux à trois jours. On prélève du sang à la jugulaire, sur tube héparine. Le sang est ensuite centrifugé.

Plusieurs méthodes ont été mises au point pour mesurer le taux de progestérone plasmatique :

Des kits quantitatifs utilisant un test ELISA peuvent être utilisés chez la chienne.

Deux exemples sont le kit OVUCHECK ND et le kit DROPPER PROGESTERONE TEST PROCEDURE ND.

Ces kits permettent des mesures au-delà des valeurs témoins, avec une fiabilité excellente, mais nécessitent un appareil de lecture optique (spectrophotomètre) pour lequel il faut comparer les valeurs avec celles d'un laboratoire de référence, afin de bien interpréter les résultats. Bien qu'assez

simples d'utilisation, le temps requis pour la procédure (une heure minimum) et l'équipement nécessaire rendent cette technique peu abordable pour les vétérinaires praticiens réalisant peu de suivis de chaleurs. (Hewitt D., England G. 2000).

Des kits de tests ELISA semi-quantitatifs ont été développés (kit PREMATE ND, Vétuquinol et, kit OVULATION TEST ND, BVT), produisant un changement de couleur lors du passage d'une progestéronémie basse à une progestéronémie élevée. L'échantillon à doser est comparé à deux standards :

Un témoin A, rose foncé, correspondant au début de l'augmentation du taux de progestérone (environ 3 ng/ml, moment du pic de LH).

Un témoin B, rose pâle, correspondant à la valeur supérieure du moment de l'ovulation (10 ng/ml).

Lorsque l'échantillon est :

-plus foncé ou aussi foncé que A ($P4 < 3$ ng /ml) : phase pré-ovulatoire.

-plus clair que A et plus foncé que B ($P4$ entre 3 et 10 ng/ml) : l'œstrus a probablement commencé.

-plus clair que le témoin B ($P4 > 10$ ng/ml) : phase post-ovulatoire.

L'utilisation de tels kits par les vétérinaires praticiens a entraîné une augmentation significative des taux de gestation des chiennes suivies en cliniques vétérinaires. Un autre avantage de ces kits semi quantitatifs par rapport aux kits quantitatifs ELISA est leur coût bien plus abordable. Ces tests sont donc très utiles en pratique courante et représentent une bonne alternative entre les autres méthodes. (Hewitt D., England G. 2000.).

La progestérone peut être dosée par deux autres types de tests :

Des tests radio-immunologiques (RIA) : On considère que l'ovulation se situe à une valeur d'environ 5 ng/ml, alors que par la méthode immuno- enzymatique cette valeur est de 10 ng/ml. (GUERIN C.1998).

Des tests par électro chimiluminescence (CLIA) offrent également une grande précision et les valeurs obtenues peuvent être corrélées à celles obtenues par RIA. La CLIA présente comme avantage de pouvoir faire des dosages en continu permettant un turnover rapide alors que les isotopes utilisés lors de RIA ne le permettent pas. (Kutzler M.A., Mohammed H.O., Lamb S.V. *et al.* 2003).

7. Intérêts et limites :

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

Ainsi, on utilise les dosages de progestérone à bon escient et il est inutile de débiter les dosages tant que la chienne est toujours en pro-œstrus, à moins que l'on ait des doutes ou des difficultés à

interpréter les autres tests (chienne présentant des chaleurs atypiques- ne perdant pas de sang à la commissure vulvaire- refusant systématiquement l'accouplement à toute période- montrant une kératinisation très précoce des frottis vaginaux bien avant l'ovulation ou au contraire une évolution incomplète de ces mêmes frottis qui n'atteignent jamais un aspect caractéristique de frottis d'œstrus).

La valeur de la progestéronémie est un bon critère pour déterminer la date de l'ovulation. L'étude effectuée par Marseloo *et al.* (Marseloo N., Fontbonne A., Bassu G. *et al.* 2004.) montre qu'il y a une bonne corrélation entre la valeur de la progestéronémie et les observations faites sur les ovaires.

Cependant il est nécessaire d'effectuer des mesures en série car une seule valeur ne peut pas nous permettre de faire la relation avec une phase du cycle en particulier. Selon England et Concannon (England G. Concannon P.W.2002), si la montée initiale de la progestéronémie indiquant le pic de LH est progressive les prélèvements peuvent être effectués tous les 2 ou 3 jours, néanmoins ils ajoutent que plus les prélèvements sont espacés moins l'estimation des périodes du pic de LH, d'ovulation et de fécondabilité sera précise.

Dans le cas d'inséminations artificielles par exemple, England et Concannon conseillent donc des prélèvements quotidiens afin de pouvoir détecter le pic de LH et l'ovulation. Ainsi les IA peuvent être planifiées 4 à 6 jours après l'obtention d'une progestéronémie supérieure à 2,0 ng/ml, concentration obtenue lors du pic de LH ou juste après. (England G. Concannon P.W. 2002.).

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthode

MATERIELS ET METHODE :

1. Lieu et durée d'étude :

Notre expérimentation a eu lieu au niveau du service de pathologies des carnivores, Institut des sciences vétérinaires, université de TIARET durant la période allant du mois de septembre 2023 jusqu'au mois de mai 2024.

2. Présentation de cas :

Nous avons étudié des cas cliniques canins reçus chacun séparément pour le motif de suivi de reproduction. Ses cas cliniques sont composés de 30 chiennes de races différentes, âge compris entre 10 mois et 11 ans, ses cas cliniques sont partis d'un nombre total de 547 cas canin reçus au niveau du service de pathologies des carnivores domestiques pour différents motifs pathologiques.

Une fiche d'examen clinique est rédigée durant la consultation de chaque cas portant les renseignements sur l'état de santé de l'animal et motif de la consultation. Un examen clinique approfondi afin d'évaluer les paramètres vitaux du cas et faire un écouvillon vaginal pour la cytologie.

Nous avons réservé une rubrique dans la fiche d'examen clinique, consacrée au profil de reproduction de chaque chienne conçus pour le recueil des résultats cytologiques du frottis vaginal, les antécédents sur la reproduction, date des première chaleur, portée etc.(Figure 22)

Prélèvements : oui non
Nature du prélèvement : sang (EDTA / Citrate / Héparine / sec Urine
Cytoponction :
Examen(s) demandé(s) : NF biochimie Examen du frottis analyse des liquides de ponction
Examen histopathologique Examen cytologique

Nombre des chaleurs / Gestation antécédente / nombre de la portée
Autres informations :
Suivi des chaleurs Frottis vaginale
Nature et moment de l'observation des pertes vulvaires observées date : 20/05/24 absence
Ecouvillon : sale / propre / rosé / rouge / brun foncé
Interprétation du frottis vaginal :
présence des *S. proteus* assez des petites intermédiaires avec présence
des leptothorax et y a une prolifération de la muqueuse vaginale
une transition, Fin de Anestrus.
de cycle

Dermatologie
Dr. Slimani Service de pathologies des carnivores 2024

Figure 22 : La fiche d'examen clinique, consacrée au profil de reproduction d'une chienne berger belge reçus au niveau du service de pathologies des carnivores domestiques.

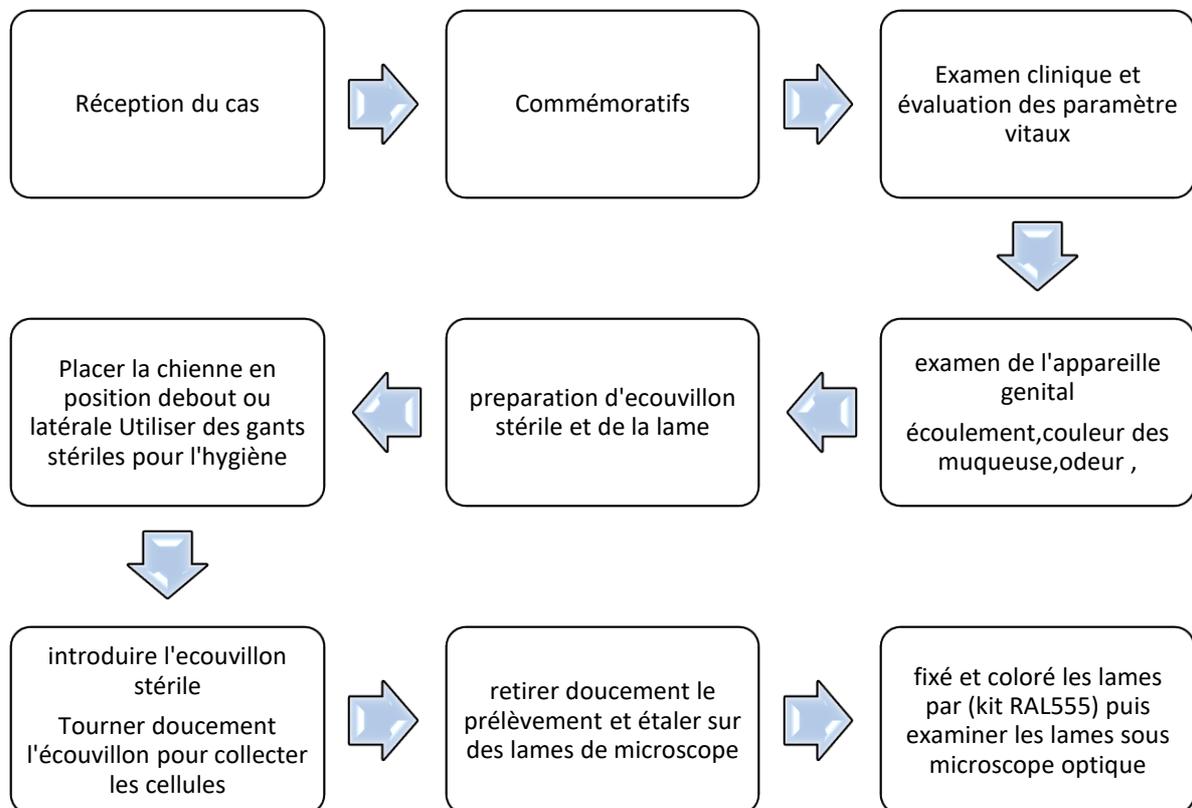
Tableau :

**Tableau 6 : Présentation des cas canines et de différentes races, sexes et âge.
(Dr. Slimani Service de pathologies des carnivores 2024)**

Cas /chienne	Age	Race
1	2ans	Setter anglais
2	2ans	Berger allemand
3	5ans	Berger allemand
4	4ans	Lévrier
5	4ans	Berger allemand
6	3ans	Berger belge
7	7ans	Berger d'atlas
8	7ans	Braque français
9	1ans	Berger croisé
10	4ans	Bichon
11	10 mois	Berger allemand
12	2ans	Berger allemand
13	9ans	Berger belge
14	4ans	Berger allemand
15	1ans	Berger allemand
16	6 ans	Berger allemand
17	3 ans	Berger allemand
18	12 ans	Dogue de bordeaux
19	6 ans	Berger allemand
20	6 mois	Berger allemand
21	4 ans	Berger allemand
22	6 ans	Berger allemand

23	6 ans	Berger allemand
24	8 mois	Berger belge
25	3 ans	Berger belge
26	7 ans	Chihuahua
27	6 ans	Berger allemand
28	6 ans	Dogue argentin
29	1 ans	Staff américain
30	3 ans	Croisé berger allemand

3. Protocole expérimental :



4. Matériel et méthode :

5.1. Matériels :

5.1.1. Matériels utilisés pour le frottis vaginal :

- Lames ports Objet.
- Écouvillonne stérile.

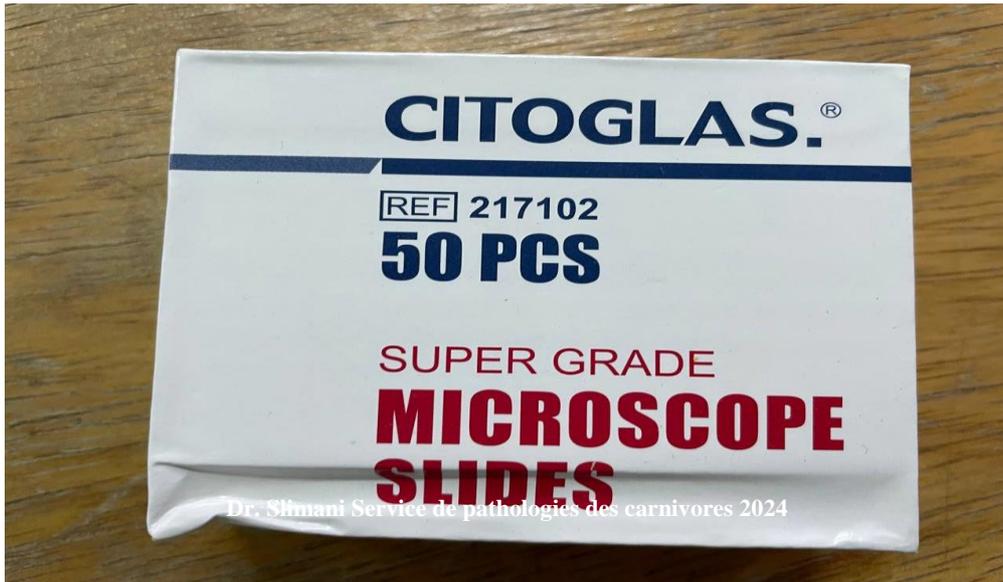


Figure 23: lames (CITOGLAS. REF217102 boîte de 50 PCS).



Figure 24 : Ecouvillonne stérile (Plastic Tipped Applicators).

5.1.2. Colorant :

- Kit RAL 555 (RAL DIAGNOSTICS).



Dr. Slimani Service de pathologies des carnivores 2024



Dr. Slimani Service de pathologies des carnivores 2024

Figure 25: kit RAL555 (RAL DIAGNOSTICS).

5.1.3. Microscope :

- Microscope optique OPTIKA B-350.
- Microscope optique KERN OPTICS.



Figure 26: lecture de la lame sous microscope optique OPTIKA B-350.



Figure 27 : lecture de la lame sous microscope optique KERN OPTICS.

5.2. Méthodes :

5.2.1. Examen clinique :

Un examen clinique était effectué pour tous les cas dès leurs réceptions, afin d'évaluer l'état général et les paramètres vitaux. Ainsi, qu'un examen complet de tractus génitale femelle

Il comprenait :

1. Anamnèse :

- **Historique médical** : Recueillir des informations sur les antécédents médicaux de la chienne, y compris les maladies passées, les traitements reçus, les cycles œstraux antérieurs et les comportements reproductifs.
- **Symptômes actuels** : Interroger le propriétaire sur tout symptôme actuel tel que des pertes vaginales, des comportements de chaleurs, des signes de douleur ou d'inconfort.
- **Reproduction** : Demander des informations sur les précédentes portées, les accouplements, et les complications éventuelles.

2. Examen général :

- **Observation** : Observer la chienne dans son environnement pour évaluer son état général, son comportement, et son niveau d'activité.
- **Température, pouls, respiration (TPR)** : Mesurer la température corporelle, le pouls, et le rythme respiratoire pour détecter des signes de fièvre, de stress ou d'autres anomalies.

3. Examen physique détaillé :

- **Inspection générale** : Examiner la chienne pour des signes de santé ou de maladie visibles, y compris la condition corporelle, la peau, et le pelage.
- **Palpation abdominale** : Palper l'abdomen pour détecter des masses, des douleurs, ou des anomalies des organes internes.
- **Examen des mamelles** : Inspecter les mamelles pour des signes d'inflammation, de masses ou de sécrétion anormale.
- **Examen génital externe** : Inspecter la vulve et la région périnéale pour des signes de rougeur, d'enflure, de sécrétion ou d'autres anomalies.

4. Examen spécifique du système reproducteur :

- **Imagerie (éventuellement)** : Utiliser des techniques d'imagerie comme l'échographie ou la radiographie pour examiner l'utérus et les ovaires plus en détail si des anomalies sont suspectées.

5. Préparation pour le frottis vaginal :

- **Assurer le confort de la chienne** : Placer la chienne en position debout ou latérale, selon ce qui est le plus confortable et sécuritaire pour elle. (Figures 28)



Figure 28 : Une chienne de race Chihuahua de 11 ans placée en position debout pour la réalisation d'un écouvillon vaginal.

6. Procédure du frottis vaginal :

- **Prélèvement de l'échantillon** : Utiliser un écouvillon stérile pour prélever les cellules vaginales en tournant doucement l'écouvillon à l'intérieur du vagin. (Figures 29)



Figure 29 : prélèvement de l'échantillon avec réalisation d'un écouvillon vaginale chez une chienne berger belge malinois de 3 ans.

- **Etalement de l'échantillon :** Retirer doucement l'écouvillon et étaler le prélèvement sur une lame de microscope pour l'analyse cytologique. (Figure 30,31).

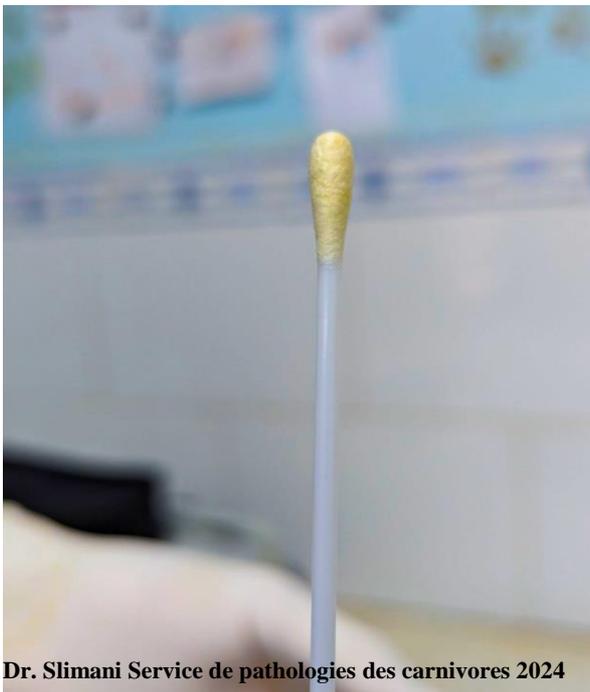


Figure 31 : présentation d'un écouvillon Sale utilisé chez une chienne berger Allemand de 6ans.

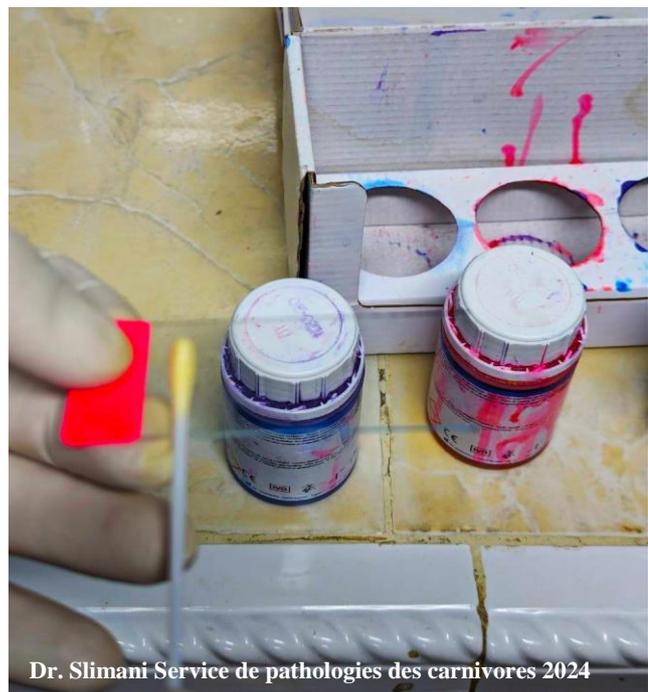


Figure 30 : étalement de l'écouvillon sur une lame de microscope.

- **Fixation et coloration de l'échantillon :** émerision de la lame de microscope dans : (1) fix-ral555 (5second), (2) éosine-ral555 (5second),(3) bleu-ral555(5second). (Figure 32,33,34).



Figure 34 : (3) bleu-ral555



Figure 32 : (2) éosine-ral555

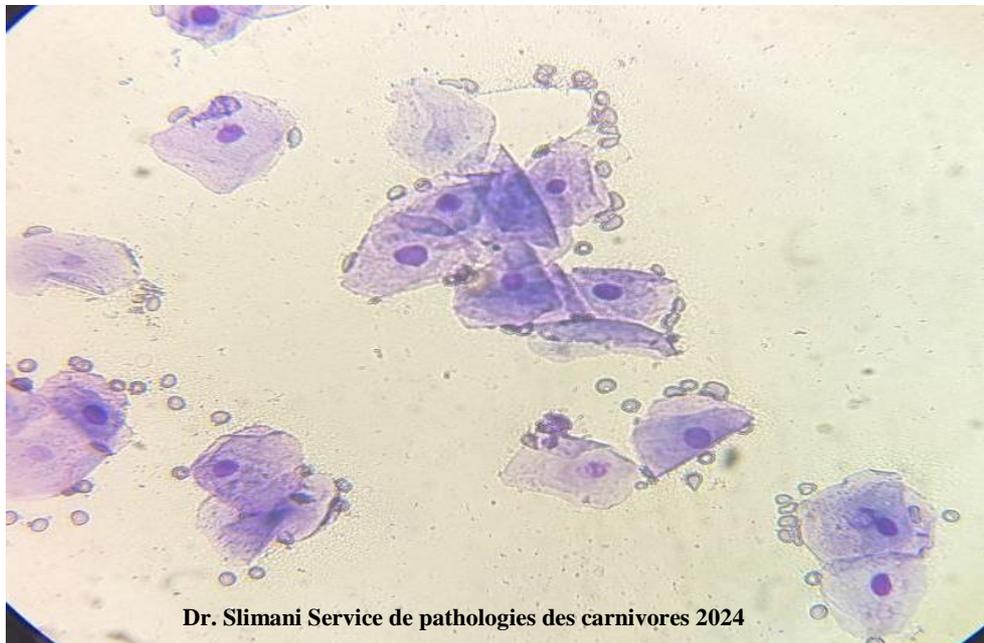


Figure 33 : (1) fix-ral555

Dr. Slimani Service de pathologies des carnivores 2024.

7. Analyse et suivi :

- **Interprétation des résultats :** Analyser les frottis au microscope pour déterminer le stade du cycle œstral, détecter des infections ou identifier d'autres anomalies. (Figures 35)



Dr. Slimani Service de pathologies des carnivores 2024

Figure 35 : interprétation des résultats de frottis vaginale chez une chienne staff American de 1ans et détermination la phase du cycle (proestrus moyen), sous microscope KERN OPTICS, au grossissement x40.

Résultats et discussion

1. Résultats :

Tableau 7 : résultats cytologiques des chiennes après réalisations des frottis vaginaux.

Dr. Slimani Service de pathologies des carnivores 2024

Cas	Nature de la coloration	Aspect du frottis	Interprétation du frottis /IE	Phase du cycle
1	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) +++ - cellules petites intermédiaires ++ - cellule parabasale + IE ≤ 20%	Metoestrus tardif
2	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) ++ - cellules petites intermédiaires majoritaires + IE ≥ 20%	Metoestrus moyen
3	KIT RAL 555	Frottis propre	- cellule parabasale majoritaires ++ - frottis pauvre en cellules IE ≤ 10%	Anœstrus
4	KIT RAL 555	Frottis propre	- cellules superficielles kératinisées majoritaires à noyau petit, ± pycnotique, voire absent +++ - grande cellules intermédiaire + IE ≥ 80%	Œstrus
5	KIT RAL 555	Frottis propre	- Cellule fortement éosinophile (kératinisé) ++++ - cellules superficielles kératinisées sans noyaux majoritaires +++ IE ≥ 80%	Œstrus

6	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) +++ - cellules petites intermédiaires majoritaires + IE≥20%	Metoestrus moyen
7	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) +++ - cellules petites intermédiaires majoritaires + IE≥20%	Metoestrus moyen
8	KIT RAL 555	Frottis propre	-cellule parabasale majoritaires ++ IE ≤ 10% - frottis pauvre en cellules	Anœstrus
9	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) ++ - cellules petites intermédiaires majoritaires ++ IE≥20%	Metoestrus moyen
10	KIT RAL 555	Frottis sale	-riche en cellules -globules rouges +++ -cellules superficielles en voie de kératinisation et cellules grandes intermédiaires majoritaires +++ IE≤30%	Proœstrus précoce
11	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) ++ - cellules petites intermédiaires majoritaires ++ IE≥20%	Metoestrus moyen
12	KIT RAL 555	Frottis sale	-riche en cellules -globules rouges +++	Proœstrus précoce

			-cellules superficielles en voie de kératinisation et cellules grandes intermédiaires majoritaires +++ IE≤30%	
13	KIT RAL 555	Frottis propre	-cellule parabasale majoritaires + - frottis pauvre en Cellules IE≤10%	Anœstrus
14	KIT RAL 555	Frottis propre	-cellule parabasale majoritaires + - frottis pauvre en cellules IE≤10%	Anœstrus
15	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) ++ - cellules petites intermédiaires ++ -cellule parabasale +/- IE≤20%	Metœstrus tardif
16	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) ++ - cellules petites intermédiaires ++ -cellule parabasale +/- IE≤20%	Metœstrus tardif
17	KIT RAL 555	Frottis propre	-cellule parabasale majoritaires + - frottis pauvre en cellules IE≤10%	Anœstrus
18	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) +++ - cellules petites intermédiaires majoritaires ++ IE≥20%	Metœstrus moyen

19	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) +++ - cellules petites intermédiaires majoritaires ++ IE≥20%	Metoestrus moyen
20	KIT RAL 555	Frottis propre	Cellule en voie de kératinisation (en exposition) +++ -grandes cellules intermédiaire dominant +++ -quelque cellule kératinise à noyau pycnotique +++ -globules rouge +/- IE≥50%	Fin de proestrus
21	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) + - cellules petites intermédiaires majoritaires ++ IE≥20%	Metoestrus moyen
22	KIT RAL 555	Frottis propre	Cellule en voie de kératinisation (en exposition) +++ -grandes cellules intermédiaire dominant +++ -quelque cellule kératinise à noyau pycnotique +++ -globules rouge +/- IE≥50%	Fin de proestrus
23	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) +++ - cellules petites intermédiaires + -cellule parabasale + IE<20%	Metoestrus tardif

24	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) ++ - cellules petites intermédiaires + -cellule parabasale + IE≤20%	Metœstrus tardif
25	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes +++ (PNN) - cellules petites intermédiaires majoritaires ++ IE≥20%	Metœstrus moyen
26	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) ++ - cellules petites intermédiaires ++ -cellule parabasale ++ IE≤20%	Metœstrus tardif
27	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) ++ - cellules petites intermédiaires ++ -cellule parabasale ++ IE≤20%	Metœstrus tardif
28	KIT RAL 555	Frottis propre	- cellule parabasale majoritaires+ -frottis pauvre en cellules IE≤10%	Anœstrus
29	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) +++ - cellules petites intermédiaires ++ -cellule parabasale+ IE≤20%	Metœstrus tardif

30	KIT RAL 555	Frottis sale	- nombreux leucocytes (PNN) +++ - cellules petites intermédiaires + - cellule parabasale++ IE≤20%	Metœstrus tardif
-----------	-------------	--------------	---	------------------

1.1 Présentation des cas cliniques :

Cas N1 :

Présentation Clinique de Sacha berger belge âgé de 3 ans recevez au niveau de service des pathologies des carnivores domestiques pour un suivi de reproduction.

Identification de la Chienne :

- Nom : Sacha
- Âge : 3ans
- Race : berger belge
- Sexe : femelle

Anamnèse :

- Motif de la Consultation : suivi de reproduction

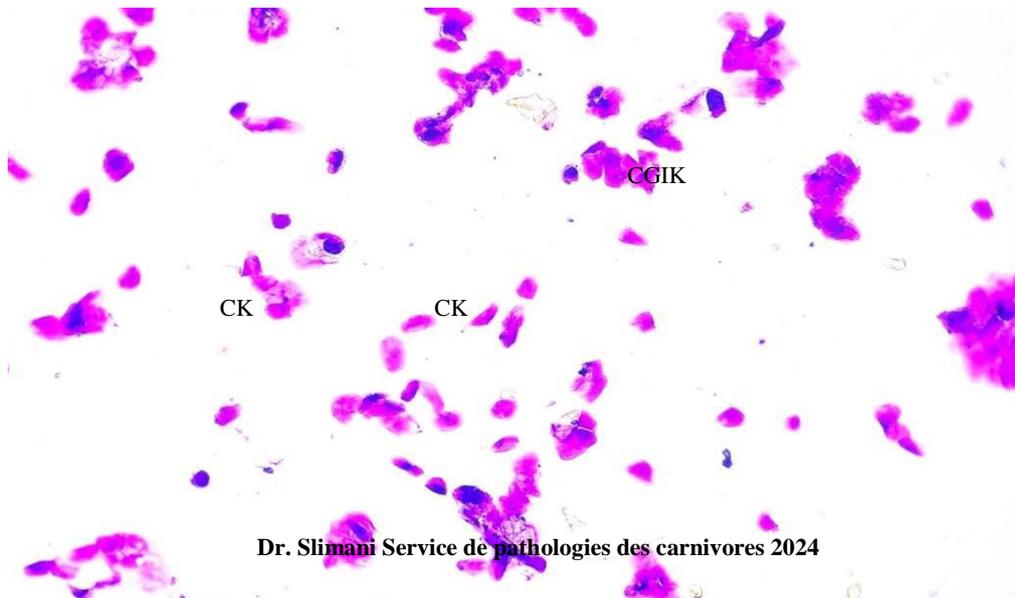
Examen Clinique :

- Animal on bon état de santé.

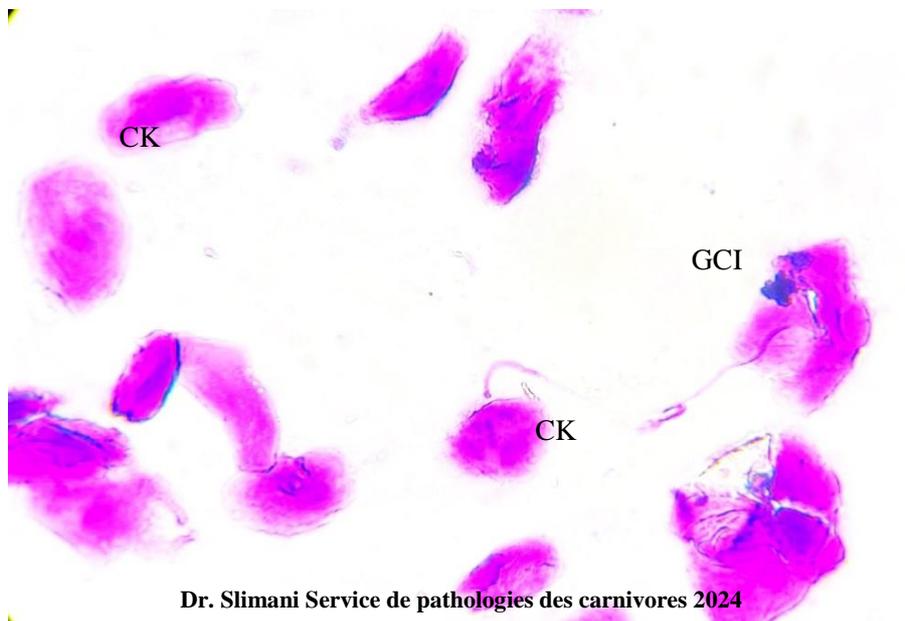
L'examen cytologique :

- Frottis propre
- Grandes intermédiaires et cellule kératinisé anucléé dominant
- Index éosinophile $\geq 80\%$

Conclusion : phase de cycle œstrus.



Figures 36 : Vue d'un frottis vaginal d'œstrus, coloré KIT RAL 555, au grossissement x10, frottis riche en cellules, fond propre, rares globules rouges, cellules superficielles kératinisées majoritaires, présence d'amas de cellules kératinisées anucléées, indice éosinophilique $\geq 80\%$. CK : cellules superficielles kératinisées. CGIK : cellules grandes intermédiaires kératinisées, CGIK : cellules grandes intermédiaires kératinisées.



Figures 37 : Vue d'un frottis vaginal d'Œstrus, coloré au KIT RAL 555, au grossissement x40, fond propre, hématies absentes ou rares, cellules superficielles kératinisées majoritaires, CK : cellules superficielles kératinisées à noyau petit, \pm pycnotique, voire absent, GCIK : cellules grandes intermédiaires kératinisées.

Cas N2 :

Présentation Clinique de maxi berger D'atlas âgé de 7 ans recevez au niveau de service de pathologies des carnivores domestiques pour un suivi de reproduction.

Identification de la Chienne :

- Nom : maxi
- Âge : 7ans
- Race : berger D'atlas
- Sexe : femelle

Anamnèse :

- Motif de la Consultation : suivi de reproduction.

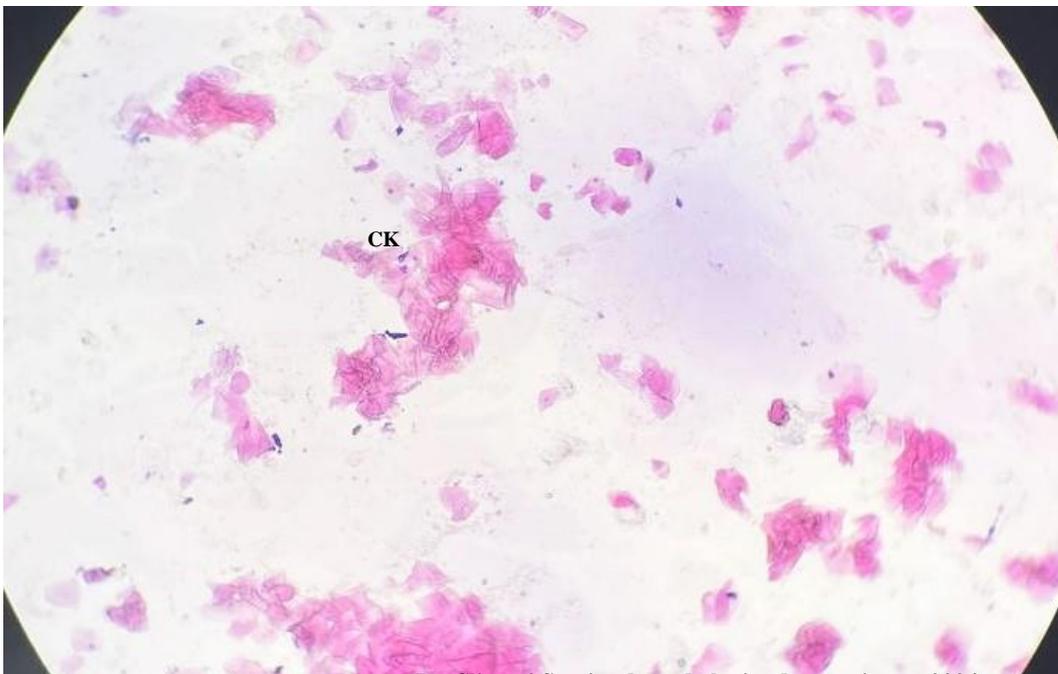
Examen Clinique :

- Animal on bon état de santé.

L'examen cytologique :

- Frottis propre
- Cellules fortement éosinophile-kératinisé
- Index éosinophile 100%

Conclusion : phase de cycle œstrus.



Dr. Slimani Service de pathologies des carnivores 2024

Figures 38 : Vue d'un frottis vaginal d'œstrus, coloré KIT RAL 555, au grossissement x10, frottis riche en cellules, fond propre, rares globules rouges, cellules superficielles kératinisées majoritaires, présence d'amas de cellules kératinisées anucléées, indice éosinophile 100%. CK : cellules superficielles kératinisées.

Cas N3 :

Présentation Clinique de Peggy dogue de bordeaux âgé de 12 ans recevez au niveau de service de pathologies des carnivores domestiques pour un suivi de reproduction.

Identification de la Chienne :

- Nom : Peggy
- Âge : 12ans

- Race : dogue de bordeaux
- Sexe : femelle

Anamnèse :

- Motif de la Consultation : écoulement sanguinolent.

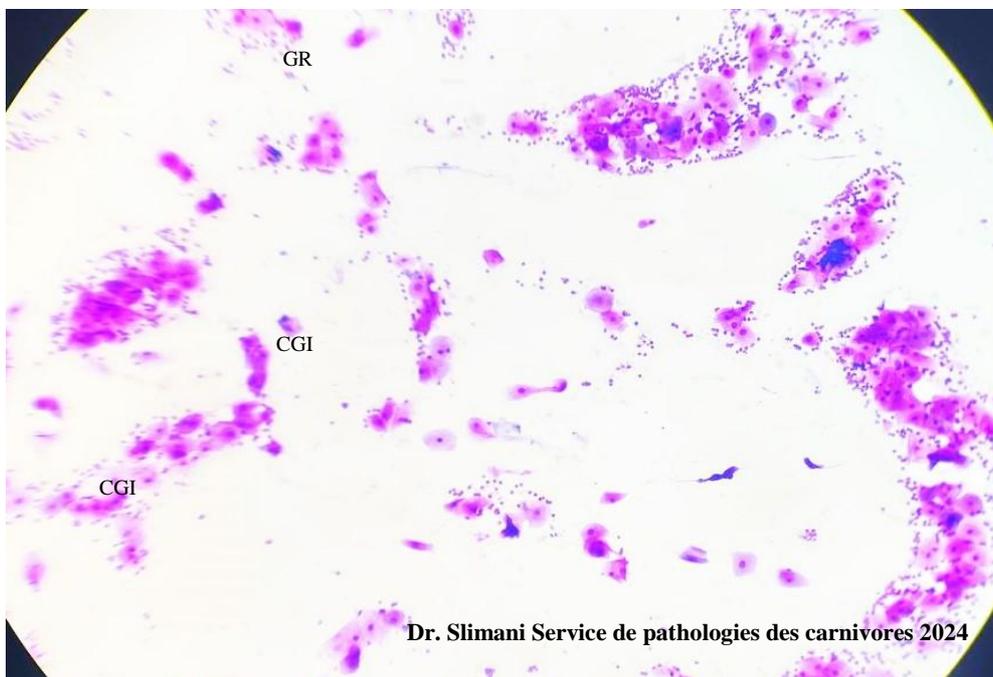
Examen Clinique :

- Animal on bon état de santé.

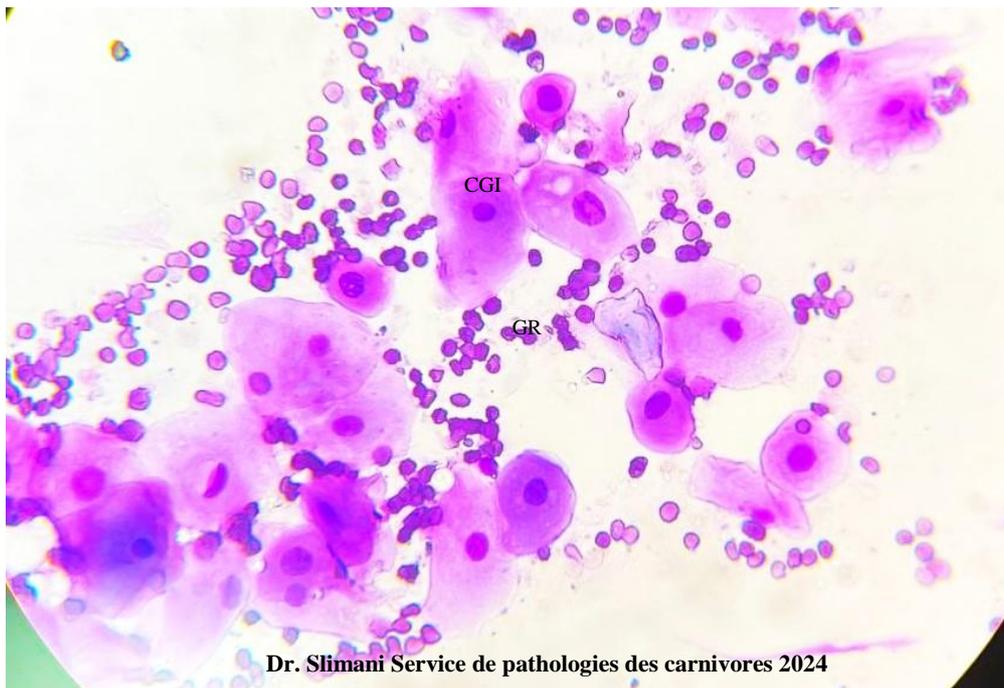
L'examen cytologique :

- Frottis propre
- Hématies GR
- Plusieurs amas de grandes cellules intermédiaires
- Index éosinophile 50%

Conclusion : phase de cycle præstrus moyen.



Figures 39 : Vue d'un frottis vaginal de præstrus (milieu), coloré au KIT RAL 555, au grossissement x10, riche en cellules, fond sale, cellules grandes intermédiaires majoritaires, indice éosinophile > 40 %. CGI : cellules grandes intermédiaires. ; CKA : cellules kératinisées acidophiles ; CGI : cellules grandes intermédiaire.



Figures 40 : Vue d'un frottis vaginal de proœstrus moyen (milieu), coloré KIT RAL 555, au grossissement x40, riche en cellules, fond sale, cellules grandes intermédiaires majoritaires, CGI : cellules grandes intermédiaires ; CKA : cellules kératinisées acidophiles ; CGI : cellules grandes intermédiaires.

Cas N4 :

Présentation Clinique de Diams berger allemand âgé de 4 ans recevez au niveau de service de pathologies des carnivores domestiques pour un suivi de reproduction.

Identification de la Chienne :

- Nom : Diams
- Âge : 4ans
- Race : berger allemand
- Sexe : femelle

Anamnèse :

- Motif de la Consultation : suivi de reproduction.

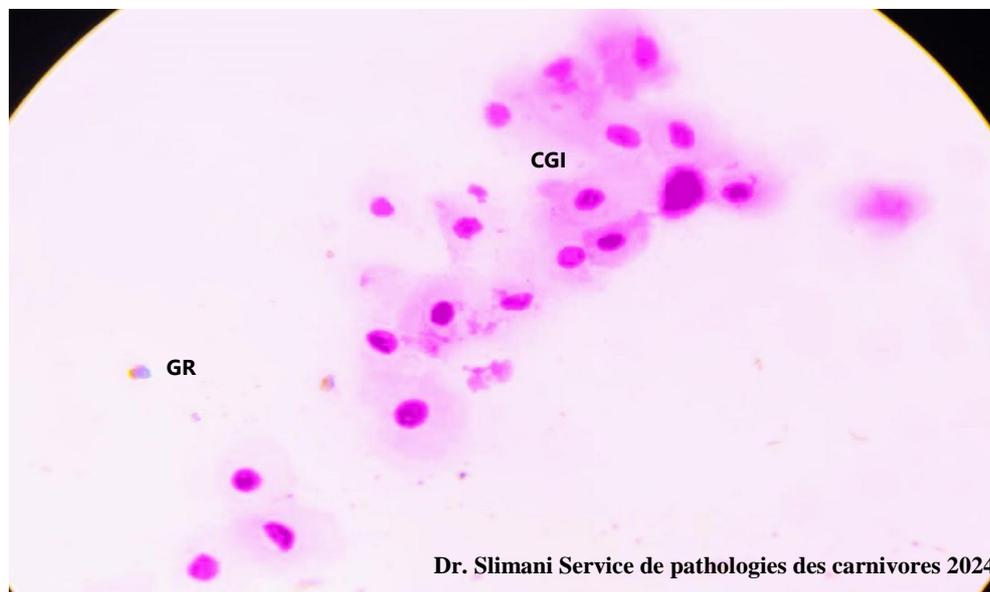
Examen Clinique :

- Animal on bon état de santé.

L'examen cytologique :

- Frottis sale
- Quelques Hématies GR
- Quelques cellules grands intermédiaires
- Frottis pauvre en cellules

Conclusion : phase de cycle début de præstrus.



Figures 41 : Vue d'un frottis vaginal de præstrus précoce (début), coloré au KIT RAL 555, au grossissement x40, fonde sale, pauvre en cellules, quelques cellules intermédiaires moyenne et quelques globules rouges.

Cas N5 :

Présentation Clinique de Peggy dogue de bordeaux âgé de 12 ans recevez au niveau de service de pathologies des carnivores domestiques une 2eme fois après une semaine pour un suivi de reproduction, plus un écoulement muco-sanguinolent.

Identification de la Chienne :

- Nom : Peggy

- Âge : 12ans
- Race : dogue de bordeaux
- Sexe : femelle

Anamnèse :

- Motif de la Consultation : écoulement muco-sanguinolent.

Examen Clinique :

- Animal on bon état de santé.

L'examen cytologique (2eme frottis vaginal) :

- Frottis propre
- Cellules en voie de kératinisation a noyau pycnotique (en exposition)
- Quelques amas de cellules grandes intermédiaires
- Indice éosinophile 70%

Conclusion : phase de cycle fin de proœstrus.

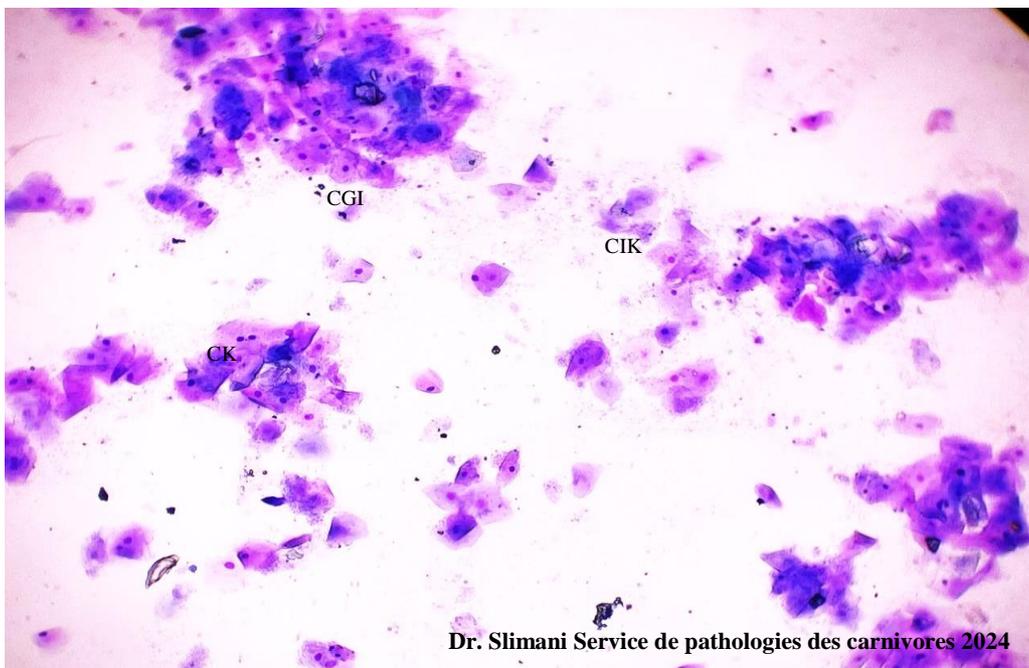


Figure 42 : Vue d'un frottis vaginal de proœstrus tardif (fin), coloré KIR RAL555, au grossissement x10, riche en cellules, fond propre, cellules superficielles kératinisées et cellules grandes intermédiaires majoritaires. Indice éosinophile 70%. CIK : cellules intermédiaires kératinisées.

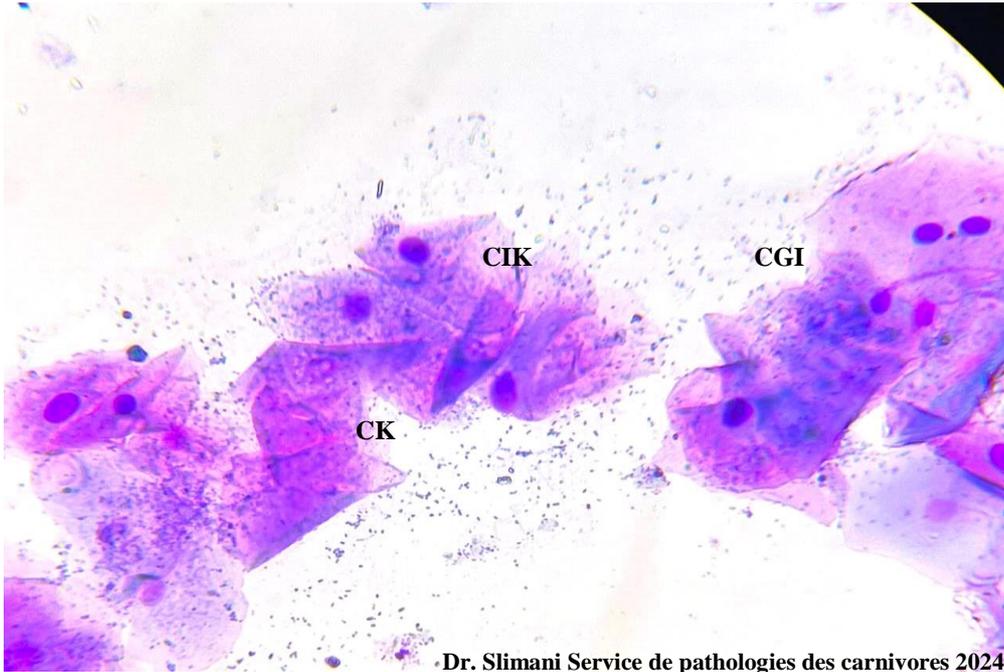


Figure 43 : Vue d'un frottis vaginal de proestrus tardif (fin de proestrus), coloré KIR RAL555, au grossissement x40, riche en cellules, fond propre, cellules superficielles kératinisées et cellules grandes intermédiaires majoritaires. CIK : cellules intermédiaires kératinisées.

Cas N5 :

Présentation Clinique de Roxy berger belge malinois âgé de 3 ans recevez au niveau de service de pathologies des carnivores domestiques pour un suivi de reproduction.

Identification de la Chienne :

- Nom : Roxy
- Âge : 3ans
- Race : berger belge
- Sexe : femelle

Anamnèse :

- Motif de la Consultation : suivi de reproduction.

Examen Clinique :

- Animal on bon état de santé.

L'examen cytologique :

- Frottis propre
- Cellules en goutte
- Cellules parabasales
- Indice éosinophile $\geq 10\%$

Conclusion : phase de cycle début anœstrus.

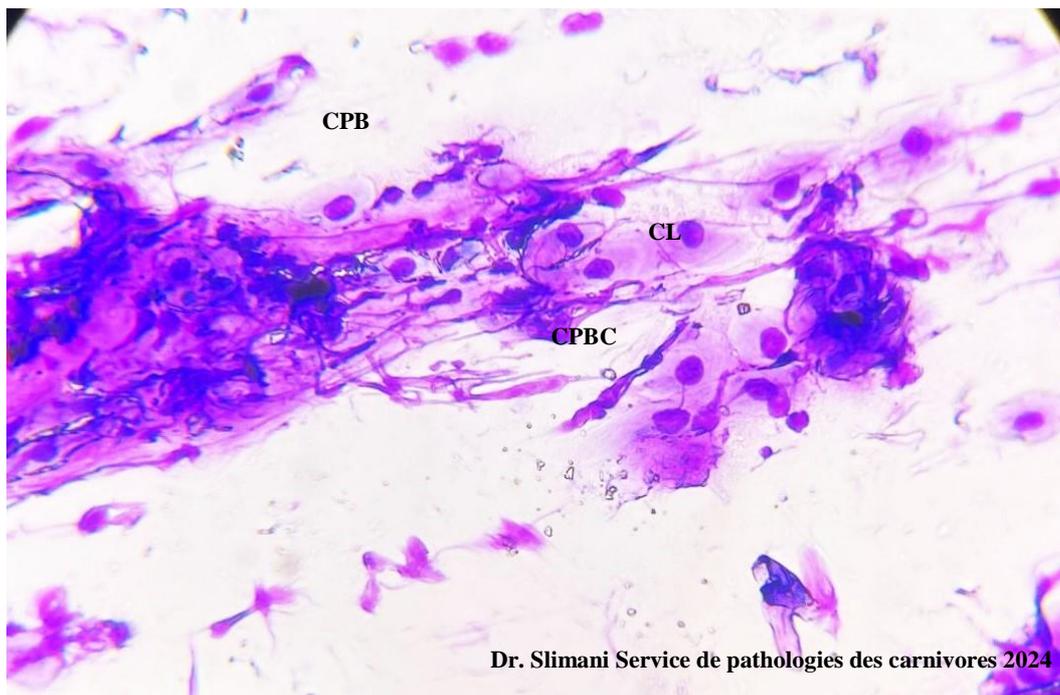


Figure 44 : Vue d'un frottis vaginal d'anœstrus, coloré au KIT RAL555, au grossissement x10, frottis pauvre en cellules ; cellules parabasales majoritaires, mucus. Indice éosinophile $\geq 10\%$.

CPBC : cellules parabasales en colonne ; CPB : cellules parabasales. ; CI : cellules petites intermédiaires.

Cas N6 :

Présentation Clinique de Tchiba de race Carlin âgé de 3 ans recevez au niveau de service de pathologies des carnivores domestiques pour un suivi de reproduction.

Identification de la Chienne :

- Nom : Tchiba
- Âge : 3ans
- Race : Carlin
- Sexe : femelle

Anamnèse :

- Motif de la Consultation suivi de reproduction.

Examen Clinique :

- Animal on bon état de santé.

L'examen cytologique :

- Frottis propre
- Quelques cellules grandes intermédiaires
- Quelques cellules parabasales
- Présence des polynucléaires neutrophiles
- Phagocytose
- Indice éosinophilique < 20%

Conclusion : phase de cycle metoestrus moyen.

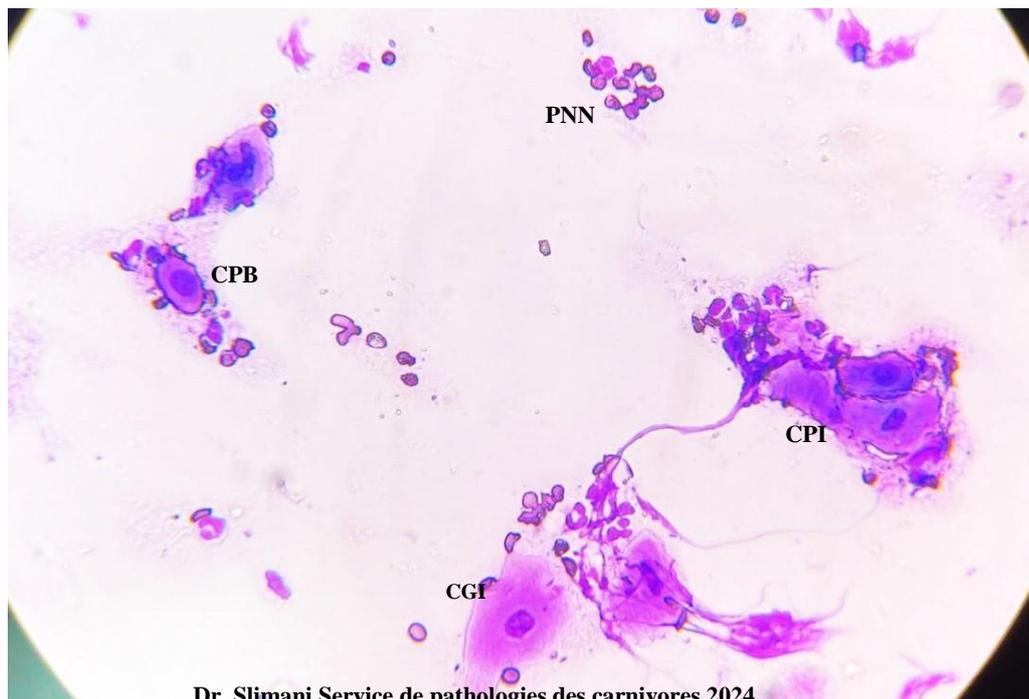


Figure 45 : Vue d'un frottis vaginal de metoestrus tardif , coloré au KIT RAL555, au grossissement x10, cellules petites intermédiaires majoritaires et présence de cellules intermédiaires avec leucocytes superposés (cercles), fond propre, nombreux leucocytes (polynucléaires neutrophiles), mucus, indice éosinophilique < 20%. CPI : cellules petites intermédiaires ; PNN : polynucléaires neutrophiles.

Cas N7 :

Présentation Clinique de Peggy dogue de bordeaux âgé de 12 ans recevez au niveau de service de pathologies des carnivores domestiques une 2eme fois après une semaine pour un suivi de reproduction, plus un écoulement purulent.

Identification de la Chienne :

- Nom : Peggy
- Âge : 12ans
- Race : dogue de bordeaux
- Sexe : femelle

Anamnèse :

- Motif de la Consultation : écoulement purulent

Examen Clinique :

- Possibilité d'une vaginite et confirmation de l'absence de pyromètre avec examen échographique.

L'examen cytologique (3-ème frottis vaginal) :

- Frottis sale
- Caractère infectieuse
- Quelques amas des cellules petite intermédiaires
- Forte infiltration des polynucléaires neutrophiles avec phagocytose

Conclusion : phase de metoestrus moyen avec suspicion d'une vaginite.

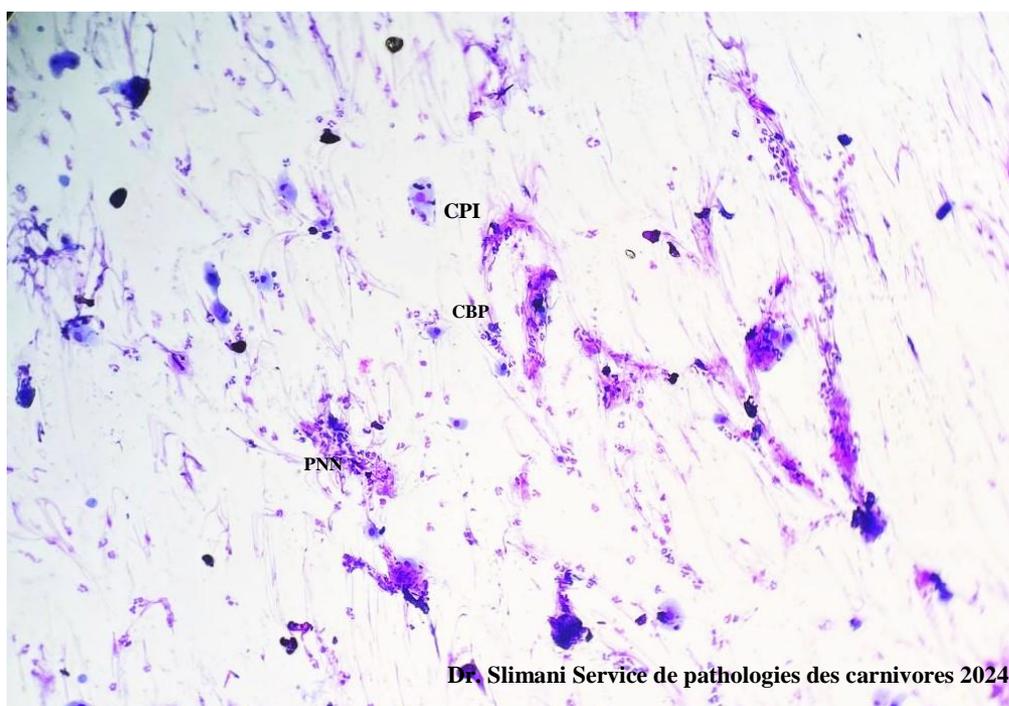


Figure 46 : Vue d'un frottis vaginal de metoestrus moyen, coloré au KIT RAL555, au grossissement x10, cellules petites intermédiaires majoritaires et présence de cellules intermédiaires avec leucocytes superposés (cercles), fond sale, nombreux leucocytes (polynucléaires neutrophiles), mucus, indice éosinophilique < 20%. CPI : cellules petites intermédiaires ; PNN : polynucléaires neutrophiles. CPB : cellules parabasales.

Cas N8 :

Présentation Clinique de Liza chihuahua âgé de 11 ans recevez au niveau de service de pathologies des carnivores domestiques une 2eme fois après une semaine pour un amaigrissement.

Identification de la Chienne :

- Nom : Liza
- Âge : 11ans
- Race : chihuahua
- Sexe : femelle

Anamnèse :

- Motif de la Consultation amaigrissement

Examen Clinique et diagnostic :

- Animal atteint de leishmaniose.

L'examen cytologique :

- Frottis sale
- Cellules quelque cellules petite intermédiaire
- Plusieurs amas de cellule parabasale
- Indice éosinophilique < 20%

Conclusion : phase de cycle metoestrus tardif.

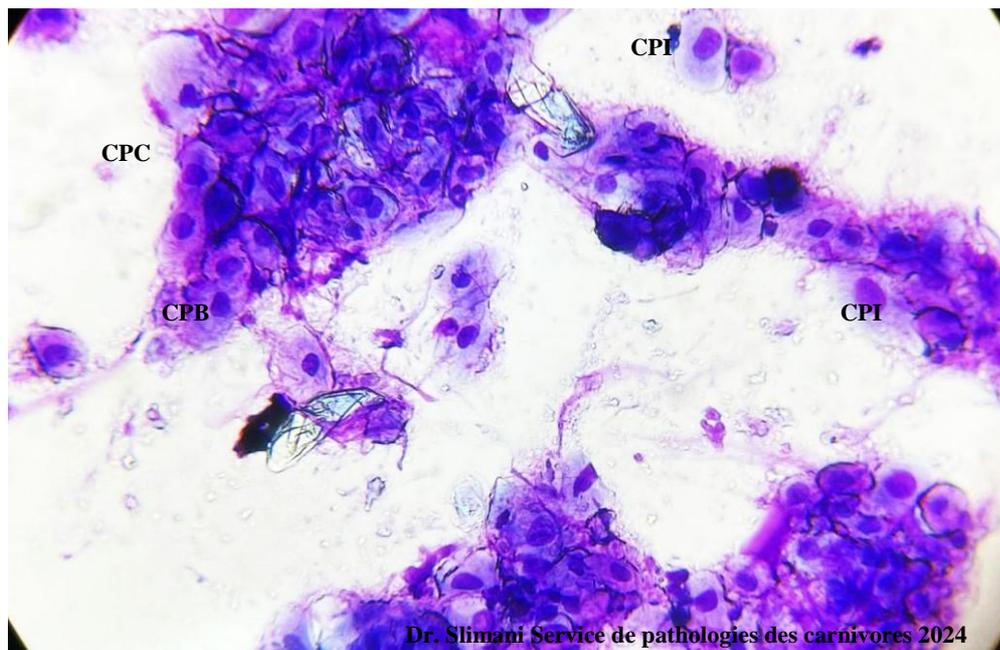


Figure 47 : Vue d'un frottis vaginal de metoestrus tardif, coloré au KIT RAL555, au grossissement x40, quelques cellules petites intermédiaires et présence de plusieurs amas de cellules parabasales superposés (cercles), fond sale, mucus, indice éosinophilique < 20%. CPI : cellules petites intermédiaires. CPBC : cellules parabasales en colonnes. CPB : cellules parabasales.

Cas N9 :

Présentation Clinique de Eva dog argentin âgé de 6 ans recevez au niveau de service de pathologies des carnivores domestiques pour un suivi de reproduction.

Identification de la Chienne :

- Nom : Eva
- Âge : 6 ans
- Race : dog argentin
- Sexe : femelle

Anamnèse :

- Motif de la Consultation pour un suivi de reproduction.

Examen Clinique et diagnostic :

- Animal on bon état de santé.

L'examen cytologique :

- Frottis propre
- Cellule parabasale majoritaires
- Frottis pauvre en cellules
- Indice éosinophilique < 10%

Conclusion : phase de cycle anœstrus.

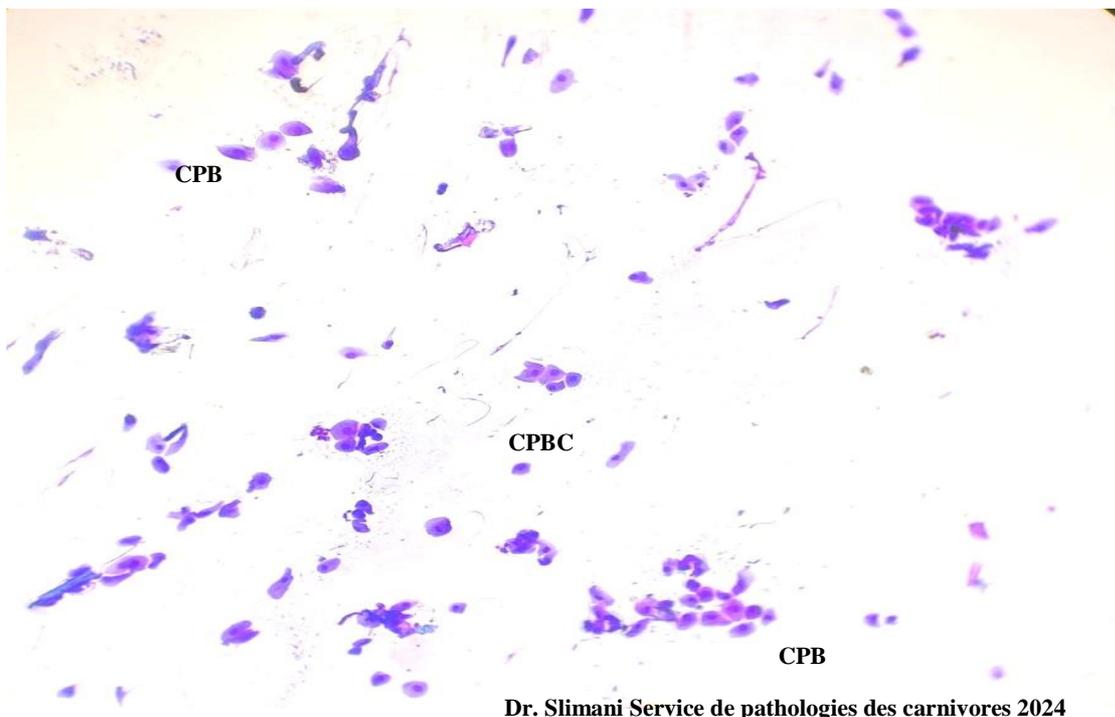


Figure 48 : Vue d'un frottis vaginal d'anœstrus, coloré au KIT RAL555, au grossissement x10, présence des cellules parabasales, frottis pauvre en cellules, fond propre, indice éosinophilique <10%. CPBC : cellules parabasales en colonnes. CPB : cellules parabasales.

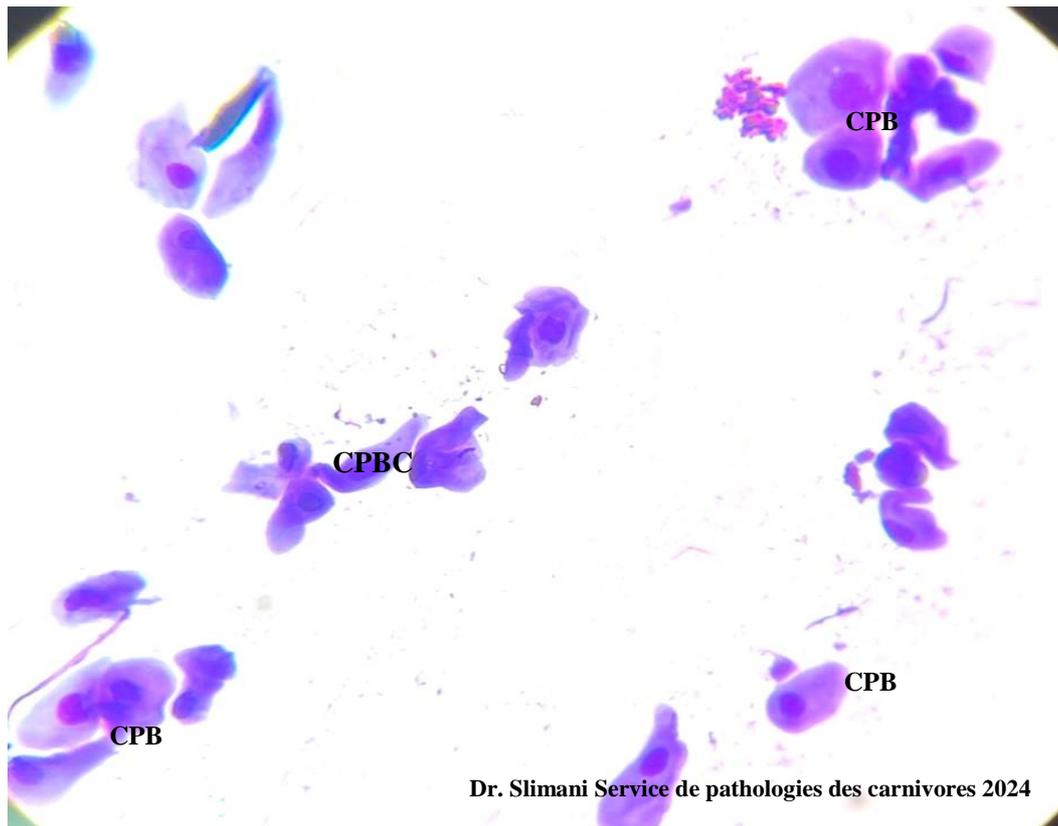


Figure 49 : Vue d'un frottis vaginal d'anœstrus, coloré au KIT RAL555, au grossissement x40, présence des cellules parabasales, fond propre, CPBC : cellules parabasales en colonnes. CPB : cellules parabasales.

Cas Particulaire N10 :

Présentation Clinique de Liza berger allemand âgé de 6 ans recevez au niveau de service de pathologies des carnivores domestiques pour un problème d'amaigrissement et une masse anale et une distension abdominale.

Identification de la Chienne :

- Nom : Liza
- Âge : 6 ans
- Race : berger allemand
- Sexe : femelle

Anamnèse :

- Motif de la Consultation : une anorexie, constipation, une masse anale, une distension abdominale, des phases de vomissement, absence des chaleurs depuis 8mois.

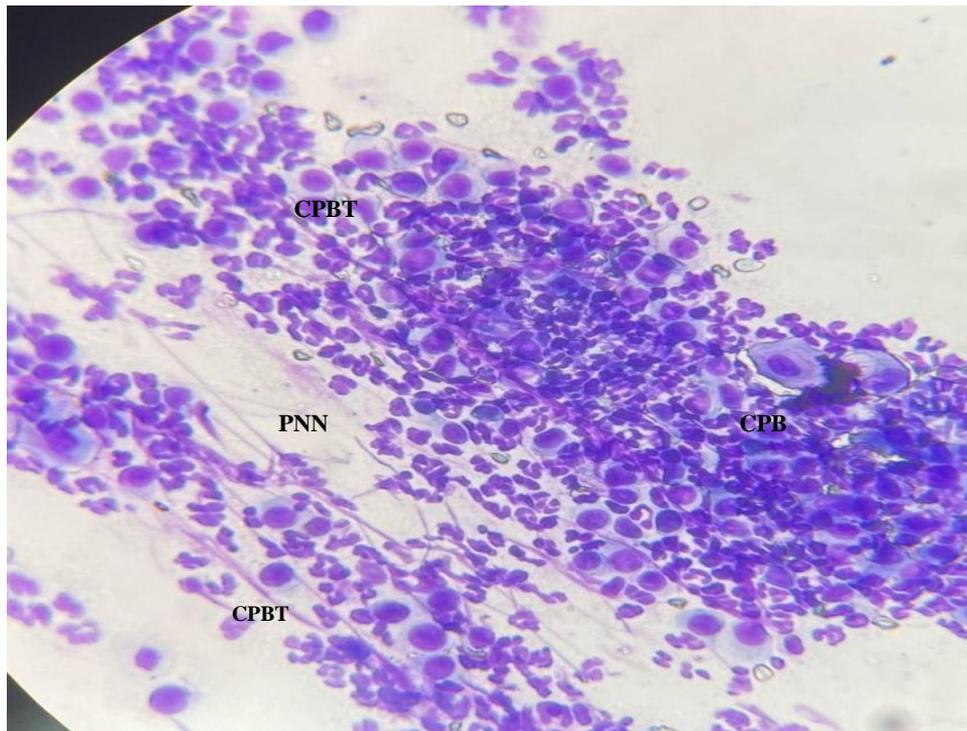
Examen Clinique et diagnostic :

- Animal atteint d'une hépatomégalie confirmée par examen échographique avec un circumanalome (tumeur des glandes périanales ou des glandes hépatoides) par examen cytologique ponction de la masse tumorale.

L'examen cytologique :

- Frottis sale
- Une forte infiltration des polynucléaires neutrophiles
- Présence de quelque cellule épithéliale
- Possibilité d'une infection vaginale
- Présence des cellules épithéliales d'origine cancéreuse ressemblable à des cellules parabasales mais avec un grand noyau et une anisocytose et anisocaryose marquée.

Conclusion : une infection vaginale avec un phénomène de métastase tumorale au niveau de la muqueuse vaginale.



Dr. Slimani Service de pathologies des carnivores 2024

Figure 50 : Vue de frottis vaginale de la chienne Liza berger allemand, coloré au KIT RAL555, au grossissement x40, frottis sale, une forte infiltration des polynucléaires neutrophiles, présence de quelque cellule épithéliale parabasale, présence des cellules épithéliales d'origine cancéreuse ressemblable a des cellules parabasales mais avec un grand noyau et une anisocytose et anisocaryose marquée. PNN : polynucléaires neutrophiles ; CPB : cellule parabasale ; CPBT : cellule parabasale tumorale

2. Discussion :

Durant notre étude, on a trouvé que l'examen cytologique permet une détection précise du moment de l'ovulation et du début de l'œstrus chez les chiennes. Cela permet aux éleveurs et aux vétérinaires de planifier avec précision la reproduction des chiennes pour augmenter les chances de conception.

En suivant le cycle œstral de chaque chienne individuellement, l'examen cytologique permet un suivi personnalisé qui tient compte des variations normales dans la durée et l'intensité des différentes phases du cycle œstral.

Le frottis vaginal est une méthode rapide et peu coûteuse de détection des chaleurs chez les chiennes. En utilisant un matériel simple et peu coûteux, cette technique offre une alternative pratique pour les éleveurs et les vétérinaires dans la gestion de la reproduction canine.

La cytologie vaginale c'est une méthode simple de détermination du stade du cycle œstral chez la chienne. Elle est basée sur le fait que l'épithélium vaginal subit des transformations sous l'effet des variations hormonales. Les œstrogènes induisent une prolifération de l'épithélium vaginal, ce qui permet probablement de protéger la muqueuse pendant l'accouplement. (Goodman M.2001).

La cytologie peut aider à diagnostiquer les anomalies du cycle œstral, telles que les cycles prolongés ou irréguliers, les troubles hormonaux et les infections utérines. Cela permet une gestion précoce et appropriée de ces problèmes de santé reproductive.

Concannon, P.W., et al. (1986) : Ils ont réalisé plusieurs études sur la cytologie vaginale et l'évaluation des chaleurs chez les chiennes, contribuant ainsi à la compréhension de l'utilisation de cette méthode dans la gestion de la reproduction canine.

Johnston, S.D., et al. (2001) : Ils ont publié des recherches sur les méthodes de suivi du cycle œstral chez les chiennes, mettant en évidence l'importance de l'examen cytologique dans la détection des chaleurs et la planification de la reproduction.

En identifiant le moment optimal pour la saillie ou l'insémination artificielle, la détection des chaleurs par cytologie permet une planification efficace de la reproduction. Cela peut augmenter les taux de réussite de la conception et réduire les coûts associés à la reproduction assistée. En permettant une gestion précise du cycle œstral, la cytologie peut contribuer à réduire les risques associés à la reproduction, tels que les infections utérines, les grossesses non désirées et les complications lors de la mise bas.

La détermination de la date d'ovulation est donc importante et permet ainsi d'optimiser la reproduction d'une chienne afin de dépasser le taux de fertilité naturelle. (Badinand F., Petit C.1998). Un bon suivi et donc une connaissance du moment optimal pour l'accouplement est utile pour les éleveurs qui organisent des saillies ou des inséminations à l'étranger ou dans des élevages très éloignées. Connaître la date d'ovulation est également important dans le suivi de la gestation. Cela permet de prévoir à quel moment effectuer le diagnostic de gestation et réaliser le suivi du développement embryonnaire. (Durrant B.S., Ravida N., Spady T.2006).

Le frottis doit être fixé immédiatement (dans les quelques secondes qui suivent l'étalement sur la lame), alors qu'il est encore humide. En effet, si l'air sèche les lames, les cellules peuvent se distordre (Roszel, 1977 ; Concannon & Digregorio 1987 ; Neveux, 1999).

La lame est plongée dans un bain de fixateur, qui peut être une solution de méthanol à 95% (Holst, 1986 ; Olson *et al.* 1984), un mélange à parts égales d'éthanol à 100° et d'éther (Schutte, 1967 ; Neveux, 1999), ou des solutions industrielles préparées à cet effet.

Le praticien doit choisir une technique de coloration qui soit à la fois la plus simple à effectuer, se conservant bien, et qui doit éviter les erreurs de lecture en donnant des résultats constants (Feldman & Nelson, 1996). Plusieurs techniques sont à notre disposition.

Et dans notre étude nous avons choisi le KIT RAL555 pour la technique de coloration la plus rapide et la plus efficace.

Dans le suivi du cycle sexuel chez la chienne, la coloration de Harris Shorr est la coloration de choix. Les cellules acidophiles deviennent rouge orange alors que la kératinisation progresse. Les désavantages sont sa durée de mise en œuvre (une quinzaine de minute), ce qui en fait l'une des techniques les plus longues ainsi que le grand nombre de récipients de produits mis à disposition (Feldman & Nelson, 1996). Cependant, il existe comme alternative des kits simplifiés de coloration tels que le Diagnoestrus RAL®.

La lecture de la lame se fait en deux temps, un faible grossissement (x10 x40 ou x100) permet d'apprécier globalement la richesse en cellules ainsi que leur répartition (dispersées, en amas ou isolées), la réussite de la coloration. On peut déjà observer l'éventuelle présence de mucus, de polynucléaires neutrophiles, de spermatozoïdes. Cette première visualisation donne également la tendance tinctoriale du frottis (globalement basophile, acidophile, ou « mixte »).

Puis un fort grossissement (x400) nous donne des informations beaucoup plus précises sur les types cellulaires rencontrés. La morphologie et la couleur de la cellule, la taille et l'aspect du noyau sont des informations primordiales pour reconnaître le type cellulaire rencontré (Simmons, 1970 ; Neveux ,1999 ; Johnston *et al.* 2001). Théoriquement à la survenue de l'œstrus (et pendant toute cette phase) et du pic de LH, le frottis vaginal est entièrement kératinisé et présente 100% de cellules anucléées (Feldman & Nelson, 1996).

Conclusion

3. Conclusion :

L'étude du cycle œstral chez la chienne est d'une importance capitale pour la santé reproductive et générale de l'animal. À travers cet examen cytologique, nous avons pu observer les différentes phases du cycle, leurs caractéristiques cellulaires distinctes et les variations hormonales qui les accompagnent. Cette compréhension approfondie du cycle œstral est essentielle pour plusieurs raisons.

Premièrement, elle permet de détecter les anomalies précocement, qu'elles soient d'origine hormonale, inflammatoire ou tumorale. Ceci ouvre la voie à un diagnostic précoce et à une prise en charge adéquate, améliorant ainsi le pronostic et la qualité de vie des chiennes.

Deuxièmement, le suivi du cycle œstral est crucial pour la gestion de la reproduction. En connaissant avec précision la phase du cycle, les éleveurs peuvent planifier efficacement la reproduction, maximisant ainsi les chances de conception et réduisant le risque de problèmes obstétriques.

En tant qu'outil non invasif et peu coûteux, l'étude des frottis offre constitue une méthode précise et fiable pour évaluer la santé reproductive des chiennes avec détermination précise des phases du cycle avec une possibilité de planifier la mise en reproduction de la chienne, néanmoins elle devrait être complétée par un dosage de la progestéronémie lorsqu'il s'agit de la détermination du moment de l'ovulation chez la chienne ceci représente une nécessité lorsqu'une saillie ou une insémination artificielle sous assistance.

Recommandations :

1. Encourager l'intégration de l'examen cytologique du cycle œstral dans les protocoles de suivi de santé générale des chiennes.
2. Sensibiliser les éleveurs et les propriétaires de chiennes sur l'importance du suivi du cycle œstral.
3. Intégrer l'examen cytologique du cycle œstral dans la pratique vétérinaire clinique de routine et dans les centres de dressages ou d'élevages canins.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Arbeiter K, Dobretsberger M, Müller E. et al. Ein direkter Nachweis der Ovulation und Fertilisation beim Hund durch Progesteronverlaufsuntersuchungen. *J.Vet.Med.A.*1991 ;38, p:696-701.
- Baba E, Hata H, Fukata T, Arakawa A. Vaginal and uterine microflora of adult dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1983; 44 (4), p: 606-609.
- Badinand F., Petit C. Quels résultats attendre de la reproduction assistée chez la chienne ? *Recueil de médecine vétérinaire*, mars-avril 1998, 174, n°7/8, spécial reproduction canine vol.2, pp. 153-161.
- Baker R, Lumsden J.H. Appareil génital. In : Atlas de Cytologie Canine et Féline. Paris : Masson. 2001; modifié le 5 juillet 2001.
- Baron F. étude de la période pré-ovulatoire chez la chienne berger allemand. Thèse : Méd. Vét .Alfort.2006; p: 90.
- Blendiger K. Physiology and pathology of the estrous cycle of the bitch. Proceedings of the SCIVAC Congress, Rimini, Italy, 2007, [<http://www.ivis.org>].
- Bowen R.A. Techniques for preparing a canine vaginal smear. [en-ligne]. Fort Collins (USA). Colorado State University [<http://www.vivo.colostate.edu>].2000; modifié le 5 juillet 2000.
- Cathenoz L. et Marsan C. Contribution à l'étude de la reproduction chez la chienne : analyse des dossiers des chiennes suivies au centre d'étude en reproduction canine assistée de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort de 1990 à 1993. Thèse Méd. Vét., Alfort 1996, n°38.
- Chaffaux S., Bosse Ph. Biologie de la reproduction du chat et du chien. Encyclopédie Vétérinaire, Reproduction – 0100, pp. 1-16
- Choquart V. Suivi échographique et datation de la gestation chez la chienne à partir du pic de LH. Thèse Méd. Vét., Nantes 2002, n°18.
- Concannon P.W. Clinical and endocrine correlates of canine ovarian cycles and pregnancy. In Kirk editor. Current veterinary therapy small animal practice IX. Philadelphia WB Saunders. 1986; p: 1214-1224.
- Concannon P.W. Estrus induction in dogs: Approaches, Protocols and applications. Proceedings of the world congress WSAVA, 2005, [<http://www.ivis.org>].

- Concannon P.W, Digregorio G.B. Canine vaginal cytology. In Burke editor. Small animal reproduction and infertility. Philadelphia.1987; p: 96-111.
- Concannon P.W. Understanding and monitoring canine pregnancy. WSAVA 2005, [<http://www.ivis.org>].
- Concannon P.W., Verstegen j. Some unique aspects of canine and feline female reproduction important in veterinary practice. Proceedings of the world congress WSAVA, 2005, [<http://www.ivis.org>].
- Concannon P.W., Whaley s., Lein d. *et al.* . Canine gestation length: Variation related to time of mating and fertile life of sperm. *Am. J. Vet. Res.*, 1983, **44** (10), 1819-1821.
- Corre J., Rozenbaum M. Elaboration d'un document pédagogique de reproduction canine. Thèse Méd. Vét., Alfort 2004.
- Davidson A. Infertilité chez la chienne : notions actuelles. *WALTHAM Focus*, 2006, vol.16, n°2, pp. 13-21. [<http://www.ivis.org>].
- De gier J., Kooistra H.S., Djajadiningrat-laanen s.c. *et al.* Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17 β , progesterone, prolactin, and α -melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology*, 2006, **65**, pp. 1346-1359.
- Dettle E.E., Bertschinger H.J. Luteolysis in early diestrous beagle bitches. *Theriogenology*. 1988; 29, p: 757-763.
- Dore M.A. The role of the vaginal smear in the detection of metoestrus and anoestrus in the bitch. *J. small Anim. Pract.*1978; 19, p: 561-572.
- Dumon C, Fontbonne A. Reproduction du chien et du chat. Coll. Les indispensables de l'animal de compagnie.P.M.C.A. 2009 ; p : 287.
- Durrant B.S., Ravida N., Spady t. *et al.* New technologies for the study of carnivore reproduction. *Theriogenology*, 2006, **66**, pp. 1729-1736.
- England G. Vaginal cytology and cervicovaginal mucus arborisation in the breeding management of bitches. *J. small Anim. Pract.*1992; 33, p: 577-582.
- England G. Concannon P.W. Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. Juin 2002. In *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, [<http://www.ivis.org>].
- England G., Burgess C.M., Freeman s.l. *et al.* Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. *Theriogenology*, 2006, **66**, pp. 1410-1418.
- Evans J.M, Savage T; J. The collection of vaginal smears from bitches. *Vet. Rec.*1970; 87, p: 598-599.

- Farstad W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 2000, **53**, pp. 175-186.
- Fayrer, Hosken R. Canine theriogenology notes (female). Georgia (USA): University of Georgia.1996; [<http://lam.vet.uga.edu>].
- Feldman, Nelson. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 2 nd ed. Philadelphia: WB Saunders.1996; p: 526-546.
- Fontbonne A. Les pièges des frottis vaginaux chez la chienne. *Point vét* ; 1996 ; 28 ,p :19-25.
- Fontbonne A. Ovulation, maturation ovocytaire et fécondation in vivo chez la chienne, Thèse Méd., Agro Paris Tech 2008.
- Fontbonne A. Diaporama de cours : D1 gestation. ENVA, 2003, 142p.
- Fontbonne A. Insémination artificielle dans l'espèce canine. *Encyclopédie Vétérinaire, Pathologie de la reproduction – 0900*, pp 1-7.
- Fontbonne A., La reproduction, c'est « tendance ». *Pratique Vét Anim Comp.*, mars 2005, N° 14, *Bulletin du Groupe d'Étude en Reproduction, Élevage et Sélection des Carnivores domestiques (GERES) n°1*, pp. 15-16.
- Fontbonne A., Buff S., Garnier F. Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine. *Point Vét.*, 2000, **31** (209), 395-401.
- Freville A., Conduite à tenir en obstétrique canine et féline. Thèse Méd. Vét., Alfort 2005.
- Goodman M. Ovulation timing: concepts and controversies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Clinical theriogenology*. Mars 2001; 31, n°2, p: 219-235.
- Goodman M. Ovulation timing: concepts and controversies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, mars 2001, **31**, n°2, *clinical theriogenology*, pp. 219-235.
- Guerin C, Fontbonne A. Les frottis vaginaux et le suivi du cycle oestral chez les carnivores. *Intervet Ed.*, Angers.1997 ; p : 1-16.
- Guerin C. Détermination du moment de l'ovulation chez la chienne, implication pour la saillie ou l'insémination artificielle. *Rec. Méd. Vét.*, 1998, **174** (7-8), 117-123.
- Guyant L. . Canine vaginal cytology. *Vet. Tech*.1988; 9, p: 513-523.
- Heron J.F.Cytologie de Papanicolaou. *Cytologie de Papanicolaou*. [en-ligne]. Caen (France) : Centre Régional François Baclesse, Faculté de Médecine de Caen. 2004, (modifié le 21 mars 2000) [<http://www.oncoprof.net>].
- Hewitt D, England G. Assessment of optimal mating time in the bitch. *In Practice* Janvier.2000; p: 24-33.

- Hirsch D.C, Wiger N. The bacterial flora of the normal canine vagina compared with that of vaginal exudates. *J. small Anim. Pract.*1977; 18, p: 25-30.
- Hoffmann B., Hormonal control of pregnancy and parturition in the dog, Proceedings of the world congress WSAVA, 2004, [<http://www.ivis.org>].
- Holst P.A. Vaginal cytology in the bitch. In: Moorw editor. *Current therapy*; 1986.
- Holst PA, Phemister RD. Onset of diestrus in the beagle bitch: definition and significance.*Am.J.Vet.Res.*1974; 35, 3, p: 401-406.
- Johnston S.D. The bitch. In: *Reproduction: Small companion animals' proceedings*. Sydney: Post Graduate in Veterinary Science.8-12 août 1988; p: 69- 87.
- Johnston SD, Olson P.N.S, Root Kustritz M.V. The canine estrous cycle. In: *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders.2001; p: 16-31.
- Kim Y.H., Travis A.J., Meyers-wallen V. N. Parturition prediction and timing of canine pregnancy. *Theriogenology*, 2007, **68**, 1177-1182
- Kutzler M.A., Mohammed H.O., Lamb S.V. et al. Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology*, 2003, **60**, 1187-1196.
- Lennoz M. Physiologie de la reproduction. *Point Vet.*, 1978, **7**, 11-17
- Ling GV, Ruby A.L. Aerobic bacterial flora of the prepuce, urethra, and vagina of normal adult dogs. *Am. J. Vet. Res*; 1978; 39(4), p: 695-698.
- Marseloo N., Fontbonne a., Bassu g. *et al.* Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches. In: *Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*. Sao Paulo, 4-6 août 2004, 75-77.
- Marti J.A. Vaginal cytology in the bitch and queen. Proceedings of the world congress WSAVA, 2002. [<http://www.ivis.org>].
- Mestre J, Wanke M, Sucheyre S. Sucheyre S. Exfoliate vaginal cytology and plasma concentrations of progesterone, luteinising hormone and oestradiol-17 β during oestrus in the bitch. *J. small Anim. Pract.*1990; 31, p: 568-570.
- Mialot J .P. Examen de l'appareil génital femelle. In : *Pathologie de la reproduction chez les carnivores domestiques*. Maisons-Alfort: éditions du point vétérinaire.1984; p: 29-44.
- Neveux M. . Les frottis vaginaux chez la chienne. *Point Vet.*1999; 30, p: 557-564.
- Nishiyama T, Kinugasa T, Kimura T, Watanabe G, Taya K, Tsumagari S, Takeishi M. Determination of optimal time for mating by artificial insemination with chilled semen using luteinizing hormone surge as an indicator in beagles. *J. Am. Anim. Hosp.*1999; 35, 4, p: 348-352.

- Oettle E.E, Weldhagen A.A. A modified shorr's stain: a practical rapid stain for canine cytology. *J. Sth. Afr. Vet Assoc.* 1982; 82, p: 267-268.
- Okkens A.C., Hekerman T.W.M., De vogel j.w.A. *et al.* . Influence of litters size and breed on variation in length of gestation in the dog. *Vet. Quat.*, 1993, **15**, 160-161.
- Olson P.N, Husted P.W, Allen T.A, Reproductive endocrinology and physiology of the bitch and queen. *Vet. Clin. North Am. [Small Anim. Pract.]*.1984; 14 (4), p: 927-946.
- Pierson P., Grandjean D., Sergheraert R. *et al.* Guide pratique de l'élevage canin. Ed. Fontaine, 1996, 157-190.
- Platt A.M, Simpson R.B. Bacterial flora of the canine vagina. *Southwest. Vet.* 1974; 27, P: 76-77.
- Reynaud K., Fontbonne A., Marseloo N. *et al.* Maturation ovocytaire, fécondation et développement embryonnaire chez la chienne. *Bull. Ac. Vét. Fr.*, 2005, **158**(2), 167-172.
- Reynaud K., Fontbonne A., Marseloo N. *et al.* In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*, 2005, **130**, 193-201 [<http://www.reproduction-online.org>].
- Romagnoli S. Control of reproduction in dogs and cats: use and misuse of hormones. Proceedings of the world congress WSAVA, 2006, [<http://www.ivis.org>].
- Romagnoli S. Recent advances in canine female reproduction. Proceedings of the world congress WSAVA, 2006, [<http://www.ivis.org>].
- Roszel J.F. Normal canine vaginal cytology. *Vet. Clin. North. Am.* 1977; 7 (4), p: 667-681.
- Schutte AP. Canine vaginal cytology 3I Technique and cytological morphology. *J. small Anim. Pract.* 1967; 8, p: 301-306.
- Simmons J. The vaginal smear and its practical application. *Vet. Med. [small An. Clin.]*; 1970; 59, p: 369-373.
- Sokolowski J.H. The effect of ovariectomy on pregnancy maintenance in the bitch. *Lab. Anim. Sci.* 1971; 21, p: 696-699.
- Taradach C. Frottis vaginaux chez la chienne beagle. Détermination de la période d'ovulation à l'aide de l'indice éosinophile. *Revue Méd. Vét.* 1980; 131 (11), p : 775-782.
- Vaughan L. Reproduction in the bitch; *Irish Vet. J.* 1996; 49, p: 626-628.
- Verstegen J., Onclin K. Estrus control in the bitch. Proceedings of the world congress WSAVA, 2002, [<http://www.ivis.org>].
- Verstegen J., Onclin K. Régulation lutéale chez la chienne. *Recueil de médecine Vétérinaire*, mars-avril 1998, **174**, n°3/4, spécial reproduction canine vol.1, 17-23.

- Wright P.J, Parry B.W. Cytology of the canine reproductive system. *Vet. Clin. North Am. [Small Anim. Pract.]*.1989; 19 (5), p: 851-874. Post K. Canine vaginal cytology during the estrous cycle. *Can.Vet. J*; 1985; 26, p:101-104.

