

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

UNIVERSITE ibn khaldoun DE TIARET  
institut DES SCIENCES VETERINAIRES  
DEPARTEMENT DE Sante animale

PROJET DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU diplôme DE DOCTEUR  
VETERINAIRE

sous le theme

*Insémination artificielle  
chez l'espèce canine*

Présente par:

MELLE. AIDET Nacera

MELLE. BELADJINE Hayet

Encadre par:

Dr . SLIMANI Khaled



annee universitaire  
2012-2013

# SOMMAIRE

- Remerciements .....
- Dédicace .....
- Introduction .....

## PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Rappels anatomiques et physiologiques de l'appareil reproducteur de la chienne

### **1- Rappels anatomiques de l'appareil génital de la chienne .....**

- A) Les organes génitaux de la chienne .....
- a) Les ovaires .....
- b) Les trompes utérines.....
- c) L'utérus.....
- d) Le col utérin.....
- e) Le vagin .....
- f) Le sinus uro-génital .....
- f.1. Le vestibule .....
- f.2. La vulve.....
- f.3. Le clitoris .....
- g) Les mamelles .....
- A) Les moyens de fixation .....
- B) Vaisseaux des organes génitaux femelles .....

### **2 Rappels sur la physiologiques du cycle sexuel de la chienne**

- A) la puberté.....
- B) Les données générales du cycle œstral de la chienne .....
- C) particularités du cycle .....
- D) la chronologie du cycle .....
- D\_ 1) Le pro-œstrus .....



D_2) L'œstrus .....	
D_3) Le Metroestrus ou dioestrus .....	
D_4) L'Anoestrus.....	
E) Endocrinologie du cycle .....	
1) Présentation des différentes hormones.....	
1.a) Les hormones hypothalamo-hypophysaires.....	
A) Les hormones hypothalamiques .....	
B) Les hormones hypophysaires.....	
1-b) Les hormones ovariennes.....	
2) Les Variations hormonales durant le cycle .....	
a) L'anoestrus.....	
b) Le pro-œstrus .....	
c) L'œstrus .....	
d) Le metoestrus.....	
3) LES CARACTERISTIQUE DU PROFIL HORMONAL.....	

## **Chapitre II. Le suivi de chaleurs chez la chienne**

I) Méthode de détermination de la date d'ovulation .....	
A) les signes extérieurs de chaleurs.....	
B) l'observation des signes comportementaux.....	
C) La mesure de la résistivité du mucus vaginal.....	
D) Suivi endoscopique des chaleurs .....	
1Pro-œstru .....	
2œstrus.....	
3 Metroestrus.....	
4 Anoestrus.....	
E) Cytologie vaginale.....	
1) La préparation d'un frottis vaginal.....	
1.1) les techniques de prélèvement.....	
a)Le prélèvement avec une pipette.....	
b) Ecouvillonnage .....	
1.2) l'étalement.....	
1.3) La fixation du prélèvement.....	

1.4) Technique de coloration du frottis .....	
A) Les colorations unichromes	
a) La coloration de May-Grünwald-Giemsa .....	
b) Le bleu de méthylène .....	
B) Les colorations pluri chromes .....	
1) La coloration de Harris Shorr .....	
2) La coloration de Papanicolaou.....	
1.5) L'observation microscopique .....	
A) Les types cellulaires .....	
B) La maturation cellulaire .....	
C) Les cellules de l'épithélium vaginal.....	
C_1Les cellules parabasales .....	
C_2Les cellules intermédiaires .....	
Les petites cellules intermédiaires.....	
Les grandes cellules intermédiaires.....	
C_3Les cellules superficielles .....	
C_4Autres cellules issues de l'épithélium vaginal .....	
C.5) Les index cytologiques .....	
L'index éosinophile (IE).....	
2)Les variations de la cytologie vaginale au cours du cycle œstral .....	
2.1) Le proestrus .....	
2.2) L'œstrus.....	
2.3) Le Metroestrus .....	
Le Metroestrus précoce .....	
Le Metroestrus moyen et tardif.....	
2.4) L'Anoestrus .....	
2.5) La transition Anoestrus-proestrus .....	
3) Intérêts et limites des frottis vaginaux.....	
F) Les dosage hormonaux .....	
1) Le dosage de l'œstradiol.....	
2) Le dosage de l'hormone LH .....	
3) Le dosage de la progestérone plasmatique .....	
G) L'échographie ovarienne.....	
II) L'INDUCTION DES CHALEURS CHEZ LA CHIENNE.....	

- 1-Protocoles utilisant des anti-prolactines.....
- 2-Protocoles utilisant des gonadotrophines.....
- 3-Utilisation d'agonistes de la GnRH.....

**CHAPITRE III L'insémination artificielle.....**

1-HISTORIQUE.....

2-Les indications de l'insémination artificielle.....

2.1. Problèmes de comportement.....

- a) Incapacité du mâle à saillir la femelle .....
- b) Refus d'accouplement par la femelle.....

2.2. Les raisons médicales.....

- a) Douleurs ostéo-articulaires .....
- b) Malformations congénitales ou acquises de la femelle.....
- c) Fracture de l'os pénien chez le mâle .....
- d) Disproportion des reproducteurs.....

2.3. Les raisons sanitaires.....

2.4. Eloignement géographique des reproducteurs.....

- a) Eloignement géographique .....
- b) Eloignement « temporel ».....

2.5. Choix du moment de l'accouplement inadapté.....

3)La réalisation de l'insémination.....

A. Prélèvement et évaluation de la semence du mâle.....

1-Prélèvement du sperme .....

- a)Matériel de récolte.....
- b) Déroulement de la récolte.....
- c) Causes d'échec de la récolte .....

2-Stockage de la semence après la récolte.....

3- les phases de l'éjaculat du chien .....

4-Examen de la semence.....

- le spermogramme .....

a) L'aspect macroscopique .....

- 1-La couleur .....
- 2-L'odeur .....
- 3-La viscosité .....

4-Le pH.....	.....
5-Le volume .....	.....
b) L'étude microscopique.....	.....
1 Appréciation de la mobilité.....	.....
2 La numération des spermatozoïdes .....	.....
3 Le spermocytogramme .....	.....
B. Les différentes techniques d'insémination artificielle.....	.....
B_1) Les différents types de l'insémination artificielle .....	.....
B_2 D'autre Méthode de l'insémination artificielle .....	.....

## **Chapitre IV : Diagnostique de gestation de la chienne inséminée**

1 La gestation .....	.....
2. Diagnostic de gestation.....	.....
2.1. Marqueurs indirects de gestation: les signes cliniques maternels	
2.1.1. Modifications comportementales .....	.....
2.1.2. Modifications anatomiques .....	.....
2.1.2.1 Modifications physiologiques .....	.....
2.1.2.2 Modifications respiratoires.....	.....
2.1.2.3 Les modifications cardio-vasculaires.....	.....
2.1.2.4 Activité myoélectrique de l'utérus .....	.....
2.1.3. Modifications biochimiques et hématologiques .....	.....
2.2. Marqueurs directs de la gestation .....	.....
2.2.1. L'examen clinique .....	.....
2.2.1.1. La palpation externe.....	.....
2.2.1.2. L'auscultation.....	.....
2.2.2. Les dosages hormonaux.....	.....
2.2.3. Les examens d'imagerie.....	.....
2.2.3.1. L'échographie .....	.....

## **DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE**

- Démarche de l'expérimentation.....	.....
a) Durée et lieu du travail .....	.....
b) Matériel et méthodes.....	.....

1-Echantillon expérimentale .....	
2-Matériel utilisé .....	
2.A Matériel utilisé pour suivie de chaleurs .....	
2.b Matériel utilisé pour la récolte d sperme .....	
2_c .Matériel utilisé pour l'insémination (dépôt de la semence).....	
2_d .Matériel utilisé pour le suivie de la chienne inséminée.....	
-Résumé de l'étude expérimentale .....	
c) Discussion .....	
Conclusion .....	
Références bibliographiques .....	

## LISTE DE FIGURES ET TABLEAUX

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

#### Listes des figures.

Figure N° 01: Schéma de l'appareil génital de la chienne .....	
Figure N°02 : Anatomies du tractus génital de la chienne (Johnston) .....	
Figure N°03 : Profil hormonal de la chienne .....	
Figure N°04: Profil hormonal schématisé de la chienne au cours du cycle (Hors ANOESTRUS).....	
Figure N°05 : Intensité des saignements vulvaires Détectée par l'écouvillonnage vaginal ..	
Figure N°06 : Critères de détermination de la période optimale de fécondation.....	
Figure N°07 : Aspect de la muqueuse vaginale sous endoscopie .....	
Figure N°08 : Technique de prélèvement par écouvillonnage.....	
Figure N°09: Réalisation d'un frottis vaginal à l'aide d'un écouvillon .....	
Figure N°10: Technique de prélèvement à l'aide d'un spéculum (Fayrer-Hosken 1996) .....	
Figure N°11 : Etalement d'un écouvillon sur une lame de microscope (Bowen 2000).....	
Figure N°12: Frottis vaginal de chienne coloré avec la méthode Diff-Quick ® .....	
Figure N°13: Frottis vaginal pratiqué chez une femme et coloré avec la technique de Papanicolaou .....	
Figure N°14 : Représentation schématisée des cellules épithéliales et sanguines observées dans les sécrétions vaginales au cours du cycle.....	
Figure N15: Cellules parabasales (coloration Harris-Shorr) .....	
Figure N°16 : Petites cellules intermédiaires (Mialot 1984 ).....	
Figure N°17: Grande cellule intermédiaire (Mialot 1984) coloration Harris Shorr.....	
Figure N°18 : Cellules superficielles kératinisées anucléées (Mialot 1984 ) .....	
Figure N°19 : Le pic d'IE (courbe théorique) (Taradach 1980) .....	
Figure N°20 : Proestrus débutant (cliché Alain Fontbonne). (coloration Harris-Shorr).....	
Figure N°21 : Proestrus moyen (cliché Alain Fontbonne). (coloration Harris-Shorr).....	
Figure N°22 : Proestrus tardif (cliché Alain Fontbonne) (coloration Harris-Shorr).....	
Figure N°23 : Frottis d'œstrus (cliché Alain Fontbonne).(Harris Shorr) .....	
Figure N°24: Frottis de début de Metoestrus (cliché Alain Fontbonne).....	
Figure N°25 : Frottis de Metoestrus (cliché Alain Fontbonne) .....	
Figure N°26 : Frottis d'Anoestrus (cliché Alain Fontbonne) .....	
Figure N°27 : Correspondance entre le pic de LH et le début de l'augmentation du taux de progestérone (FONTBONNE A1992).....	
Figure N28 : Echographie ovarienne chez la chienne .....	
Figure N°29 : Ovaire en proestrus. <i>Fontbonne A.</i> © .....	
Figure N°30 : Ovaire en période pré ovulatoire .....	

Figure N°31_:	Ovaire post-ovulatoire, disparition de follicules .....
Figure N°32 :	Matériel nécessaire à la récolte du sperme chez le chien.....
Figure N°33 a :	Début de la récolte .....
Figure N°33 b :	Soulèvement d'un postérieur.....
Figure N°33 c :	Orientation caudale du pénis.....
Figure N°34:	Matériel nécessaire au comptage des spermatozoïdes. ....
Figure 35 :	Pistolet OSIRIS (DUMOND, et al., 1990). ....
Figure N°36 :	les différentes étapes de l'utilisation du pistolet Osiris..... (Mialot et al ; 1985)
Figure N° 37 :	Sonde norvégienne.....
Figure 38:	Méthode de cathétérisme utérin. <i>Fontbonne A. ©</i> .....
Figure 39:	Passage de la sonde urinaire dans l'ostium utérin (Fontbonne A. ©) .....
Figure N° 40 :	palpation abdominale externe .....
Figure N°41 :	Diagnostic de gestation de la chienne effectué 23 jours après l'ovulation....
Figure N°42 :	Diagnostic de gestation chez la chienne effectué 25 jours après l'ovulation
Figure N°43:	Diagnostic de gestation effectué 28 jours après l'ovulation.....
Figure N°44 :	Diagnostic de gestation effectué 33 jours après l'ovulation.....

## Liste des Tableaux

Tableau N°01:	coloration Diff-Quick ®.....
Tableau N°02 :	Coloration de Harris – Shorr.....
Tableau N°03 :	La coloration de Papanicolaou.....
Tableau N°04 :	représente des autres cellules issues de l'épithélium vaginal.....
Tableau N°05:	la variation cytologique pendant le proestrus.....
Tableau N°06 :	l'échelle de valeurs de la mobilité de masse de la semence du chien qui a été codifiée par MILOVANOV (GUIGARDET, 1997).....
Tableau N°07 :	Echelle de mobilité individuelle des spermatozoïdes de SEAGER et PLATZ. ....
Tableau 08:	Influence de la taille de la chienne sur l'exactitude de la taille de la portée Prédite .....

## PARTIE EXPERIMENTALE

### Liste des figures

Figure N°45-a:	matériel utilisé pour une IA a sonde simple souple.....
Figure N°45-b :	matériel utilisé pour une IA a sonde simple souple.....
Figure N°46:	matériel utilisé pour une IA avec sonde de Foley .....
Figure N°47:	microscope optique binoculaire .....
Figure N°48:	Kit Ral 555(coloration MGG) .....
Figure N°49 :	Kit Diagnoestrus A et B (coloration HARRIS SHORR).....
Figure N°50 :	écouvillonnage vaginal (écartement des lèvres vulvaires).....
Figure N°51 :	écouvillonnage vaginal (introduction de l'écouvillon

crânio-dorsalement) .....	
Figure N°52 : appréciation de l'aspect de l'écouvillon (Écouvillon rosé).....	
Figure N°53: Technique d'étalement des cellules vaginales récoltées .....	
Figure N°54 : Fixation du frottis .....	
Figure N°55 : La coloration du frottis ( technique 555) .....	
Figure N°56 : frottis vaginal d'œstrus (ovulations) , un nombre important d'amas de cellules kératinisées ,IE>90%, par MGG .....	
Figure N°57 : Frottis vaginal avec fond sale, cellules kératinisées (CK) et grandes intermédiaires (GI), (x400) (fin proestrus début d'œstrus) (MGG555).....	
Figure N°58: frottis vaginal avec fond propre, cellules kératinisées(x400)..... (Fin proestrus début d'œstrus) (Coloration Harris Shorr). .....	
Figure N° 59 : cellules petites intermédiaires(PI) en amas avec présence de polynucléaires (PN) (milieu du metoestrus) coloration MGG (x100) .....	
Figure N°60 : amas de cellules petites intermédiaires (PI) avec présence de polynucléaires (PNN) (milieu du metoestrus) (x400).....	
Figure N°61 : Photos du male reproducteur (berger allemand de 3 ans).....	
Figure N°62: Stimulation du male avant la récolte par des Sécrétions vaginales .....	
Figure N°63: Début de récolte (émission de la 1ère phase) .....	
Figure N°64: Milieu de la récolte émission de la 2ème phase .....	
Figure N°65 : Fin de récolte récupération de la dernière phase.....	
Figure N°66 : Les trois phases d'éjaculat du chien.....	
Figure N°67 : Introduction de la chienne dans la salle de l'IA.....	
Figure N°68 : Tranquillisation de la chienne avant l'IA.....	
Figure N°69 : La mise en place du guide .....	
Figure N°70 : Introduction de la sonde simple (silicone).....	
Figure N°71 : Injection du sperme récolté .....	
Figure N°72 : Stimuler la contraction vaginale reflex de Ferguson.....	
Figure N°73 : La mise en place du guide et de la sonde à ballonnet.....	
Figure N°74 : Gonflement du ballonnet à l'aide d'une seringue.....	
Figure N°75 : Injection du sperme récolté .....	
Figure N°76 : Maintien d'une position inclinée pour faciliter le passage de la semence dans le vagin et éviter des reflus.....	
Figure N°77 : Stimulation la contraction vaginale reflex de Ferguson .....	
Figure N°78: Diagnostique de gestation par échographie 18 jours après IA .....	
Figure N°79: Photos échographique d'une ampoule de 20 mm après 18 jr de l'IA. ....	
Figure 80 : Photos échographique d'une ampoule de 35mm J35 .....	
Figure 81 : Photo de la troisième chienne .....	
Figure N°82 : Réalisation d'un écouvillonnage vaginal .....	
Figure N°83 : Photo du matériel échographique utilisé.....	



## Liste des tableaux

Tableau N°79 : Résumé de l'étude expérimentale .....

## LISTE DES ABREVIATIONS

Cm	: Centimètre
ECG	: Equine Gonadotropine Hormone
Echo	: Echographie
FSH	: Folliculo Stimulating Hormone
GB	: Globules rouge
GnRH	: Gonadotropine Releasing Hormone
HCG	: Human chorionic gonadotropine
IA	: Insémination artificielle
IE	: Indice éosinophilique
LH	: Luteostimulating Hormone
Mm	: Millimètre
ng/ml	: Nanogramme par millilitre
PMSG	: Pregnant mare serum gonadotropine
PN	: Polynucléaires
PRL	: Prolactine
UI/kg	: Unité par kilogramme
µg/kg	: Microgramme par kilogramme
Mm	: Micromètre

# Remerciements

Au terme de ce travail, on remercie **DIEU** tout puissant qui nous a donné la force et la volonté D'achever ce travail et on lui rend grâce.

On tient tout d'abord à adresser nos plus vifs remerciements à Monsieur **SLIMANI Khaled**, pour toute son aide. Nous sommes ravis d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique,

il a toujours été là pour nous soutenir et nous conseiller au cours de l'élaboration de ce travail, il nous a fait l'honneur d'être notre encadreur.

Il nous est impossible d'oublier d'exprimer notre gratitude pour **nos enseignants** qui ont participé à notre formation.

On tient à remercier particulièrement monsieur Belhamiti, monsieur Ayad , Monsieur Ait Amran et monsieur Hamoudi

On tient aussi à remercier l'équipe du service de la clinique des pathologies des carnivores :Khadidja, Fatiha et Zahira. A tous ceux et celles qui nous a aidés de près ou de loin dans la réalisation de ce mémoire.

Il nous sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses Personnes que nous avons pu mener cette thèse à son terme.

J'en oublie certainement encore et je m'en excuse.

# Dédicace

***A mes parents***

***A ma très chère maman***

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites.

***A mon chère Papa***

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

***A mes grandes parents : A ma grande mère et la mémoire de mon grand-père .***

***A mon frère BENOÛ et mes adorable sœurs : LIDA ,AMINA ,RAFIka*** pour tous nos moments de complicité passés et futurs.

***A ma fille bicha***

***A Mon binôme HAYET et mes amis***

***A tous ceux qui me sont chères.***

***A tous ceux qui m'aiment.***

***A tous ceux que j'aime.***

***A tous les membres de ma famille, petits et grands***

Nacéra



# Dédicace

## ***A mes parents***

### ***A ma très chère maman***

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites.

### ***A mon chère Papa***

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

***A mes grandes parents : A ma grande mère et la mémoire de mon grand-père.***

***A mes adorable sœurs : BOUDOR ;HOUDA ,pour tous nos moments de complicité passés et futurs.***

***A Mon binôme NACERA et mes amis***

***A tous ceux qui me sont chères.***

***A tous ceux qui m'aiment.***

***A tous ceux que j'aime.***

***A tous les membres de ma famille, petits et grands***



# Hayet



***Introduction***

## INTRODUCTION

L'insémination artificielle est une alternative de choix dans de nombreux cas la ou la reproduction naturelle d'une chienne s'avère impossible ; elle constitue donc un excellent outil pour la sélection génétique ainsi que l'amélioration des taux de fertilité et de prolificité chez l'espèce canine.

Cette technique de reproduction est réalisable avec de la semence fraîche, réfrigérée ou congelée. Si l'insémination en semence fraîche est la plus utilisée, celle réalisée en semence réfrigérée permet de s'affranchir de la barrière spatiale, et voire même temporelle en semence congelée.

Cependant, les clés de succès de l'insémination artificielle résident dans la détermination du moment optimal pour inséminer la chienne, mais aussi dans l'utilisation d'une semence de qualité, ainsi que dans la technique d'insémination en elle même. Le moment favorable pour inséminer une chienne ne peut convenablement être déterminé qu'à la suite d'un suivi attentif de ses chaleurs. Le cycle œstral de la chienne présente de grandes variations individuelles et raciales. C'est la raison pour laquelle les propriétaires des chiennes font appel aux vétérinaires, dont les moyens techniques sont de plus en plus performants, afin de déterminer le moment où il est préférable de faire saillir ou inséminer leurs chiennes.

Notre étude a pour bute d'étudier l'insémination artificielle en semence fraîche, tout en débutant par un rappel anatomique du tractus génital féminin et les caractéristiques du cycle œstral de la chienne, puis on abordant les différents moyens permettant de déterminer le moment propice au dépôt de la semence. En suite les techniques d'insémination artificielle et le diagnostic de gestation. Et dans la dernière partie nous présenterons les résultats de notre étude.



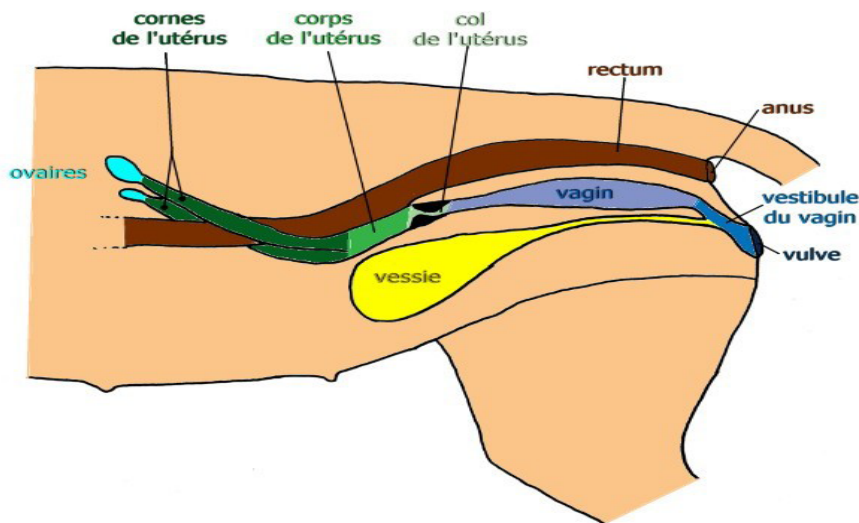
***Chapitre I :***

***Rappels anatomiques et physiologiques de  
l'appareil reproducteur de la chienne***



## 1- Rappels anatomiques de l'appareil génital de la chienne

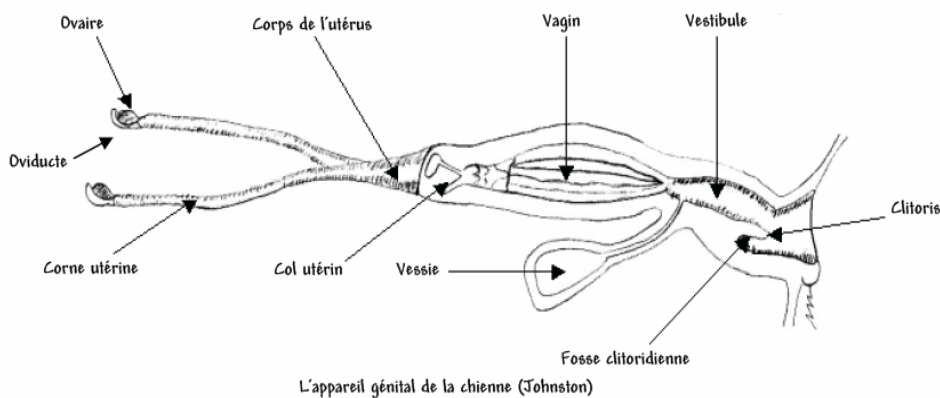
La chienne a un appareil génital localisé en région pelvienne, mais également très largement, dans la cavité abdominale puisque les ovaires ne se déplacent pas caudalement dans cette espèce et restent positionnés en regard du pôle caudal des reins. La disposition de cet appareil génital présente quelques particularités anatomiques que le praticien devra connaître afin d'appréhender sans problème une insémination artificielle



**Figure N° 01:** Schéma de l'appareil génital de la chienne.

### A) Les organes génitaux de la chienne

Les organes génitaux de la chienne comprennent dans l'ordre : les ovaires, les oviductes, l'utérus, le vagin, le clitoris et la vulve.



**Figure N°02 :** Anatomies du tractus génital de la chienne (Johnston)



**a) Les ovaires :** sont situés en arrière des reins. Ce sont deux GONADES d'environ 1,5cm de Long (chez une chienne de taille moyenne) qui produisent les OVOCYTES au cours d'un Processus appelé ovogenèse et des hormones sexuelles femelles.

Les hormones produites sont la PROGESTERONE et les œstrogènes. Elles jouent un rôle Primordial dans les modifications physiques et comportementales liées au cycle sexuel

Le maintien de la gestation et le déclenchement de la mise bas.

**b) Les trompes utérines :** correspondent à l'extrémité des cornes de l'utérus Elles ont une forme d'entonnoir qui s'ouvre vers les ovaires. Elles recueillent les ovocytes libérés par les ovaires au moment de l'OVULATION. C'est dans les trompes que se déroule la FECONDATION.

**c) L'utérus :** de la chienne de type bipartite a une forme en Y avec un pied court et de très longues branches.

Le pied du Y correspond au corps de l'utérus alors que les branches du Y représentent les cornes dans lesquelles se développeront les fœtus. Chez une chienne de taille moyenne

La longueur de l'utérus est environ de 18 cm (une quinzaine pour les cornes et 3 à 4 pour le corps). La paroi de ces cornes a une structure particulière composée de deux couches principales : l'ENDOMETRE et le MYOMETRE.

L'utérus communique avec le vagin par le col de l'utérus.

#### **d) Le colutérin**

Le col utérin est la partie la plus caudale de l'utérus. Il constitue une barrière protectrice Contre l'entrée de micro-organismes dans l'utérus. Ce col est ouvert pendant l'œstrus et lors De la mise-bas et fermé pendant le Metoestrus et l'Anoestrus. Il a une longueur de 0,5 à 2 cm.

Le col est dirigé obliquement et ventro-caudalement du vagin vers l'utérus Une courte partie du col d'un diamètre d'environ 0,8 cm peut pénétrer dans le vagin, entourée du fornix vaginal.

Le fornix, est un cul-de-sac annulaire qui circonscrit la partie vaginale du col utérin. Il est plus profond ventralement (3cm) que dorsalement. Le fornix est interrompu par un pli muqueux dorsalement. Ce repli muqueux dorsal rend difficile l'introduction d'une canule dans l'utérus. Son rôle n'est pas connu mais on le suspecte fortement d'avoir une fonction dans l'accouplement. (CHRISTENSEN GC, 1993, McENTEE K, 1990)

#### **e)Le vagin**

Le vagin est un conduit impair et médian. C'est un canal musculo-membraneux qui s'étend Du col utérin au vestibule, la limite caudale du vagin se situant crânialement à l'ouverture Urétrale. L'hymen n'est normalement pas présent à la jonction vagino-vestibulaire chez L'adulte, mais un vestige peut être présent chez certaines femelles. Il est formé de plis

Transversaux incomplets, surtout marqués sur la paroi ventrale, qui délimitent l'ostium Vaginal.

Le vagin mesure 12 à 15 cm chez une chienne de taille moyenne. Il est assez long chez les Chiennes en comparaison avec les autres espèces. Cette longueur rend difficile l'examen du Vagin dans son intégralité sans un matériel particulier comme un endoscope et même Impossible par une simple palpation ou en utilisant un otoscope classique. Cela implique Également la nécessité de réaliser une épisiotomie lors d'une chirurgie concernant la partie crâniale du vagin.

**Histologiquement** : La paroi vaginale est constituée de trois couches : une muqueuse, une musculuse et une séreuse (ou adventice).

**- La muqueuse** : est un épithélium stratifié squameux et non glandulaire qui répond aux stimulations des hormones gonadiques. Des replis rugueux longitudinaux de la muqueuse vaginale permettent une augmentation de son diamètre pendant le proestrus, l'œstrus, la gestation et la mise-bas.

Le vagin est ainsi extensible autant en longueur qu'en largeur lors de l'œstrus, de la gestation ou de la parturition.

**- La musculuse** : consiste en une fine couche de fibres musculaires lisses circulaires et une fine couche de fibres musculaires lisses longitudinales située plus extérieurement.

**- La séreuse** : contient du tissu conjonctif, des vaisseaux et des nerfs.

Le sang est acheminé au vagin par l'artère vaginale qui provient de l'artère urogénitale.

(BURKE TJ, REYNOLDS HA. 1981, JONES DE, JOSHUA JO. 1988, PURSWELL BJ. 2000, SODERBERG SF.1986)

#### **f) Le sinus uro-génital**

La zone du sinus uro-génital correspond à la partie commune aux appareils génital et urinaire.

On distingue deux segments différents par la topographie et par la structure :

Le vestibule du vagin qui est la partie profonde qui conduit au vagin et la vulve avec le clitoris qui est la partie qui s'ouvre sur l'extérieur

##### **f.1. Le vestibule**

Le vestibule du vagin est un conduit impair plus large que long. A son extrémité crâniale, On trouve l'ostium vaginal et l'ostium externe de l'urètre. Un rétrécissement de la lumière Identifiable par palpation vaginale correspond à la jonction vagino-vestibulaire. L'orifice ou ostium urétral se situe sur le plancher ventral du vestibule à environ 0,5 cm de la jonction vagino-vestibulaire, juste caudalement à l'hymen. Cet orifice est large de 2 cm et il

est très dilatable. Il est protégé par le tubercule urétral, une crête muqueuse transversale située sur le plancher ventral du vestibule. Ce tubercule est large crânialement et son apex très étroit caudalement se termine environ à mi-chemin entre l'orifice urétral et le clitoris. De chaque côté de ce tubercule, on trouve une dépression en gouttière dans laquelle s'ouvrent les orifices excréteurs de nombreuses glandes vestibulaires.

La taille du vestibule varie en fonction de la taille de la chienne et du fait qu'elle soit gestante ou non. Pour une chienne adulte de 11 kg, nullipare, la distance entre l'orifice urétral externe et la commissure ventrale de la vulve est de 5 cm environ et le diamètre de la jonction vagino-vestibulaire est de 1,5 à 2 cm.

Caudalement, le vestibule communique avec l'extérieur par la fente de la vulve. Il est fortement coudé de la jonction vagino-vestibulaire jusqu'à la vulve comme nous pouvons l'observer sur la figure 2. La conséquence de cette courbure est qu'il faudra se diriger dorsalement dans un premier temps lors de l'examen au spéculum.

Le vestibule est entouré d'un muscle appelé muscle constricteur du vestibule ; Ce muscle puissant et épais entoure l'urètre, le vestibule et la portion caudale du vagin. La muqueuse est lisse et de couleur rose jaunâtre. Elle est riche en nodules lymphatiques translucides. (McENTEE K, 1990, PURSWELL BJ. 2000 , CHRISTENSEN GC, 1993)

### **f.2. La vulve**

La vulve est la partie de l'appareil génital femelle visible de l'extérieur. Elle est constituée de deux lèvres délimitant la fente vulvaire. Les deux lèvres de la vulve qui sont en partie homologues au scrotum du mâle sont molles et déformables puisqu'elles sont constituées d'un tissu conjonctif élastique et fibreux, de fibres musculaires lisses et de graisse en abondance. Ces deux lèvres se raccordent par deux commissures. La commissure dorsale de la vulve est surmontée, voire parfois recouverte, d'un pli cutané transversal. La distance entre la Commissure dorsale de la vulve et l'anus chez une chienne adulte d'environ 11 kg est de 8 à 9 cm. La commissure ventrale qui abrite le clitoris forme une pointe qui se dirige vers le bas et vers l'arrière de l'animal et sur laquelle on trouve souvent une touffe de poils. (CHRISTENSEN GC , 1993, SODERBERG SF, 1986. WYKES PM, 1986)

### **f.3. Le clitoris**

Le clitoris est l'homologue du pénis du mâle. Il se compose d'une paire de muscles, d'un corps et d'un gland. Les muscles et le corps sont semblables aux corps caverneux péniens et le gland du clitoris est comparable au gland du pénis bien qu'il ne soit pas en deux parties. Le corps du clitoris se compose de graisse et de tissu érectile. Il est recouvert par une albuginée.

La principale différence entre le clitoris et le pénis du mâle vient du fait que chez la femelle, l'orifice urétral ne fait pas partie du clitoris alors que chez le mâle, l'urètre est incorporé au pénis.

Le plus souvent, le clitoris ne présente pas de structures osseuses même si un os clitoridien est parfois présent en situation physiologique. Le gland du clitoris est très petit. Chez une chienne adulte de 11kg, il mesure environ 0,6cm de long et 0,2 cm de diamètre. Il a une structure érectile. Il se projette dans la fosse clitoridienne, qui est profonde. L'ouverture de la fosse fait environ 1 cm de diamètre. Cette fosse ne doit pas être confondue avec le méat urinaire. (McENTEE K, 1990, CHRISTENSEN GC, 1993, SODERBERG SF1986, BANKS WJ.1993, WYKES PM, 1986)

### **g) Les mamelles**

Ne font pas partie de l'appareil génital à proprement parler mais jouent un rôle dans la fonction de reproduction.

mamelles en plus ou en moins, cela n'a aucune conséquence et ne compromet pas une lactation future. Il faut cependant veiller à ne pas confondre une mamelle surnuméraire avec un KYSTE ou une tumeur ; en cas de doute ne pas hésiter à consulter son vétérinaire.

La taille des mamelles varie avec l'âge, le nombre de portées, l'état d'embonpoint de la chienne. En dehors des périodes de lactation, leur emplacement est presque uniquement marqué par la présence des PAPILLES (ou tétines). Elles deviennent plus volumineuses pendant la lactation.

### **B) Les moyens de fixité**

Chaque corne est soutenue dans la cavité abdominale par le mesometrium, et les oviductes par le mesosalpynx. Le ligament large de l'ovaire présente une extension ronde, qui va fixer l'utérus par son bord latéral juste à côté de l'anneau inguinal. Latérale, ou ligament

**C) Vaisseaux des organes génitaux femelles :** ces organes sont essentiellement irrigués et drainés par les artères et veines ovariennes, utérines, vaginales et honteuses internes.

Les artères ovariennes quittent l'aorte abdominale environ à mi-distance entre les artères rénales et circonflexes iliaques profondes. Chaque artère se divise dans le mésovarium en plusieurs branches plus ou moins flexueuses pour vasculariser l'ovaire, l'oviducte et les structures adjacentes. Elle irrigue en outre la région crâniale de la corne utérine correspondante grâce à une branche utérine qui s'anastomose avec l'artère utérine issue de l'artère vaginale, elle-même branche de l'artère honteuse interne.

Les deux artères honteuses internes vascularisent le vagin et le vestibule. À sa sortie de la cavité pelvienne, chaque artère irrigue la région du périnée jusqu'à la vulve et se termine par l'artère du clitoris. Les lèvres de la vulve ainsi que la région ventrale du périnée sont aussi vascularisées par des ramifications des deux artères honteuses externes, branches des troncs pudendo-épigastriques.

**D) Nerfs des organes génitaux femelles :** L'innervation des ovaires est surtout sympathique. Les oviductes, l'utérus, le vagin et le vestibule reçoivent une innervation sympathique et parasympathique par les plexus pelviens. Des fibres viscérales afférentes atteignent également le tractus génital femelle. Les innervations viscérales afférente et efférente de la vulve et du clitoris proviennent des plexus pelviens et des nerfs honteux. Le nerf génito-fémoral atteint les lèvres de la vulve. Les nerfs honteux fournissent également l'innervation efférente au muscle urétral et au muscle vestibulaire et constricteur de la vulve.

## **2 Rappels sur la physiologiques du cycle sexuel de la chienne**

### **❖ A) la puberté**

La puberté correspond au début de l'activité sexuelle et la mise en place de la cyclicité ; dont les premières chaleurs apparaissent lorsque la femelle atteint environ les deux tiers de son poids adulte (Fontbonne et al. 2000) ; C'est-à-dire dès le 5<sup>ème</sup> mois pour les races naines et petites et plus tardivement pour les races de grand gabarit (jusqu'à 24 mois pour les races géantes et molossoïdes) (FELDMAN EC, NELSON RW. 2003, MILLION CM. 2004)

Les conditions d'environnement et certains éléments iatrogènes peuvent considérablement perturber la survenue de la Puberté (ARTHUR G.H., NOAKES D.E., PEARSON H. *et al*1996) : l'emploi abusif de traitements antimycosiques en élevage, ou de tout type de stéroïde (Corticoïdes ou anabolisants) par exemple

L'aspect des premières chaleurs est parfois modifié, sans que cela corresponde à une maladie Particulière. Ainsi, les premières chaleurs peuvent passer inaperçues auprès du propriétaire car Les manifestations cliniques restent parfois frustes, les saignements vulvaires étant très réduits et la vulve peu dilatée. Ces chaleurs dites silencieuses font donc croire à tort au propriétaire à un retard de puberté (Fontbonne et al. 2000) Par ailleurs, les premières chaleurs peuvent correspondre à des chaleurs « Blanches», ou faux œstrus, avec développement vulvaire et pertes de courte durée, mais sans ovulation. Une ou plusieurs périodes de chaleurs peuvent alors s'enchaîner à deux ou trois reprises à intervalles Rapprochés d'une semaine à deux mois. On parle alors de chaleurs disjointes« split-heats»

(CONCANNON PW, NOAKES DE, PARKINSON TJ, ENGLAND GC , 2001)

Ces manifestations particulières n'ont cependant aucun impact sur la fertilité future des chiennes concernées.

### **❖ B) Les données générales du cycle œstral de la chienne**

Le cycle sexuel de la chienne est qualifié de mono oestrien, c'est-à-dire qu'il n'y a qu'une seule période d'acceptation du mâle par cycle, et il est à ovulation spontanée, (l'ovulation ne peut pas être déclenchée par l'accouplement) (GRANDJEAN D., HAYMANN F. 2003)

La chienne ovule une à deux fois par an, à intervalle compris entre 5 et 12 mois, même si la majorité des chiennes a un interoestrus compris entre 5 et 7 mois (CONCANNON P.W., McCANN J.P., TEMPLE M. 1989).

Le déroulement du cycle sexuel est sous contrôle hormonal, lequel fait intervenir l'hypothalamus, l'antéhypophyse et les gonades.

L'hypothalamus contrôle la libération des gonadotrophines par l'antéhypophyse, par l'intermédiaire de substances spécifiques Stimulatrices et inhibitrices. Ainsi l'hormone GnRH stimule la libération à la fois de FSH et de LH (SILIART B., MONTARDE M.P., LEBRETON A1992).

Le cycle sexuel de la chienne est décomposé en quatre phases déterminées par la physiologie ovarienne, chacune caractérisée par leurs particularités anatomiques, cliniques et comportementales qui sont :

Le pro-estrus, estrus, Metoestrus et Anoestrus

### **❖ C) particularités du cycle**

1- Cycle mono-oestrien : Une seule période de chaleurs par cycle

2- Durée très variables des différentes phases du cycle

3- Ovulation spontanée

4- Lutéinisation pré-ovulatoire : La sécrétion de progestérone débute avant l'ovulation La progestéronémie est le témoin de l'ovulation

5- Ovulation d'ovocytes immatures

6- Gestation courte : 61 à 63 jours après l'ovulation ou 65 jours après le pic de LH 57 à 70 jours après la saillie

7- Phase lutéale très longue

8- Luteolyse progressive

9- Cycle similaire avec ou sans gestation : La phase lutéale de la chienne gestante comme celle de la chienne non gestante dure environ 2 mois et les profils hormonaux observés durant la gestation ne sont pas réellement différents de ceux observés durant la non gestation. Les différences notoires sont une augmentation de la prolactine et de la relaxine à partir du 22<sup>ème</sup> jour, non observée durant le dioestrus non gestant.

10- Anoestrus non saisonnier

11- Intervalle long et variable entre les cycles : D'une durée variable en fonction des chiennes, généralement d'une durée de 6 à 7 mois, Mais pouvant aller de 4 à 12 mois (CONCANNON, 2010).

#### ❖ **D) la chronologie du cycle**

##### **D\_1) Le pro-œstrus :**

Le pro-œstrus correspond à la première phase du cycle et au début des chaleurs.

**Sur le plan comportemental :** la chienne attire le mâle par l'odeur de l'urine et les phéromones contenues dans les sécrétions vaginales (CONCANNON P.W., Mc CANN J.P., TEMPLE M 1989), Durant cette phase, la chienne refuse la saillie. La durée moyenne du pro-œstrus est de 10 jours en moyenne (DUMON 1992), avec des variations selon les races 5 à 15 jours (GUERIN et FONTBONNE), 5 à plus de 20 jours (FONTBONNE).

Pour certaines chiennes, le premier pro-œstrus peut être long (plus de trois semaines), et peut alors faire soupçonner une insuffisance de stimulation hypophysaire nécessaire à la maturation folliculaire (ALLEN W.E 1992).

**Sur le plan histologique :** le pro-œstrus correspond à la phase de maturation folliculaire. Les follicules ovariens passent de 1 à 4 mm et libèrent des hormones, dont des œstrogènes. L'utérus est congestionné, sa muqueuse est épaissie et très vascularisée. La muqueuse vaginale est rouge, oedématisée et présente des plis profonds et arrondis (CATHENOZ L. et MARSAN C 1996).

**Sur le plan génital :** le pro-œstrus se distingue par un gonflement œdémateux de la vulve et des pertes sanguines d'origine utérine abondantes et fluides, qui s'écoulent à la

commissure Inférieure de la vulve (FONTBONNE A 1996). Mais qui peuvent être absentes chez certaines chiennes rendant difficile l'observation du pro-œstrus.

Cet écoulement sanguin est la conséquence d'une diapédèse des érythrocytes à travers l'endomètre (CONCANNON 1989).

Le comportement de pro-œstrus est le résultat de l'augmentation de la concentration sanguine en œstrogènes sécrétés par les cellules de la granulosa des follicules en croissance (CONCANNON P.W., Mc CANN J.P., TEMPLE M 1989).

Cette phase de pro-œstrus se termine par un pic de sécrétion d'œstradiol qui se produit environ 12 à 24 heures avant le pic d'hormone ovulante LH d'origine hypophysaire.

### **D\_2) L'œstrus**

L'œstrus correspond à la période d'acceptation du mâle. L'acceptation du mâle par la femelle se traduit par l'apparition du réflexe d'Amantéa : l'attouchement de la région provoque l'extension du tronc, le relèvement de la croupe, la déviation latérale de la queue, l'élévation et l'ouverture de la vulve. Ce comportement lors de l'œstrus est lié à la chute du taux d'œstrogènes plasmatique et à l'augmentation de la concentration en progestérone dans le sang. Cependant, l'observation de ce signe est très inconstante, puisque certaines chiennes dominantes refusent systématiquement tout accouplement durant leurs chaleurs. (GUERIN C. 1998)

La durée moyenne de l'œstrus est de sept jours environ, 3 à 8 jours (GUERIN et FONTBONNE 1997), 3 à 30 jours (FONTBONNE A 1996), 3 à 10 jours (DUMON 1992).

C'est au cours de l'œstrus que l'ovulation se produit. Celle-ci est spontanée et survient 2-3 jours après le début de l'acceptation du mâle par la femelle, soit 48 heures après le pic de LH (GUERIN et FONTBONNE 1997). L'ovulation est toujours complète en 24 heures maximum, et peut même durer moins de 12 heures chez certaines chiennes ; l'ovulation est concomitante sur les deux ovaires.

Lors de l'ovulation, les ovules libérés sont immatures (ovocytes en prophase I de méiose, stade vésicule germinative), ce qui en fait une des grandes particularités de la chienne par rapport aux autres mammifères. Ces ovocytes immatures ne sont pas fécondables *in vivo*,

Ainsi la chienne ne devient fécondable au minimum que 2 jours après l'ovulation, soit 4 jours après la décharge de LH. La période de fécondation se situe donc dans la deuxième moitié de l'œstrus.



**D'un point de vue histologique** : l'endomètre utérin se développe et se prépare à la nidation. La muqueuse vaginale est pâle, avec des plis profonds, anguleux et serrés (crénulation maximale), dont la surface est desséchée.

**Sur le plan génital** : la dilatation et l'œdème vulvaire sont au maximum. Dans la plupart des cas, les écoulements vulvaires s'éclaircissent pour devenir muqueux puis se tarir par la suite. Mais chez certaines chiennes, les pertes sanguines persistent pendant toute la durée des chaleurs.

### **D\_3) Le Metroestrus ou dioestrus**

Cette période, appelée phase lutéale, regroupe la fin de la mise en route du corps jaune (Metroestrus) et la phase d'état de celui-ci (dioestrus), les deux étant le plus souvent confondues chez la chienne (FONTBONNE A., BUFF S., GARNIER F2000)

Le début du Metroestrus peut se définir par le premier refus du mâle par la femelle. L'ardeur sexuelle disparaît, la chienne est plus calme. Elle présente parfois un appétit augmenté.

Par ailleurs, lorsque la femelle est non gestante, on observe parfois une pseudo-gestation comportementale lors du Metroestrus : après un délai de 3 semaines à 1 mois, on observe un élargissement du ventre en arrière des côtes, et parfois un durcissement et une turgescence des tétines (BARTOLO A 2004)

La phase de Metroestrus dure environ deux mois : 60-65 jours (GUERIN et FONTBONNE, 1997). et jusqu'à 110-140 jours. (CATHENOZ L. et MARSAN C1996)

Une autre particularité propre à l'espèce canine est à signaler : chez la chienne non gestante, le corps jaune reste fonctionnel puisque, malgré de très légères différences, la courbe de sécrétion de la progestérone en dioestrus chez la chienne non gestante est similaire à celle de la chienne gestante, et se prolonge même un peu plus longtemps. (FONTBONNE A., BUFF S., GARNIER F 2000)

**Du point de vue de l'histologie** : du tractus génital, la sécrétion de progestérone par le corps jaune détermine une augmentation de taille de l'utérus, ainsi que la multiplication et la croissance des glandes de l'endomètre qui sécrètent du mucus en grande quantité. A cette phase de prolifération et de sécrétion de l'endomètre va succéder la desquamation puis la restauration de la paroi utérine. (CATHENOZ L et MARSAN C1996)

La progestérone provoque également une diminution de la fréquence et de l'amplitude des contractions de l'utérus, ce qui permet l'implantation des embryons suivie de la gestation.

Durant le Metoestrus, le vagin est rose, sa surface est humide et il présente des plis séparés et peu profonds.

**D'un point de vue génital :** le gonflement vulvaire diminue et les pertes vulvaires disparaissent ; parfois on observe une courte période de 4-5 jours avec réapparition de pertes sanguines foncées, glaireuses, filantes et nauséabondes, mais ce cas de figure est rare (FONTBONNE A 1996)

#### **D\_4) L'Anoestrus**

C'est la phase de repos sexuel. La femelle est calme et ne présente aucun comportement sexuel.

La durée moyenne de l'Anoestrus est de 4-5 mois, mais elle peut varier de 2 à 10 mois sans cause ni conséquence pathologique. (DUMON 1992)

La régularité de l'Anoestrus est très importante car elle optimise la fonction de reproduction, ainsi les chiennes dont la fréquence des chaleurs est irrégulière souffrent plus souvent de troubles de la reproduction. En outre, l'involution utérine dure deux mois environ. Des chaleurs trop rapprochées sont donc moins favorables à une bonne reproduction.( BARTOLO A 2004)

Au repos sexuel, la vulve est petite, non dilatée. Les écoulements vulvaires se sont taris. Le repos ovarien apparent est suivi d'une phase d'involution puis de repos utérin.

Cependant, des données récentes montrent que la phase d'Anoestrus n'est pas silencieuse au niveau endocrine. On a ainsi pu décrire une lente mais constante augmentation du taux plasmatique de FSH tout au long de l'Anoestrus, de même une lente mais constante baisse en prolactine avec des valeurs basales observées seulement quelques jours avant le pro-œstrus suivant. Enfin, on observe une hausse de la fréquence et de l'amplitude des décharges de LH environ 3 à 4 semaines avant l'œstrus suivant. De plus, au cours de l'Anoestrus, les ovaires continueraient à produire de la progestérone en très faible quantité. (ONCLIN et VERSTEGEN 2004),

La production de progestérone endogène par le corps jaune est responsable directement (au niveau des ovaires, en inhibant le développement folliculaire) ou indirectement (au niveau du système nerveux central, par un rétrocontrôle négatif) de l'Anoestrus prolongé observé chez la chienne. Il propose une théorie : la progestérone serait le facteur inhibiteur qui régule la durée de l'Anoestrus chez la chienne, empêchant des vagues folliculaires spontanées de se développer. La diminution de la progestéronémie serait la

conséquence de la baisse de la prolactine, facteur lutéotrope majeur de la fin de vie du corps jaune.

### **L'interoestrus.**

L'interoestrus n'est pas une phase du cycle à proprement parler, puisqu'il regroupe les phases de Metoestrus et d'Anoestrus. Il correspond simplement à l'intervalle entre deux périodes d'œstrus successives. L'interoestrus dure en moyenne 5 à 7 mois, avec un intervalle de 26 à 36 semaines (ARTHUR G.H., NOAKES D.E., PEARSON H 1996). Lors de gestation, cette durée est augmentée de trois semaines environ {29 semaines en moyenne pour les chiennes non gravides, contre 32 semaines en moyenne pour les chiennes gravides (CHRISTIE D.W., BELL E.T 1971)}.

Un interoestrus de durée inférieure à 3 mois ou supérieure à 12 mois est considéré comme anormal.(ALLEN W.E 1992), un interoestrus de durée inférieure à 4 mois suppose que l'ovulation n'a pas lieu ou que la phase lutéale est courte.( JOHNSTON *et al.* 2001), Un interoestrus de moins de 4 mois entraîne de gros échecs de fertilité, sans doute parce que l'endomètre n'a pas le temps de se régénérer entre deux phases de chaleurs successives. Inversement, un interoestrus trop long peut être normal et en rapport avec un trouble saisonnier.

## **❖ E) Endocrinologie du cycle**

Le cycle sexuel est sous contrôle hormonal. Cette régulation fait intervenir le système nerveux central, l'antéhypophyse et les gonades.

### **1) Présentation des différentes hormones**

#### **🚦 1\_a) Les hormones hypothalamo-hypophysaires**

##### **A) Les hormones hypothalamiques :**

**La GnRH** (*Gonadotropin Releasing Hormone*). Une hormone hypothalamique, décapeptide de faible poids moléculaire,

Elle est synthétisée dans le noyau arqué de l'hypothalamus dans sa partie médio-basale antérieure et libérée par exocytose au niveau de l'imminence médiane, dans le système vasculaire porte liant l'hypothalamus aux cellules hypophysaires la synthèse de la GnRH se fait d'une façon pulsatile( ce qui explique sa libération intense mais brève dans le sang )

toutes les 20 à 30 secondes en lien avec l'existence de ce système porte et de la faible demi-vie de cette molécule.

Celle-ci est par ailleurs identique chez beaucoup de mammifères notamment la chienne et la femme ; Elle agit sur les récepteurs à GnRH des cellules sécrétrices des gonadotrophines LH et FSH (JOHNSON CA, 2003, DUHAUTOIS B2003, CONCANNON PW1989)

### **B) Les hormones hypophysaires**

**La FSH** (*Folliculo Stimulating Hormone*). Il s'agit d'une glycoprotéine formée de deux chaînes. Elle est produite dans la pars distalis de l'antéhypophyse par les cellules basophiles (Fontaine 1998).

Elle est responsable de la croissance folliculaire jusqu'au stade de follicules mûrs et pré-ovulatoires (Le François et Tiret 2000).

Elle induit la sécrétion d'œstrogènes par la thèque interne des follicules.

**La LH** (*Luteinizing Hormone*). Active la maturation des follicules, provoque l'ovulation et la formation du corps jaune sur un ovaire préalablement sensibilisé par la FSH. De plus, elle stimule la synthèse des stéroïdes par toutes les cellules ovariennes. Elle présente les mêmes caractéristiques biochimiques que la FSH et est produite dans la même zone de l'hypophyse (Fontaine 1998). Elle provoque la rupture folliculaire et la lutéinisation (Le François et Tiret 2000).

**La Prolactine.** Secrétée par l'hypophyse antérieure, sa synthèse et sa sécrétion sont régulées par des neuromédiateurs : la TRH (thyroïdolibérine) favorise la sécrétion, la dopamine l'inhibe (Rotten D1991). Il existe aussi des régulations d'origine ovarienne.

Elle a une activité lutéotrophique mise en évidence par un syndrome de suppression par des agonistes de la dopamine, intervient dans la production de lait. Sa concentration augmente régulièrement après 35 jours de gestation, de 5 à 25 ng/ml (De Coster R., Beckers J., Beerens D., de Mey J1983, Hoffmann B., Höveler R., Nohr B., Hasan S.H1994)

pour continuer à augmenter pendant les 30 premiers jours de lactation. Des variations similaires, mais inférieures en quantités, existent chez la chienne non gravide.

Elle est synthétisée dans les cellules acidophiles de la *pars distalis* de l'antéhypophyse. Il s'agit d'une simple chaîne peptidique de 21 acides aminés. Son action majeure concerne la

mamelle et la lactation. Cependant elle interagit avec les hormones gonadotropes. Sa concentration est fluctuante mais basse lors de l'Anoestrus, du proestrus et de l'œstrus. Pendant le Metoestrus, sa concentration augmente progressivement à l'inverse de celle de la progestérone. Cette valeur est toutefois plus importante chez les chiennes gestantes ou pseudo-gestantes. Puis on observe un pic 1 à 2 jours avant le part .

### **La Thyroxine et le cortisol**

Leurs taux restent pratiquement inchangés pendant la gestation, mais les réponses aux tests de stimulation (par TSH, ACTH) ne sont pas les mêmes.

Il est courant d'observer une augmentation du cortisol à l'approche du part (40 à 80 ng/ml), reflet possible de l'augmentation de la sécrétion fœtale (Concannon P.W., Mc Cann J.P., Temple M, 1989, Lennoz-Roland M 2000). On constate aussi souvent une diminution de sensibilité à l'insuline, pouvant conduire à un état pré-diabétique.

### **✚ 1\_b) Les hormones ovariennes**

#### **Les œstrogènes**

Le terme d'œstrogène provient de ce que ces substances induisent l'œstrus. Ils sont sécrétés par la thèque interne des follicules.

Les œstrogènes provoquent la congestion, l'œdème de la vulve et du vagin ainsi que l'hyperplasie de l'utérus. Ils augmentent la contractilité utérine et favorisent l'ouverture du col utérin. Ils sont également responsables de la croissance de l'épithélium vaginal, accompagnée d'une kératinisation et d'une desquamation des cellules de la couche épithéliale superficielle. Les œstrogènes exercent aussi une activité de maturation sur les follicules et permettent l'hyperplasie et la différenciation des cellules du tractus génital. Au niveau cellulaire, leur action est centrée sur la réplication de l'ADN, et plus généralement sur la multiplication cellulaire. (DUHAUTOIS B, 2003 ; CONCANNON PW, 1989)

#### **La progestérone**

La progestérone est sécrétée principalement par le corps jaune et en plus faible quantité par les follicules ovariens. Elle est impliquée dans l'ovulation. Elle règle l'activité protéolytique et pourrait favoriser la rupture folliculaire. Elle est aussi nécessaire pour la lutéinisation des cellules de la granulosa. Elle assure en outre la formation de replis de l'endomètre et le prépare de ce fait à la nidation. Elle inhibe la motricité utérine et maintient le col fermé.

Enfin, elle entraîne une mucification vaginale. La progestérone permet aussi l'involution vaginale. Elle a une action inhibitrice sur la sécrétion de la GnRH et sur la décharge ovulante de LH. (JOHNSON CA, 2003 ; DUHAUTOIS B, 2003 ; CONCANNON PW, 1989)

### **Les androgènes**

Les cellules de la thèque interne, sous l'influence de la LH, produisent deux androgènes : l'androsténédione et la testostérone.

La testostéronémie augmente au début du proestrus. La valeur maximale (0,3 à 1 ng/ml) est atteinte juste après le pic d'œstradiol et coïncide avec le pic de LH (Concannon et Castratane 1985, Johnston et al. 2001a). Cette valeur est identique à celle trouvée chez les mâles non castrés. Puis, la concentration diminue et reste en deçà de 0.2 ng/ml pendant toute la phase lutéale (Olson et al. 1984a et b, Concannon et al, 1989, Concannon et Castratane 1985, Johnston et al. 2001).

La concentration sérique en androsténédione augmente pendant le proestrus. De même que pour la testostérone, la valeur maximale (0,6 à 2,3 ng/ml) est atteinte au pic de LH. Puis, que l'animal ait été fécondé ou pas, la concentration reste élevée pendant la phase lutéale et diminue brutalement lors du pare (Concannon et Castratane 1985, Concannon et al. 1989).

Le pic d'androgènes est lié à l'amplification de la stéroïdogénèse entraînant le pic d'estrogènes. Cependant on ne sait pas si ces molécules jouent un rôle dans les modifications lors du cycle telles que le comportement œstral, ou la prolifération des tissus cibles. (Olson et al. 1984 a et b). Une publication récente indique que les récepteurs aux androgènes sont présents en très faible quantité dans la paroi utérine et que leur quantité ne varie pas au cours du cycle. Le rôle de ces hormones serait minime (Vermeirsch et al. 2002).

### **Les Prostaglandines**

Elles interviennent dans les mécanismes d'hémostase et d'érythropoïèse, les réactions inflammatoires et immunitaires, et ont une action sur la musculature lisse, la filtration rénale, les sécrétions gastro-intestinales.

Elles sont produites dans tous les tissus, où elles possèdent des effets différents selon leur type et leur tissu-cible. Pour l'appareil génital femelle, les prostaglandines (PG) du groupe E et la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  sont prépondérantes. Dans l'ovaire, elles sont sécrétées par la granulosa et la thèque interne des follicules, sous l'influence des FSH et LH. Dans l'endomètre, leur production est

contrôlée par le rapport œstrogènes/progestérone (Hoffmann B., Höveler R., Nohr B., Hasan S.H 1994).

Elles influencent la croissance folliculaire (PGE), l'ovulation (PGF2 $\alpha$  et PGE), la croissance, l'activité (PGE), la lyse du corps jaune (PGF2 $\alpha$ ) (Donnay I., Verstegen J., Touati K., Ectors F. 1988).

### **La Relaxine**

Elle est indispensable au maintien de la gestation. Elle inhibe les contractions du myomètre, favorise la croissance utérine, prépare la parturition : augmente l'élasticité de la ceinture pelvienne, accroît la dilatation du col.

Les ovaires et le placenta sont à l'origine de sa sécrétion.

Elle est non détectable, pendant l'Anoestrus et chez les chiennes non gravides. Son dosage devient possible à partir du 20e jour de gestation environ, le taux augmente jusqu'au 40<sup>e</sup> à 50<sup>e</sup> jour (5 ng/ml), puis diminue jusqu'à la parturition (Steinetz B.G., Goldsmith L.T., Lust G1987). Il existe des tests rapides de diagnostic sérologique.

## **2) Les Variations hormonales durant le cycle**

### **a) L'Anoestrus**

Les concentrations d'œstradiol sont basales pendant l'Anoestrus. 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'Anoestrus.

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,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 nouveaux 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 (Goodman M, 2001), entre 30 et 70 pg/ml. (Fontbonne A, Buff S, Garnier F, 2000). Cette augmentation se fait sur une période de 10 à 14 jours. (Goodman M, 2001) Le pic a lieu 2 à 3 jours avant le début de l'œstrus. (Goodman M, 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 PW, 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, Onclin K 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, Buff S, Garnier F, 2000) Cette augmentation rapide de la concentration de progestérone ne peut être dissociée chronologiquement de l'augmentation du taux de LH. (Concannon PW, 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 endocrinologiques alors que l'œstrus comportemental apparaît en moyenne à J1 avec des variations pouvant aller de J-3 à J+4 du cycle. (Concannon PW, 2005) La durée de la décharge ovulante semble varier de 1 à 3 jours. de 24 à 96h, dure en moyenne 3,3 jours. (Fontbonne A, Buff S, Garnier F, 2000), et 36+/-5 heures. (DE GIER. J, KOOISTRA.H.S, DJAJADININGRAT-LAANEN S.C, *et al*, 2006) Son taux sérique varie de 10 à 22 ng/ml. (Fontbonne A, Buff S, Garnier F, 2000) et est en moyenne de 18,7+/-5,8 ng/ml

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

Lors de l'ovulation les ovocytes n'ont pas encore achevés 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<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> jour de l'œstrus endocrinologiques, moment où débute le metoestrus 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, 2006)

#### **d) Le metoestrus**

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<sup>e</sup> et le 30<sup>e</sup> jour suivant le pic LH

avec des valeurs variant de 15 à 90 ng/ml selon Goodman et de 15 à 80 ng/ml (selon Blendinger), puis décline jusqu'à atteindre un taux inférieur à 1 ng/ml à J60-J70 post pic LH ce qui marque la fin du dioestrus. (Goodman M, 2001)

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

*Lors de gestation :*

- Après son pic, la progestéronémie chute légèrement. Cependant une légère remontée se produit entre le 25<sup>ième</sup> et le 40<sup>ième</sup> 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, 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<sup>ième</sup> ou 30<sup>ième</sup> jour de gestation contribuant à la phase de croissance et de différenciation des acini mammaires (mammogénèse) et, plus tard à la préparation du part.

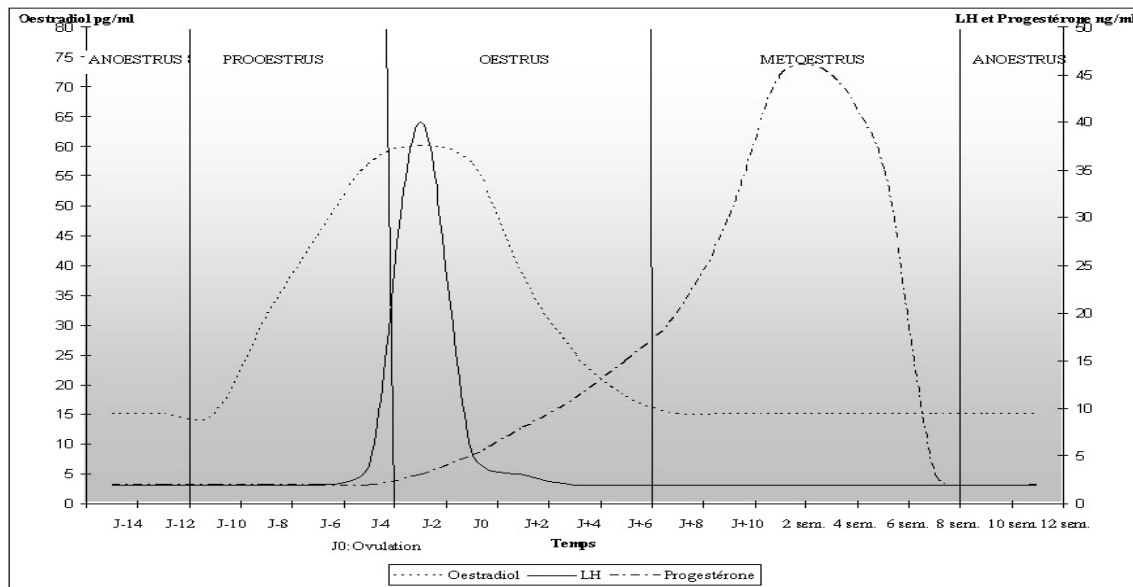
- La Relaxine, produite par le placenta de la chienne, est détectable 19 à 28 jours après le pic de LH. Sa sécrétion présente un pic à 4-6ng/ml entre le 40<sup>ième</sup> et le 50<sup>ième</sup> jour de gestation puis diminue avant terme. Elle devient indétectable 1 à 6 semaines après la parturition.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

- Le taux de prolactine augmente dès le deuxième tiers de la gestation et devient significativement élevé entre le 30<sup>ième</sup> et le 35<sup>ième</sup> 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, 2006)

*Lors de non gestation :*

- la progestéronémie ne présente pas de remontée après son pic, elle diminue progressivement à partir du deuxième tiers du metoestrus jusqu'à J50-J80 après le pic de LH (Romagnoli S, 2006)

- La prolactinémie reste basse pendant la deuxième moitié du metoestrus, 2ng/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.

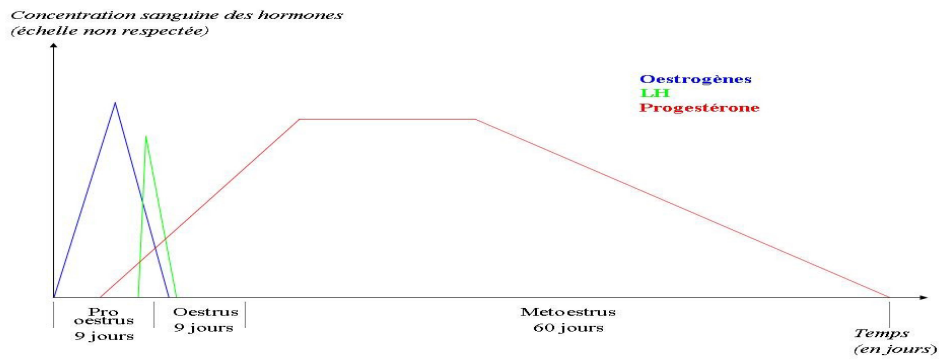


**Figure N°03 : Profil hormonal de la chienne.**  
(CONCANNON PW, LEIN DH 1989 ; DUMON C 1992)

### 3) LES CARACTERISTIQUE DU PROFIL HORMONAL

Le profil hormonal de la chienne au cours du cycle sexuel est caractérisé par :

- ✚ Une sécrétion importante d'œstrogènes par les follicules au cours du pro-œstrus puis une diminution rapide au cours de l'œstrus
- ✚ Un pic de production d'Hormone Lutéinisante (ou LH) au 1er jour de l'œstrus, la LH déclenchant l'OVULATION 48 heures après Une sécrétion de PROGESTÉRONE qui commence avant le pic de LH (et donc avant l'ovulation) qui reste élevée pendant la première partie du Metoestrus puis qui décroît progressivement jusqu'à la fin du Metoestrus
- ✚ Une production de PROGESTÉRONE identique chez la chienne gestante ou non-gestante



**Figure N°04:** Profil hormonal schématisé de la chienne au Cours du cycle (Hors ANOESTRUS)



## Chapitre II :

Suivi des chaleurs chez la chienne

Le suivi de chaleurs chez la chienne constitue un moyen très important Pour avoir des chances raisonnables de gestation, de manière à déterminer précisément le moment de l'ovulation et d'inséminer au moment optimum. On se basant sur différentes techniques telles que le dosage hormonal et cytologie vaginale ainsi que l'échographie ovarienne

### **I) Méthode de détermination de la date d'ovulation**

#### **A) Les signes extérieurs de chaleurs**

Les chaleurs de la chienne se caractérisent par l'apparition de changements tant au niveau comportemental que physique

L'apparition de pertes hémorragiques, le gonflement de la vulve, peuvent aider l'éleveur à évaluer le moment où sa chienne ovulera

Les pertes vulvaires s'atténuent pendant l'œstrus, il est rare qu'une chienne fécondable perde encore beaucoup de sang très coloré et foncé, mais certaines chiennes et certaines races perdent du sang tout au long de leurs chaleurs, sans aucune diminution apparente au moment optimal ; un tel critère est dans ce cas totalement inutile.

Les éleveurs accouplent traditionnellement leur chienne entre le 9ème et le 13ème jour des chaleurs. Cependant il n'est pas toujours facile de détecter le premier jour des chaleurs si on se base sur l'apparition des premières pertes vulvaires hémorragiques. De plus certaines chiennes peuvent avoir des cycles œstraux anormaux (chaleurs silencieuses, cycles courts ovulation précoce ou tardive, voire cycle anovulatoire).



**Figure N°05:** Intensité des saignements vulvaires Détectée par l'écouvillonnage vaginal (Fontbonne A. ©)

L'aspect de l'écouvillon peut apporter une indication rapide ; de gauche à droite :

- Ecouvillon rose ou rouge : la chienne est vraisemblablement en chaleur, probablement en proestrus.
- Ecouvillon marron "sale" : la chienne entre probablement en Metoestrus.
- Ecouvillon très propre : la chienne peut être en œstrus comme en Anoestrus.

### B) Observation des signes comportementaux

**Acceptation du mâle par la femelle :** C'est un **signe très fruste**. En effet, celle-ci peut se produire aussi précocement que 3 jours avant l'ovulation, aussi tardivement que 5 jours après l'ovulation (LECHEF O, 1989). L'acceptation du mâle n'est donc pas un bon critère de détection du moment optimal d'insémination.

**Acceptation de la femelle par le mâle :** Certains mâles semblent pouvoir détecter Les femelles qui sont dans leur période fertile. Cependant ce critère est très approximatif et non fiable.

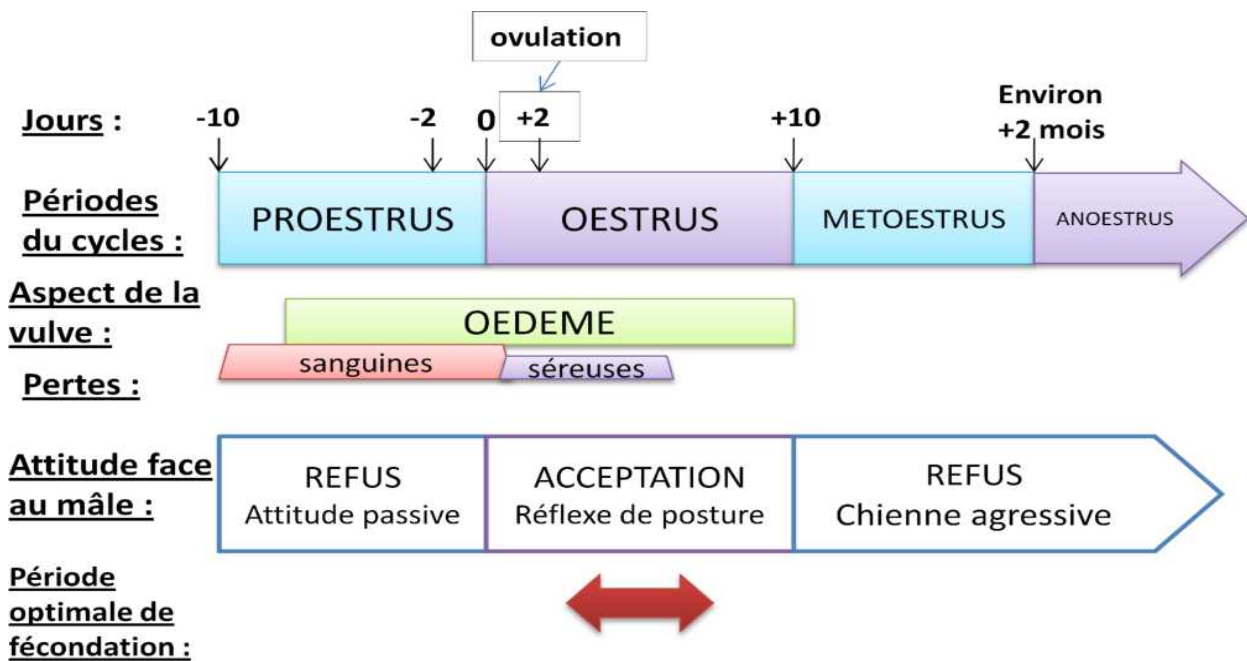


Figure N°6 : Critères de détermination de la période optimale de fécondation.

Il s'avère que l'observation des critères extérieurs de chaleurs, est insuffisante pour déterminer précisément la période fécondante de la chienne. Heureusement qu'il existe d'autres outils pour détecter la période ovulatoire.

### **C) La mesure de la résistivité du mucus vaginal**

La conductance électrique du mucus vaginal se modifie au cours des chaleurs : la résistivité vaginale est proportionnelle à la kératinisation de l'épithélium vaginal. Lors du pro-œstrus, atteint son maximum au moment du pic de LH, puis s'effondre au début du Metoestrus. On mesure cette conductance à l'aide d'une électrode vaginale reliée à un ohmmètre. Cette technique donne de bons résultats chez la renarde pour détecter l'ovulation. Chez la chienne on peut déterminer les périodes non fécondes, mais la méthode ne permet de détecter précisément ni le pic de LH ni l'ovulation. Par contre, cette technique donne de bons résultats si on l'associe aux dosages de progestérogène.

En pratique, elle demeure peu utilisée car nécessite l'achat d'une sonde et demeure moins précise que les frottis vaginaux. En outre, cette technique pose le problème du risque de transmission de maladies. (BRICOUT E. 1994, CATHENOZ L. et MARSAN 1996, DOUCET F., VANNIMENUS C. 2001, ROTA A., IGUER-OUADA M., VERSTEGEN J., LINDE-FORSBERG C. 1999)

### **D) Suivi endoscopique des chaleurs**

Les changements d'apparence de la muqueuse vaginale durant le cycle sexuel, qui peuvent être attribués à l'effet des hormones sur l'activité et les fonctions de l'épithélium vaginal, mais aussi à la capacité de la muqueuse à retenir ou pas les sécrétions, sont des moyens assez fiables pour définir chaque stade du cycle sexuel (JEFFCOATE, et al., 1993). Cependant, la vaginoscopie est beaucoup moins répandue que la cytologie vaginale et les dosages hormonaux, sans doute en raison de l'équipement nécessaire (HEWITT, et al., 2000). La vaginoscopie est basée sur l'observation des plis de la muqueuse vaginale, de la couleur de cette muqueuse et de l'aspect et de la couleur du fluide présent.

**Le matériel :** Pour la vaginoscopie on utilise un endoscope rigide. Il se compose :

- \* D'une optique rigide
- \* D'un câble de lumière
- \* D'une source de lumière
- \* D'un système d'acquisition vidéo



### **1. Pro-œstrus**

Début de pro-œstrus : les cellules de la muqueuse du vagin prolifèrent sous l'effet des œstrogènes. En conséquence on observe un engorgement œdémateux des plis du vagin qui apparaissent rose ou rose-blanchâtre. La concentration en œstrogènes augmente, et favorise de ce fait la rétention des sécrétions par la muqueuse. Des sécrétions sanguines commencent à arriver par l'ostium du col. La lumière du vagin est très étroite occupée par de nombreux plis. Le passage de l'optique est donc difficile. Le col est mou, œdémateux et proéminent.

Milieu de pro-œstrus : sous l'action des œstrogènes, la muqueuse devient moins œdémateuse, les plis rétrécissent entraînant une angulation des reliefs. Cette muqueuse semble froissée, ridée, et devient plus pâle. Des pertes hémorragiques tapissent le vagin.

Fin de pro-œstrus : l'angulation est maximale. Les cellules de la muqueuse sont très kératinisées, et le vagin est blanchâtre.

### **2. Œstrus**

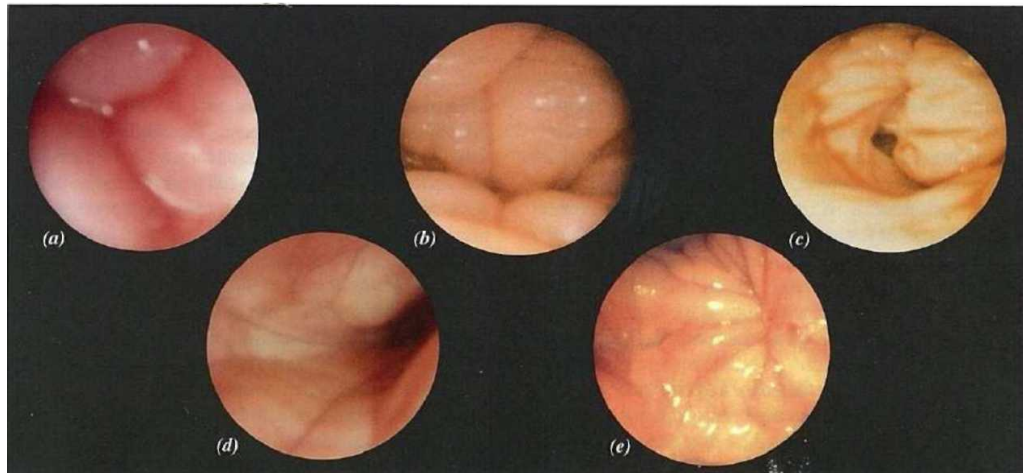
Pendant cette phase le nombre de plis augmente encore, la muqueuse est très angulée avec des profils pointus. La muqueuse s'assèche avec la disparition des pertes sanguines. Elle semble presque banche autour du pic de LH (SIMPSON, et al., 1998).

### **3. Metoestrus**

La couche de cellules kératinisées disparaît après l'œstrus. La muqueuse est hyperhémie et facilement irritable par l'optique. Les plis s'aplatissent et s'arrondissent. La lumière vaginale se ferme progressivement. Ces plis peuvent entraîner une sensation de résistance, voire de rejet de l'optique. Ils forment alors une rosette et l'on parle de pseudo-cervix car le praticien débutant pourra confondre cette image avec le col.

### **4. Anoestrus**

Au cours de cette phase de repos sexuel, la muqueuse du vagin est lisse, légèrement creusée de plis longitudinaux. La muqueuse semble fine et présente une micro-vascularisation donnant une couleur rose uniforme. La lumière du vagin est grande en comparaison à sa taille lors des autres phases du cycle. Enfin la muqueuse fragile peut être irritée par le passage de l'optique. Une méthode de notation de la muqueuse vaginale en endoscopie a été proposée par LINDSAY.



**Figure N°07 :** Aspect de la muqueuse vaginale sous endoscopie

(SIMPSON, ENGLAND, & HARVEY, 1998)

(a) : Pro-œstrus, (b) : début d'œstrus, (c) : milieu d'œstrus, (d) : début de metoestrus, (e) : fin de metoestrus

## E. Cytologie vaginale

Les changements de l'histologie vaginale sont sous contrôle hormonal, et subissent notamment les effets de la variation de concentration plasmatique en œstrogènes. La réalisation de frottis vaginaux permet, grâce à leur interprétation, de nous renseigner sur la phase du cycle œstral dans laquelle se situe la chienne (DUMON, 1994).

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 et Nelson 1996, Neveux 1999, Johnston et al. 2001b).

### 1) La préparation d'un frottis vaginal

#### 1.1) Les techniques de prélèvement

##### a) Le 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 ml de solution saline stérile. On peut également

rattacher la pipette à une seringue contenant au minimum 5 ml 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 (England 1992, Baker et 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 et Savage 1970, Guyant 1988, Olson et al. 1984d).

#### **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 « abaisses langue » coupés en quatre, polis et humidifiés avec du sérum physiologique (Christie, Bailey et Bell 1970). Ce matériel, outre son manque d'asepsie, rendait l'examen douloureux pour l'animal. On a également utilisés des spatules en métal (Evans et 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. 2001b). Néanmoins, lorsqu'on utilise du matériel non humidifié, le coton collecte les cellules mais également du mucus, ce qui peut gêner l'étalement du prélèvement. Les lèvres vulvaires peuvent être écartées manuellement avec le pouce et l'index. L'écouvillon est introduit au niveau de la commissure dorsale de la vulve. Puis il est orienté crânio-dorsalement en direction de la colonne vertébrale. Une fois 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 et Digregorio 1987, Neveux 1999).



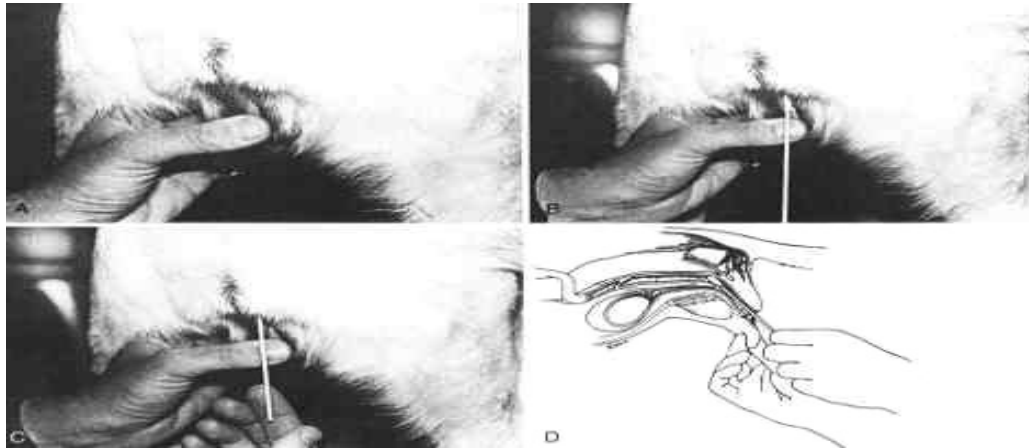
**Figure N°08 :** Technique de prélèvement par écouvillonnage (Bowen 2000).

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. 2001b, Olson et al. 1984d).

\*L'introduction sur 15 cm (pour une chienne de format moyen) est obligatoire. Les manipulations dans le vagin crâniale peuvent être douloureusement ressenties par certaines femelles (Schutte 1967a). 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 1967a), 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. 2001b).



**Figure N°09:** Réalisation d'un frottis vaginal à l'aide d'un écouvillon

- A : Tenir les lèvres de la vulve ouvertes pour permettre l'introduction de l'écouvillon.
- B : L'écouvillon est placé dans la vulve.
- C : L'écouvillon est introduit dans le vagin.
- D : Un schéma illustrant la position de l'écouvillon en coton.

Certains auteurs ont conseillé l'utilisation de spéculums pour éviter 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 et Digregorio 1987, Holst 1986, Mialot 1984b, Neveux 1999, Fayer-Hosken 1996). Cependant ils sont rarement nécessaires en pratique courante.



**Figure N°10 :** Technique de prélèvement à l'aide d'un spéculum (Fayer-Hosken 1996)

### **1.2) L'étalement**

L'étalement sur une lame de microscope doit être effectué rapidement, afin d'éviter le dessèchement du prélèvement (Concannon et Digregorio 1987, Holst 1986).

Le but est de transférer un matériel représentatif du prélèvement et non l'ensemble de ce dernier.

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

Généralement deux à trois lignes parallèles, bien séparées, peuvent être étalées sur toute la longueur d'une seule lame (Concannon et 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 1984b, Roszel 1975, 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 N°11** : Etalement d'un écouvillon sur une lame de microscope (Bowen 2000)

### **1.3) La 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 (Neveux 1999, Concannon et Digregorio 1987, Roszel 1977).

La lame est plongée dans un bain de fixateur, qui peut être une solution de méthanol à 95% (Holst 1986, Olson et al. 1984d), un mélange à parts égales d'éthanol à 100° et d'éther (Schutte 1967a, 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 et Digregorio 1987, Johnston et al. 2001b, Neveux 1999).

#### **1.4) Technique de coloration du frottis**

##### **A) Les colorations unichromes**

###### **a. La coloration de May-Grünwald-Giemsa**

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

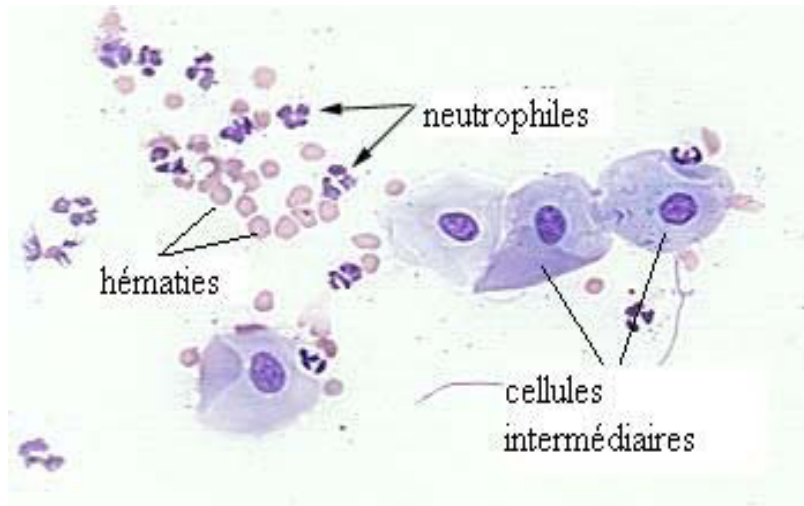
**Tableau N°1:** Coloration Diff-Quick ® (d'après Bowen 2000).

<b>Ordre de passage</b>	<b>Produits</b>	<b>Temps</b>
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 (Neveux 1999, Johnston et al. 2001b, Concannon et Digregorio 1987, Wright et Parry 1989). Cette technique permet une très bonne visualisation des polynucléaires neutrophiles et des hématies (Neveux 1999).

Les avantages de cette technique résident dans son faible coût et dans sa rapidité d'exécution (Concannon et Digregorio 1987, Olson et al. 1984 a et b)





**Figure N°12:** Frottis vaginal de chienne coloré avec la méthode Diff-Quick ® (D'après Bowen2000).

**b) Le 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 (Guyant 1988, Neveux 1999, Johnston et al. 2001b, Olson et al. 1984a et b, Feldman et Nelson 1996, Simmons 1970).

**B) Les colorations pluri chromes**

**1) La coloration de Harris Shorr :**

Cette coloration trichrome a été mise au point par Ephraïm Shorr en 1940 (Shorr 1940 a, b, 1941). Elle connaît de nombreuses variantes qui ont permis d'augmenter son efficacité et de faciliter sa mise en pratique (Guyant 1988, Oettlé et Weldhagen 1982, Roszel 1977, Neveux 1999, Schutte 1955c).



**Tableau N°2 :** Coloration de Harris – Shorr (d'après Neveux 1999).

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

L'intérêt de cette technique est la coloration orangée des précurseurs cytoplasmiques de la kératine (Olson et al. 1984 d). 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. 2001b).

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 et Nelson 1996).

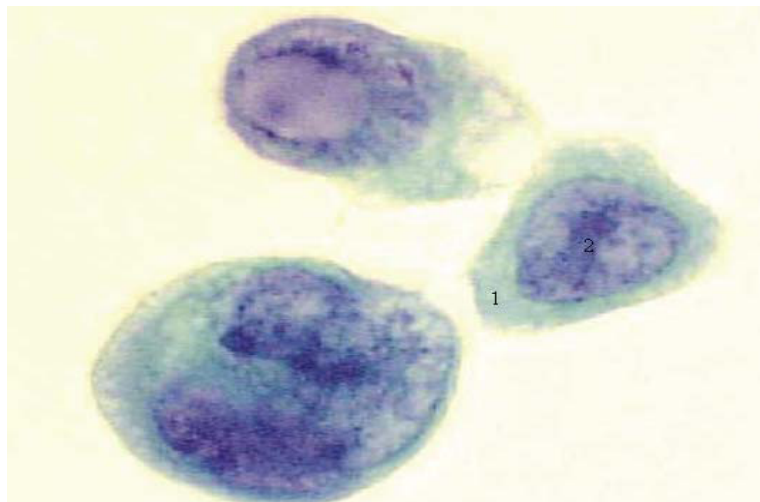
## **2) La coloration de Papanicolaou :**

Cette coloration penta chrome a été décrite par Georges Papanicolaou en 1942 (Papanicolaou 1942). De même que le trichrome de Harris Shorr, elle a subi de nombreuses modifications (Schutte 1967a) .

**Tableau N°3 :** La coloration de Papanicolaou (d'après cours d'anatomie pathologique du CHU Necker). (1) éosine, (2) mélange de vert lumière et de brun Bismarck.

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	hématoxyline de Harris	5 minutes
5	eau distillée	plonger 10 fois
6	alcool à 95°	passage
7	alcool à 80°	passage
8	alcool à 70°	passage
9	alcool à 70°	passage
10	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 N°13:** Frottis vaginal pratiqué chez une femme et coloré avec la technique de Papanicolaou. (D'après Heron 2004 avec son autorisation).

(1) Coloration verte du cytoplasme (cellule parabasale), (2) Coloration bleutée du noyau.

Il s'agit de la coloration standard des frottis vaginaux chez la femme. 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.

### **1.5) L'observation microscopique :**

L'observation de la lame se fait en deux temps.

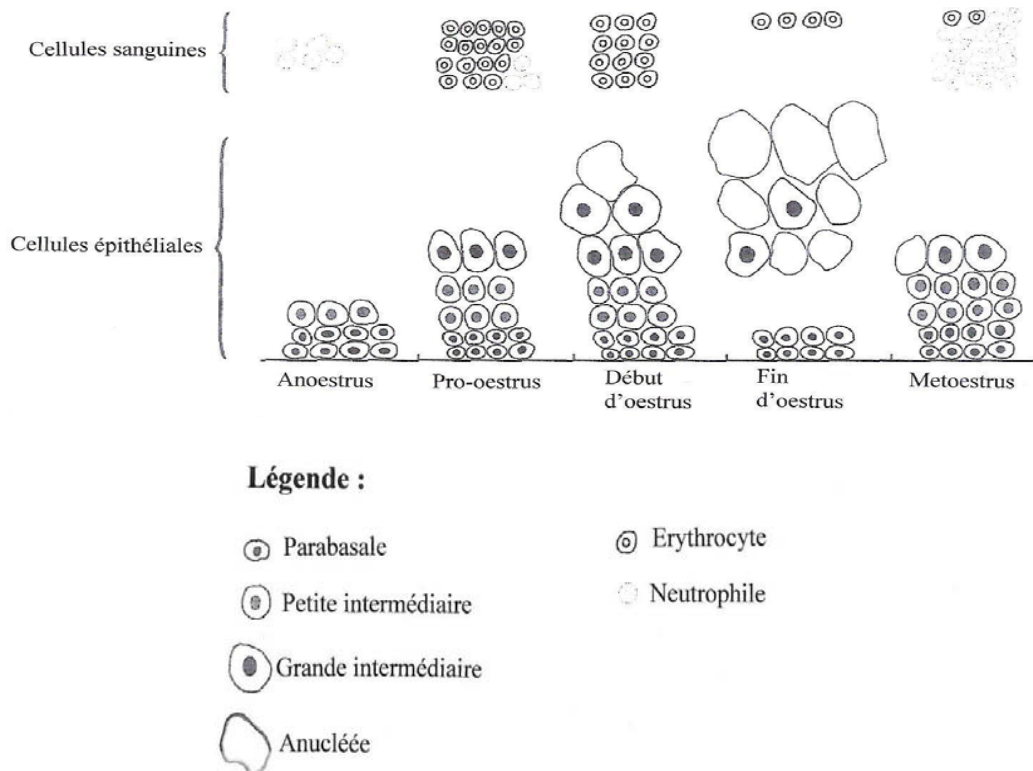
D'abord, un faible grossissement (x40 ou x100) permet d'apprécier globalement la richesse en cellules ainsi que leur répartition (dispersées, en amas ou isolées), la réussite de la coloration.

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 1999, Johnston et al. 2001b, Simmons 1970).

### **A Les 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, 1967a).



**Figure N°14 :** Représentation schématique des cellules épithéliales et sanguines observées dans les sécrétions vaginales au cours du cycle.

### B) La maturation cellulaire

Les différentes couches cellulaires présentent les trois stages de maturation physiologique : la prolifération, puis la différenciation et enfin l'exfoliation. Ce phénomène est sous la dépendance hormonale des estrogènes

Lors de la lecture du frottis, on rencontre les différents types cellulaires de l'épithélium ainsi que des cellules présentes dans la lumière vaginale. Il convient donc de les classifier avec soin.

### C) Les cellules de l'épithélium vaginal :

Les affinités tinctoriales des cellules seront décrites en fonction de la coloration de Harris Shorr.

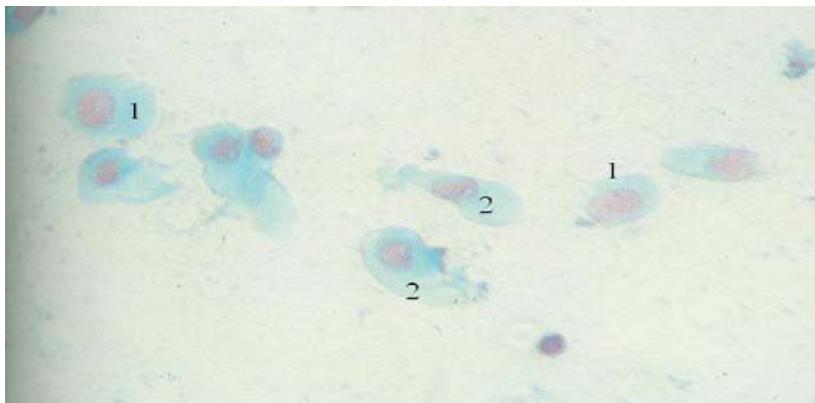
#### C1. Les cellules parabasales :

Ce sont les plus petites cellules épithéliales observées sur un frottis. Leur diamètre est de 10 à 20  $\mu\text{m}$  (Concannon et Digregorio 1987, Johnston et al. 2001b). En effet, les cellules de la couche germinative ne sont que très rarement visualisées (Olson et al. 1984d, Johnston et al. 2001b).

Leur forme est généralement ronde et uniforme (Olson et al. 1984d, Schutte 1967a, 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. 1984d, Guyant 1988, Johnston et al. 2001b, Feldman et Nelson 1996, Vaughan 1996).

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



**Figure N°15:** Cellules parabasales (coloration Harris-Shorr)  
(1) : cellules parabasales rondes, (2) cellules parabasales allongées

### **C.2. Les 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.

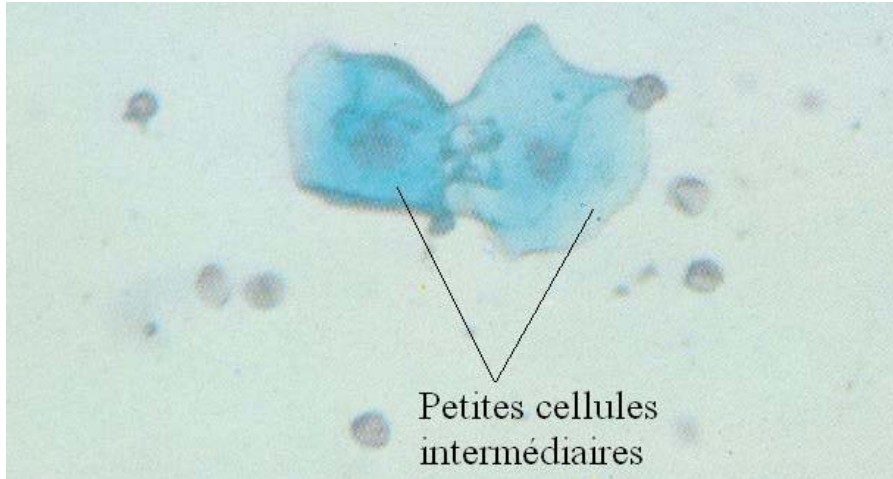
#### **Les petites cellules intermédiaires :**

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 (cf. figure 28) (Feldman et Nelson 1996, Concannon et Digregorio 1987).

Leur diamètre est supérieur à 20µm (Johnston et al. 2001b).

Leur forme varie de rond à anguleux. La plupart sont ellipsoïdes (Concannon et Digregorio 1987, Johnston et al. 2001b).

Le noyau est encore bien rond et bien visible. Son diamètre représente de 30 à 35 % de celui de la cellule (Schutte 1967a, Concannon et Digregorio 1987). La coloration cytoplasmique reste basophile. Le noyau peut commencer à prendre une légère teinte acidophile (Concannon et Digregorio 1987).



**Figure N°13 :** Petites cellules intermédiaires (Mialot, 1984).

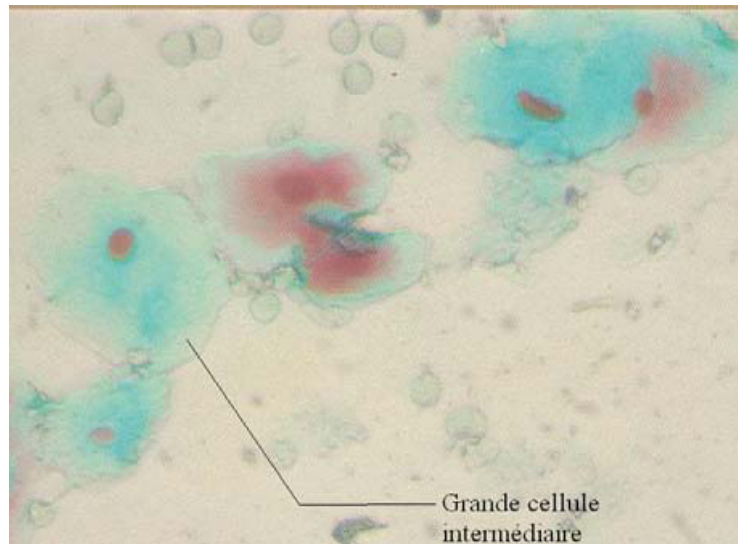
#### **Les grandes cellules intermédiaires :**

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 et Digregorio 1987). Leur diamètre est supérieur à 30 $\mu$ m (Johnston et al. 2001b). Elles sont plates. Leur contour est anguleux (cf. figures 28 & 29) (Johnston et al. 2001b, Concannon et Digregorio 1987).

Le noyau est de taille normale, visible et encore fonctionnel (Johnston et al. 2001b). 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 et Digregorio, 1987).

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



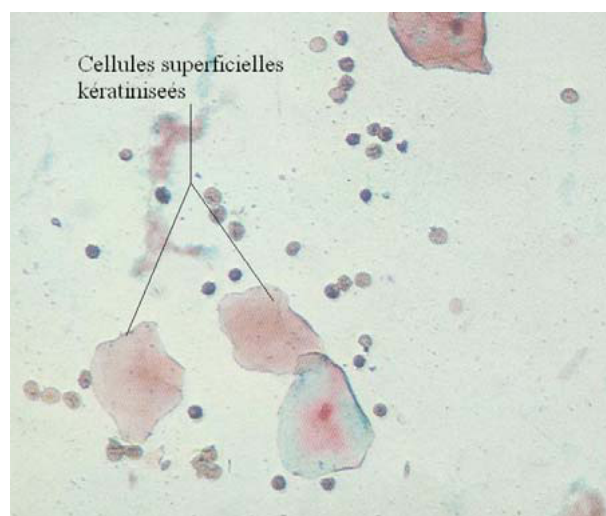
**Figure N°17 :** Grande cellule intermédiaire (Mialot 1984) Coloration Harris Shorr.

### **C.3. Les cellules superficielles :**

Sont les cellules les plus superficielles, plus grandes des cellules; leur diamètre est compris entre 30 et 75  $\mu\text{m}$  (Johnston et al. 2001b, Vaughan 1996, Concannon et Digregorio 1987).

Les bords cellulaires sont irréguliers, anguleux et plissés (Olson et al. 1984d, Concannon et 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 (Johnston et al. 2001b, Vaughan 1996, Concannon et Digregorio 1987, Schutte 1967a).



**Figure N°18 :** Cellules superficielles kératinisées anucléés (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, 2001b).

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

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 et 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 sénescence, plus l'acidophilie sera marquée (Johnston et al. 2001b).

Néanmoins certaines squames ne prennent absolument aucune coloration et apparaissent donc transparents. (Concannon et Digregorio 1987).

Ces cellules offrent une protection à l'épithélium vaginal lors de l'accouplement (Guyant1988).



### C.4. Autres cellules issues de l'épithélium vaginal

**Tableau N°4 :** Représente des autres cellules issues de l'épithélium vaginal

Autres cellules	Caractéristiques
Les cellules metoestrales	cellules parabasales modifiées, présentes lors de la phase lutéale du cycle contiennent un ou plusieurs polynucléaires neutrophiles dans leur cytoplasme reflètent la propriété de phagocytose de l'épithélium vaginal. peuvent être observées dès que des polynucléaires neutrophiles sont présents (début de proestrus, ou vaginite) selon (Johnston et al. 2001b).et (Feldman et Nelson 1996, Johnston 1988, Neveux 1999, Johnston et al. 2001b, Olson et al 1984 d, Guyant 1988)
Les cellules spumeuses ou « foam cells »	cellules parabasales ou intermédiaires contiennent des vacuoles cytoplasmiques. Leur origine et leur signification sont inconnues selon (Feldman et Nelson 1996, Olson et al 1984 d, Johnston et al. 2001b, Johnston 1988, Guyant 1988).
Les cellules superficielles avec des corps cytoplasmiques	fréquemment en œstrus. L'origine et la signification des inclusions cytoplasmiques est inconnue 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. 2001b). (Olson et al, 1984 c)
Les cellules épithéliales avec grains de mélanine	observées sur des frottis issus de chiennes possédant un épithélium pigmenté (les labradors noirs). Elles ne doivent pas être confondues avec des cellules cancéreuses de mélanome. (Olson et al. 1984d, Johnston et al. 2001 b).
Les cellules néoplasiques	cellules anormales qui peuvent s'exfolier. de type tumoral les plus rencontrés : carcinomes à cellules transitionnelles, les tumeurs vénériennes, les carcinomes à cellules squameuses, les métastases d'adénocarcinomes mammaires et les lymphosarcomes (Johnston et al. 2001 b, Guyant 1988).
Les cellules sanguines	double origine : l'utérus. et le vagin ont été observées sur des frottis de chiennes en proestrus qui avaient été auparavant hystérectomisées
Les érythrocytes	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 selon (Concannon et Digregorio 1987). (Johnston, Olson et Kutritz 2001 b) (Holst 1986).
Les leucocytes	Les polynucléaires neutrophiles (PNN) 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. 2001b). 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 il s'agit soit d'œstrus, une métrite ou une vaginite doivent être envisagées.

	(Johnston et al. 2001b).
Les cellules de la fosse clitoridienne	observées si le prélèvement a été mal effectué ; c'est-à-dire dans la fosse clitoridienne au lieu du vestibule ou du plafond vaginal sont éosinophiles, très abondantes pendant l'Anoestrus et l'œstrus, peuvent être confondues avec des cellules squameuses. Cependant, leur aspect fusiforme ou un prélèvement non adéquat (frottis effectué à proximité de la vulve, ou algie de la chienne lors du prélèvement) doivent alerter le praticien (Johnston et al. 2001 b, Concannon et Digregorio 1987, Neveux 1999, Roszel 1977, Olson et al. 1984 c et d, Guyant 1988).
Les 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. 2001b).
Les 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).

### **C.5) Les index cytologiques :**

Les index ont été établis pour décrire quantitativement les images cellulaires visualisées sur les frottis et suivre plus précisément l'évolution du frottis au cours du cycle œstral.

**L'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 femme, cette réaction est limitée aux cellules les plus superficielles; seules les cellules superficielles avec un noyau pycnotique ou les squames sont compilées (Gaufroy 1958).

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 1967c).

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 1967c, Taradach 1980, Mialot 1984, Post 1985, Wright et Parry 1989).

L'IE est calculé par la relation suivante :

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

(Sans les petites cellules intermédiaires et les cellules basophiles)

Les variations au cours du cycle œstral : La valeur de l'IE en début de proestrus est presque nulle. Puis suite à l'augmentation de la concentration en estrogènes qui induit la kératinisation des cellules épithéliales, l'IE croît et connaît un pic (Shutte 1967c, Mialot 1984b, Post 1985, Wright et Parry 1989).

D'après Schutte (1967c), 89% des chiennes ont atteint ce pic au 14ème jour du cycle. Seules 43 % des chiennes l'avaient atteint au 10ème jour (le jour de l'apparition des pertes vulvaires étant le premier jour du cycle).

D'après Taradach (1980), ce pic survient entre le 8ème et le 12ème jour du cycle .Par ailleurs, les valeurs au pic sont très variables entre les individus. Selon l'étude de Schutte (1967c) 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 1984b).

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

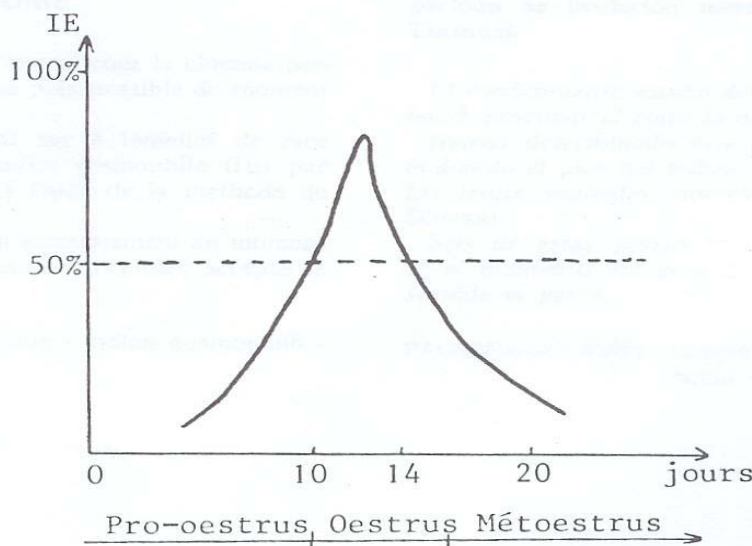


Figure N°19 : Le pic d'IE (courbe théorique) (Taradach 1980).

2) Les variations de la cytologie vaginale au cours du cycle œstral

2.1) Le proestrus :

Tableau N°5 : Variation cytologique pendant le proestrus

Proestrus précoce	Proestrus moyen	Prooestrus tardif
<p>un frottis pauci cellulaire</p> <p>présence de cellules parabasales, des petites et grandes cellules intermédiaires</p> <p>Les PNN et les bactéries sont présents en quantité variable</p> <p>Le proestrus est communément déterminé par la présence en grand nombre d'érythrocytes</p> <p>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</p> <p>La proportion en parabasales par rapport au nombre total de cellules vaginales est de 5 à 30% selon (Feldman et Nelson 1996). (Johnston et al. 2001b).</p>	<p>Les premiers effets de l'élévation sérique en œstrogènes sur le tractus génital sont visualisés</p> <p>Le frottis est riche en cellules.</p> <p>La kératinisation cellulaire débute. La proportion en parabasales et petites intermédiaires diminue progressivement, au profit de celle en cellules superficielles nucléées et anucléées</p> <p>une disparition des PNN.</p> <p>L'épaississement brutal de la muqueuse vaginale empêche la diapédèse des neutrophiles. Ils ne seront plus visualisables jusqu'au Metroestrus</p> <p>Les GR commence à décroître</p> <p>Le fond du frottis est variable. Il peut être soit muqueux soit propre</p> <p>la proportion en parabasales passe à moins de 5% quatre à 5 jours avant le pic de LH selon Johnston et al. 2001b ; Roszel 1977, Feldman et Nelson 1996).</p>	<p>Le frottis est riche en cellules</p> <p>Plus de 80% de cellules superficielles qui présentent un noyau vésiculaire, pycnotique, ou alors pas de noyau du tout Elles forment souvent de larges amas .</p> <p>pas de PNN</p> <p>La présence d'hématies est variable</p> <p>Le fond du frottis est propre</p> <p>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 selon (Feldman et Nelson 1996).Roszel1977</p>

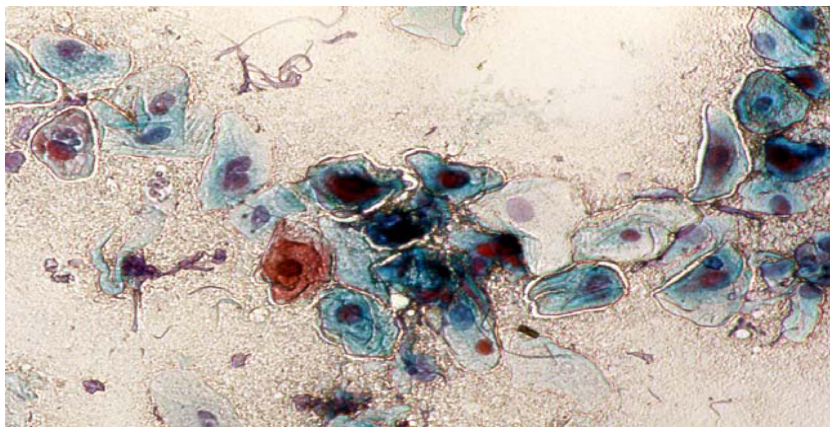
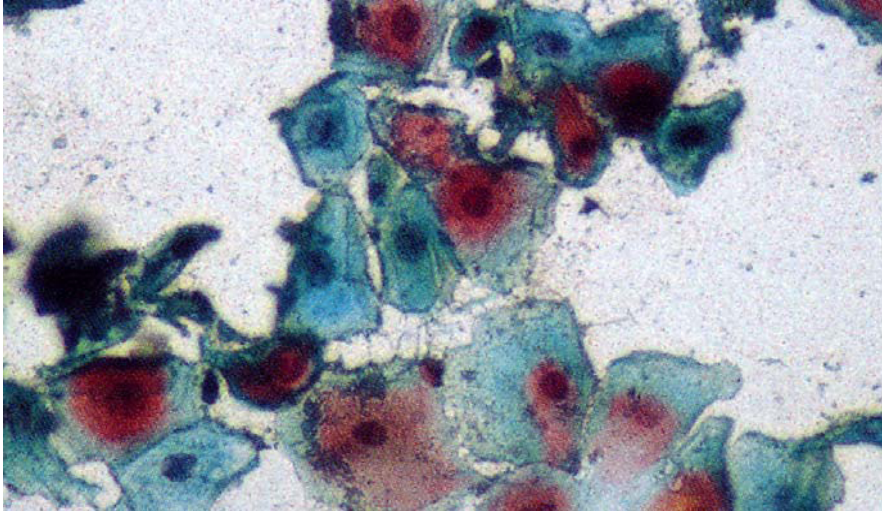


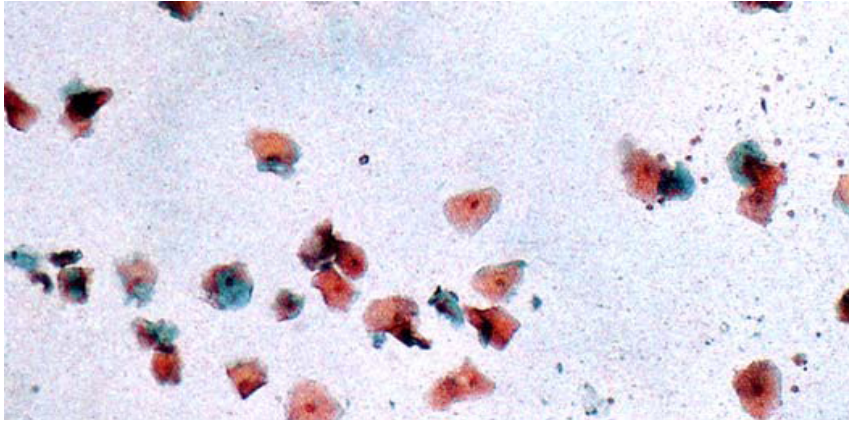
Figure N°20 : Proestrus débutant (cliché Alain Fontbonne).

(Coloration Harris-Shorr)



**Figure N°21 :** Proestrus moyen (cliché Alain Fontbonne).

(coloration Harris-Shorr)



**Figure N°22 :** Proestrus tardif (cliché Alain Fontbonne)

(coloration Harris-Shorr)

### **2.2) 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 et 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 et Nelson 1996).

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 riche en cellules et il est entièrement kératinisé et présente 100% de cellules anucléées (Feldman et Nelson 1996). Dont l'aspect tinctorial cette est très **acidophile**

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 et Nelson 1996)

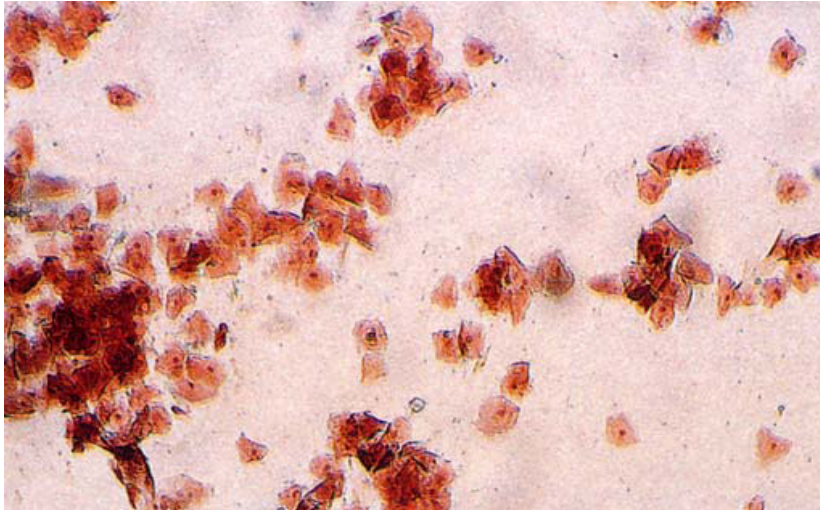
La kératinisation maximale peut être représentée par des « frottis-types » suivants :

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

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 (Olson et al 1984 c et d, Concannon et Digregorio 1987, Holst et Phemister 1974).

Les PNN sont absents, très rares ou présentant des formes dégénératives (Olson et al. 1984 c et d, Feldman et Nelson 1996, Concannon et Digregorio 1987, Schutte 1967 b, Baker et Lumdsen 2001, Guyant 1988) ; 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 ( $7.7 \pm 3.1$  jours après le pic de LH) des petits amas de leucocytes pouvaient être visualisés à nouveau sur les frottis (Bell et Christie 1971b, England 1992). Il s'agit du premier des effets visualisables du déclin de l'activité des estrogènes sur le vagin (Roszel 1977).





**Figure N°23 :** Frottis d'œstrus (cliché Alain Fontbonne) (Harris Shorr)

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. 2001b).

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, Leur absence est constatée chez certaines femelles. (Concannon et Digregorio 1987).

Cependant la plupart des chiennes présentent encore des cellules sanguines sur leurs frottis (Bell et Christie 1971b).

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

**Remarque :** La cytologie vaginale est donc bien une méthode imprécise pour apprécier le premier jour de l'œstrus. Cependant c'est un moyen indirect mais satisfaisant pour estimer la concentration plasmatique en estrogènes. Les effets marqués de cette classe de stéroïdes sur la muqueuse vaginale persistent malgré leur retour à des valeurs basales au début du Metroestrus.

### **2.3) Le Metoestrus**

**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 et Phemister, 1974 ; Concannon et Digregorio, 1987 ; Feldman et Nelson, 1996 ; Johnston et al, 2001b). Le frottis est riche en cellules (Feldman et 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 et Phemister, 1974) . A cet instant l'aspect des cellules superficielles se modifie : elles apparaissent pliées, leur contour s'estompant (Holst et Phemister 1974).

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

Dans une étude, les petites cellules vaginales (parabasales et petites intermédiaires) représentaient  $63.8 \pm 12.5$  % et les grandes cellules intermédiaires ainsi que les superficielles  $36.7 \pm 12.8$ % (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 et Digregorio 1987).

La coloration est à **prédominance basophile**.

Occasionnellement des cellules spumeuses et/ou des cellules metoestrales sont visualisées (Feldman et Nelson 1996, Johnston et al. 2001b, Johnston 1988, Roszel 1977, Schutte 1967b, Post 1985, Neveux 1999).

Les leucocytes réapparaissent en nombre variable au moment de la modification des types cellulaires du frottis (Hancock et Rowlands 1949, Mulligan 1972, Schutte 1967b, Roszel 1977, Olson et al, 1984c et d, Johnston et al, 2001, Concannon et Digregorio 1987, Neveux 1999)

Moins fréquemment ils sont observés dans les 3 premiers jours du Metoestrus (Holst et Phemister 1974). Chez les individus pour lesquels ces cellules étaient déjà présentes en fin d'œstrus, leur quantité est plus importante (Dore 1978).

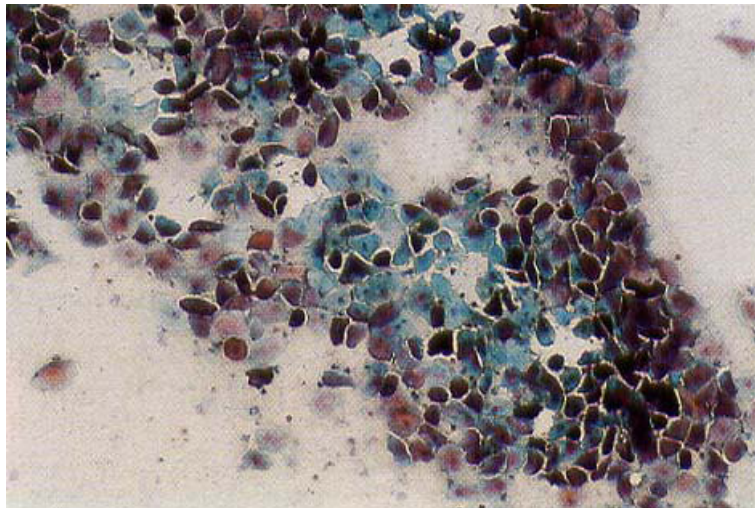


Néanmoins en début de Metoestrus (du 3ème au 5ème jour), un pic de leucocytes est observé (Bell et Christie 1971b).

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 micro-organismes pendant le Metoestrus.

Les hématies sont encore visualisables durant les 18 premiers jours du Metoestrus (Olson et al. 1984 c&d, Johnston et al. 2001b, Neveux, 1999)

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) (Bell et Christie 1971). Le fond du frottis est sale, contenant de grands amas de débris cellulaires (Neveux 1999, Feldman et Nelson 1996).



**Figure N°24:** Frottis de début de Metoestrus (cliché Alain Fontbonne).

**Le Metoestrus moyen et tardif :** A la suite des modifications majeures intervenues lors des premiers jours, la cytologie vaginale ressemble à celle de l'Anoestrus (Feldman et Nelson 1996, Johnston et al. 2001b).

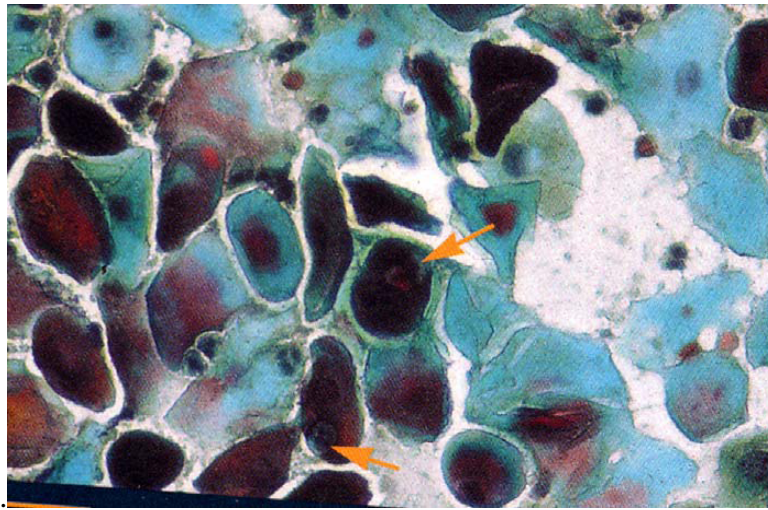
Les petites cellules vaginales (parabasales et petites intermédiaires) sont prédominantes. Dans l'étude de M.A. Dore, elles représentent  $83 \pm 11\%$  des cellules contre  $16.7 \pm 11.8\%$  pour les grandes cellules intermédiaires et les cellules superficielles (Dore 1978). Les cellules parabasales apparaissent cuboïdales 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 (Bell et Christie 1971b)

Durant le reste du Metoestrus, la présence des érythrocytes est rare et aléatoire. Dans l'étude de Bell et Christie, pendant les 30 derniers jours du Metoestrus, des hématies n'étaient visualisées que sur 4 des 62 frottis réalisés, et en quantité « négligeable » (cellule isolée à 2 à 3 cellules par champ microscopique) (Bell et Christie 1971)

Le fond du frottis tend à devenir propre (Feldman et Nelson 1996).



**Figure N°25 :** Frottis de Metoestrus (cliché Alain Fontbonne)

**2.4) L'Anoestrus :**

Il s'agit d'un frottis pauci cellulaire (Neveux 1999, Concannon et Digregorio 1987, Post 1985).

Les cellules parabasales et petites intermédiaires sont prédominantes (Neveux 1999, Johnston et al. 2001b, Post 1985, Roszel 1977, Concannon et Digregorio 1987, Olson et al. 1984 c&d, Guyant 1988, Feldman et Nelson 1996). D'après l'étude de M.A. Dore, elles représentent  $87.0 \pm 7.4$  % des cellules (Dore 1978). Les cellules intermédiaires présentent des granules cytoplasmiques (Roszel 1977).

Les cellules adhèrent à des amas ou des traînées de mucus (Concannon et Digregorio 1987)

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

Le frottis est **basophile** mais est très peu marqué tinctorialement (Concannon et Digregorio 1987).

Pendant l'Anœstrus, la quantité de leucocytes est très variable entre les individus. Cependant la plupart des frottis présentent des PNN isolés (Bell et Christie 1971b).

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

Les érythrocytes sont absents (Christie et Bell 1971b)

Le fond du frottis est sale (Neveux 1999, Feldman et Nelson 1996).



**Figure N°26** : Frottis d'Anœstrus (cliché Alain Fontbonne).

### **2.5) La transition Anœstrus-proœstrus :**

Quinze jours avant le début du proœstrus, le frottis jusqu'alors pauci cellulaire, voit la quantité de cellules augmenter. Ce sont les cellules intermédiaires (grandes et petites) qui voient leur nombre croître (Concannon et Digregorio 1987, Dore 1978).

A la même période, des hématies sont à nouveau visualisables (Christie et Bell 1971b)

### **3) Intérêts et limites des frottis vaginaux**

Cette méthode est **facile à mettre en œuvre** et peu contraignante. Cependant la cytologie vaginale n'est pas toujours aussi caractéristique de chaque phase du cycle comme nous l'avons décrit plus haut. Les frottis vaginaux s'avèrent de bons indicateurs du déroulement des chaleurs mais sont **insuffisants seuls pour la détermination du moment de l'ovulation**. Leur utilisation reste donc indissociable des dosages de progestérone.

## **F) Les dosage hormonaux**

### **1) Le dosage de l'œstradiol**

L'œstradiol hormone présente transitoirement durant la première partie du cycle, Son dosage se fait en général par une méthode radio immunologique ou par électro chimiluminescence, mais les concentrations plasmatiques observées sont très faibles (aux alentours de 10 à 100 pg/ml).

Ce dosage n'est donc pratiqué que dans des laboratoires spécialisés.

L'œstradiol présente une augmentation de sa concentration depuis le niveau de base (10-20 pg/mL) jusqu'à 50-100 pg/ml durant le pro-œstrus (GUERIN C 1998).

La valeur maximale se situe 1 à 2 jours avant le pic de LH, puis le taux d'œstradiol chute progressivement pour atteindre des valeurs indétectables 36 heures après le pic de LH (BADINAND F., FONTBONNE A., MAUREL M.C. *et al*1993).

Le taux d'œstradiol fluctuant beaucoup au cours du pro-œstrus, l'utilisation de ce dosage pour déterminer le moment de l'ovulation suppose de détecter précisément le pic d'œstradiol, d'en déduire la date du pic de LH et, partant, la date de l'ovulation ; donc suppose de réaliser des prises de sang tous les deux jours à partir du troisième jour des chaleurs (FONTBONNE A1992) (en pratique 5 à 7 dosages d'œstradiol pour le suivi de la maturation folliculaire).

Cependant, la concentration d'œstradiol présente de trop grandes variations individuelles pour utiliser son dosage dans la détermination de la date de saillie (BADINAND F., FONTBONNE A., MAUREL M.C. *et al*1993). Il n'est donc pas utilisé en pratique courante.

### **2) Le dosage de l'hormone LH**

La LH présente chez la chienne un pic net qui dure de 1 à 4 jours, ce qui est relativement long par rapport aux autres espèces (CONCANNON P.W1986). Le niveau de base de cette hormone est de l'ordre de 1,4 +/- 0,1 ng/mL, le pic de 7,5 à 45 ng/mL.

Le pic de LH se produit lors de la transition pro-œstrus – œstrus ou dans les tous premiers jours de l'œstrus ; il déclenche l'ovulation 48 heures plus tard, en moyenne.

C'est un excellent repère pour évaluer la date de l'ovulation.

Le dosage est réalisable par l'emploi de méthodes radio immunologiques ou immun enzymatiques (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 même 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).

La réalisation de prélèvements et de dosages quotidiens durant le pro-œstrus alourdit considérablement le suivi de chaleurs chez la chienne. On réservera donc le dosage de la LH aux cas demandant la plus grande précision, à savoir les inséminations en semence congelée pour lesquelles la durée de vie de la semence est inférieure à 12 heures.

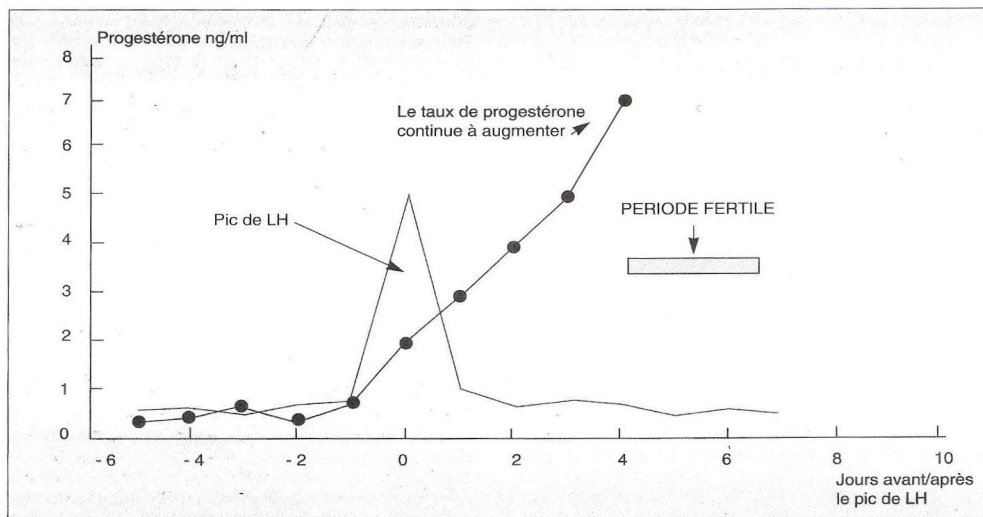


Figure N°27: Correspondance entre le pic de LH et le début de l'augmentation du taux de progestérone (FONTBONNE A1992)

### 3) Le dosage de la progestérone plasmatique

Une des grandes particularités de la chienne est la lutéinisation des follicules pré-ovulatoires, qui se mettent à sécréter de la progestérone avant que l'ovulation ne se produise. Les concentrations plasmatiques de la progestérone, qui augmentent lentement en période pré-ovulatoire, suivent ensuite une courbe avec une pente ascendante brutale autour de l'ovulation, puis atteignent un plateau à des taux élevés en une dizaine de jours.

Le taux de progestérone est relativement important dans le sang, aussi est-il facilement dosable.

### **Evolution de la progestéronémie au cours du cycle sexuel**

Le taux plasmatique de la progestérone en période pré-ovulatoire passe de moins 1 ng/mL à une valeur comprise entre 1 et 2,5 ng/mL (FONTBONNE A, 1992). Cette première augmentation correspondrait au pic pré-ovulatoire de LH.

La progestéronémie atteint 2 ng/mL dans les 24 heures qui suivent le pic de LH. On sait que l'ovulation a lieu environ 48 h après le pic de LH mais cependant on ne peut pas arrêter les dosages à ce moment là car la progestéronémie n'est pas vraiment un moyen fiable pour détecter le pic de LH.

Dans l'état actuel des connaissances, il est impossible de dire qu'une chienne est fécondable pour un taux précis de progestérone. Par contre la valeur de la progestéronémie à l'ovulation est assez constante (autour de 5 à 6 ng/mL) (MARSELOO N., FONTBONNE A., BASSU G., RIVIERE., LEBLANC B., RAULT D., BIOURGE V., CHASTANT-MAILLARD 2004). On se réfère donc au moment de l'ovulation et on attend un minimum de 48 heures pour inséminer.

Après ovulation le taux de progestérone continue d'augmenter. Une valeur de 15 nanogrammes par mL semble suffisante pour maintenir une gestation.

En pratique, il est donc intéressant de combiner les frottis vaginaux et les dosages de progestérone. On commence par contrôler la chienne par frottis vaginal dès les 5-6<sup>ème</sup> jours des chaleurs.

### **G) L'échographie ovarienne**

L'échographie ovarienne nécessite l'utilisation d'échographes perfectionnés (avec des sondes de 7,5 à 12 MHz). Elle demande une technicité importante de la part de l'échographiste et surtout, n'est réalisable que sous la forme d'un suivi échographique et d'exams rapprochés. Le jour de l'ovulation peut ainsi être déterminé de manière précise mais nécessite un suivi journalier par échographie (MARSELOO N., FONTBONNE A., BASSU G., RIVIERE., LEBLANC B., RAULT D., BIOURGE V., CHASTANT-MAILLARD S4 au 6<sup>th</sup> August 2004). En effet l'aspect d'un follicule pré-ovulatoire est très proche d'un corps jaune en début d'évolution, d'où la nécessité d'échographier tous les jours.





Figure N28 : Echographie ovarienne chez la chienne

Les ovaires sont situés en position sous lombaire au niveau de la 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> apophyse transverse lombaire, en regard du pôle crâniale du rein (l'ovaire droit étant plus crâniale que le gauche) et en contact avec la paroi abdominale. Les ovaires sont donc très superficiels. En **Anoestrus les ovaires sont difficiles à observer.**

Au début des chaleurs apparaissent de petits follicules de 2 à 3 mm. (Figure ci-dessous).

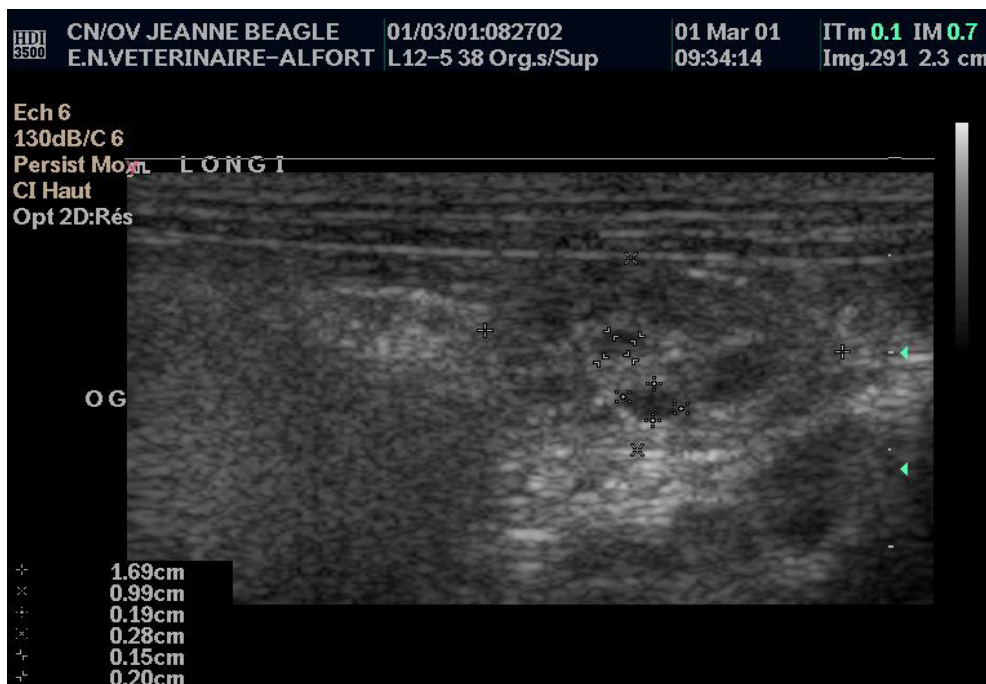
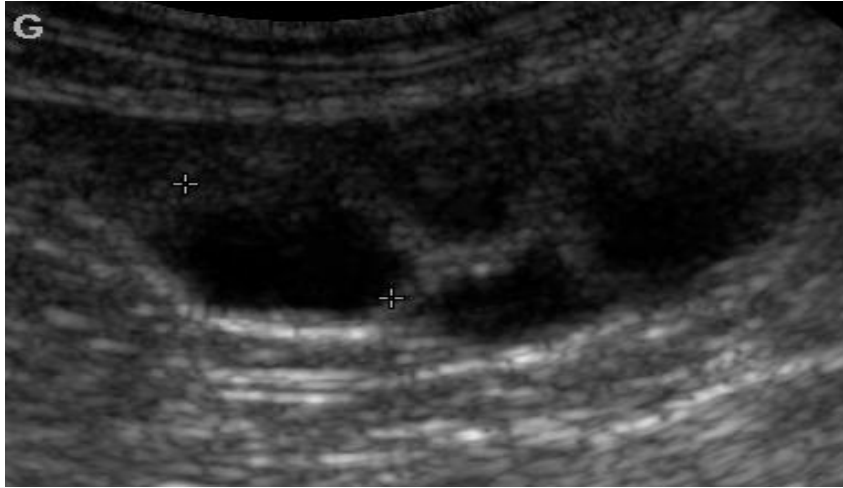


Figure N°29: Ovaire en proestrus. Fontbonne A. ©

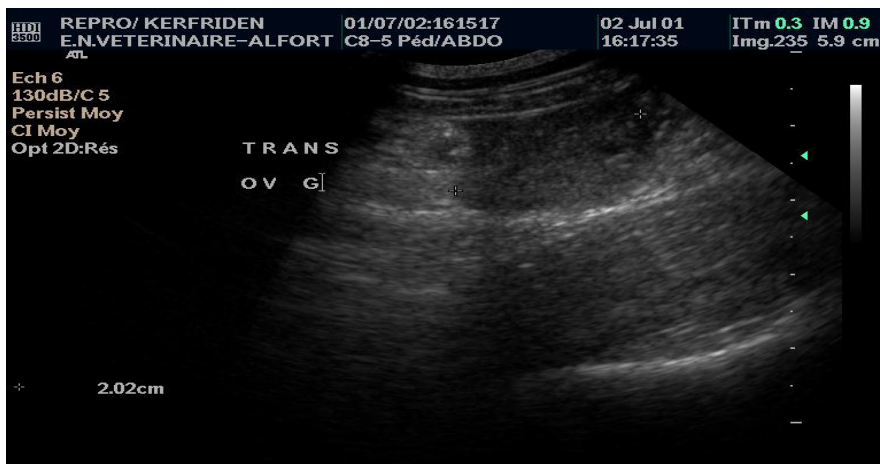
Les structures folliculaires ne sont pas encore bien délimitées et ont un aspect flou. La période pré-ovulatoire, la paroi de l'ovaire est très fine et les follicules sont de grande taille environ 5 mm (CONCANNON P. W., ENGLAND G., VERSTEGEN J., LINDE FORSBERG C 8 juin 2002).



**Figure N°30 :** Ovaire en période pré ovulatoire

La paroi est très fine donne un aspect de nid abeille a l'échographie (en rapport à la ressemblance avec les alvéoles fabriquées dans la ruche, les follicules sont de grandes taille 6 à 9 mm

Lorsque l'ovulation a eu lieu on remarque la disparition de certaines la cavité folliculaire plus fréquemment, tous les follicules n'ovulent pas. Parfois on observe la présence de liquide intra folliculaire entre l'ovaire et la bourse ovarique. On est alors très proche de l'ovulation



**Figure N°31:** Ovaire post-ovulatoire (disparition de follicules)

Les follicules ont libéré les ovocytes et ne sont donc plus visibles.



## **II) L'INDUCTION DES CHALEURS CHEZ LA CHIENNE**

Différents protocoles thérapeutiques sont proposés dans la littérature : le principe est de stimuler la folliculogénèse puis l'ovulation. L'intervention ne peut se faire qu'en Anœstrus tardif car pendant le metœstrus, le corps jaune inhibe l'axe hypothalamo-hypophysaire.

### **1. Protocoles utilisant des anti-prolactines**

L'utilisation de substances dopaminergiques est recommandée en première intention lors d'Anœstrus pathologique (>7mois d'interœstrus) : c'est l'effet dopaminergique central qui semble agir favorablement lors de cet effet inducteur de chaleurs. (Edwards RG, Howles CM, Macnamee MC, 1990). Cabergoline (GALASTOP®): 5µg/kg/jour pendant trois semaines. On obtient 70% de chaleurs induites dans le mois suivant le début du traitement, et un taux de fertilité dépassant 80 %. Si la chienne rentre en chaleurs avant la fin des trois semaines de traitement (cas fréquent), on peut stopper le traitement. (Nota : il existe une spécialité contenant de la cabergoline en médecine humaine (Dostinex®\*) : un peu moins onéreuse que le Galastop®). (Badinand F 1995).

Bromocryptine (Parlodel®): 20µg/kg 2 fois/jour pendant 30 à 40 jours. (Dumon C 1992).

La métergoline (Contralac®) ne possède un effet dopaminergique qu'à forte dose : elle est donc peu utilisée pour tenter d'induire des chaleurs. (Fontbonne A, Fontaine E, 2008).

L'utilisation en anticipation de l'œstrus (déclenchement moins de 7 mois après les dernières chaleurs) est très décevante. (Fontbonne A, Fontaine E, 2008).

### **2. Protocoles utilisant des gonadotrophines**

L'ECG (Chronogest-PMSG®), anciennement nommée PMSG, est une hormone à effet FSH, qui stimule la folliculogénèse.

L' hCG (Chorulon®) est une hormone à effet LH qui déclenche l'ovulation. Le protocole le plus souvent utilisé consiste en l'administration de 20 à 30UI/kg d'ECG pendant 5 à 9 jours, puis de 50UI/kg d'hCG au début de l'œstrus (frottis vaginal à fort index éosinophilique, ou follicules pré-ovulatoires visibles à l'échographie ovarienne), pour induire l'ovulation. L'efficacité est limitée, on obtient souvent à peine 50% de taux de gestation. Une insuffisance lutéale est souvent observée du fait de la mauvaise qualité des corps jaunes obtenus. (Fontbonne A, Fontaine E, 2008).

### **3. Utilisation d'agonistes de la GnRH.**

Technique peu utilisée car elle implique une administration pulsatile qui nécessite un matériel de perfusion très onéreux, ce qui est impossible en pratique. L'administration per os (comprimés) ou par voie parentérale (injections répétées) de façon discontinue est inefficace. A l'avenir, des implants d'agonistes de la GnRH (desloréline (OVUPLANT®), nafaréline (GONAZON®...)) devraient être commercialisés et pourraient permettre d'induire des chaleurs fertiles. (Dumon C 1992)



## Chapitre III :

### Insémination artificielle chez la chienne

L'insémination artificielle est une technique qui permet la reproduction sans contact physique entre les deux partenaires.

Après prélèvement et examen, le sperme peut être utilisé tel quel, réfrigéré ou congelé avant dépôt dans les voies génitales femelles

### **1) Historique**

La première insémination artificielle dans l'espèce canine a été relatée en 1787, d'après (Badinand F. 1998) Deux cent ans plus tard, en 1969, est pratiquée la première insémination artificielle en semence congelée aux U.S.A. (TAINTURIER D., BENCHARIF D., GUINTARD C2003.). En France, la première tentative date de 1982. (Badinand F. 1998) Jusqu'en 1989, moins de 500 inséminations en semence congelée chez la chienne ont été réalisées dans le monde (JOHNSTON S.D 2001). L'amélioration des techniques de congélation depuis 1970, permettra à cette méthode de devenir de plus en plus courante dans le monde de l'élevage.

### **2) Les indications de l'insémination artificielle**

Dans un premier temps il faut se pencher sur les raisons qui mènent les propriétaires à recourir à l'insémination artificielle pour leurs chiennes. En effet, nous allons voir qu'il existe de multiples indications à l'insémination artificielle, celle-ci se révélant parfois être le seul recours possible pour une mise à la reproduction.

#### **2.1. Problèmes de comportement**

##### **a) Incapacité du mâle à saillir la femelle**

(1) Défaut de libido : Il se peut que le mâle ait une libido atténuée voire même absente. Cela peut s'exprimer par une diminution physiologique de sécrétion de testostérone avec l'âge (JOHNSON, 2001). Cependant certaines races sont prédisposées au manque de libido : le Basset Hound, le Golden Retriever, le Colley, le Mastiff, le Scottish Terrier (GUERIN, 1997).

Certains chiens peuvent aussi être totalement inhibés, car leur mode de vie les a tenus éloignés de leurs congénères (par exemple les petites races vivant en appartement) (DUMON, 1992). Dans ce cas, le mâle tente plus ou moins de chevaucher la femelle, puis il se couche à ses côtés, satisfait. Ou bien il peut se montrer agressif envers la femelle.

(2) Mâle inexpérimenté : Les mâles trop jeunes, peuvent être capables d'éjaculations spontanées, cependant, celles-ci peuvent s'avérer trop précoces et souvent extra-vaginales.

Le manque d'expérience les rend maladroits. Il est important de présenter les jeunes males a des femelles expérimentées et non –agressives, car sinon il y a un risque de « blocage » du male lors de saillies ultérieures.

### **b) Refus d'accouplement par la femelle**

Chez des femelles très dominantes qui se montrent très agressives envers le male choisi. Elles refusent alors catégoriquement le chevauchement, même si elles sont normalement en période d'acceptation du male. C'est le cas des chiennes de garde et de défense (ex : Chow-chow, Rottweiler).

D'autres vont avoir leur préférence pour un étalon, et refuseront tout autre qu'on leur proposera. Enfin, certaines chiennes auront encore en mémoire un précédent coït douloureux, et refuseront alors l'accouplement.

## **2.2. Les raisons médicales**

### **a) Douleurs ostéo-articulaires**

Le chevauchement peut déclencher des douleurs ostéo-articulaires si la chienne a de l'arthrose ou toute autre lésion, au niveau des hanches ou de la colonne vertébrale. Si le poids du male est important, la douleur risque d'être d'autant plus forte.

### **b) Malformations congénitales ou acquises de la femelle**

Il existe de nombreuses malformations congénitales de l'appareil génital femelle qui vont compromettre la saillie ou même des anomalies acquises suite a des traumatismes (GUERIN, 1997).

**Strictions des voies génitales** : une chienne peut présenter une ou plusieurs strictions sous la forme de bandes fibreuses au niveau de la jonction vulve vestibule ou dans le vagin. Ces strictions empêchent l'intromission du pénis de l'étalon et provoquent une douleur intense pour la chienne. Cela peut dans certains cas s'accompagner d'infections urinaires chroniques, et même d'incontinence urinaire (KYLE, et al., 1996).

**Angulation anormale de la vulve** : la vulve est trop horizontale, cela empêche également une intromission normale du pénis. Cela se révèle aussi douloureux pour la femelle.

**Hyperplasie vaginale** : c'est une réponse anarchique du tissu vaginal et vestibulaire, a un taux pourtant normal d'œstrogènes lors du pro-œstrus et de l'œstrus. La muqueuse du plancher du vagin s'hypertrophie, s'œdématie et présente une hyperhémie. Celle-ci empêche

également la pénétration. Les races prédisposées sont les races brachycéphales, notamment le Boxer, le Carlin, et le Mastiff. Cependant, cette affection peut se rencontrer dans d'autres races.

**Vulve souvent atrésique** chez le Colley, et **vulve barrée** c'est à dire qu'un repli transversal couvre l'orifice de la vulve, c'est le cas notamment chez les Bergers Picards (GUERIN, 1997). Des replis vaginaux importants peuvent être présents chez des races brachycéphales comme le Mastiff et le Carlin. Il faut également se méfier de l'abondance de poils chez certaines races, qui peut faire obstacle entre le pénis du male et la vulve de la femelle (ex : Bobtail, certains Terriers).

#### **c) Fracture de l'os pénien chez le mâle**

La fracture de l'os pénien du chien est très souvent occasionnée lors d'une saillie et provoque une vive douleur. Hormis la réticence du male à la saillie (due au souvenir de cette douleur), la fracture entraîne la formation d'une cal osseuse et une déformation du pénis empêchant la pénétration.

#### **d) Disproportion des reproducteurs**

Dans certaines races il existe une différence physiologique de taille ou de corpulence (ex : Bulldog Anglais, Matin de Naples...). Ces disproportions se retrouvent souvent chez les très petites races ou les races géantes. Un problème d'obésité chez le male peut rendre impossible le chevauchement, du fait d'une charge trop importante à supporter pour la femelle.

### **2.3. Les raisons sanitaires**

L'insémination artificielle évite tout contact physique entre les reproducteurs. Ainsi la contamination par certaines maladies peut être évitée, comme des maladies parasitaires par exemple. Cependant c'est dans le cas d'une maladie comme la Brucellose que les raisons sanitaires montrent toute leur importance. En effet, c'est une maladie transmise par voie vénérienne qui a de graves conséquences sur la reproduction. L'insémination artificielle n'empêche cependant que la contamination du male par la femelle, puisqu'elle reçoit la semence de celui-ci. Une sérologie Brucellose est donc indiquée pour l'étalon.

L'insémination artificielle peut aussi être intéressante pour limiter une contamination par l'herpe virus canin (THEBAULT, 2004).

## 2.4. Eloignement géographique des reproducteurs

### a) Eloignement géographique

Dans certains cas, même si les reproducteurs sont aptes à la saillie et que les conditions sanitaires sont réunies, leur rencontre ne sera pas possible du fait d'un éloignement géographique trop important. Il peut s'avérer fastidieux et coûteux de déplacer un reproducteur. Le transport de la femelle peut même contribuer à diminuer sa fertilité. En effet le stress occasionné par le voyage peut provoquer une décharge de glucocorticoïdes, qui peut provoquer une baisse de LH.

### b) Eloignement « temporel »

C'est une indication exclusive de l'insémination artificielle en semence congelée. En effet, la durée de conservation de la semence congelée en azote liquide est quasi-illimitée (FONTBONNE, 1992). Cela rend alors possible le fait d'inséminer avec la semence d'un male trop âgé pour se reproduire (malade, ou qualité de sperme altérée), ou même d'un étalon décède.

## 2.5. Choix du moment de l'accouplement inadapté

Il s'agit surtout d'une indication pour un suivi de chaleur rigoureux avant celle d'une insémination artificielle. Théoriquement, dans 80 % des cas, la chienne recherche le male entre le 9ème et le 13ème jour des chaleurs, c'est à dire au moment de l'ovulation. Toutefois, certaines chiennes peuvent ovuler de façon précoce, dès le 7ème jour, ou tardive, après le 14ème jour (DUMOND, et al., 1990).

La date du premier jour des chaleurs n'est pas toujours facile à déterminer. Certaines chiennes ne présentent pas d'œdème vulvaire et gardent une vulve petite, non modifiée. D'autres peuvent attirer les males sans être en chaleur (infection urinaire, vaginite, métrite).

Certaines chiennes peuvent présenter d'autres modifications du cycle œstral :

- ✚ Les **chaleurs peuvent aussi être silencieuses**, ou les signes de pro-œstrus peuvent être très discrets, et de ce fait, le moment de l'ovulation est difficile à détecter.
- ✚ Il existe aussi des **cycles non-ovulatoires**. La chienne présente une augmentation du taux d'œstrogènes, mais le pic de LH entraînant l'ovulation ne se fait pas. Il n'y a donc pas non plus d'augmentation du taux de progestérone.
- ✚ Chez certaines les chaleurs sont dites « atypiques ». Dans ce cas la chienne entre en pro-œstrus, présente des pertes hémorragiques vaginales, et attire les males. Cependant

elle peut ne pas entrer en œstrus tout en restant en chaleur, ou les signes de pro-œstrus disparaissent brutalement et réapparaissent deux à dix 20 semaines plus tard. L'ovulation se produit généralement au cours du dernier cycle court

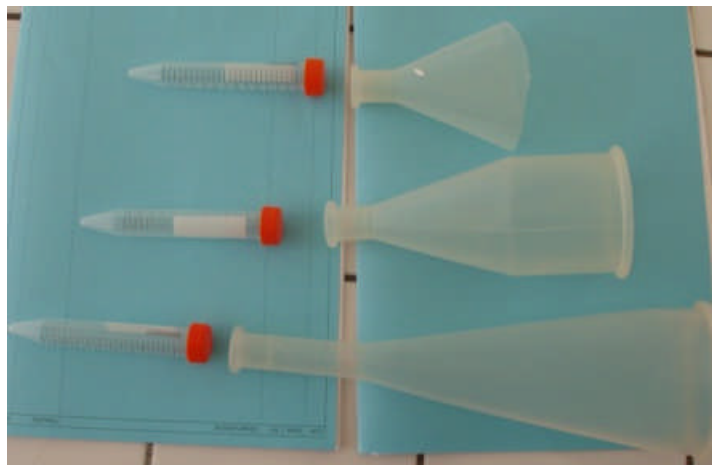
### **3) La réalisation de l'insémination**

#### **A. Prélèvement et évaluation de la semence du mâle**

##### **1. Prélèvement du sperme**

**a) Matériel de récolte :** La méthode la plus utilisée actuellement reste le prélèvement manuel. Celui-ci est relativement simple chez le chien, mais requière quelques précautions. Il permet de réaliser une insémination en semence fraîche en présence du male et de la femelle, de conditionner une semence à diluer en vue d'une insémination en semence congelée ou réfrigérée, ou de mettre en œuvre un spermogramme dans le cadre d'un diagnostic d'infertilité. La technique d'électrostimulation existe chez le chien comme chez les bovins, cependant, c'est une méthode plus lourde qui nécessite une anesthésie, et qui peut mener à une contamination du sperme par l'urine. Quant à la méthode de récolte à l'aide d'un vagin artificiel, bien que se rapprochant plus des conditions naturelles, elle reste également plus compliquée à réaliser en routine chez le chien.

Le prélèvement manuel se fait grâce à des cônes en plastique souple ou en Caoutchouc, reliés à des tubes de récolte. Il existe deux tailles de cônes. Les tubes de récoltes sont des tubes de centrifugation en polystyrène cristal, incassables (évite des blessures), et gradués. Il est préférable de tiédir les cônes dans une étuve avant le prélèvement, afin d'éviter l'inhibition de l'érection due au froid. Le nettoyage du matériel de récolte doit être minutieux pour éviter la dissémination de germes entre animaux. Les détergents ménagers sont pour la plupart spermicides, il convient donc de procéder à un rinçage parfait.



**Figure N°32 :** Matériel nécessaire à la récolte du sperme chez le chien.



(En haut cône pour chien de petite taille, au milieu pour chien de taille moyenne,  
en bas pour chien de grande taille)

**b) Déroulement de la récolte**

La récolte doit se faire dans un endroit calme, de petite superficie, avec un sol non glissant. La présence d'une chienne en chaleurs est conseillée. Cependant certains chiens peuvent éjaculer avec la stimulation manuelle en présence d'une chienne qui n'est pas en chaleurs, voire même en l'absence de chienne (JOHNSON, 2001). Si la femelle n'est pas en Chaleurs, il est possible d'utiliser des phéromones de synthèse de femelle en chaleurs (méthyle p-hydrox benzoate) ou des sécrétions vaginales de femelle en chaleurs, conservées congelées sur des compresses, qui seront déposées sur la vulve de la chienne (KUTZLER, 2005).

Il faut éviter la présence d'un trop grand nombre de personnes autour du chien. Le propriétaire pourra être présent afin de mettre le chien en confiance, mais son absence sera souhaitée s'il communique son stress à l'animal. Selon les cas, le vétérinaire pourra penser à retirer sa blouse blanche.

La récolte s'effectue en général au sol, nombre de chiens refusant de saillir quand ils sont sur un plan élève. D'une main, le vétérinaire doit masser fermement et rapidement la base du pénis et, de l'autre, remonter le fourreau en arrière des bulbes érectiles tout en coiffant le cône sur la verge durcie dès le début du prélèvement. Une striction entre le pouce et l'index en arrière des bulbes érectiles est mise en place. Quand le chien est suffisamment en érection, le fourreau reste naturellement en arrière des bulbes érectiles (sauf en cas de paraphimosis) (ROUSSET, et al., 2008). A cet instant, le chien essaie souvent de chevaucher la chienne. Si celle-ci y consent, on peut le laisser faire. La chienne peut être muselée en prévention d'une éventuelle morsure (dirigée contre le chien ou l'opérateur).



**Figure N°33 a : Début de la récolte.**

La tête du chien est maintenue par le propriétaire et orientée vers l'arrière train de la femelle. Massage en arrière des bulbes, retrait du fourreau et application d'une pression en arrière des bulbes.



**Figure N°33 b : Soulèvement d'un postérieur.**



Deuxième phase

Echange des cônes pour récupérer la troisième phase

**Figure N°33 c : Orientation caudale du pénis.**

Après la récolte, le chien est promené plusieurs minutes afin de faciliter le recalottage du pénis dans le fourreau. Avant le départ du chien, il est important de vérifier que le pénis est entièrement recouvert par le prépuce et qu'il n'y a pas de poils coincés dans l'orifice préputial ni d'éversion de la membrane préputiale (Kutzler, 2005)

### **c) Causes d'échec de la récolte**

Il existe des causes :

- **Liées au chien.** Il peut y avoir des échecs de récolte lorsque le chien est trop âgé ou au contraire lorsqu'il est jeune et inexpérimenté, lorsque le chien a eu des expériences sexuelles négatives ou enfin lorsqu'il souffre d'une pathologie de l'appareil urogénital telle qu'une fracture ancienne de l'os pénien ou des calculs urétraux ;

- **Liées à l'environnement** comme un excès de bruit ou un nombre trop important de personnes ;

- **Liés à l'expérimentateur.** Une masturbation trop ferme ou à l'inverse trop douce peut aboutir à un échec du prélèvement. (Fontbonne et Dumont, 1992 ; Feldman et Nelson, 1987)

### **2 Stockage de la semence après la récolte.**

La semence est sensible au froid qui entraîne un choc thermique mais également au chaud. La semence doit donc être conservée à température ambiante durant son évaluation. (Fontbonne et Dumont, 1992).

### **3 Les phases de l'éjaculat du chien**

Le sperme du chien est constitué de trois phases émises successivement pendant l'éjaculation : les phases urétrale, spermatique et prostatique, toutes séparées d'un temps de pause d'une à deux secondes.

**La phase urétrale :** est émise par la prostate au cours de l'excitation pendant vingt à trente secondes. Elle est transparente, a un volume de un à trois millilitres et sert de lubrifiant.

**La phase spermatique** a un volume semblable, elle est de couleur laiteuse et est émise lorsque l'érection est maximale, c'est-à-dire lorsque les coups de reins cessent. Elle est éjaculée pendant trente à soixante secondes grâce à des contractions de l'épididyme qui chassent les spermatozoïdes vers le canal déférent. Elle contient donc les spermatozoïdes et c'est elle qui est observée au microscope pour évaluer la qualité de la semence.

**La phase prostatique** est la plus volumineuse (dix à trente millilitres, jusqu'à 80 millilitres pour certains mâles de race géante). Elle sert principalement à augmenter le volume du sperme (dilueurs) et à protéger les spermatozoïdes lors de leur trajet dans les voies génitales femelles. Son émission est longue (jusqu'à vingt minutes) et intervient lors de la

phase d'accolement .Elle est d'apparence transparente et claire. Comme son nom l'indique, elle est secrétée par la prostate.

Le sperme du chien ne coagule pas et reste liquide.

#### **4. Examen de la semence**

##### **le spermogramme**

La qualité du sperme du chien peut varier en fonction des conditions dans lequel se trouve le chien. En effet, les conditions de prélèvement, l'expérience du chien, son état de sante, son âge ou encore la saison, sont autant de paramètres qui peuvent influencer la qualité de la semence. Il s'avère donc important de d'analyser la semence prélevée, et cela de manière rapide afin de ne pas altérer ses qualités.

##### **a) L'aspect macroscopique**

Le spermogramme comprend l'analyse des propriétés physico-chimiques de la semence, et celle de la mobilité, de la morphologie et la numération des spermatozoïdes.

Afin de pouvoir réaliser une analyse complète, il convient d'avoir récolte les trois phases de l'éjaculat, si possible dans trois tubes distincts, afin de pouvoir contrôler le pH, le volume et la couleur de chaque fraction (ROUSSET, et al., 2008).

##### **1 La couleur**

L'observation de la couleur du sperme peut déjà nous donner quelques renseignements. En effet de nombreux facteurs agissent sur la couleur de l'éjaculat : la concentration en spermatozoïdes, mais aussi la présence d'autres éléments comme du pus, du sang, des cellules inflammatoires.

Incolore : absence de spermatozoïdes

Jaune clair a verdâtre : présence d'urine ou de pus, ou coloration due a des caroténoïdes (origine alimentaire)

Rosee a rougeâtre : hemospermie (le plus souvent a cause d'une affection prostatique, ou d'un traumatisme pénien), ou administration de phénothiazines

Brun : présence d'hémoglobine ou d'éléments sanguins dégénères

Augmentation de l'opacité : témoin d'une dégénérescence testiculaire, avec un passage de cellules géantes

##### **2 L'odeur**

Le sperme est inodore, sauf dans le cas ou il est contamine par de l'urine, ou du pus (cas d'une prostatite).

### **3 La viscosité**

Elle dépend directement de la concentration en spermatozoïdes, de la charge et de la conductibilité électrique.

#### **4 Le pH**

On le mesure à l'aide d'un pH-mètre ou avec du papier pH. Il doit être compris entre 6,3 et 6,6, avec quelques variations entre les différentes fractions.

La vitesse suivant laquelle l'acidité augmente après l'éjaculation, présente plus de signification pour l'estimation de la qualité de la semence que la valeur initiale du pH de celle-ci. Ce phénomène est fonction de l'activité glycolytique réelle des spermatozoïdes. Le métabolisme des spermatozoïdes, en milieu anaérobie, fournit de l'acide lactique, et le pH diminue. Cette variation de pH est fonction également de la densité et de la mobilité des spermatozoïdes.

#### **5 Le volume**

Il se mesure à l'aide d'un tube gradué. Le chien est une espèce à éjaculation de type vaginal et dont le sperme est abondant et peu concentré. Le volume de l'éjaculat total est compris entre 3,5 et 25 ml environ, avec une moyenne de 7 ml. C'est essentiellement la fraction prostatique qui détermine le volume total, le volume de la fraction spermatique ne variant pas dans des proportions importantes.

### **b) L'étude microscopique**

#### **1 Appréciation de la mobilité**

La mobilité des spermatozoïdes doit être évaluée rapidement après la récolte. Cette méthode est subjective, soumise à l'interprétation du manipulateur, cependant elle renseigne déjà sur la mobilité approximative des spermatozoïdes et donc la qualité de la semence.

**La mobilité de masse :** Une goutte de sperme non diluée est déposée sur une lame, et idéalement examinée sur la platine chauffante du microscope à une température comprise entre 37 et 38°C. Cette précaution permet d'éviter les chocs thermiques, très nocifs pour les spermatozoïdes. On observe la lame à un faible grossissement (X100).

Si on observe des vagues, des mouvements amples d'ensemble, provoqués par la réunion puis la dispersion des spermatozoïdes, c'est souvent le signe d'une bonne vitalité des gamètes, et d'une concentration élevée de la semence. Il est possible de chiffrer la mobilité, avec une certaine habitude, en utilisant différentes échelles de valeurs. Ci-dessous

**Tableau N°6 :** l'échelle de valeurs de la mobilité de masse de la semence du chien qui a été codifiée par MILOVANOV (GUIGARDET, 1997).

Note	Interprétation
0	Spermatozoïdes immobiles
1	Spermatozoïdes en mouvement mais pas de mouvement d'ensemble
2	Ebauche de mouvements d'ensemble circulaires
3	Mouvements d'ensemble : cercles centrés sur eux-mêmes
4	Mouvements d'ensemble : vagues rondes en mouvement
5	Mouvements d'ensemble intensifiés

**La mobilité individuelle :** Le sperme est dilué au dixième dans un soluté isotonique de chlorure de sodium, et est examiné au fort grossissement (X400). Cela nous permet d'évaluer le pourcentage de gamètes mobiles, et leur degré de motilité. Les spermatozoïdes se déplacent grâce aux mouvements ondulatoires de la queue, associés à une rotation autour de leur axe longitudinal, de telle sorte que leur progression est rectiligne (spermatozoïdes fléchant).

Ces résultats sont subjectifs, mais les études montrent que lorsque l'opérateur est expérimenté, les estimations du pourcentage de mobilité sont tout à fait correctes. Une échelle est proposée par SEAGER et PLATZ.

**Tableau N°7 :** Echelle de mobilité individuelle des spermatozoïdes de SEAGER et PLATZ.

Note	Interprétation
0	Tous les spermatozoïdes sont morts
1	Lents mouvements oscillatoires, pas de progression rectiligne
2	Rapides mouvements oscillatoires, pas de progression rectiligne
3	Mouvements rapides oscillatoires, progression occasionnelle
4	Progression lente mais régulière
5	Progression rapide et régulière

Un sperme de bonne qualité présentera plus de 70 % de spermatozoïdes fléchant (LINDE-FORSBERG, 1995), avec un degré de mobilité de coefficient 5. En dessous de 50 % la fertilité diminue et la semence doit être rejetée.

On parle d'asthenospermie lorsque les spermatozoïdes ont une mobilité réduite. Même s'il existe des fécondations avec des semences peu mobiles, la corrélation entre mobilité et fertilité est considérée comme bonne.

Il existe quelques systèmes automatisés qui évaluent la mobilité des gamètes, permettant d'obtenir de nombreux paramètres objectifs en évaluant un très grand nombre de spermatozoïdes en très peu de temps. Les principaux inconvénients de ces systèmes automatisés sont leur coût, la nécessité de leur validation et de leur standardisation. Mais, une fois standardisés, ils montrent une très grande répétabilité, avec des coefficients de variation inférieurs à 10 %. Ils s'avèrent donc très utiles pour évaluer de façon objective et précise la mobilité des spermatozoïdes (FUERTES, 2008).

## **2 La numération des spermatozoïdes**

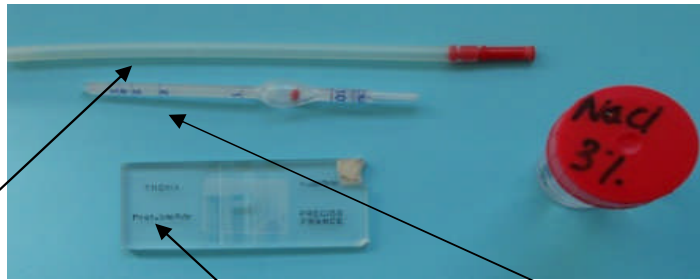
On peut effectuer en routine, la numération à l'aide d'une cellule hématimétrique : cellule de Thomas ou de Malassez. Cette cellule est constituée d'un plateau de verre quadrillé en 100 rectangles mesurant chacun 0,20 x 0,25 mm, dont 25 sont eux-mêmes divisés en 20 petits carreaux. Deux gouttières bordent ce plateau, et une lamelle le surmonte. La hauteur entre la lame et le plateau est de 0,20 mm, le volume contenu dans 100 rectangles est donc de 1 mm<sup>3</sup>.

On réalise en général une dilution au 1/100<sup>ème</sup> dans une solution saline hypertonique de chlorure de sodium à 3 %. L'utilisation de cette solution hypertonique permet d'immobiliser les spermatozoïdes. Il est important d'avoir un échantillon bien représentatif, c'est-à-dire homogène et bien dilué.

À l'aide d'une pipette on dépose une goutte de semence diluée, et celle-ci migre par capillarité sous la lamelle. On observe la préparation au grossissement X400. Par convention, les spermatozoïdes situés sur le haut et le côté gauche du carré sont pris en compte, et on ignore donc ceux situés en bas à droite.

Afin d'obtenir le nombre de spermatozoïdes par millilitre (N), il suffit d'affecter un coefficient multiplicateur :  $N = n \times 10 \times \text{dilution}$  avec n le nombre de spermatozoïdes dans 10 rectangles.

La concentration spermatique obtenue doit être pondérée par le volume total de l'éjaculat. Le nombre total de spermatozoïdes par éjaculat doit être compris entre 200 et 500 millions pour un chien de 15 kg.



Embout raccordé au mélangeur

Mélangeur de Potain

Cellule de thomas

de Potain. Utilisé pour aspirer la semence et la solution de Na Cl.

**Figure N°34:** Matériel nécessaire au comptage des spermatozoïdes.

Il faut rappeler que la proportion de spermatozoïdes varie en fonction des fractions de l'éjaculat :

- Fraction urétrale :  $<3.10^6$  spz/ml
- Fraction epididymaire :  $400.10^6$  spz/ml
- Fraction prostatique : rare spermatozoïdes
- Ejaculat total : environ  $400.10^6$  spz/ml

Quand les spermatozoïdes sont en quantité insuffisante, on parle d'oligospermie, et une absence de spermatozoïdes est appelée azoospermie. Pour inséminer une chienne, il convient d'avoir un éjaculat d'environ 150 millions de spermatozoïdes normaux et mobiles.

Le nombre total de spermatozoïdes diminue lors de prélèvements fréquents (et a moins de 48h d'intervalle), probablement du fait de la diminution des réserves epididymaire (ROOTKUSTRITZ, 2007).

On peut également citer d'autres méthodes existantes pour comptabiliser les spermatozoïdes, telles : la spectrophotométrie, la cryométrie de flux ou encore le système Hamilton-Thorne.

### 3 Le spermocytogramme

Réaliser un spermocytogramme consiste à analyser la morphologie des et à déterminer le pourcentage de spermatozoïdes normaux et anormaux.

(a) **Intérêts** : L'analyse morphologique est importante pour pouvoir expliquer une non-fécondité. En effet, la présence d'une anomalie spécifique très largement majoritaire dans un spermogramme, est souvent associée à une stérilité ou une fécondité faible du chien. Des



spermatozoïdes anormaux peuvent être vivants et mobiles. Leur nombre croissant peut être le témoin d'une anomalie au niveau de l'appareil sexuel, et notamment :

- Un dysfonctionnement hormonal,
- Une immaturité sexuelle,
- Une inflammation des glandes annexes,
- Des phénomènes dégénératifs de l'épithélium séminifère,
- Une dégénérescence testiculaire (le maintien d'une gouttelette en position proximale de la pièce intermédiaire est un bon indicateur).

Une quantité trop importante de spermatozoïdes anormaux se nomme une **teratozoospermie**. Le taux d'anomalie ne doit pas excéder 30 %, car les spermatozoïdes anormaux diminuent le pouvoir fécondant de la semence (Feldman, et al., 2004).

L'avenir du chien en tant que reproducteur est fonction du type d'anomalie. Si plus de 10% des anomalies sont de type primaire (c'est à dire d'origine testiculaire), le pronostic reproducteur est limité à long terme.

**(b) Méthode ;** L'analyse morphologique est réalisée après coloration à l'éosine-nigrosine et étalement sur lame à la manière d'un frottis sanguin. Une goutte de colorant est mise en contact avec une goutte de fraction spermatique et mélangée avec précaution. Le concept de cette coloration repose sur le marquage des cellules mortes par l'éosine, et un fond de nigrosine pour améliorer le contraste. Lors de la mort d'une cellule, l'architecture membranaire change, et autorise ainsi la pénétration de l'éosine.

### **(c) Les différentes anomalies observables**

On peut classer ces anomalies en fonction de leur sévérité. Les anomalies majeures surviennent pendant la spermatogenèse, et les anomalies mineures qui surviennent durant le stockage des spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme, la récolte de la semence ou la préparation de la lame.

#### **Anomalie majeures :**

- o Gouttelettes cytoplasmiques proximales (dégénérescence testiculaire)
- o Têtes piriformes
- o Queue bouclée et enroulée en chignon, ou queue enroulée autour de la tête
- o Déformation de la pièce intermédiaire
- o Spermatozoïdes mal développés

o Cratères au niveau de la tête

**Anomalies mineures :**

- o Gouttelettes cytoplasmiques distales
- o Têtes normales sans queue
- o Queues repliées ou enroulées a l'extrémité
- o Têtes étroites, petites ou géantes
- o Implantation abaxiale
- o Acrosomes anormaux (plisses, détaches)

**(d) Test hypo-osmotique: test HOS**

Le test hypo-osmotique permet d'évaluer l'intégrité de la membrane plasmique du flagelle des spermatozoïdes (DUFOUR, 1998). Cette membrane est a la fois importante dans le métabolisme et la capacitation des spermatozoïdes, et dans la fécondation de l'ovule.

Le principe de ce test consiste a plonger les cellules dans un milieu hypo-osmotique (mélange de citrate de sodium, ou de fructose et eau), et de voir si les cellules se gorgent d'eau selon le gradient osmotique. Ainsi, les spermatozoïdes dont la membrane plasmique est intacte et fonctionnelle, vont se gorger d'eau et montrer une incurvation de leur flagelle ou un gonflement de celui-ci. En revanche, l'absence d'observation de gonflement souligne le défaut d'intégrité de la membrane plasmique. Celle-ci a alors permis le passage d'ion et d'eau, perturbant le gradient osmotique.

Ce test permet de prédire la viabilité du sperme lors d'asthenospermie. Il est peu couteux, rapide et quasi extemporané.

Les différents examens décrits précédemment permettent de conserver une semence de qualité, et donc d'améliorer le pourcentage de réussite des inséminations.

**B. Les différentes techniques de l'insémination artificielle**

Aujourd'hui, c'est l'insémination en semence fraiche qui reste la plus utilisée en pratique courante. Elle est de réalisation plus facile, c'est une insémination intra-vaginale. Cependant les techniques a partir de semence réfrigérée ou congelée se démocratisent progressivement. Dans le cas de l'utilisation de semence réfrigérée de mauvaise qualité, ou de sperme congèle, l'insémination est réalisée après passage du col utérin, en déposant la semence directement dans l'utérus. Pour cela plusieurs méthodes sont possibles : a travers le col de l'utérus par cathétérisme, qui est possible avec ou sans contrôle endoscopique, ou directement dans les cornes utérines après laparoscopie (BLENDINGER, 2007).

**b\_1) Les différents types de l'inséminations artificielle**

Il existe trois moyens d'effectuer une insémination artificielle :

- Insémination en **semence fraîche (IAF)**
- Insémination en **semence réfrigérée (IAR)**
- Insémination en **semence congelée (IAC)**

Les principales différences se situent dans la préparation et dans les indications. En matière d'insémination canine il convient de différencier l'insémination en semence fraîche, facile à réaliser, des autres méthodes, où il est plus difficile d'obtenir les mêmes résultats que dans d'autres espèces animales. Le pourcentage de succès dépend principalement de la maîtrise des techniques, mais aussi de la détermination de la date de l'accouplement.

### L'insémination artificielle en semence fraîche (*Méthode intra vaginale*)

#### a) *Matériel et technique d'insémination*

En semence fraîche, la technique la plus utilisée est l'insémination intra-vaginale. La totalité de l'éjaculat du male est prélevée en présence de la chienne à inséminer, contrôlée au microscope, puis immédiatement réintroduite dans les voies génitales de la chienne (au fond du vagin) en période optimale pour la fécondation. Très souvent, seules les fractions spermatiques et prostatiques de l'éjaculat sont utilisées. L'insémination se fait à l'aide d'un dispositif non traumatisant, adapté à l'anatomie des voies génitales de la femelle, appelé pistolet OSIRIS (DUMOND, et al., 1990)

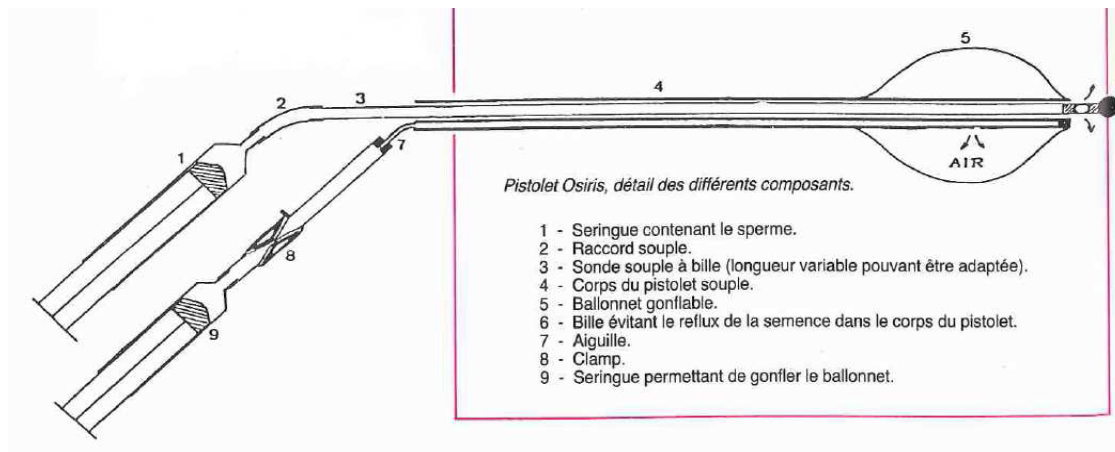


Figure 35 : Pistolet OSIRIS (DUMOND, et al., 1990).

C'est un système qui mime les conditions de la saillie naturelle. Il est formé d'une sonde souple avec conduit télescopique à l'extrémité de laquelle se trouve un ballonnet gonflable. Ce ballonnet simule le gonflement des corps caverneux du male, stimule les

contractions vaginales de la chienne, et évite le reflux de sperme dans le vagin. Cela permet de faciliter le passage des spermatozoïdes vers l'utérus.

Cependant l'utilisation de ce ballonnet est parfois contraignante, et l'étanchéité n'est pas toujours parfaite. C'est la raison pour laquelle son utilisation est parfois abandonnée. La sonde télescopique est terminée par une bille qui permet de déposer le sperme contre le col de l'utérus sans risque de lésion, et qui empêche ainsi le reflux de la semence dans le corps du pistolet. Ce dispositif doit être stérile pour éviter tout risque d'infection.

**Matériel nécessaire pour l'insémination à semence fraîche :**

Seringue stériles de 5 ou 10 ml sans piston en caoutchouc

Aiguilles longues roses stériles

Lames porte-objet, Lamelles, Pipettes Pasteur stériles, Bain-marie

Microscope a platine chauffante, Etuve, Porte-tube

Papier absorbant, Glycérine (pour la lubrification du vagin)

Sonde d'insémination OSIRIS

Tout ce matériel doit impérativement être a une température de 37°C.

**Utilisation du pistolet OSIRIS**

La sonde souple est introduite dans le vagin sans speculum jusqu'au col de l'utérus.

Le ballonnet est gonfle a l'aide de la seringue. Le conduit est ensuite clampe pour éviter qu'il ne se dégonfle. Le sperme de l'étalon choisi est aspire dans une autre seringue. Cette dernière est reliée a la sonde télescopique souple. La sonde est remplie, poussée vers l'avant et le sperme est injecte. A la fin de l'opération, 1 a 2 ml d'air sont insuffles afin qu'il ne reste pas de sperme dans la sonde. La sonde est ensuite doucement tirée vers l'arrière.

Sa bille terminale obstrue l'orifice antérieur du pistolet, empêchant tout reflux de la semence. Le pistolet est laisse ainsi en place une dizaine de minutes. Il est conseille de surélever le train postérieur de la chienne pendant 10 a 20 minutes, afin d'accélérer la pénétration des spermatozoïdes au travers du col utérin par gravite, et de pratiquer un massage du plafond du vagin pour stimuler les contractions vaginales. Puis le ballonnet est dégonflé et le pistolet est retire doucement de la vulve

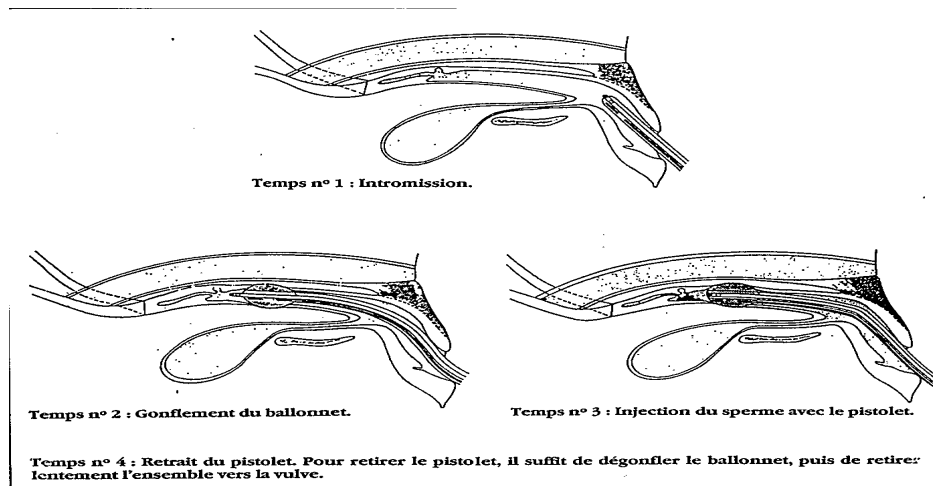


Figure N°36 : Différentes étapes de l'utilisation du pistolet Osiris (Mialot et al ; 1985)

### *b) Résultats*

L'insémination est réalisée deux fois à 48 heures d'intervalle. Lorsque le protocole est bien respecté, que la chienne a été correctement suivie au cours de ses chaleurs pour déterminer le moment optimal pour la fécondation, les résultats de la technique sont excellents. En effet le taux de gestation atteint 81,8% (NIZANSKI, 2006), et peut même varier de 80 à 85% avec une prolificité de 5,7 chiots en moyenne (DESNOIZE, 1998). Cela donne des résultats de prolificité identiques à une saillie naturelle, ce qui est très valorisant pour le praticien.

Les résultats obtenus en insémination artificielle sont aussi moins bons si l'insémination n'est pas uniquement due à un refus d'accouplement, mais fait suite à des traitements hormonaux pour infertilité, ou si la semence utilisée est de qualité moyenne (BADINAND, et al, 1998).

### **L'insémination artificielle avec de la semence réfrigérée :**

Le recours aux techniques d'inséminations artificielles, atteint son maximum avantage zootechnique ou génétique lorsque la semence est soumise à un traitement avec le froid (congélation ou réfrigération). De cette façon l'utilisation du matériel séminal est déplacé dans le temps ou dans l'espace ; on peut couvrir une lice de 2 à 4 jours après la récolte et distante de nombreux km du reproducteur.

De cette manière, les coûts de transport pour les reproducteurs et l'introduction de nouvelles lignées, pour l'amélioration génétique de la progéniture, devient plus accessible utilisant la semence de reproducteurs de pays différents.

Pour la semence réfrigérée les indications comportementales, organiques et sanitaires sont égales à celles citées précédemment pour la semence fraîche.

Le procédé qui permet à la semence canine de rester vitale, pour une brève période de temps à l'extérieur des voies génitales (2-4 jours), prévoit l'ajout de dilueurs qui lui permettent la survivance à une température de entre +4° et +6°C.

La semence une fois préparée, est transportée avec grande facilité (transport express) et maintenue à température de réfrigération au moyen de l'utilisation de simples containers (thermos et boîte polystyrène).

### **L'insémination en semence congelée**

En abaissant ultérieurement la température de conservation on arrive à la congélation de la semence. Pour cela il est nécessaire d'avoir des notions de cryobiologie, un matériel assez coûteux et le moyen de congélation l'azote liquide. Aussi cette technique prévoit l'ajout, seulement à la phase spermatique de l'éjaculat, de dilueurs spécifiques contenant des cryoprotecteurs, le plus commun est le glycérol. Celui-ci a la fonction d'éviter la formation de cristaux de glace à l'intérieur de la cellule spermatique. Les dilueurs utilisés dans le processus de congélation, ont aussi la fonction de permettre aux spermatozoïdes de résister à la phase de décongélation, où ils sont ramenés à une température corporelle de 37°.

Le passage de -196°C, qui est la température de conservation de la semence congelée, à la température corporelle en quelques secondes, est une phase très délicate. Sans l'ajout de substances nutritives et des cryoprotecteurs, une fois décongelée, la semence serait seulement constituée de spermatozoïdes morts. Les phases successives de préparation une centrifugation, une resuspension avec ajout de dilueurs, et ensuite la répartition dans de fins tubes de plastic appelés paillettes.

Dans le commerce, il en existe de différents types, de 0.25 ml, de 0,5 ml ou pellets de 1 ml ; les doses d'insémination sont constituées d'un certain nombre de paillettes, selon les critères choisis pour la congélation. Avant d'être congelée, la semence est préalablement refroidie à une température de +4°C, et ensuite, au moyen d'un congélateur spécifique et des vapeurs d'azote, progressivement refroidie jusqu'à sa congélation (-100°C/-120°C). Une fois arrivées à ce stade les paillettes sont mises dans l'azote liquide (-196°C) et ainsi amenées à la température de conservation. Une fois stockée dans l'azote liquide la durée de vie de la semence est quasi illimitée.

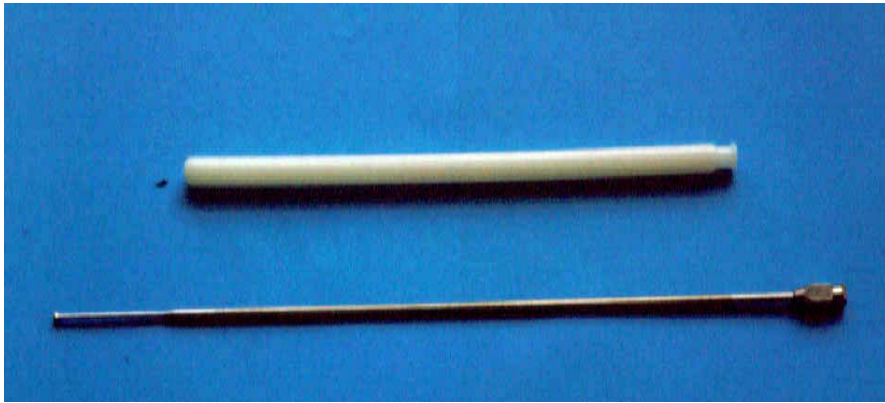
Durant le procédé de congélation on perd une partie des spermatozoïdes initiaux, et en fonction du fait que leur nombre n'est pas très élevé dans l'éjaculat d'un chien, la potentialité reproductive du chien est la plus basse de tous les animaux domestiques. Un étalon, soumis à un programme de congélation produit, un nombre de doses suffisant pur inséminé de deux à quatre femelles.

C'est pour ce motif que l'usage de la semence congelée n'a pas de sens, par exemple pour un simple empêchement à la monte naturelle. La raison d'être de cette pratique est avant tout l'amélioration génétique, l'introduction de nouvelles lignées d'élevage par le biais de reproducteurs tant distants que génétiquement différents.

## **B.2 D'autre Méthode de l'insémination artificielle**

### **❖ Méthode par cathétérisme ou technique norvégienne d'Andersen**

Cette technique nécessite un **matériel simple** (spéculum en plastique et sonde métallique pour cathétériser l'utérus). Cependant elle demande une **certaine dextérité**.



**Figure N° 37 : Sonde norvégienne**

#### **A) Contention de la chienne**

Le cathétérisme de la chienne nécessite une contention du col par voie transabdominale à l'aide d'une main et l'introduction de la sonde par les voies génitales avec l'autre main

Il faut donc intervenir sur une chienne debout sur une table étroite, accessible de tous côtés.

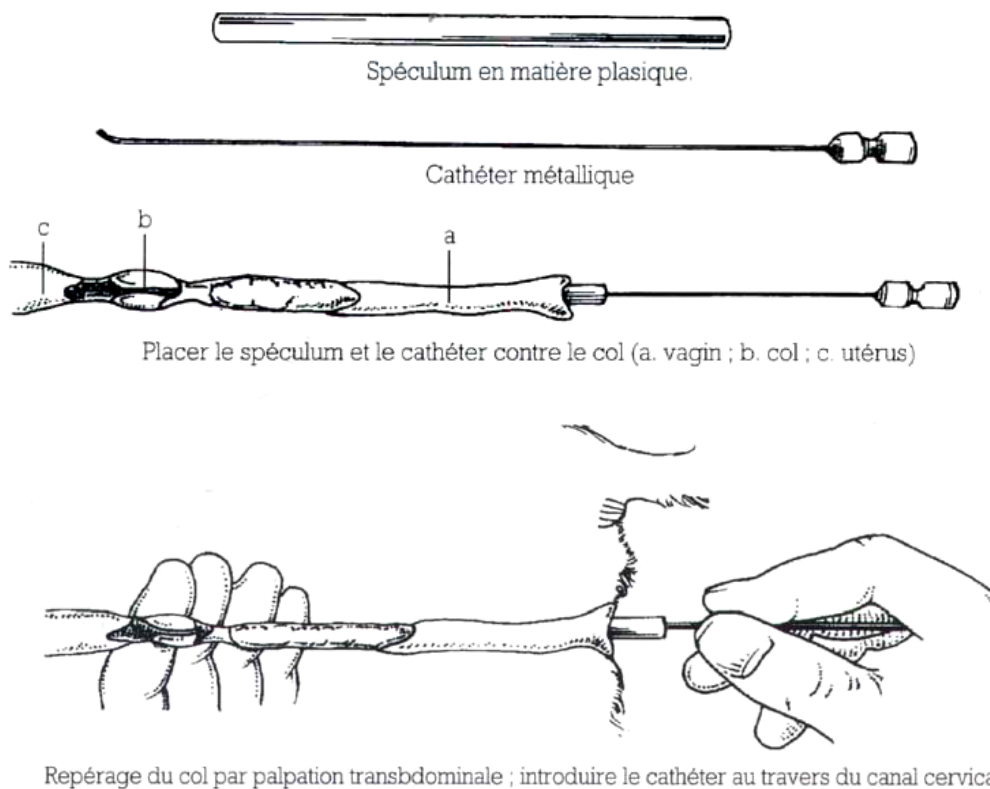
La tête est tenue (muselière si nécessaire) par le propriétaire de l'animal.

La chienne reçoit si nécessaire 0,2 mg à 0,4 mg/kg de xylazine. La sédation dure en moyenne, respectivement 24 à 35 minutes. La posologie la plus élevée est adoptée chez les animaux nerveux, inquiets ou excités. La xylazine serait cependant déconseillé selon certains auteurs puisqu'il a une action sur les contractions vaginales. (Buff, communications personnelles).

## B) Cathétérisme du col utérin

En quelques secondes, la paroi abdominale est relâchée et le col est palpable en avant du bord antérieur du pubis (éventuellement l'introduction par la vulve, jusqu'au fond du vagin, d'une grosse sonde en plastique à bout rond, permet de mieux localiser le col).

L'opérateur étant placé à gauche de la chienne, le col est saisi entre le pouce opposé aux autres doigts, paume de la main gauche au contact de la ligne blanche. On effectue une rotation du conduit de vertical à horizontal.



**Figure 38 :** Méthode de cathétérisme utérin. *Fontbonne A.* ©

Dans la plupart des cas, l'insémination par voie cervicale est possible. L'opérateur se déplace en arrière de l'animal et choisit une sonde en fonction de la taille de l'animal. Le col est immobilisé avec les doigts de la main gauche.

Le guide en plastique à extrémité arrondie est introduit par la vulve de bas en haut, crânialement, puis horizontalement dès que l'extrémité arrive sur le bassin et le plus profondément possible jusqu'à ce qu'elle butte contre le col.

L'extrémité de la sonde est poussée vers le bas dans la portion ventrale du fornix, puis retirée doucement en exerçant une pression vers le bas avec la main droite de façon à ce que



l'extrémité distale de la sonde frotte contre le col pour découvrir l'ostium. Le col est alors cathétérisé et l'extrémité de la sonde se retrouve dans le corps de l'utérus.

### **C) Mise en place de la semence**

Le sperme est injecté doucement dans l'embout distal de la sonde d'insémination. Un millilitre d'air a été préalablement aspiré dans la seringue et sera ensuite poussé dans la sonde pour chasser tous les spermatozoïdes dans la lumière du corps de l'utérus.

### **D) Avantages et inconvénients de la technique par cathétérisme**

Cette méthode peut être réalisée sans anesthésie. Le coût pour le client est moindre. On peut se permettre de réaliser plusieurs inséminations. De bons taux de réussite ont été rapportés par (Fontbonne et Badinand).

Cependant cette méthode demande une certaine dextérité de l'inséminateur et peut être potentiellement dangereuse pour la chienne car le cathéter mal positionné peut traumatiser le vagin.

### **❖ Méthode par laparotomie**

La méthode chirurgicale nécessite une anesthésie de 20 minutes environ. L'injection de barbituriques ou l'inhalation de gaz anesthésiant précédée d'une prémédication à l'atropine peut être utilisée. Une incision de 5 cm est réalisée à mi-chemin entre l'ombilic et la région inguinale. Quand le chirurgien commence l'incision, un assistant commence à décongeler la semence. L'utérus est extériorisé. La semence est aspirée à l'aide d'une seringue puis injectée dans l'utérus. On utilise un cathéter plutôt qu'une aiguille lors de l'injection : en effet, en poussant la partie plastique du cathéter on peut vérifier qu'on se trouve bien dans la lumière de l'utérus.

Celui-ci est ensuite réintroduit dans l'abdomen et la paroi suturée de manière classique.

Cependant la date d'ovulation doit être déterminée de manière très précise puisqu'il n'est pas possible de réaliser plusieurs inséminations. Le coût est élevé et il existe un risque anesthésique pour la chienne. Il se pose alors un problème éthique sur le bien fondé de cette technique. Cette méthode est d'ailleurs interdite en Grande Bretagne par exemple. Celle-ci est très utilisée aux Etats-Unis (lors de commande de semence dans ce pays, il faut d'ailleurs bien spécifier la dose de spermatozoïdes demandée). En effet par insémination chirurgicale, on utilise 50 à 80 millions de spermatozoïdes. Cette méthode permet donc d'inséminer plus de chiennes à partir d'un seul éjaculat ou bien d'utiliser de la semence de mauvaise qualité.

❖ **Méthode par endoscopie vaginale**


Cette méthode permet la visualisation du vagin à l'aide d'un endoscope. On utilise un cathéter urinaire qui est introduit dans l'ostium. La sédation est parfois nécessaire ainsi que l'insufflation d'air dans le vagin. La chienne est debout et droite. On fait passer précautionneusement l'endoscope le long des parois du vagin. Le cathéter urinaire est alors passé à travers l'ostium en faisant tourner la sonde. Le cathéter est avancé aussi loin que possible sans forcer. Et la semence est alors déposée.

Cette technique est très intéressante. Elle ne se fait pas en aveugle, permet de minimiser les traumatismes des voies génitales, et plusieurs inséminations peuvent être réalisées dans le même cycle. Dans une étude de Wilson, 32 des 40 chiennes inséminées en semence congelée par cette technique étaient gestantes.

C'est une technique d'avenir. Le propriétaire peut voir de lui-même le passage de la sonde dans l'utérus. La sonde urétérale longue permet de déposer la semence très loin dans les cornes. Cependant le coût du matériel est important.



**Figure 39:** Passage de la sonde urinaire dans l'ostium utérin  
(Fontbonne A. ©)



**Chapitre IV :**  
**Diagnostic de gestation de la chienne**  
**inséminée**

## **1 La gestation**

La gestation se définit comme un état de gravidité caractérisé par la présence d'un corps jaune de gestation bloquant le cycle. La gestation commence à la fécondation et se termine à la parturition. Sa durée moyenne est de 61 à 63 jours après l'ovulation, soit 64 à 66 jours après le pic de LH, ou encore 55 à 70 jours après la saillie. Il semblerait cette durée soit corrélée négativement avec la taille de la portée. (Bernard E, 2002, Gradil CM, Yeager AE, Concannon pw, 2000, Million CM, 2004)

Par défaut, les jours mentionnés dans le texte se réfèrent au pic de LH.

La gestation se déroule en 3 phases : la période embryon libre, la période embryon nidé et la période fœtale. La mise en place de ces phases est sous dépendance hormonale. (Choquart V, 2002 ; Evans HE, 1993)

## **2. Diagnostic de gestation**

Le diagnostic de gestation peut être un impératif, tant pour le propriétaire que pour l'animal gravide. Les motivations d'un diagnostic de gestation le plus précoce possible sont:

- Satisfaire le propriétaire désireux de connaître le statut de sa chienne
- Adapter l'alimentation de la chienne gravide de manière à assurer les apports protéiques et caloriques nécessaires à la croissance des fœtus et au dépôt des réserves indispensables à la lactation
- Surveiller l'état de santé de la chienne, aussi bien lors de gestation normale (diminution physiologique de la sensibilité à l'insuline dès le 35ème jour et donc risque d'aggravation d'un état diabétique préexistant) que lors d'état de gestation pathologique (morts fœtales ou embryonnaires, pathologies utérines)
- Assurer une bonne conduite de gestion d'un élevage
- Procéder à un avortement de convenance lors de gestation non désirée.

Il existe différentes méthodes permettant d'établir un diagnostic de gestation, reposant sur des signes cliniques généraux maternels, des examens biochimiques, hématologiques ou endocrinologiques, ou encore des examens d'imagerie.

Un outil de diagnostic de gestation doit être fiable, précoce, facile d'utilisation et d'interprétation et doit présenter une innocuité tant pour la mère que pour les embryons ou les fœtus

## **2.1. Marqueurs indirects de gestation: les signes cliniques maternels**

### **2.1.1. Modifications comportementales**

La chienne gravide devient souvent plus calme ou plus craintive. Il est souvent observé une augmentation de l'appétit correspondant à l'anabolisme gravidique et une modification générale du comportement alimentaire. Durant la seconde période de la gestation, une pollakiurie peut être observée. Puis, autour de la période de la mise bas, la chienne tend à s'isoler (Bernard E. , 2002 ; Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. 2001)

### **2.1.2. Modifications anatomiques**

Chez les primipares, il est souvent observé une augmentation du tissu adipeux sous-conjonctif en région abdominale. Néanmoins, l'augmentation de poids n'est souvent appréciable qu'à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine et est fonction du nombre de fœtus.

Une hypertrophie du tissu mammaire apparaît environ 7 jours avant le terme. Chez les primipares, des modifications de pigmentation, de congestion locale et de taille peuvent apparaître dès le 35<sup>ème</sup> jour. (Bernard E. , 2002 ; Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. 2001 Million CM2004) La lactation peut apparaître dès le 40<sup>ème</sup> jour, mais sa date de survenue est très variable selon les individus.

#### **2.1.2.1 Modifications physiologiques**

Les signes cliniques sont discrets jusque vers le 35<sup>e</sup> jour, où la prise de poids devient importante. La chienne connaît alors parfois un léger inconfort, l'utérus se repliant sur lui-même (coliques, anorexie, vomissements, ...) (SIMPSON G, ENGLAND GC, HARVEY HJ. 1998) Les modifications physiologiques concernent le sang, l'appareil cardio-respiratoire et bien sûr, l'utérus.

#### **2.1.2.2 Modifications respiratoires**

Sur le plan respiratoire, la chienne gestante présente :

- une réduction du volume pulmonaire total, du volume courant, de la capacité fonctionnelle résiduelle (CFR) par le déplacement du diaphragme et des organes abdominaux, et pendant la parturition par l'augmentation du volume sanguin pulmonaire consécutive aux contractions utérines (Yeager AE, Mohammed HO, Meyers-Wallen V, et al, 1992; Zone MA, Wanke MM.)
- une augmentation de la consommation en O<sub>2</sub> de 20 % du fait du métabolisme maternel, du développement fœtal et placentaire, du développement utérin et mammaire, entraînant une augmentation de 50 % de la ventilation. Celle-ci augmente encore pendant le travail, et sous

l'effet de la douleur, l'appréhension, l'anxiété (Simpson G, England GC, Harvey HJ. ; Steinetz BG, Goldsmith LT, Harvey HJ, Lust G. 1989)

Augmentation du débit cardiaque

### **2.1.2.3 Les modifications cardio-vasculaires**

Sont essentiellement :

- une augmentation du débit cardiaque de 30 à 50 %, pour compenser l'anémie et la diminution des résistances vasculaires systémiques, induite par les œstrogènes. Pendant et après le travail, le débit cardiaque augmente encore de 10 à 25 %, du fait du sang expulsé (Simpson G, England GC, Harvey HJ. ; Steinetz BG, goldsmith LT, Harvey HJ, lust g. 1989)
- un ralentissement des réflexes de compensation cardio-vasculaires (entraînant une moindre réponse aux agents vasopresseurs et chronotropes (Concannon PW. 1993)
- une augmentation du flux sanguin et du taux de filtration rénale d'environ 60 %.

### **2.1.2.4 Activité myoélectrique de l'utérus**

L'activité myoélectrique de l'utérus est modifiée. Les contractions sont lentes et modérées pendant la 2e moitié de la gestation (3 à 10 mn, 2 à 5 fois par heure). Leur fréquence diminue, elles deviennent plus courtes et plus intenses dans les 7 jours précédant le part, surtout dans les 48h (parallèlement à la chute de progestérone) (Simpson G, England GC, Harvey HJ.) La gestation provoque de grandes modifications du métabolisme de la femelle. Elle est justesse.

### **2.1.3. Modifications biochimiques et hématologiques**

La mise en place de la gestation est à l'origine d'une réaction inflammatoire due à l'implantation du blastocyste. Ainsi, des variations de marqueurs inflammatoires systémiques comme le fibrinogène plasmatique ou le CRP ont été décrites lors de gestation, mais sont non spécifiques puisqu'elles se rencontrent lors de toute maladie inflammatoire (Bernard E., 2002 ; Nicolas C. 2000)

Bien qu'également non spécifiques, les modifications hématologiques semblent plus sensibles que les modifications biochimiques.<sup>17</sup> L'hématocrite descend chez la chienne gestante dès le 25eme jour après le pic de LH, puis passe sous 40% en moyenne vers le 35eme jour, et sous 35% en moyenne lorsque la date du terme se rapproche ( Anderton DJ, JONES MA. ; Bernard E. 2002, Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS., 2001)

La numération-formule sanguine montre quant à elle une anémie normocytaire normochrome (dilution sanguine liée à l'augmentation du volume plasmatique, non associée à une augmentation des érythrocytes), ainsi qu'une leucocytose non spécifique (phénomène inflammatoire consécutif à l'implantation fœtale). Ces modifications seraient utilisables pour

un diagnostic de gestation entre le 35<sup>ème</sup> et le 50<sup>ème</sup> jour, mais elles restent totalement non spécifiques et peuvent se rencontrer lors d'états pathologiques comme le pyromètre. (Bernard E. 2002)

## **2.2. Marqueurs directs de la gestation**

### **2.2.1. L'examen clinique**

#### **2.2.1.1. La palpation externe**

L'implantation des blastocyste dans les cornes utérines a lieu 20 jours après le pic de LH. Dès 22 à 24 jours après le pic, de discrets renflements ovoïdes peuvent être palpés (Figure 7). Ces renflements ne sont facilement palpables que pendant 10 à 15 jours, soit jusqu'au 30<sup>ème</sup> jour de gestation environ. Par la suite, l'augmentation de taille de l'utérus lui fait prendre une position plus crâniale, en arrière des côtes, rendant la palpation difficile. Suite à la croissance des fœtus, leur palpation redevient possible à partir du 45<sup>ème</sup> jour de gestation, notamment par palpation des crânes fœtaux.( Gradil CM, Yeager AE, Concannon PW. 2000, Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. 2001, )



**Figure N° 40 : Palpation abdominale externe** Source : [non lisible]

#### **2.2.1.2. L'auscultation**

L'auscultation des bruits cardiaques fœtaux est possible, en arrière de l'ombilic, dans les 15 derniers jours de gestation. La fréquence cardiaque des fœtus est l'ordre de 180 à 240 battements par minute. En fin de gestation, une absence de bruits cardiaques discernables peut signifier une mort fœtale, mais peut aussi être liée au statut corporel de la mère ainsi qu'à la position des fœtus ou à leur nombre (Noakes DE, Parkinson TJ, England GC. 2001)

#### **2.2.2. Les dosages hormonaux**

Contrairement aux chiennes non gravides, les chiennes gestantes présentent des valeurs basses en œstrogènes. En ce qui concerne la progestérone, la concentration plasmatique des femelles gestantes n'est pas significativement différente de celle des femelles

non gestantes (Figure 8). Elle est de plus très variable, et donc peu utile en tant que diagnostic de gestation précoce. Elle peut néanmoins être utilisée pour prévoir la date du part, puisque sa Concentration chute la veille de la mise bas. Concannon PW, McCann JP, Temple M.1989, Johnston SD, ROOT Kustritz MV, Olson PNS., 2001 )

La relaxine est le marqueur hormonal le plus fiable, puisque le dosage de la relaxine à l'aide des kits de dosage Reprocheck © ELISA (dosage quantitatif) ou Witness Relaxin © (immuno-migration qualitative) (Synbiotics) permet quasiment un diagnostic de certitude. Le test ELISA peut être positif à partir de 24-27 jours et le test WITNESS à partir de 26-30 jours à partir du pic de LH. En effet, le placenta débute la sécrétion de l'hormone entre le 24<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour suivant le pic de LH, jusqu'à la mise bas. Son taux atteint un maximum de 4 à 6 ng/mL, 2 à 3 semaines avant le part, et reste élevé jusqu'à la mise bas. La concentration de cette hormone peut varier suivant les races (une chienne Labrador aura un taux plus élevé que celui d'une chienne Beagle) et la taille de la portée (plus ce dernier est important, plus le signal sera élevé). Si le résultat du test est négatif il est conseillé de le répéter une semaine plus tard ( Billault C. 2008, Feldman EC, Nelson RW. 2003)

### **2.2.3. Les examens d'imagerie**

#### **2.2.3.1. L'échographie**

L'échographie bidimensionnelle est une méthode fiable de diagnostic de gestation. (Bernard E; Bocquet C. Lyon, 1992). Elle permet un diagnostic dès le 21ème, voire le 14ème jour de gestation, et présente une sensibilité bien supérieure à la radiographie : une étude cite 99,3%, de sensibilité et une valeur prédictive négative de 100%.(Bondestam S, Alitalo I, Karkkainen M. 1983)

L'échographie bidimensionnelle ou l'échographie Doppler permettent de plus un diagnostic de viabilité fœtale par étude des mouvements et des battements cardiaques. est couramment reconnu que l'échographie permet également la détermination du nombre de fœtus. Des études annoncent une exactitude dans le dénombrement des fœtus de 31,8% à 36,0% des cas, avec une surestimation des petites portées et une sous-estimation des grandes portées La précision serait meilleure pour les portées de moins de 5 chiots (England GC, Allen WE. 1990)

Une étude plus récente annonce un résultat correct dans 65% des cas, et un résultat correct à un chiot près dans 89,5% des cas, avec une tendance à avoir de moins bons résultats dans les grandes races Lenard ZM, Hopper BJ, Lester NV, Richardson JL, Roberston ID2007)

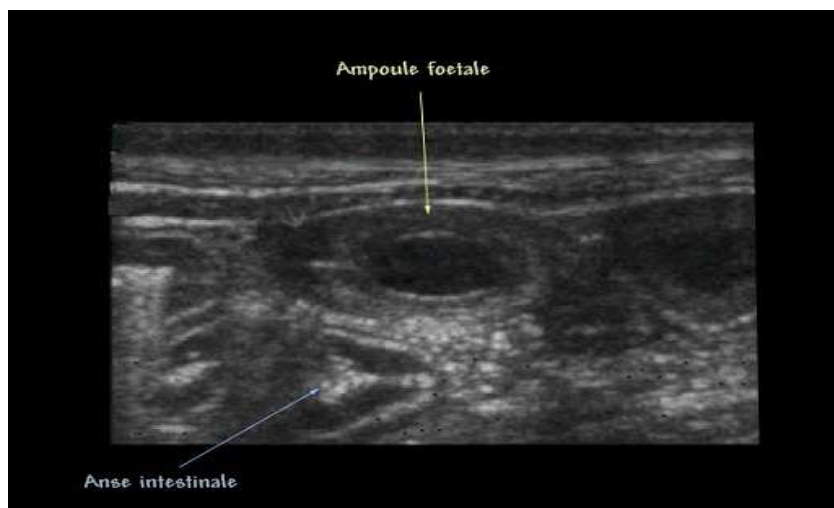


**Tableau 08:** Influence de la taille de la chienne sur l'exactitude de la taille de la portée prédite

Différence réalité/prédiction (en nombre de chiots)	Petites races (%)	Races moyennes (%)	Grandes races (%)
0	79,2	100	52,2
+/- 1 chiot	100	100	76,1
+/- 2 chiots	100	100	97,8
Nombre de chiennes	<b>24</b>	<b>6</b>	<b>45</b>

L'échographie permet de plus une détermination de l'âge du fœtus, et donc une détermination de la date du part, à partir de l'étude des structures fœtales et extra-fœtales. Du 18ème au 21ème jour après l'ovulation, la présence des embryons de chiots est difficilement détectable par palpation de l'abdomen de la chienne. Les cornes de l'utérus présentent une série de renflements fermes et ovalaires, isolés les uns des autres, atteignant approximativement les dimensions d'une noisette.

A partir de la troisième semaine, des mains expérimentées peuvent parfois, par palpation transabdominale, déceler un utérus en chapelet à condition que la chienne ne soit pas trop grasse et que la sangle abdominale soit détendue. A l'échographie, les ampoules fœtales de la chienne sont bien rondes et bien visibles.



**Figure N°41 :** Diagnostic de gestation de la chienne effectué 23 jours après l'ovulation

Dès J24, alors que l'embryon fait 14 mm environ, ses mouvements cardiaques sont visibles à l'échographie au niveau de l'ampoule fœtale. Ces bruits cardiaques du chiot ne seront néanmoins perceptibles à l'auscultation qu'uniquement dans les 15 derniers jours de la gestation.

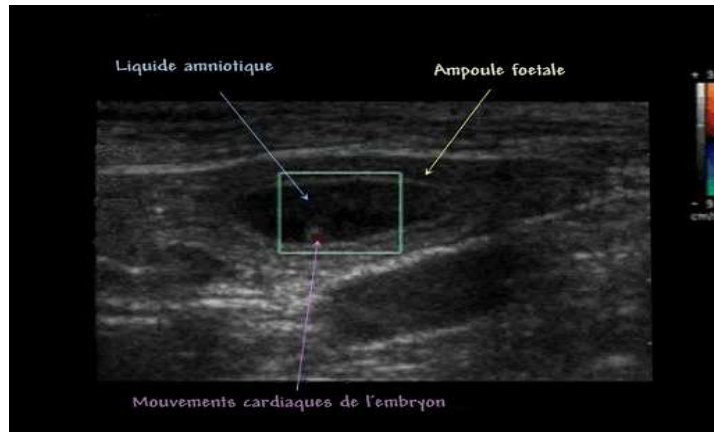


Figure N°42 : Diagnostic de gestation chez la chienne effectué 25 jours après l'ovulation

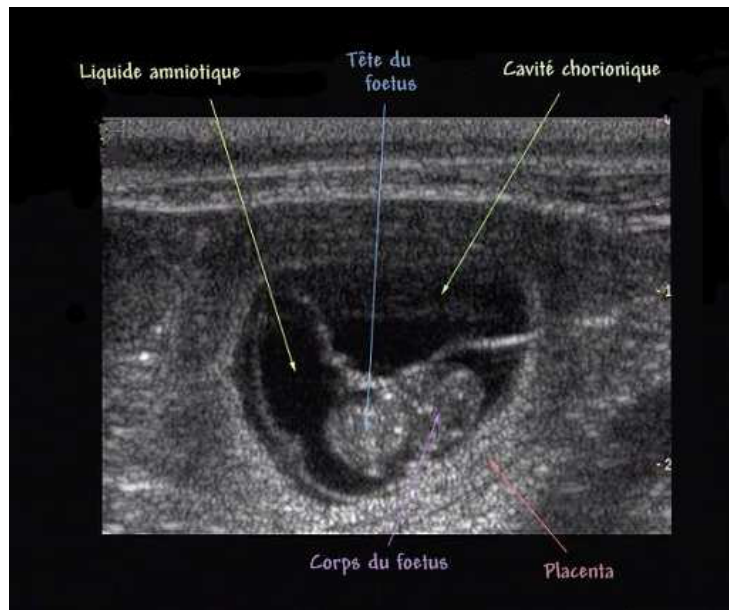


Figure N°43: Diagnostic de gestation effectué 28 jours après l'ovulation

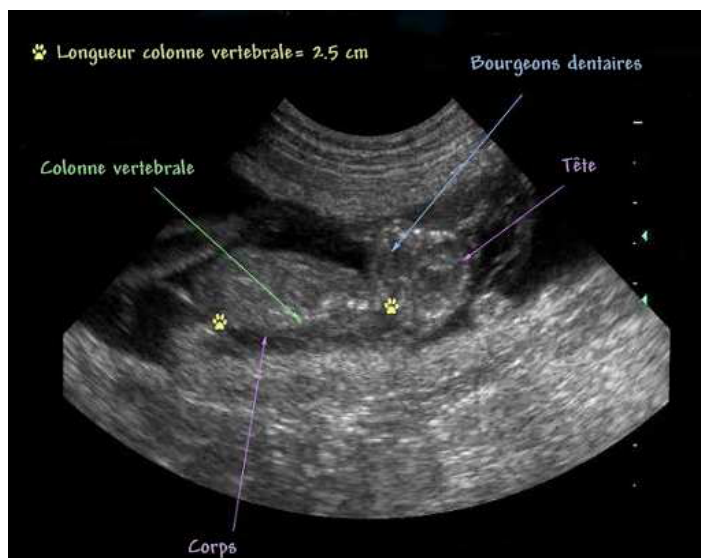


Figure N°44 : Diagnostic de gestation effectué 33 jours après l'ovulation

La mesure de la longueur de la colonne vertébrale permet de dater l'âge du fœtus pendant le deuxième tiers de la gestation. A ce stade de 33 jours après ovulation, le palais du fœtus se soude et il mesure alors 29 mm.

A 35 jours, les doigts et les organes génitaux vont commencer à se différencier. Sa longueur va atteindre 35 mm environ.

A 40 jours, alors qu'il fait 65 mm de longueur, les paupières du fœtus vont se souder et les ongles vont apparaître.

La radiographie pour le diagnostic de gestation chez la chienne ne devient intéressante qu'en fin de gestation lorsque le squelette des futurs chiots devient calcifié et donc radio-opaque (à partir du 45<sup>e</sup> jour). Attendez donc ce stade avant de rendre visite à votre vétérinaire.

Les autres techniques recherchant les changements de comportement, les battements cardiaques des fœtus par auscultation, les modifications sanguines et le développement mammaire sont trop tardives ou trop aléatoires pour être utilisées de façon fiable en élevage canin.

## DEUXIEME PARTIE

---

### ETUDE EXPERIMENTALE

## **Démarche de l'expérimentation :**

### **A) Lieu et durée du travail :**

Dans cette deuxième partie nous avons réaliser l'insémination artificielle (deux insémination à 48 heures d'intervalle) de trois chiennes après avoir suivi leur chaleur par la méthode de cytologie vaginale (examen de frottis vaginaux préparés à partir d'étalement sur lame d'écouvillon), par dépôt intra vaginal de semence fraîche en utilisant une sonde souple simple, et sonde à ballonnet.

Notant que les chiennes en question en fait l'objet d'un diagnostic échographique en vue de confirmer la présence d'une gestation et cela 18 jours après la deuxième insémination.

Ce travail se déroulait au niveau du service de pathologie des carnivores de l'Institut des Sciences Vétérinaires Tiaret, durant la période allant de septembre 2012 jusqu'en mai 2013.

### **B) Matériel et Méthode :**

#### **1 Echantillon expérimental :**

Les femelles en question ont fait l'objet d'un examen générale préliminaire a fin d'évaluer leur état sanitaire qui s'est révélé bon ; alors elles étaient correctement déparasitées et vaccinées.

Deux chiennes ont subis un traitement inducteur des chaleurs par l'usage d'un agoniste dopaminergique.

Pour l'autre chienne les chaleurs étaient naturelles.

#### **2 Matériel utilisé :**

##### **2.a. Matériel utilisé pour le suivie de chaleur :**

- Ecouvillons non stériles pour la récolte des cellules vaginales
- Lames pour examen microscopique du frottis réalisé.
- Un fixateur spécial : Fixateur Cytologique pour frottis. (Cyto RAL 150 ml).
- Les Kits de coloration
  - Kit RAL 555(coloration MGG)
  - kit Diagnoestrus A et B (coloration HARRIS-SHORR)
- Eau distillée pour rinçage des lames.

- Microscope optique binoculaire de marque : avec une capacité de grossissement de x10 x40 x100.

### 2.b. Matériel utilisé pour la récolte du sperme :

- cônes en Caoutchouc
- des tubes de récolte incassables gradués
- Porte-tube
- Un écouvillon stérile (utiliser pour stimuler le male)

### 2.c . Matériel utilisé pour l'insémination (dépôt de la semence) :

- Sonde souple simple(en silicone)
- Seringue 2 pièces (sans aiguille et sans embout) 20 ml
- Sonde de Foley munie d'un ballonnet (en silicone)
- Des Seringues
- Un tranquillisant si nécessaire
- tube en plastique stérile (servant d'un guide)

### 2.d. Matériel utilisé pour le suivi de la chienne inséminée :

- Un échographe transportable de mark KAIER 1000. Muni d'une sonde sectorielle 5MhZ.

## Résumé de l'étude expérimentale

1) Le tableau suivant résume notre travail expérimental :

Tableau N°09 : résumé de l'étude expérimental

### La chienne N°01 : Données générales

Nom	Race	Age	Historique reproductif	Date de réception pour consultation Et suivie de Reproduction	Modifications Génitales (signes de chaleurs)
Loriga	Berger allemand	19 mois	Chaleurs pubertaires à 12 mois	26/11/12	Chaleurs naturelles observées le 25/11/12 Ecoulement sanguinolent légèrement vulves tuméfiées
				06/12/12	Pertes vaginale (légèrement Sanguinolentes) vulves tuméfiées
				09/12/12	Vulve légèrement tuméfiée Les pertes presque absentes
			Aucune portée		

Chienne N°01 : Suivi des chaleurs et insémination artificielle

Ecouvillonnage vaginal		Réalisation du frottis		résultat	Insémination artificielle		Suivi après la 2 <sup>ème</sup>
Date de réalisation	Aspect	Date et type de coloration	Interprétation		Date	type	IA
26/11/12	Sale Rosé	26/11/12 MGG(555)	Fond : sale Forte présence GB cellules petites intermédiaires en amas et éparpillées absence de polynucléaires	Début de pro- œstrus			
06/12/12	Rose	06/12/12 MGG(555)	Fond : propre Présence des amas de cellules kératinisées IE > 70 % De rares GB D'autres cellules kératinisées éparpillées	Début d'œstrus  en pic de LH	06/12 /12	1ère IA  Intra Vaginal  Semence fraiche	
09/12/12	Propre  Rose clair	09/12/12	Fond : propre Présence d'un nombre important des amas de cellules kératinisées IE>90% (Kératinisation 100%)	Œstrus  (ovulation)	09/12/ 12	2ère IA  Intra_ Vaginal Semence fraiche	Echo pour le 27/12/1 2

**1) La chienne N° 02 : Données générales :**

Cette chienne à subit une induction de chaleurs par l'usage d'un agoniste de la dopamine anti prolactine : la Bromocryptine dont le nom commercial est : Parlodel® 2 ,5 mg, a la dose de 1,25 mg/ animal une fois par jour jusqu'a apparition de chaleurs (la dose recommandée est de 20 à 50 µg une a deux fois par jour pendant 30 jours.

Nom	Race	âge	Historique reproductif	Date de réception pour consultation Et suivie de Reproduction	Modifications Génitales (signes de chaleurs)
Gense	Croisé Berger allemand Berger Belge	24 mois	Une portée en juillet2012 avec naissance d'un seul chiot	22/O1/13 début de traitement d'induction de chaleur le 26/11/12 apparition de chaleurs 45 jours après	Observation de chaleurs le 15/01/13  Pertes vaginales Tuméfaction vulvaire
				27/01/13	De légères pertes vulves tuméfiées
				31/01/13	Vulve légèrement tuméfiée Absence de pertes



## La chienne N°02 : Suivi des chaleurs et insémination artificielle

Ecouvillonnage vaginal		Réalisation du frottis		Résultat	Insémination artificielle		Suive après la 2 <sup>ème</sup> IA
Date de réalisation	Aspect	Date et type de coloration	Interprétation		Date	type	IA
22/01/13	Sale Rosé	22/01/13 MGG(555)	Fond : sale Présence de GB cellules grandes intermédiaires en grand nombre éparpillées kératinisation < 30%	Milieu de pro-œstrus			
27/01/13	Rose Propre	27/01/13 MGG(555)	Fond : propre Présence de quelque amas de cellules kératinisées IE > 50 % Présence de globules rouges D'autres cellules kératinisées éparpillées Absence de PN cellules grandes intermédiaires en grand nombre	Fin de pro_œstrus Début d'œstrus (en pic de LH)	27/01/13	1ère IA  Intra_Vaginal Semence fraîche	
31/01/13	Propre  Rose clair	31/01/13 MGG(555)	Fond : propre Riche en amas de cellules kératinisées IE>90% Absence de GB et PN Rare cellules grandes intermédiaires	Début Œstrus	31/01/13	2ère IA  Intra_Vaginal Semence fraîche	Echo pour le 18/02/13

### 1) La chienne N° 03 Données générales

#### Suivi des chaleurs et insémination artificielle

Nom	Race	âge	Historique Reproductif	Date de réception pour consultation Et suivie de reproduction	Modifications Génitales (signes de chaleurs)
Ritta	Berger allemand Croisé	24 mois	Aucune information	06/05/13	Absence d'écoulement Aucune information sur la date d'apparition de chaleurs  Arrêt de l'écoulement vaginal le 4/5/13  (Elle a subit une induction de chaleurs par le Parlodel)

Ecouvillonnage Vaginal		Réalisation du frottis		Résultat	Insémination artificielle
Date de réalisation	Aspect	Date et type de coloration	Interprétation	début d'œstrus	Programmée pour une IA le même jour qui n'a pas eu lieu à cause de non disponibilité du male
06/05/13	Rose foncé	06/05/13 MGG(555)	Fond : propre Plusieurs amas de cellules kératinisées Quelques cellules grandes intermédiaires Quelques GB PN(-) IE> 80%		
		Harris Shorr	Riche en Amas de cellules kératinisées en rouge orangé Quelques Cellules grandes intermédiaires bleue verdâtre quelques GB et bactéries		

### **3) Méthodes (réalisation de l'insémination artificielle):**

#### **3-a) La technique entreprise pour l'insémination artificielle :**

Par dépôt de la semence fraîche au niveau vaginal à l'aide d'une sonde simple et souple(en silicone) et une autre à ballonnet aussi en silicone (la sonde de Foley). La sonde était introduite par l'intermédiaire d'un guide (tube en plastique stérile utilisé pour ce bute)

#### **3-b) La récolte de la semence :**

✚ La semence utilisée était fraîche récoltée et déposée immédiatement dans le tractus génitale féminin sans aucun moyen de conservation.

✚ La récolte était manuelle par l'usage de tubes de récoltes stériles et gradués incassables (03 tubes pour chaque phase d'éjaculat).

✚ Nous avons utilisé les phases N° 02 et 03 afin d'avoir un volume important de semence déposée dans le vagin à la différence au dépôt utérin qui nécessite qu'une petite quantité et pour augmenter ainsi les chances de conception.

✚ Les males reproducteurs ont été reçus dans le même service et après avoir été examinés pour évaluer leur état de santé ils étaient orientés vers une salle séparée à celle où se trouve la femelle pour éviter tout facteur stressant qui pourra perturber le déroulement de la récolte donc favoriser un climat optimal pour cette étape.

✚ Une fois la récolte terminée le male est reconduit à l'extérieure par son propriétaire afin qu'il retrouve son état normal puis son appareil reproducteur est réexaminé pour assurer que l'organe copulateur a retrouvé sa place initiale

NB: notant que l'examen de la semence et l'évaluation de sa qualité n'a pas pu être réalisé vu que notre service ne disposait pas de moyens nécessaires (surtout le microscope à phase et à plaque chauffante) pour tel examen ce qui nous a pas permis d'évaluer la qualité des reproducteurs, par contre un seul examen était réalisé celui de l'estimation de la mobilité des spermatozoïdes.

### **3-c) Fréquence et moment de l'insémination :**

L'insémination n'était réalisée que sur la base des examens cytologiques (examen de frottis réalisés à partir des prélèvements vaginaux) par l'usage de méthodes de coloration spécifiques : la MGG(555) pour les deux premières chiennes et l'Harris Shorr présentées sous forme de Kit pour la troisième chienne (voire tableau)

Une fois le frottis confirmé la richesse en cellules kératinisées qui traduit un état d'œstrus donc pic de LH et l'approche de l'ovulation l'insémination était réalisée immédiatement à la fréquence de deux insémination à 48heurs d'intervalle

Après le dépôt de la semence il faut stimuler la contraction vaginale ainsi que l'amélioration de la progression des spermatozoïdes par les reflexe de Ferguson qui sert à poser le doigt pendant 15minutes à l'entrée du vagin

### **3-d) suivie après insémination artificielle :**

Un suivie échographique était programmé le 18ème jour après la 2ème insémination artificielle à fin de diagnostiquer une éventuelle gestation

- La 1<sup>ère</sup> chienne a présenté une pseudo gestation (absence de toute conception).
- La 2<sup>ème</sup> chienne à conçu avec un diagnostic positif d'une ampoule une résorption fœtale était constatée à un mois de gestation.
- La 3<sup>ème</sup> chienne n'a pas subi une insémination vu l'absence du male reproducteur.

# 1) Photos du matériel utilisé

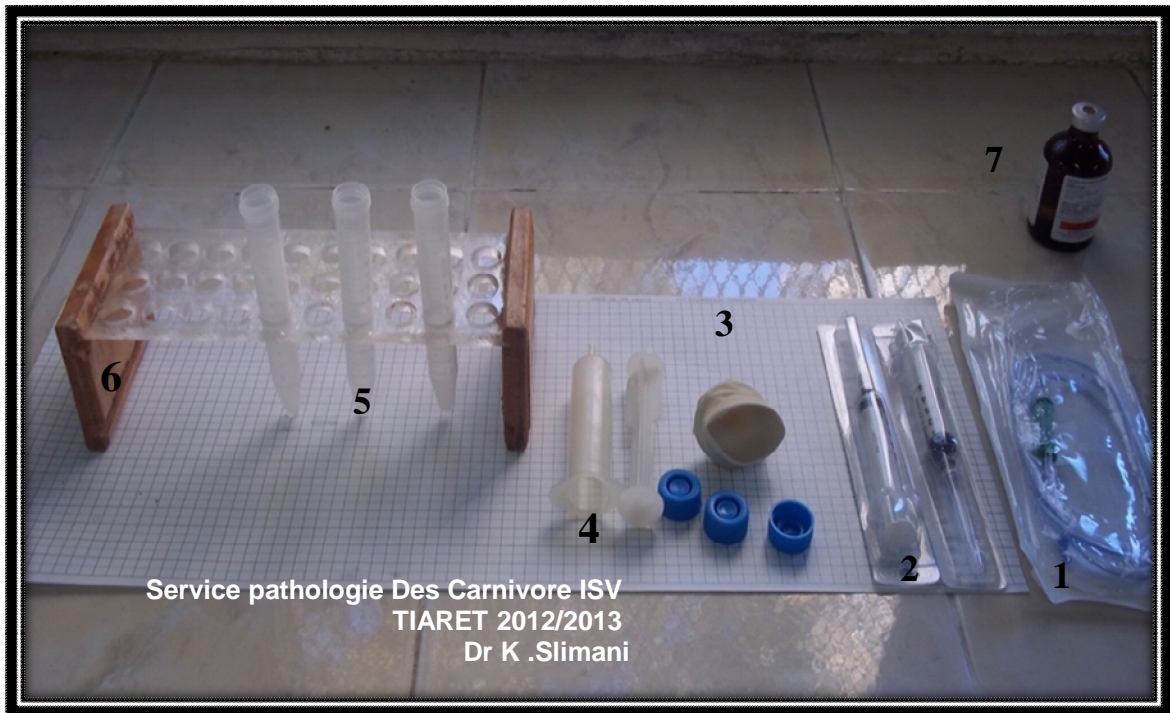
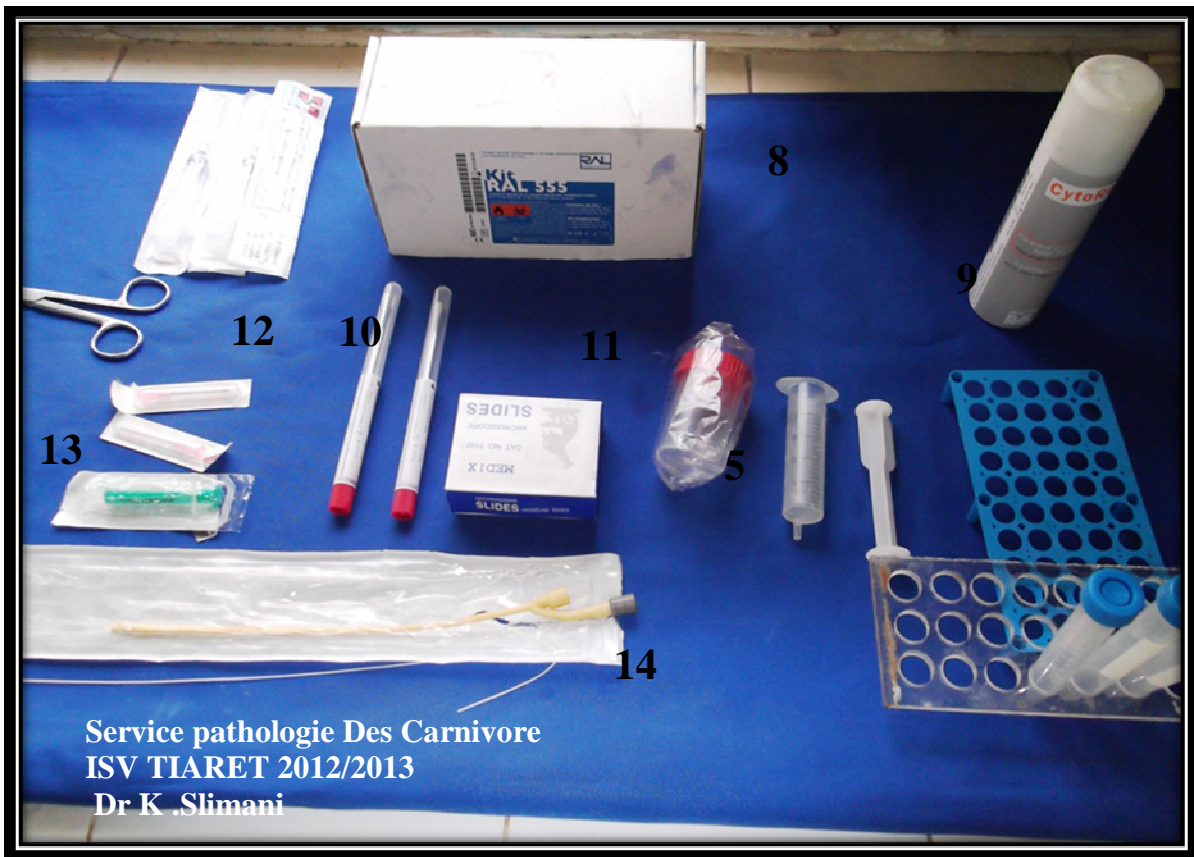


Figure N°45-a : Matériel utilisé pour une IA a sonde simple souple



Figure N°45-b : Matériel utilisé pour une IA a sonde simple soupl



**Figure N°46:** Matériel utilisé pour une IA avec sonde de Foley

**La légende :**

- 1 : une sonde simple pour IA
- 2 : seringue de 5ml
- 3 : cône en caoutchouc ; pour récolte de la semence
- 4 : seringue 2 pièces
- 5 : tubes de récolte en plastique gradués
- 6 : porte tube
- 7 : tranquillisant
- 8 : Kit Ral 555
- 9 : cytofixateur
- 10 : des écouvillons
- 11 : boîte de lames
- 12 : aiguilles
- 13 : seringue
- 14 : sonde de Foley



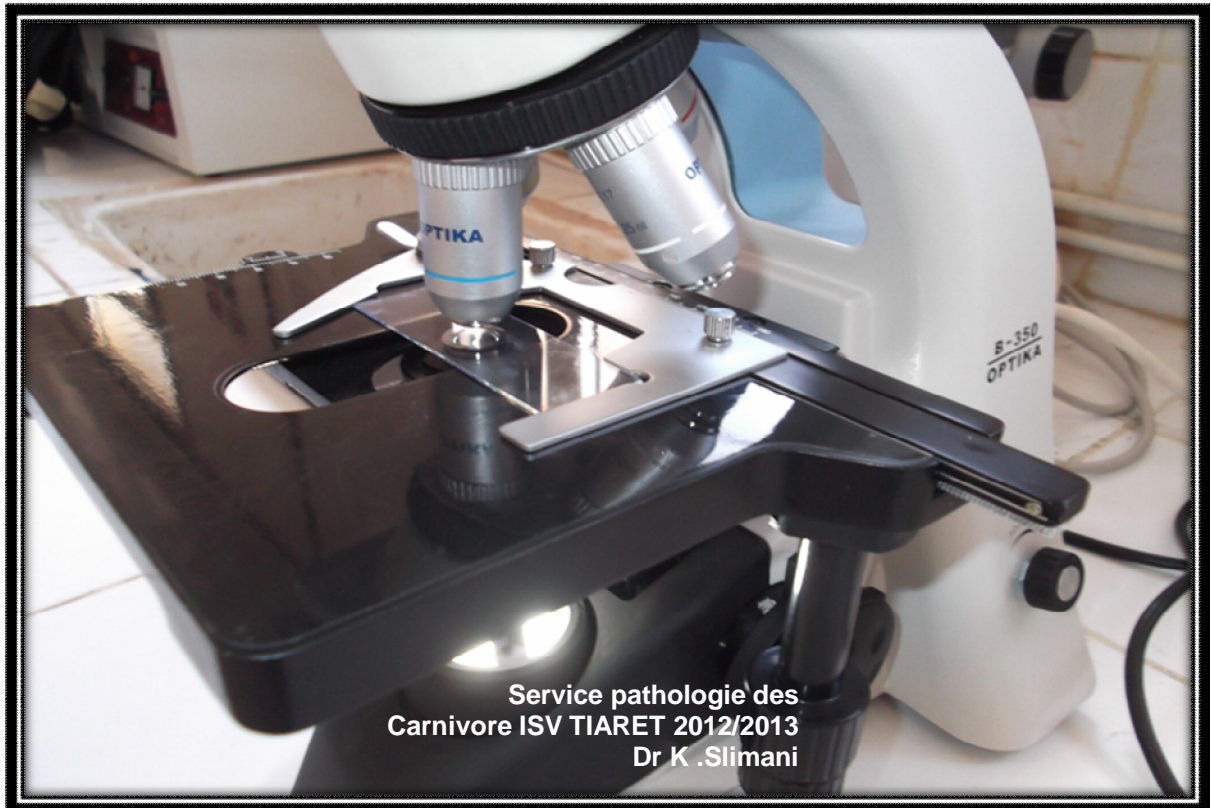


Figure N°47: Microscope optique binoculaire



**Figure N°48 : Kit Ral 555(coloration MGG)**



**Figure N°49 : Kit Diagnostoestrus (Coloration HARRIS SHORR)**



## 2) Photos de réalisation de la cytologie vaginale

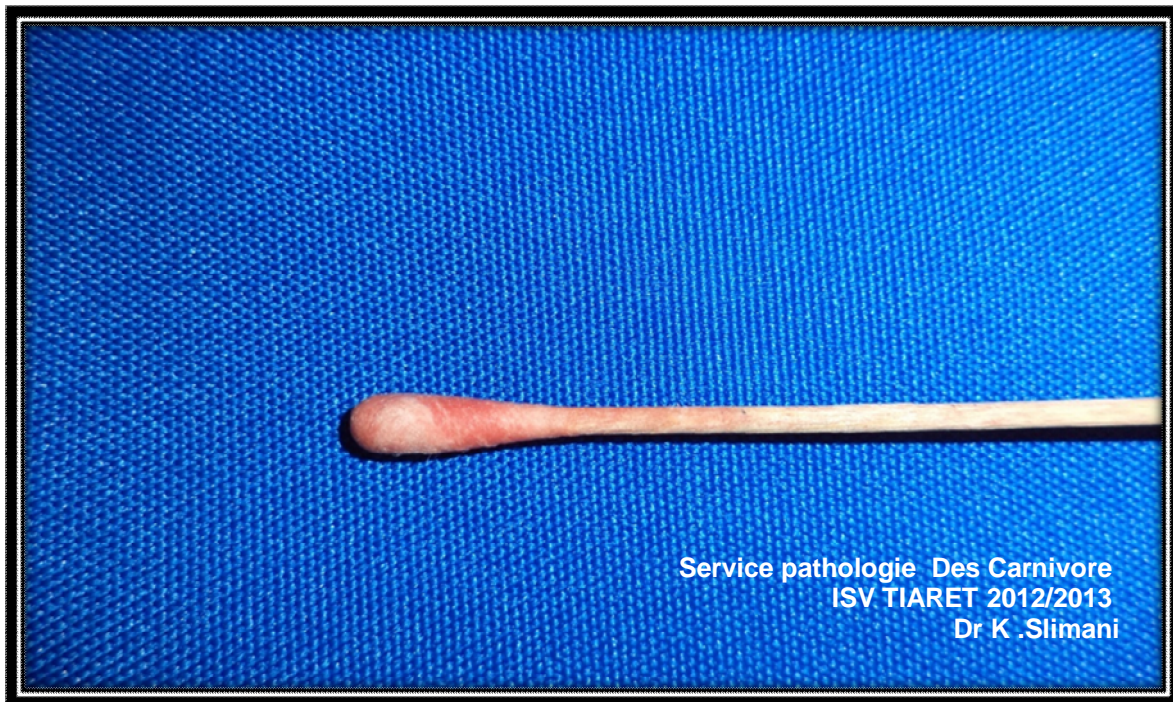


**Figure N°50 :** Ecouvillonnage vaginal (écartement des lèvres vulvaires)



**Figure N°51 :** écouvillonnage vaginal (introduction de l'écouvillon crânio-dorsalement)





**Figure N°52 :** appréciation de l'aspect de l'écouvillon  
(Écouvillon rosé foncé)



**Figure N°53 :** Technique d'étalement des cellules vaginales récoltées



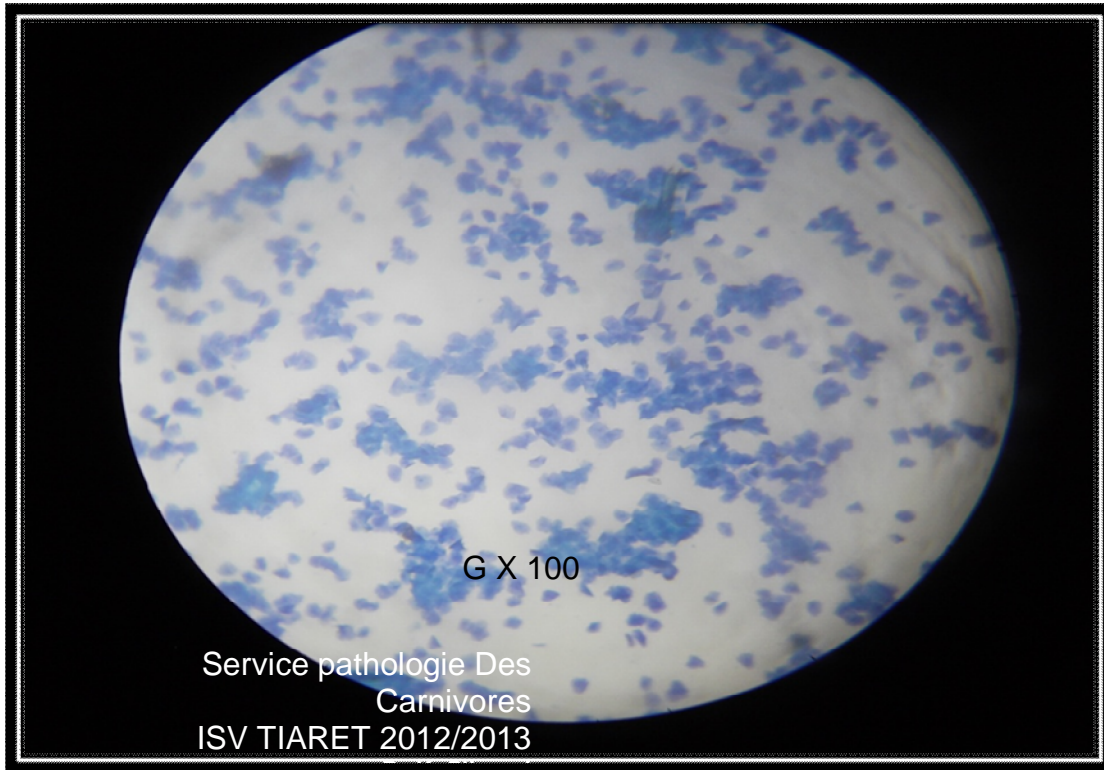
**Figure N°54 : fixation du frottis**



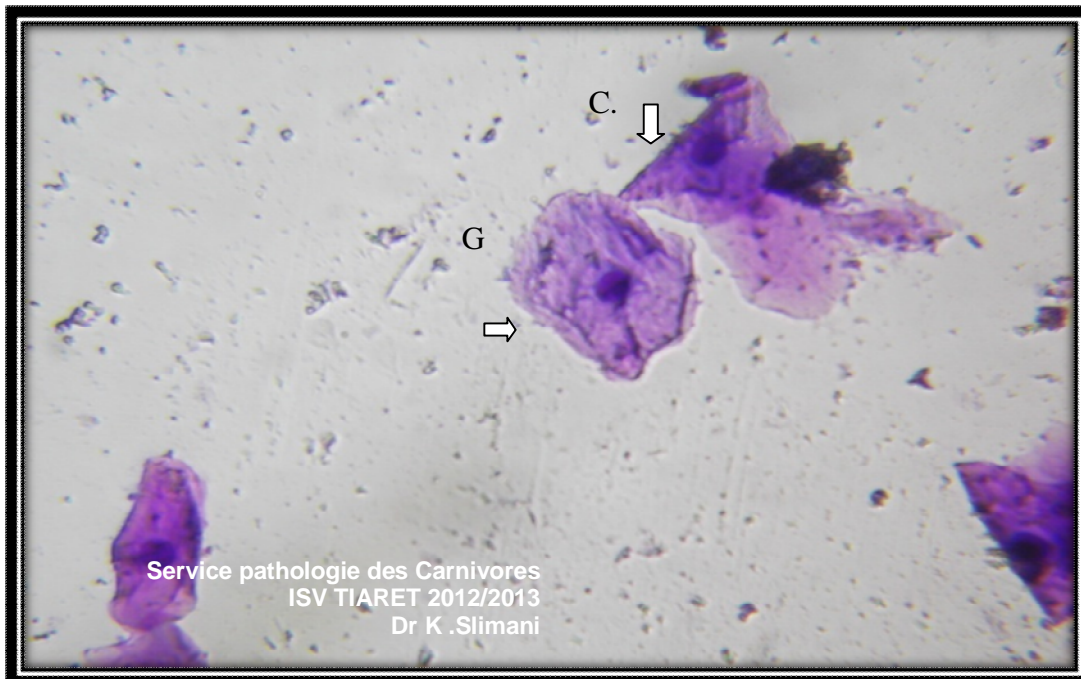
**Figure N°55 : la coloration du frottis (technique 555)**



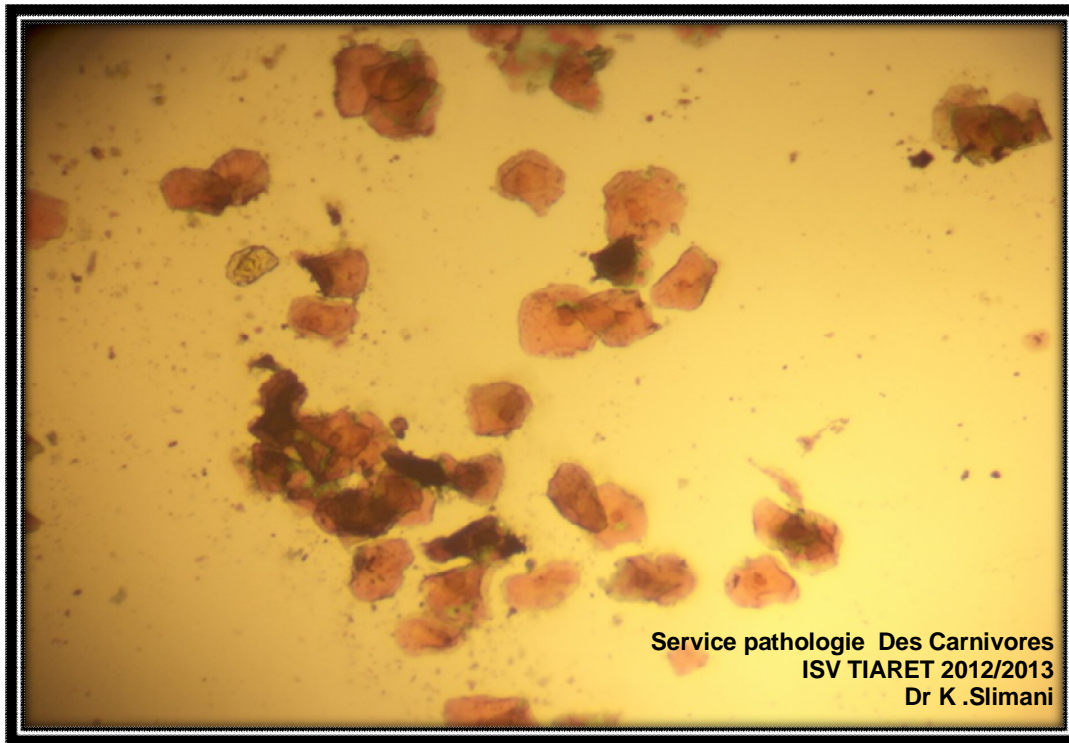
**3) Photos de L'observation microscopique des frottis**



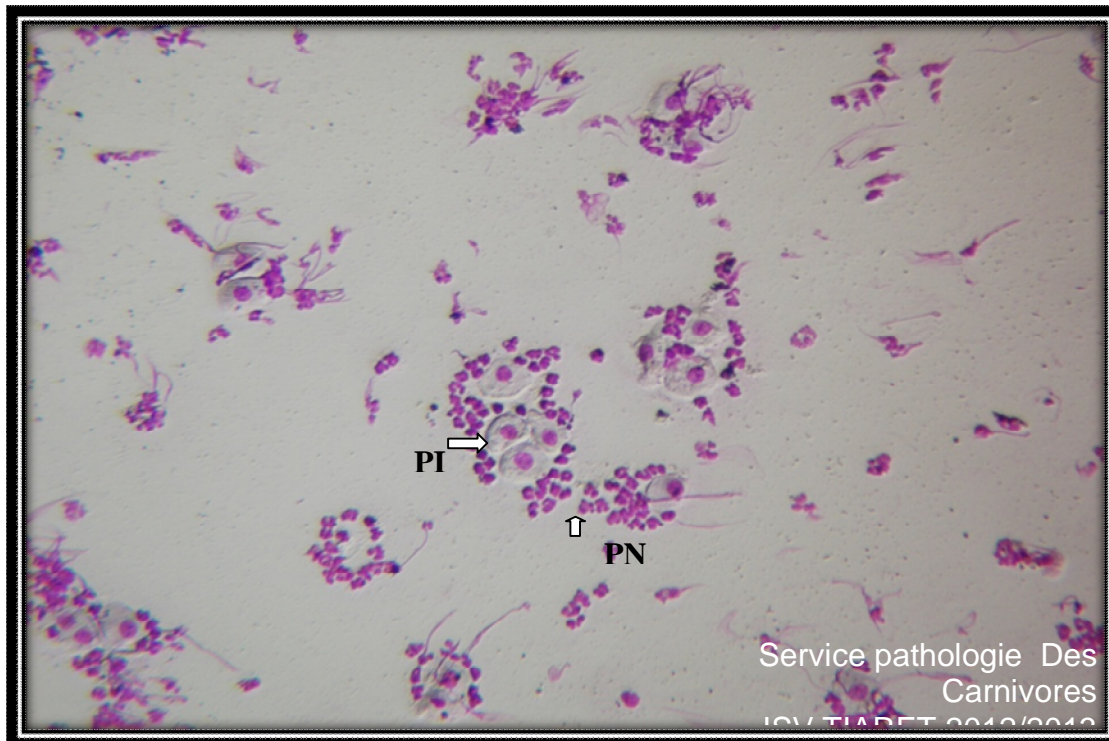
**Figure N°56 :** frottis vaginal d'œstrus (ovulations) , un nombre important d'amas de cellules kératinisées ,IE>90%, par MGG .



**Figure N°57 :** frottis vaginal avec fond sale, cellules kératinisées (CK) et grandes intermédiaires (GI), (x400) (fin proestrus début d'œstrus) (MGG555)



**Figure N°58** : Frottis vaginal avec fond propre, cellules kératinisées(x400)  
(Fin proestrus début d'œstrus) (Coloration Harris Shorr).



**Figure N°59** : cellules petites intermédiaires(PI) en amas avec présence de polynucléaires  
(PN) (milieu du metoestrus) coloration MGG (x100)





**Figure N°60** : amas de cellules petites intermédiaires (PI) avec présence de polynucléaires (PNN) (milieu du metoestrus) (x400)

**4 photos de la récolte du sperme**



**Figure N°61** : photos du male reproducteur (berger allemand de 3 ans)



**Figure N°62:** stimulation du male avant la récolte par des sécrétions vaginales.



**Figure N°63:** début de récolte (émission de la 1ère phase)





**Figure N°64:** milieu de la récolte émission de la 2<sup>ème</sup> phase



**Figure N°65 :** fin de récolte récupération de la dernière phase



**Figure°66** : les trois phases d'éjaculat du chien

- 1 : la phase urétrale
- 2 : la phase spermatique
- 3 : la phase prostatique

**5) PHOTOS de la réalisation de l'insémination artificielle proprement dite (dépôt de la semence)**

**La première chienne :**



**Figure N°67** : introduction de la chienne dans la salle de l'IA





**Figure N°68 : tranquillisation de la chienne avant l'IA**



**Figure N°69 : la mise en place du guide**



**Figure N°70 : introduction de la sonde simple (silicone)**



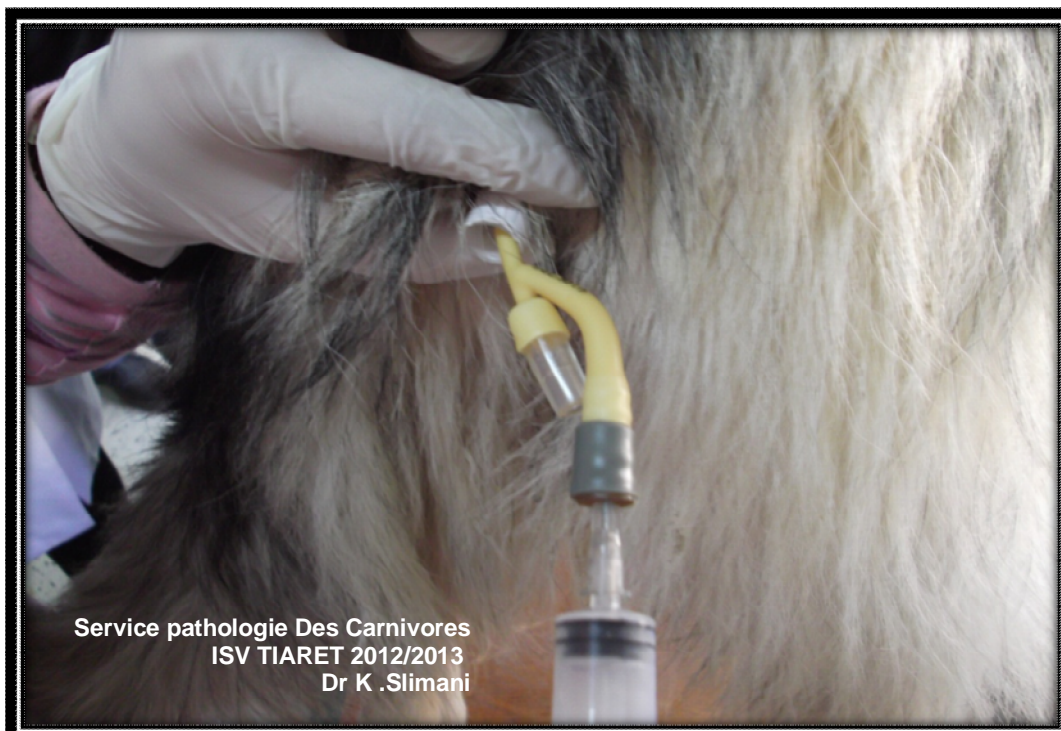
**Figure N°71 : injection de la semence récoltée**





**Figure N°72 :** stimulation la contraction vaginale reflexe de Ferguson

**La deuxième chienne :**



**Figure N°73 :** la mise en place d'un guide et d'une sonde à ballonnet



**Figure N°74 : gonflement du ballonnet à l'aide d'une seringue**



**Figure N°75 : injection de la semence récoltée**





**Figure N°76 :** maintien d'une position inclinée pour faciliter le passage de la semence dans le vagin et éviter des reflux



**Figure N° 77 :** stimulation de la contraction vaginale Ferguson

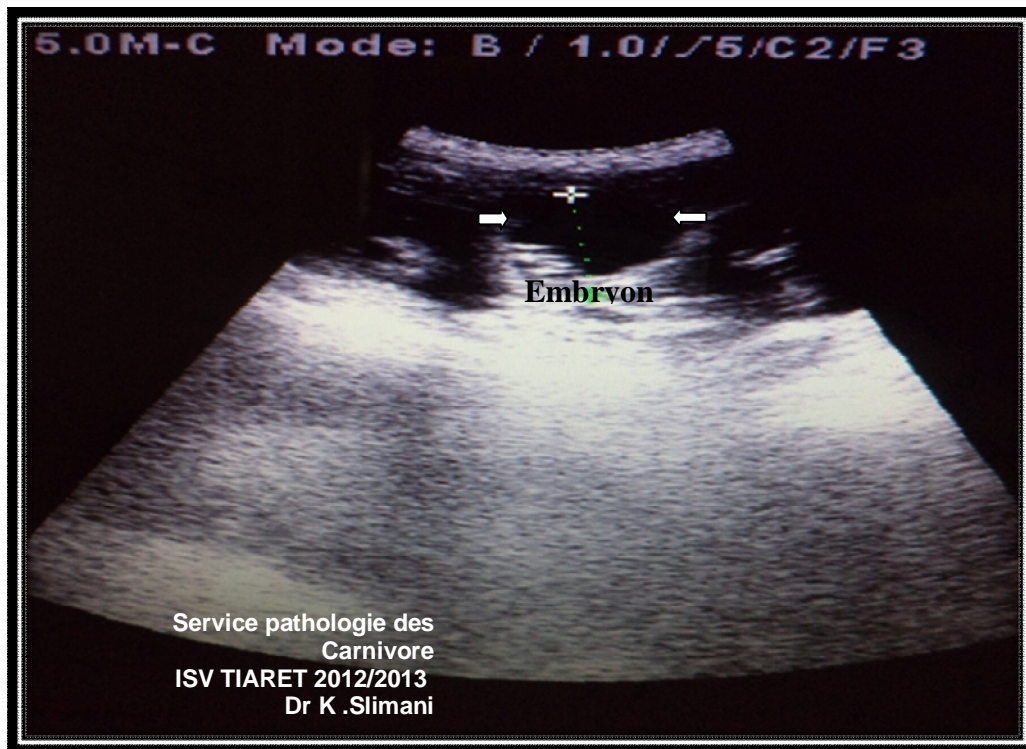


**Figure N° 78:** diagnostic de gestation par échographie 18 jours après IA



**Figure N°79 :** photos échographique d'une ampoule de 20 mm après 18 jr de l'IA.





**Figure N°80 :** photos échographique d'une ampoule de 35mm J35

**La Troisième chienne:**



**Figure N°81 : photo de la troisième chienne**



**Figure N°82 : réalisation d'un écouvillonnage vaginal**

**6) Photos du matériel nécessaire pour le diagnostic de gestation**



**Figure N°83 : photo du matériel échographique utilisé**



### **C) Discussion :**

Le suivi de chaleur chez la chienne était un élément indispensable pour la détermination du moment optimal de l'insémination artificielle, ce suivi se fait grâce à la cytologie vaginale et aux dosages hormonaux cela a été constaté au cours de notre expérimentation et bien décrit en bibliographie.

Les techniques entreprises dans notre expérimentation concernant la récolte de la semence et son dépôt étaient basées sur les données décrites en bibliographie reste que l'insémination artificielle nécessite une préparation minutieuse d'une part et du matériel nécessaire d'une autre part.

L'endroit où se déroule l'insémination artificielle doit être adéquat pour une telle pratique (calme) afin d'éviter un stress inutile aux animaux surtout au moment de la récolte de la semence cela va de même pour le nombre de technicien pratiquant l'insémination.

L'étude de la semence ( sa qualité, nombre de spermatozoïdes, présence ou non des anomalies , indice de mobilité ...etc. ) est un examen indispensable avant toute insémination malheureusement ce paramètre a fait défaut au cours de notre recherche par manque de matériel nécessaire ce même facteur affecte également le choix de la technique d'insémination artificielle dont la meilleure est une insémination par dépôt utérin qui se réalise par une sonde métallique adaptée à ce bute malheureusement non disponible ce qui nous a obligé à choisir le dépôt vaginal dont les chances de réussite sont moindres ce qui a répercuté probablement sur notre résultat.



***CONCLUSION***

## **Conclusion :**

La reproduction chez la chienne est un domaine qui nécessite une connaissance parfaite des particularités physiologique qui caractérise le cycle sexuelle chez l'espèce canine cela va de même qu'une maîtrise des différentes techniques actuelles utilisées pour le suivi des chaleurs ,permettant ainsi de réaliser dans des conditions optimales l'insémination artificielle ; technique permettant d'optimiser la reproduction chez la chienne sur plusieurs paramètres (sanitaire, nombres de portées, fréquence des gestations et d'évité des contraintes qui empêchent d'effectuer une reproduction naturelle (voir détaillées en bibliographie )

Un suivi rigoureux des chaleurs chez une chienne permettant une détermination du moment optimal pour l'insémination (approche de l'ovulation) et l'acquisition d'un matériel adéquat, tous ces facteurs garantissent des résultats positifs chose qui garde tous son intérêt chez le propriétaire.

A la fin notre étude garde toute son originalité vue que c'est une première au niveau de l'institut vétérinaire de Tiaret ( service de pathologies des carnivores) qui reste à développer dans les prochaines années a fin quelle soit pratique courante et intégrante dans le suivi de la reproduction chez l'espèce canine tout en gardant un intérêt particulier sur le palan scientifique pour les étudiants en médecine vétérinaire ainsi qu'une source de connaissances pour les vétérinaires souhaitant métriser la reproduction canine dans ses différent volés.



***Références Bibliographiques***

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALLEN W.E. Endocrinology of the estrus cycle. Vaginal changes of clinical significance. Abnormal bitch physiology and endocrinology. Approach to infertility cases. *In Fertility and Obstetrics in the Dog*, BSAVA Ed., London, 1992, 14-17, 18-28, 129-135.
2. ANDERTON DJ, JONES MA. Blood sampling bitches for pregnancy tests. *Vet Rec*, 1990, 127:119-120 ; BERNARD E. Diagnostic et suivi de la gestation par échographie chez la chienne : élaboration d'un document pédagogique. Thèse Méd. Vét., Lyon, 2002, 89 p ;
3. ARTHUR G.H., NOAKES D.E., PEARSON H. *et al.* Infertility in the bitch. *Vet. Repro. Obst.*, Ed. W.B. Saunders, Philadelphia (USA), 1996, 516-543.
4. BADINAND F., FONTBONNE A., MAUREL M.C. *et al.* Fertilization time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. *J. Repro. Fert.*, 1993, **47**, 63-67.
5. BADINAND F., PETIT C. Quels résultats attendre de la reproduction assistée chez la chienne ? *Recueil de médecine Vétérinaire. Spécial reproduction canine*, 1998, **174**, 153-161.
6. BANKS WJ. Female reproductive system. *In: Applied veterinary histology*. 3rd Ed. Saint Louis: Mosby Inc, 1993, 446-459.
7. BARONE R. Développement des os. *In : Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Paris, Vigot, 1990, 64-66, BARONE R. Appareil urogénital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. *In : Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Paris, Vigot, 1990, 267-674,
8. BARTOLO A. *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 1999 à 2002*. Thèse Méd. Vét., Alfort 2004, n°59.
9. BERNARD E. *Diagnostic et suivi de la gestation par échographie chez la chienne : élaboration d'un document pédagogique*. Thèse Méd. Vét., Lyon, 2002, 89 p ,
10. BILLAULT C. *La durée de gestation réelle chez la chienne et les facteurs l'influençant : étude rétrospective effectuée au Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores entre 2001 et 2006*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2008, 129 p
11. BLENDIGER K. Physiology and pathology of the estrous cycle of the bitch. *Proceedings of the SCIVAC Congress, Rimini, Italy, 2007*, [<http://www.ivis.org>].
12. BRICOUT E. *Contribution à la détermination du moment du pic de LH chez la chienne*. Thèse Méd. Vét., Alfort 1994, n°10.
13. BURKE TJ, REYNOLDS HA. The female genital system. *In: BOJRAB MJ. Pathophysiology in small animal surgery*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1981, 425-434.
14. 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

15. CHRISTIE D.W., BELL E.T. Some observations on the seasonal incidence and frequency of oestrus in breeding bitches in Britain. *J. Small Anim. Pract.*, 1971, **12**, 159-167.
16. CHOQUART V. Suivi échographique et datation de la gestation chez la chienne à partir du pic de LH. Thèse Méd. Vét., Nantes, 2002, 185 p
17. CHRISTENSEN GC, EVANS HE. Female genital organs. *In: MILLER ME. Anatomy of the dog.* Philadelphia: W.B Saunders Company, 1993, 537-546
18. CONCANNON P. W., ENGLAND G., VERSTEGEN J., LINDE FORSBERG C. Determination of the optimal breeding time in the bitch : basic considerations. *Recent advances in small animal reproduction.* IVIS, 8 juin 2002.
19. CONCANNON P.W. Estrus induction in dogs: Approaches, Protocol and applications. *Proceedings of the world congress WSAVA, 2005*, [<http://www.ivis.org>].
20. CONCANNON P.W. Clinical and endocrine correlates of canine ovarian cycles and pregnancy. *In : Kirk (R.W), Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice*, Saunders, Philadelphia, 1986, 1214-1224.
21. CONCANNON PW, LEIN DH. Hormonal and clinical correlates of ovarian cycles, ovulation, pseudopregnancy, and pregnancy in dogs. *In: BONAGURA JD, KIRK RW. Current veterinary therapy X, small animal practice.* Philadelphia: W.B Saunders Company, 1989: 1269-1282.
- 22. Concannon P.W., Mc Cann J.P., Temple M.** Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog *J.Reprod. Fert.*, 1989, Suppl 39, 3-25.
23. CONCANNON PW, POWERS ME, HOLDER W, HANSEL W. Pregnancy and parturition in the bitch. *Biol Reprod*, 1977, 16:517-526; JOHNSTON SD, ROOT KUSTRITZ MV, OLSON PNS. *Canine and Feline Theriogenology.* Philadelphia, WB Saunders, 2001, 592 p
24. CONCANNON PW. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci*, à paraître.
- 25. De Coster R., Beckers J., Beerens D., de Mey J.** A homologous radioimmunoassay for canine prolactin : plasma levels during the reproductive cycle *Acta Endocrinol.*, 1983, Copenhagen (Danemark), 103, 473-478.
26. **Donnay I., Verstegen J., Touati K., Ectors F.** Utilisation des prostaglandines en reproduction canine : bilan et perspectives *Ann. Méd. Vét.*, 1988, 132 (4), 297-306.
27. DOUCET F., VANNIMENUS 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 1994 à 1998.* Thèse Méd. Vét., Alfort 2001, n°38.
28. DUHAUTOIS B. Système reproducteur. *In : Guide pratique de chirurgie des tissus mous chez le chien et le chat.* Paris : MED'COM, 2003, 382-390.

29. DUMON C. Physiologie sexuelle de la chienne. *In : Reproduction du chien et du chat.* Collection les indispensables. Paris : PMCAC Ed. 1992, 11-16.
30. DUMON C. Physiologie sexuelle de la chienne. *In Reproduction du chien et du chat.* PMCAC Ed., Paris, 1992, 11-18.
31. EVANS HE. Prenatal development. *In : Miller's Anatomy of the dog.* 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1993, 32-54,
32. EVANS HE, SACK WO. Prenatal development of domestic and laboratory animals: growth curves, external features and selected references. Zentralbl
33. FELDMAN EC, NELSON RW. *Canine and feline endocrinology and reproduction.* 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 2003, 1104 p.
34. FONTBONNE A., BUFF S., GARNIER F. Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine. *Point Vét.*, 2000, **31** (209), 395-401.
35. FONTBONNE A. *Faire reproduire son chien ou sa chienne. Les clefs d'une pratique réussie.* Maradi Ed., Isle en Dodon, 1996, 15-75, 244-252.
36. FONTBONNE A. Suivi de chaleurs et de gestation : approche diagnostique en cas de troubles de la reproduction et thérapeutique. *In : Comptes rendus du congrès CNVSPA 1993,* 564-567.
37. FONTBONNE A. Utilisation de la mesure du taux de progestérone plasmatique pour la détermination de la période optimale de fécondabilité chez la chienne. *Conférence du congrès CNVSP.* 1992, 121-130, CNVSPA, Paris.
38. FONTBONNE A. Utilisation du dosage de la progestérone chez la chienne. *In Reproduction du chien et du chat.* PMCAC Ed., Paris, 1992, 53-58.
39. JOHNSON CA. Disorders of the estrous cycle. *In: COUTO CG, NELSON RW. Small animal internal medicine.* 5th ed., Saint Louis: Mosby Inc, 2003, 847-867.
40. JOHNSTON S.D. *Canine and feline theriogenology.* Philadelphia: WB Saunders, 2001, 4, 61-65.
41. JONES DE, JOSHUA JO. *Reproductive clinical problems in the dog.* 2nd Ed. Bristol: Wright PSG, 1988, 25-29.
42. **Hoffmann B., Höveler R., Nohr B., Hasan S.H.** Investigations on hormonal changes around parturition in the dog and the occurrence of pregnancy-specific non conjugated oestrogens. *Clin. Endocrinol.*, 1994, 102, 185-189.
43. 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.
45. GRADIL CM, YEAGER AE, CONCANNON PW. Pregnancy diagnosis in the bitch. *In : Kirk's Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice, Vol XIII.* Philadelphia, WB Saunders, 2000, 918-923,

46.GRANDJEAN D., HAYMANN F. *Encyclopédie Royal Canin du Berger Allemand*. Aniwa Publishing 2003, 226-236.

47.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.

48.GUERIN C., FONTBONNE A. Les frottis vaginaux et le suivi du cycle oestral chez les carnivores. Intervet Ed., Angers, 1997, 1-16.

49.LECHEF O. *L'insémination artificielle à l'aide de sperme congelée dans l'espèce canine. Etude bibliographique*. Thèse Méd. Vét., Nantes, 1989, n°111.

**50.Lennoz-Roland M.** Physiologie de la gestation. Diagnostic et suivi de gestation chez la chienne Reproduction du chien et du chat : applications pratiques, Conférence du GERES, Toulouse, 2000, 58-68, CNVSPA, Paris

51.MARSELOO N., FONTBONNE A., BASSU G., RIVIERE., LEBLANC B., RAULT D., BIORGE V., CHASTANT-MAILLARD S. Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches. *5<sup>th</sup> International symposium on canine and feline reproduction "Basic an applied research on domestic, exotic and endangered carnivores". 4 au 6<sup>th</sup> August 2004.* **8**, 75-77.

52.MILLION CM. Déroulement de la mise bas chez la chienne : analyse des dossiers cliniques du centre d'études en reproduction des carnivores de 1989 à 2002. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2004, 125 p.)

53.NICOLAS C. La gestation chez la chienne: Diagnostic, suivi par échographie, estimation de la date de la mise bas chez des chiennes de grandes races (>30kg) à partir des mesures échographiques sur les foetus (diamètre bipariétal et abdominal transverse). Thèse Méd. Vét., Nantes, 2000, 147 p

54.NOAKES DE, PARKINSON TJ, ENGLAND GC. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8th ed. Philadelphia, WB Saunders, 2001, 864 p.

55.ONCLIN K., VERSTEGEN J.P. The role of corpus luteum in pregnancy and anoestrus regulation in the bitch. *In : Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*. Sao Paulo, 4-6 août 2004, 290-292.

56.PURSWELL BJ. Vaginal disorders. *In: Ettinger SJ, Feldman EC. Textbook of veterinary internal medicine*. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 2000, 1566-1571.

57.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>].

58.ROTA A., IGUER-OUADA M., VERSTEGEN J., LINDE-FORSBERG C. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, 1999, **51**, 1045-1058.



- 59.Rotten D.** Régulation de la synthèse et de la sécrétion de *FSH La Reproduction chez les mammifères et l'homme*, 1991, éd INRA, 89-112.
- 60.SILIART B., MONTARDE M.P., LEBRETON A. Endocrinologie de la reproduction. *In Reproduction du chien et du chat*. PMCAC Ed., Paris, 1992, 37-46.
- 61.SIMPSON G, ENGLAND GC, HARVEY HJ. *Manuel of Small Animal Reproduction and Neonatology*. BSAVA, 1998, 235 p)
- 62.SODERBERG SF. Vaginal disorders. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1986, **16**:543-559.
- 63.STEINETZ BG, GOLDSMITH LT, HARVEY HJ, LUST G. Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: detection of relaxin as a marker of pregnancy. *Am J Vet Res*, 1989, 50:68-71. 3.1.2.3 ;
- 64.Steinetz B.G., Goldsmith L.T., Lust G.** Plasma Relaxin levels in pregnant and lactating dogs *Biol. Reprod*, 1987, 37, 719-725.
- 65.TAINTURIER D., BENCHARIF D., GUINTARD C. Insémination artificielle intra utérine en sperme congelé chez la chienne ; technique opératoire scandinave : le cathétérisme du col en aveugle. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 2003, **38**, 237-242.
- 66.THEBAULT, A. (2004). Prophylaxie de l'herpesvirose en élevage canin. *Le Point Vétérinaire* (245), 18- 23.
- 67.VERSTEGEN J., ONCLIN K. Estrus control in the bitch. *Proceedings of the world congress WSAVA, 2002*, [<http://www.ivis.org>].
- 68.YEAGER AE, MOHAMMED HO, MEYERS-WALLEN V, et al. Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus, and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in beagles. *Am J Vet Res*, 1992, 53:342-351; ZONE MA, WANKE MM. Diagnosis of canine fetal health by ultrasonography. *J Reprod Fertil Suppl*, 2001, 57:215-219)