

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**Université MUSTAPHA
Stambouli**



جامعة مصطفى أسطمبولي
معسكر

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biologie

Laboratoire de reproduction animale

THESE de DOCTORAT en SCIENCES

Spécialité biologie

Intitulée

**Détection de l'ovulation et datation de la gestation par usage de
l'examen échographique et cytologique chez la chienne**

Présentée par : Mr **SLIMANI KHALED MABROUK**

Le 08 /07/2020

Devant le jury :

Président	Mr Benbarek Hamma	Pr	Université de Mascara
Examineur	Mme Benchaib Fatima	Pr	Université de Tiaret
Examineur	Mr Yarrou Houari	MCA	Université de Mascara
Examineur	Mr Benhanifia Mokhtar	MCA	Université de Mascara
Examineur	Mr Abdelhadi Si Aneur	Pr	Université de Tiaret
Directeur de thèse	Mr Niar Abdellatif	Pr	Université de Tiaret

Année Universitaire : 2019/ 2020

DEDICACE

*A toi cher père, à toi ma douce mère,
en témoignage de mon amour et ma reconnaissance
pour la saine éducation que vous m'avez donnée et
qui me permet d'être ce que je suis aujourd'hui.*

*A mes charmantes sœurs,
en témoignage de mon attachement pour leur
affection, leurs encouragements et leur sollicitude.*

*A mes beaux-frères en particulier Youssef
en témoignage de ma gratitude
pour leur encouragements.*

*A mes petits neveux et nièces
en leur souhaitant un avenir radieux.*

A vous tous,

Je dédie ce modeste travail.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je rends grâce à Dieu qui m'a donné la force et la volonté d'étudier et d'achever ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent aux membres du jury pour leur participation dans l'évaluation et la valorisation du présent travail.

J'exprime ma profonde gratitude au promoteur de cette étude au *Professeur Abdellatif NIAR*, pour le suivi de l'étude et pour ses précieux conseils qui m'ont servi à la réalisation de ce mémoire. Sa compétence, son dévouement et sa modestie me serviront toujours d'exemple.

Mes remerciements s'adressent en particulier à Mr S.M. HAMMOUDI, et MR BAGDAD KHIATI pour m'avoir initié à l'approche scientifique, pour leur disponibilité sans aucune limitation et pour leurs encouragements.

A toutes mes collègues du service de pathologie des carnivores pour leur soutien et leur aide précieuses.

Table des matières

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Cycle sexuel chez la chienne	4
1.1 Différentes phases du cycle œstral	4
1.1.1 Anœstrus	4
1.1.2 Prœstrus	4
1.1.3 Œstrus	4
1.1.4 Metœstrus ou diœstrus.....	5
1.2 Profil hormonal du cycle	7
1.2.1 Anœstrus	7
1.2.2 Pœstrus	7
1.2.2.1 En début de prœstrus	7
1.2.2.2 Pendant le prœstrus	7
1.2.2.3 En fin de prœstrus	7
1.2.3 Œstrus.....	8
1.2.3.1 Phase pré-ovulatoire	8
1.2.3.2 Phase ovulatoire	8
1.2.3.3 Phase post- ovulatoire.....	9
1.2.4 Metœstrus	9
1.2.4.1 Dans le cas de gestation.....	10
1.2.4.2 Dans le cas de non gestation	10
1.3 Particularités de l'ovulation chez la chienne	11
1.3.1 Folliculogenèse et maturation ovocytaire.....	11
1.3.2 Type d'ovulation.....	12
1.3.3 La phase lutéale.....	12
1.3.4 Particularités chez la chienne de la phase lutéale	13
1.3.5 Particularités de la lutéolyse chez la chienne.....	13
2. Suivi de la reproduction chez la chienne.....	14
2.1 Cytologie vaginale	14
2.1.1 Méthode de prélèvement	14
a. Prélèvement avec une pipette.....	14

b. Ecouvillonnage	14
2.1.2 Fixation du prélèvement	17
2.1.3 Différentes techniques de coloration.....	18
a. Coloration de May-Grünwald-Giemsa.	18
b. Bleu de méthylène	19
c. Coloration de HarrisShorr	19
d. Coloration de Papanicolaou	20
2.1.4 Observation microscopique	21
a. Types cellulaires.....	21
a.1 Cellules parabasales	22
a.2 Cellules intermédiaires	22
a.3 Petites cellules intermédiaires	24
a.4 Grandes cellules intermédiaires.....	24
a.5 Cellules superficielles.....	25
b. Autres cellules vaginales.....	27
b.1 Cellules « metoestrales »	27
b.2 Cellules spumeuses ou « foam cells ».....	27
b.3 Cellules superficielles avec des corps cytoplasmiques.....	27
b.4 Cellules épithéliales contenant des grains de mélanine	28
b.5 Cellules néoplasiques.....	28
c. Autres populations cellulaires	28
c.1 Erythrocytes	28
c.2 Leucocytes	28
c.3 Cellules de la fosse clitoridienne.....	29
c.4 Spermatozoïdes.....	29
c.5 Bactéries	29
2.1.5 Variations de la cytologie vaginale au cours du cycle œstral	29
2.1.5.1 Durant le proœstrus précoce	29
2.1.5.2 Durant le proœstrus moyen.....	30
2.1.5.3 Durant le proœstrus tardif.....	31
2.1.5.4 Durant l'œstrus	32
2.1.5.5 Durant le metœstrus précoce.....	34
2.1.5.6 Durant le metœstrus moyen et tardif	37

2.1.5.7	Durant l'œstrus	38
2.1.5.8	Durant la transition œstrus – œstrus	39
2.1.6	Index cytologiques	42
2.1.6.1	Index éosinophile	42
2.1.6.1.1	Variations de l'IE au cours du cycle œstral	42
2.1.6.1.2	Avantages et inconvénients l'index eosinophile	42
2.1.6.2	Index caryopycnotique (ICP)	42
2.1.6.2.1	Variation au cours du cycle œstral	42
2.1.6.2.2	Avantages et les inconvénients de L'index caryopycnotique (ICP)	42
2.1.6.3	Index superficiel (IS)	42
2.1.6.3.1	Variations au cours du cycle œstral	43
2.1.6.3.2	Avantages et les inconvénients L'index superficiel (IS)	43
2.1.7	Interprétation et détermination de la phase du cycle sexuel	43
2.1.8	Intérêts et limites de la cytologie vaginale	44
2.2	Dosages Hormonaux	45
2.2.1	Dosage de l'œstradiol	45
2.2.2	Dosage de LH	45
2.2.3	Dosage de la progestérone plasmatique	47
2.2.3.1	Evolution de la progestéronémie au cours du cycle	48
2.2.3.2	Réalisation pratique	50
2.3	Echographie ovarienne	53
2.3.1	Technique	53
2.3.2.1	Pendant l'œstrus	54
2.3.2.2	Pendant le œstrus	54
2.3.2.3	Période péri-ovulatoire	55
2.3.3	Intérêts et limites	60
2.4.	Aperçus sur l'induction de l'œstrus par l'utilisation des antiprolactiniques (agoniste de la dopamine)	61
3.	Gestation	63
3.1	Facteurs influençant la durée de gestation	63
3.1.1.	Intervalle ovulation-insémination	63
3.1.2.	Race	64
3.1.3.	Age de la chienne	64
3.1.4.	Poids de la chienne avant la gestation	64

3.1.5. Taille de la portée.....	65
3.1.6. Parité	65
3.1.7. Mode d'insémination : intra-vaginale et intra- uterine.....	65
3.2. Déroulement de la gestation	66
3.2.1. Période de l'embryoblaste	67
3.2.1.1.Période tubaire	67
3.2.1.2 Périodes utérines	68
3.2.2 Période embryonnaire.....	70
3.2.2.1 Mise en place des annexes embryonnaires	70
3.2.2.2 Développement de l'embryon	75
3.2.3 Période fœtale	78
3.2.3.1 Dentition	78
3.2.3.2 Ossification	79
3.2.3.3 Calendrier de la période fœtale	83
3.3 Modifications physiologiques de la chienne gestante	86
3.3.1 Modification hématologiques	86
3.3.2 Modifications biochimiques	86
3.3.3 Modifications cardio-vasculaires	86
3.3.4 Modifications hormonales	86
3.3.5 Modification comportementales	87
3.3.6 Modification physiques	87
3.4 Diagnostic et suivi de la gestation.....	88
3.4.1 Signes physiques liés à la gestation.....	88
a. Modifications comportementales	88
b. Changements d'aspect de la femelle.....	89
3.4.2 Témoins biologiques de la gestation	90
a. Paramètres biochimiques	90
b. Dosages hormonaux	92
3.4.3 Datation échographique de la gestation.....	94
3.4.3.1 Diagnostic précoce de la gestation	96
3.4.3.2 Vitalité des fœtus.....	97
3.4.3.3 Dénombrement des fœtus	98
3.4.3.4 Période embryonnaire.....	100

3.4.3.5 Période fœtale.....	101
-----------------------------	-----

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

1. Objectifs de l'étude	106
2. Lieu de l'étude	106
3. Durée de l'étude.....	107
4. Matériel et méthodes	107
4.1 Animaux	107
4.2 Répartition de l'échantillon en fonction des paramètres étudiés	107
4.3 Suivi des chaleurs.....	108
4.3.1 Animaux concernés	108
4.3.2 Techniques	108
4.3.3 Protocole d'induction des chaleurs	108
4.3.4 Cytologie vaginale	109
4.3.4.1 Matériel utilisé préparation et examen des frottis	110
4.3.4.2 Colorant et coloration	110
4.3.5 Examen échographique des ovaires	114
4.3.5.1 Caractéristique du dispositif	114
4.3.5.2 Sondes.....	115
4.3.5.3 Enregistrements.....	115
4.3.6 Dosage de la progestérone	115
4.3.7 Résultats.....	116
4.3.8 Discussion.....	125
4.3.8.1 Protocole du suivi des chaleurs	125
4.3.8.2 Durée des chaleurs et moment de l'ovulation.....	126
4.3.8.3 Suivi des chaleurs après induction	129
4.3.8.3.1 Dans le cas des chiennes présentant un anœstrus tardif	129
4.3.8.3.2 Dans le cas des chiennes présentant un metœstrus tardif	136
5. Diagnostic et suivi échographique de la gestation.....	139
5.1 Protocole de mise en reproduction.....	140
5.1.1 Suivi des chaleurs.....	140
5.1.2 Saillie.....	140
5.1.3 Choix du repère déterminant le début de la gestation (JO)	140
5.1.4 Matériel échographique	141

5.1.5 Réalisation de l'examen échographique	142
5.1.5.1 Préparation et contention	142
5.1.5.2 Echographie	142
4.5.2.3 Localisation des ampoules	143
5.1.5.3 Identification des l'ampoule	143
5.1.5.3 Tableaux d'étude	144
5.2 Résultats	144
5.2.1 Diagnostic précoce de la gestation	144
5.2.2 Echographies durant la période embryonnaire	144
a. Description des ampoules	145
a.1 Localisation topographique	145
a.2 Aspect échographique des ampoules	145
a.3 Diagnostic différentiel	146
b. Echographie de l'embryon	146
c. Mise en place des annexes	147
c.1 Chorion	147
c.2 Vésicule vitelline et l'allantoïde	148
c.3 Amnios	148
5.2.3 Échographie durant la période fœtale	149
a. Évolution des annexes fœtales	149
a.1 Chorion	149
a.2 Vésicule vitelline	149
b. Echographie du fœtus	149
b.1 Mobilité du fœtus	149
b.2 Identification des régions anatomiques et des organes cavitaires	150
b.3 Gros vaisseaux	152
b.4 Squelette	152
5.2.4 Réalisation d'un calendrier gestationnel	154
5.2.5 Dénombrement des fœtus	155
5.2.6 Durée de la gestation	156
5.2.7 Signes physiques liés à la gestation	156
5.2.7.1 Modifications comportementales	157
5.2.7.2 Modifications anatomiques durant la gestation	157

5.2.7.3 Autres observation.....	158
5.3 Discussion.....	158
5.3.1 Diagnostic précoce de la gestation.....	158
5.3.2 Vitalité des fœtus.....	159
a. mouvements cardiaques.....	159
b. Mouvements fœtaux.....	159
c. Les signes de mortalité fœtale.....	160
5.3.3 Dénombrement des fœtus	160
5.3.4 Datation de la gestation	161
5.3.4.1 Données morphologiques et anatomiques	161
a. Période embryonnaire.....	161
b. Période fœtale	162
5.3.4.2 Calendrier gestationnelle	164
5.3.5 Les signes physiques liés à la gestation.....	168
5.3.5.1 Modifications comportementales	168
5.3.5.2 Modifications anatomiques de la femelle	169
5.3.6 Durée de la gestation et facteurs influençant.....	171
a. Taille de la portée.....	171
b.Parité	171
c.Race	171
d. Age de la chienne	172
CONCLUSION	174
LISTE DES TABLEAUX	
Tableau 1: Principaux événements du cycle sexuel de la chienne	6
Tableau 2 : coloration Diff-Quick ®.....	18
Tableau 3 : Coloration de Harris – Shorr	19
Tableau 4 : La coloration de Papanicolaou	20
Tableau 5: Valeurs du pic de LH.....	47
Tableau 6 : Déroulement des différents évènements d’une gestation chez la chienne	85
Tableau 7: Protocoles expérimentaux des différents auteurs cités	95
Tableau 8 : Première détection échographique de différents stades du développement embryonnaire et de la parturition.....	101
Tableau 9 : Développement embryonnaire du chiot.....	103
Tableau 10 : calendrier gestationnel chez la chienne.....	104

Tableaux 11 : diagnostic précoce des ampoules sur un effectif de 37 chiennes	144
Tableau 12 : évaluation de la taille de la portée, comparée au nombre de chiots nés évaluation réalisée sur un effectif de 7 chiennes.....	155
Tableau 14 : datation échographique de la gestation, effectuée sur 37 chiennes de différentes races, par usage d'un échographe DRAMINSKI Animal profil de J26-DS à J50-DS	166
Tableau 13 : datation échographique de la gestation, effectuée sur 37 chiennes de différentes races, par usage d'un échographe DRAMINSKI Animal profil de J10-DS à J25- DS	167

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution hormonale (LH, progestérone et œstradiol) au cours du cycle sexuel chez la chienne gestante	9
Figure 2 : représentation schématique de la courbe de progestérone chez une chienne gestante et non gestante	11
Figure 4 : Technique de prélèvement par écouvillonnage	15
Figure 3 : Rappels anatomiques et technique de prélèvement	16
Figure 5 : schéma des différentes couches de l'épithélium vaginal de la chienne	17
Figure 6 : Frottis vaginal de chienne coloré avec la méthode Diff-Quick	18
Figure 7 : Frottis vaginal au grossissement 1000 pratiqué chez une femme et coloré avec la technique de Papanicolaou.	21
Figure 8 : Cellules parabasales au grossissement 400	22
Figure 9: Petites cellules intermédiaires au grossissement 400.....	23
Figure 10 : Grande cellule intermédiaire au grossissement 400.....	24
Figure 11 : Les cellules du frottis vaginal	25
Figure 12 : Cellules superficielles kératinisées anuclées au grossissement 400	26
Figure 13 : Cellules metoestrales au grossissement 100	27
Figure 14 : Frottis de proœstrus débutant grossissement 400	30
Figure 15 : Frottis de proœstrus moyen grossissement 400	31
Figure 16 : Frottis de proœstrus tardif grossissement 100	32
Figure 17 : Frottis d'œstrus grossissement 100	33
Figure 18 : Représentation schématique de la cytologie vaginale rencontrée lors du proœstrus, de l'œstrus et du metœstrus	34
Figure 19 : Schéma typique de la modification des cellules épithéliales vaginales à la survenue du metœstrus	36
Figure 20 : Frottis de début de metœstrus 100	36
Figure 21 : Frottis de metœstrus grossissement 400.....	37

Figure 22 : Frottis d'ancestrus grossissement 100	38
Figure 23 : Correspondance entre le pic de LH et le début de l'augmentation du taux de Progesterone	48
Figures 24 : Aspect échographique des ovaires en période pré-ovulatoire	55
Figure 25 : « collapsus folliculaire » au moment de l'ovulation	56
Figure 26 : Aspect échographique des ovaires au moment de l'ovulation : persistance de structures hypoéchogènes juste après ovulation	58
Figure 27 : Aspect échographique des ovaires après ovulation	59
Figure 28 : Aspect échographique des ovaires après ovulation : accumulation de liquide entre l'ovaire et la bourse ovarique	59
Figure 29 : Durée de la gestation chez la chienne : variation suivant le repère choisie pendant la chaleur (J0= jour du pic de LH)	66
Figure 30 : Blastocyste uni laminaire chez les Mammifères.....	69
Figure 31: Implantation centrale de l'œuf	70
Figure 32 : Premiers stades de formation des annexes embryonnaires chez la chienne J20-LH soit J12-DS	71
Figure 33 : Embryon 16 somites, de 4,5mm de long à J21-LH	72
Figure 34 : Utérus et l'embryon à J23-LH soit J15-DS	74
Figure 35: Annexes fœtales à la fin du développement du chiot	76
Figure 36: Embryon à J23- LH.	77
Figure 37 : Evolution de l'ossification sur une vue latérale du squelette	80
Figure 38: Ossification des sternèbres	82
Figure 39 : Ossification progressive du membre thoracique et de l'épaule	83
Figure 40 : kits de coloration utilisée durant le suivi des chaleurs	111
Figure 41: écouvillonnage vaginale en vue de la réalisation d'un frottis	112
Figure 42 : étalement avant coloration.....	112
Figure 43 : Fixation du frottis avant coloration.....	113
Figure 44 : lecture au microscope des frottis vaginaux	113
Photos 45 : Examen échographique durant les chaleurs	115
Figure 46 : évolution chronologique du diamètre des ovaires et l'index éosinophile (IE) à partir du 5ème jour de præstrus jusqu'au jour de l'ovulation chez 39 chiennes	116
Figure 47 : Perte vulvaire observée chez les chiennes après 35 jours de traitement par la bromocriptine (Parlodel® 2,5 mg) administration orale	117
Figure 48 : écouvillons de præstrus	119

Figure 49: évolution chronologique de l'index éosinophilique (IE) et le diamètre des ovaires à partir du 5 ^{ème} jour de proœstrus jusqu'au jour de l'ovulation.....	119
Figure 50 : Évolution chronologique du taux de la progestérone et de l'index éosinophilique (IE) à partir du 5 ^{ème} jour du proœstrus jusqu'au jour de l'ovulation.....	120
Figure 51 : évolution chronologique de la progestéronémie et du diamètre des ovaires a partir du 5 ^{ème} jour du proœstrus jusqu'au jour de l'ovulation	121
Figure 52 : Vue d'un frottis vaginal de proœstrus au grossissement x40.....	122
Figure 53: Une vue d'un frottis vaginal d'œstrus à un grossissement de x100	122
Figure 54: Vue échographique longitudinale de l'ovaire	123
Figure 55 : vue échographique en coupe longitudinale de l'ovaire en période pré-ovulatoire	124
Figure 56 : salle aménagée pour la réalisation les examens échographiques.....	143
Figure 57 : moment de détection des bourgeons génitaux par échographie durant les suivis de gestation de 8 chiennes (J0-DS)	151
Figure 58 : variation de la durée de la gestation (repère choisie J0-DS) en fonction du nombre de la portée sur un effectif de 8 chiennes	156
ANNEXES	
Annexes 1 : Illustrations cytologies des différentes phases du cycle œstral.....	176 -190
Annexes 2 : Illustrations d'échographie réalisées durant le suivi de gestation chez 37 chiennes durant la gestation	191-212
REFERENCES	213

تضمنت هذه الدراسة الكشف عن رصد الشبق، الإباضة، متابعة الحمل وتطبيق بروتوكول لتحفيز الشبق على عدد إجمالي يبلغ 95 كلبة من سلالات مختلفة وتتراوح أعمارهن بين 6 أشهر و 13 عامًا ، في عيادة أمراض أكلت اللحوم في معهد العلوم البيطرية في تيارت على مدار الفترة بين يناير 2011 ويناير 2016. تُستخدم ثلاث تقنيات تشخيصية لمراقبة الشبق واكتشاف الإباضة المتمثلة في فحص المبايض بالموجات فوق الصوتية وقراءة مسحات المهبل وتحديد مستويات هرمون البروجسترون في الدم. تتم مراقبة المسار السريري للحمل عن طريق الفحص بالموجات فوق الصوتية وذلك منذ آخر تزاوج الذي يمثل اليوم الذي تم اختياره معلماً لتحديد بداية الحمل. تظهر مراقبة الشبق من اليوم الخامس من بداية فقدان الدم من الفرج وجود علاقة كرونولوجية بين مستويات البروجسترون وتطور مؤشر الحمضات وتطور قطر المبيضين. في يوم الإباضة ، يتراوح قطر المبيض بين 18.04 ± 1.69 مم إلى 19 ± 2.077 مم وهو ما يقابل مؤشر الحمضات أكبر من 80% مع مستوي يفوق 23 نانومول/ل للبروجسترون في الدم. سمح استخدام البروموكريبتين عن طريق الفم عند كليات من سلالة أطلس شبيرد بتحفيز الشبق على التوالي بعد 40 ± 8 أيام في حالة استخدامه خلال المينستروس المتأخر و 32 ± 10 يوماً في المتوسط في حالة استخدامه أثناء انستروس المتأخر. التشخيص المبكر بواسطة الموجات فوق الصوتية للحمل، ممكن على وجه اليقين من اليوم 15 منذ آخر تزاوج و من خلال مراقبة المراحل المتعاقبة من نمو الجنين ، تم وضع تقويم الحمل وفقاً للمعايير التشريحية والمورفولوجية التي تم وصفها من يوم 13 إلى يوم 50 منذ آخر تزاوج الذي يمثل اليوم الذي تم اختياره معلماً لتحديد بداية الحمل.

الكلمات الرئيسية : الحث ; رصد الشبق ; الإباضة ; المبيض ; الموجات فوق الصوتية ; علم الخلايا ; الحمل ; آخر تزاوج .

Resumé

Cette étude comprend une détection de l'ovulation, un suivi de la gestation et l'application d'un protocole d'induction des chaleurs, sur un effectif total de 95 chiennes de différentes races et d'un âge compris entre 6 mois et 13 ans, au niveau de la clinique de pathologies des carnivores de l'institut des sciences vétérinaires de Tيارت sur une période comprise entre janvier 2011 et janvier 2016. Trois techniques de diagnostic sont utilisées pour le suivi des chaleurs et la détection de l'ovulation à savoir, l'examen échographique des ovaires, la lecture des frottis vaginaux et la détermination des taux sanguins de la progestérone. Le suivi de l'évolution clinique de la gestation est réalisé par examen échographique et ceci à partir du dernier jour de la saillie. Le suivi des chaleurs à partir du cinquième jour depuis le début des pertes vulvaires montre l'existence d'une relation chronologique entre les taux de la progestérone, la progression de l'index éosinophilique et l'évolution du diamètre des "ovaires". Au moment de l'ovulation, le diamètre de l'ovaire se situe entre $18,04 \pm 1,69$ mm à $19 \pm 2,077$ mm correspondant à un indice éosinophilique supérieur à 80 % et à un taux de progestérone supérieur à 23 nmol/L ; L'utilisation de la bromocriptine par voie orale chez des chiennes de race berger de l'atlas a permis l'induction des chaleurs respectivement après 40 ± 8 jours dans le cas de son utilisation durant le métoestrus tardif et 32 ± 10 jours en moyenne dans le cas de son utilisation durant l'anoestrus tardif . Un diagnostic précoce de la gestation par est possible avec certitude à partir du 15ème jour depuis la dernière saillie et en observant les étapes successives du développement fœtal, le calendrier de la gestation est élaboré en fonction de critères anatomiques et morphologiques décrits du 13ème au 50ème depuis la dernière saillie.

Mots clés : induction, suivi des chaleurs, ovulation, ovaire, échographie, cytologie, gestation, dernière saillie.

Summary

This study includes a detection of ovulation, a follow-up of the pregnancy and the application of a protocol of induction of heat, on a total number of 95 bitches of different breeds and an age between 6 months and 13 years, at the clinic of carnivore pathology, Institute of Veterinary Sciences of Tيارت over a period between January 2011 and January 2016. Three diagnostic techniques are used for monitoring heat and detecting ovulation at namely, ultrasound examination of the ovaries, reading vaginal smears and determining blood levels of progesterone. The clinical course of gestation is monitored by ultrasound examination and this from the last day of mating. The follow-up of heat from the fifth day since the onset of vulvar losses shows the existence of a chronological relationship between the levels of progesterone, the progression of the eosinophilic index and the evolution of the diameter of the ovaries. ovulation, the diameter of the ovary is between 18.04 ± 1.69 mm to 19 ± 2.077 mm corresponding to an eosinophilic index greater than 80% and a progesterone tau greater than 23 nmol / L; L The use of bromocriptine orally in bitches of the Atlas Shepherd breed allowed the induction of heat respectively after 40 ± 8 days in the case of its use during late metoestrus and 32 ± 10 days on average in the case of its use during late anestrus. An early diagnosis of pregnancy by is possible with certainty from the 15th day since the last mating and by observing the successive stages of fetal development, the pregnancy calendar is worked according to anatomical and morphological criteria described from the 13th to the 50th since the last mating.

Keywords: induction, heat monitoring, ovulation, ovary, ultrasound, cytology, pregnancy, last mating

INTRODUCTION

La détermination du jour de l'ovulation est un objectif important dans le suivi des chaleurs chez la chienne ; ainsi la cytologie est intéressante dans la détermination de la phase du cycle, mais demeure insuffisante dans le diagnostic de l'ovulation et nécessite d'être combinée aux dosages de la progestérone et/ou à l'échographie des ovaires, cette dernière présente l'avantage de visualiser directement les ovaires et l'utérus, sans être invasif et offre une précision, car l'ovulation peut être déterminée avec certitude. Dans un cadre médical l'échographie des ovaires et la cytologie vaginale offrent la possibilité de dépistage d'éventuelles infections génitales ou des anomalies ovariennes (kystes, tumeurs) qui se répercute sur le cycle œstral de la chienne.

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

Dans une première partie, nous rappellerons les différents événements qui caractérisent le cycle sexuel de la chienne ainsi que ses particularités, les différentes techniques utilisées dans le suivi des chaleurs toute en s'intéressant également à la gestation et son suivi en détaillant les différentes étapes du développement embryonnaire et foetal. Ses données bibliographiques nous ont servies au cours de notre expérimentation, de valider les repères choisis pour déterminer les différentes phases du cycle et le moment de l'ovulation ainsi que le calendrier gestationnel la datation de la gestation que nous avons proposée

Dans une seconde partie, nous précisons les techniques utilisées dans le suivi des chaleurs à savoir la cytologie vaginale, l'examen échographique des ovaires et le dosage de la progestérone, l'induction des chaleurs ainsi qu'un rappel du principe de fonctionnement et la sémiologie l'échographique et la datation échographique de la gestation.

Notre étude expérimentale présente un suivi de la reproduction sur un effectif de 135 chiennes de différentes races, à la clinique de pathologie des carnivores de l'Institut des Sciences vétérinaires de Tiaret, sur une période s'étalant de janvier 2011 à janvier 2016.

Les buts poursuivis est de répondre aux questions suivantes :

- ✓ faut-il compléter l'utilisation des frottis vaginaux ou de l'échographie par un dosage de progestérone pour le diagnostic de l'ovulation ?
- ✓ existe-il un lien entre l'évolution de l'indice éosinophilique, l'aspect échographique des ovaires et le taux de la progestérone à l'approche de l'ovulation ?
- ✓ Quels sont les facteurs qui peuvent influencer la détection de l'ovulation par l'usage de ces trois techniques ?
- ✓ Peut on utiliser la bromocriptine par voie orale peut-il induire des chaleurs ovulatoires?
- ✓ La bromocriptine peut-elle être utilisée pour anticiper un retour de chaleur en dehors de ses indications habituelles pour le traitement de l'anœstrus tardif chez la chienne ?
- ✓ à partir de quel moment est possible de diagnostiquer précocement une gestation par échographie ?
- ✓ Est-il possible d'établir un calendrier gestationnel, qui récapitule toutes les étapes du développement embryonnaire et fœtal à partir du jour de la dernière saillie ?
- ✓ Quels sont les facteurs qui influencent la datation de la gestation par échographie ?
- ✓ Quelles sont les différentes modifications anatomiques et comportementales accompagnant la gravidité de la chienne ?

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Cycle sexuel chez la chienne

1.1 Différentes phases du cycle œstral

1.1.1 Anœstrus

Phase de repos sexuel apparent, est une période longue et obligatoire marquée par une inactivité ovarienne, une involution utérine et une réparation de l'endomètre. La vulve est petite et il n'y a pas de pertes vulvaires. D'un point de vue comportemental la chienne n'a aucun intérêt sexuel pour les mâles.

Cette phase dure de 2 à 8 mois selon Fontbonne et al. (2000) et 1 à 6 mois selon Blendinger (2007). Elle débute avec la parturition chez la chienne gestante et prend fin avec l'apparition des chaleurs. Chez la chienne non gestante il est difficile de distinguer cliniquement le début de cette phase du cycle.

1.1.2 Proœstrus

C'est la période d'imprégnation œstrogénique et de croissance folliculaire caractérisée par des manifestations comportementales et génitales. Elle débute par des écoulements séro-hémorragiques à hémorragiques d'origine utérine à la commissure inférieure de la vulve. Cette dernière s'œdématie et devient turgescente. La chienne attire les mâles mais refuse l'accouplement par un comportement agressif ou joueur. La durée du pro-œstrus varie de 3 jours à 3 semaines avec une moyenne de 9 jours selon Blendinger (2007) et, de 6 à 11 jours avec un intervalle pouvant s'étendre de 2-3 jours à 25 jours selon Marti (2002) .

En fin de pro-œstrus, au moment du pic d'œstradiol, le comportement de défense vis-à-vis des mâles est moindre et les sécrétions vaginales tendent à s'estomper.

1.1.3 Oestrus

Cette phase débute lorsque la chienne accepte la saillie, cela se traduit par l'apparition du réflexe d'Amantéa : l'attouchement de la région périnéale 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 est dû à une baisse brutale du taux d'œstradiol et à une augmentation de la progestéronémie. C'est pendant cette phase qu'ont lieu l'ovulation et la fécondation. L'ovulation se produit 48 à 72 heures après le début de l'œstrus (Guerin, 1998) ou 12 jours après le début du pro-œstrus mais cela varie beaucoup et peut aller de 5 à 27 jours après le début des chaleurs (Romagnoli, 2006).

L'œstrus comportemental dure en moyenne 7 jours avec un intervalle allant de 3 jours à 3 semaines selon Blendinger (2007) (5). Selon Verstegen & Onclin (2002), il peut débuter de 5 jours avant à 3 jours après l'ovulation. Les chaleurs regroupent les phases de pro-œstrus et d'œstrus.

1.1.4 Metœstrus ou diœstrus

Cette période, appelée phase lutéale, regroupe la fin de la mise en route du corps jaune (metœstrus) et la phase d'état de celui-ci (diœstrus), les deux étant le plus souvent confondues chez la chienne (Baron, 2006). Le diœstrus est caractérisé par une activité importante des corps jaunes qui sécrètent la progestérone à un taux élevé, que la chienne ait été ou non fécondé. Il débute par l'arrêt de l'acceptation du mâle. Sa fin est plus difficile à définir, en général on prend comme critère la reconstitution complète de l'endomètre, 2 à 3 mois lors d'absence de gestation) La vulve reprend un aspect semblable à ce qui peut être observé en anœstrus (Blendinger, 2007). Cette phase dure en moyenne 75 jours avec un intervalle allant de 60 à 90 jours (8) et peut aller jusqu'à 110-140 jours selon Cathenoz & Marsan (1996) (tableau 1).

Tableau 1: Principaux événements du cycle sexuel de la chienne (Fontbonne, 2003).

Phases	Pro-œstrus	Œstrus	Métœstrus	Anoestrus
Durées	7 à 10 jours	5 à 10 jours	60 à 120 j.	Longueurs variable
Ovaires	Croissance folliculaire rapide	Ovulation, et développement du corps jaune	Corps jaune sécrétant puis régressant	Croissance folliculaire lente
Utérus	Congestion Augmentation des glandes	Prolifération de l'endomètre	Nidation, gestation, Phase sécrétoire de l'endomètre, puis desquamation et restauration	Phase de repos, puis léger épaissement de l'endomètre
Muqueuse vaginale	Rouge, oedématisée Présence de plis Sécrétion fluides	Rougeâtre, moins oedématisée Plis profonds et serrés Dessèchement de la surface	Rose Plis séparés, peu profonds Surface à reflets humides	Lisses (rose) Plis effacés Modérément humide
Observations cliniques et comportementales	Vulve augmentée de volume Prestes vulvaires sanguines Attraction des males Refus de l'accouplement	Vulve oedématisée Pertes vulvaires réduites Attraction des males Réflexe de posture et acceptation du male	Nidation, gestation Mises bas et lactation ou pseudo gestation (durée de vie du corps jaune)	Pas de signe extérieur Période optimale pour les interventions de convenances

1.2 Profil hormonal du cycle

1.2.1 Anœstrus

Les concentrations d'œstradiol sont basales pendant l'anœstrus. 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'anœstrus. 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 & Onclin, 2002).

1.2.2 Proœstrus

1.2.2.1 Début de proœstrus

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 (Verstegen & Onclin, 2002). 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 (Verstegen & Onclin, 2002).

1.2.2.2 Pendant le proœstrus

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) (Verstegen & Onclin, 2002).

1.2.2.3 En fin de proœstrus

L'augmentation du relargage d'œstradiol aboutit à un pic qui prépare l'hypophyse et l'hypothalamus à une décharge massive de LH et de FSH. Le taux d'œstradiol passe d'une valeur basale située entre 2 et 10 pg/ml à une valeur située entre 50 et 120 pg/ml selon Goodman (2001), entre 30 et 70 pg/ml selon Fontbonne et al. (2000). Cette augmentation se fait sur une période de 10 à 14 jours (Goodman, 2001).

Le pic a lieu 2 à 3 jours avant le début de l'œstrus (Goodman, 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, 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 (Verstegen & Onclin, 2002).

Concannon (2005) 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.

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 *et al.* 2000). Cette augmentation rapide de la concentration de progestérone ne peut être dissociée chronologiquement de l'augmentation du taux de LH (Concannon, 2005).

1.2.3 Œstrus

1.2.3.1 Phase pré-ovulatoire

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

La durée de la décharge ovulante semble varier de 1 à 3 jours selon Concannon (2005) ; de 24 à 96h selon Chaffaux & Bosse (1997) ; dure en moyenne 3,3 jours selon Fontbonne *et al.* (2000) et 36+/-5 heures d'après De Gier *et al.* (2006). Son taux sérique varie de 10 à 22 ng/ml selon Fontbonne *et al.* (2000) et est en moyenne de 18,7+/-5,8 ng/ml selon De Gier *et al.* (2006).

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

1.2.3.2 Phase ovulatoire

Le pic pré-ovulatoire de LH déclenche l'ovulation 30 à 48 heures plus tard, cela peut

dépasser 96h dans certains cas (De Gier *et al.* 2006) .On considère que l'ovulation a eu lieu lorsque le taux circulant de progestérone dépasse 5 à 10 ng/ml (Fontbonne *et al.* 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 (Fontbonne *et al.* 2000).

1.2.3.3 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^{ème} et le 11^{ème} jour de l'œstrus endocrinologique, moment où débute le metœstrus cytologique (figure2). 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, 2006) .

1.2.4 Metœstrus

Que la chienne soit gestante ou non, le corps jaune sécrète de la progestérone à des taux élevés. Le taux circulant atteint un maximum entre le 15^{ème} et le 30^{ème} 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 (2007) , puis décline jusqu'à atteindre un taux inférieur à 1 ng/ml à J60-J70 post pic LH ce qui marque la fin du diœstrus (Goodman, 2001 ; Blendinger, 2007).

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

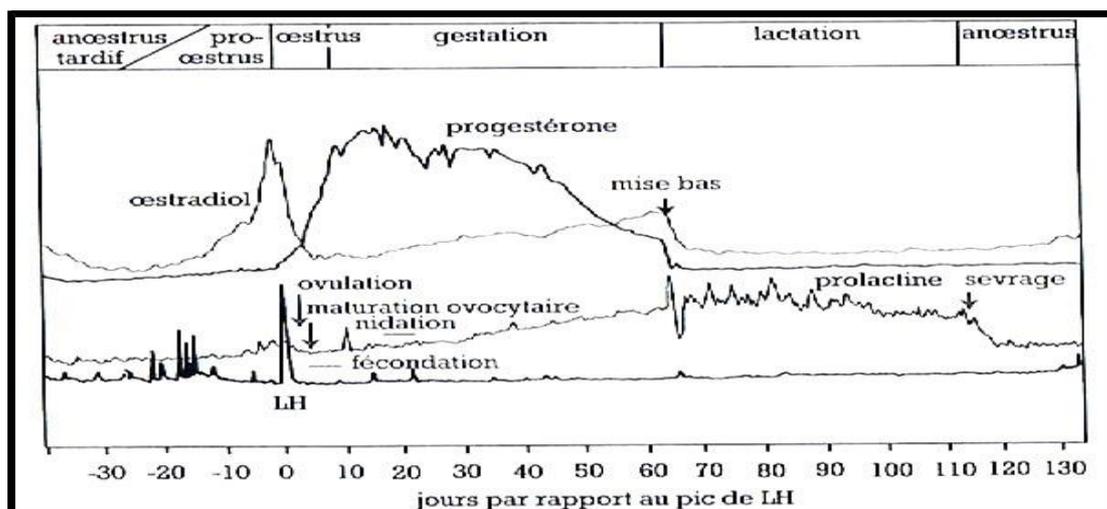


Figure 1 : Evolution hormonale (LH, progestérone et œstradiol) au cours du cycle sexuel chez la chienne gestante (Fontbonne *et al.* 2000).

1.2.4.1 Dans le cas de gestation

Après son pic, la progestéronémie chute légèrement. Cependant une légère remontée se produit entre le 25^{ème} et le 40^{ème} 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, 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 (Goodman, 2001). le taux d'œstradiol, devenu très faible au moment du pic de LH, remonte après le 25^{ème} ou 30^{ème} 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 (Figure 1). Sa sécrétion présente un pic à 4-6ng/ml entre le 40^{ième} et le 50^{ième} jour de gestation puis diminue avant terme. Elle devient indétectable 1 à 6 semaines après la parturition (Fontbonne *et al.* 2000 ; Romagnoli, 2006).

Le taux de prolactine augmente dès le deuxième tiers de la gestation et devient significativement élevé entre le 30^{ème} et le 35^{ème} 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, 2006).

1.2.4.2 Dans le cas de non gestation

La progestéronémie ne présente pas de remontée après son pic, elle diminue progressivement à partir du deuxième tiers du metœstrus jusqu'à J50-J80 après le pic de LH (Romagnoli, 2006) (figure2). La prolactinémie reste basse pendant la deuxième moitié du metœstrus, \leq 2ng/ml, sauf lors de pseudogestation. 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 pseudogestation deux mois après les chaleurs (Romagnoli, 2006) (figure2).

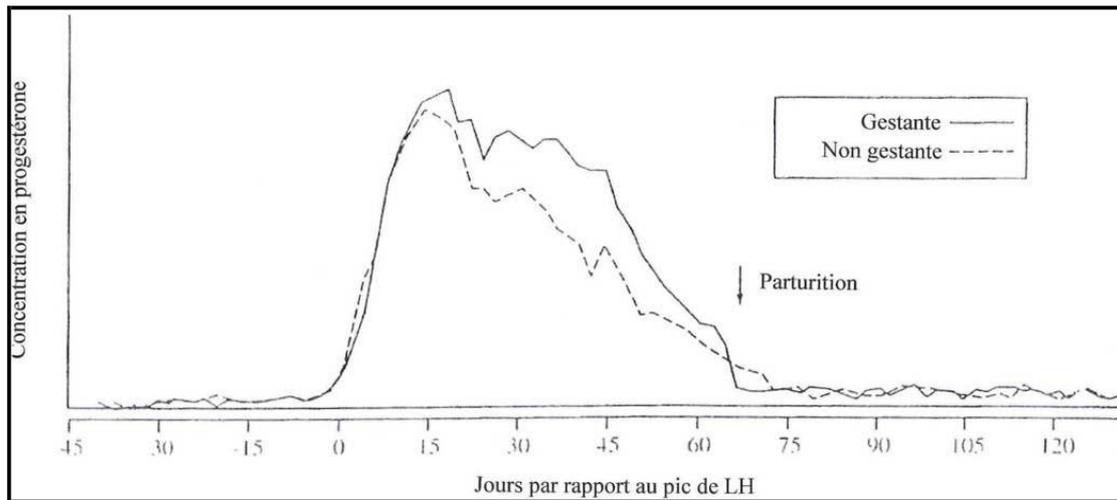


Figure 2 : représentation schématique de la courbe de progestérone chez une chienne gestante et non gestante (Baron, 2006)

En résumé le cycle hormonale de la chienne se traduit par :

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

Contrairement à ce que nous observons dans les autres espèces, l'élévation de la progestéronémie chez la chienne n'est pas le témoin de la gestation, mais de l'ovulation.

1.3 Particularités de l'ovulation chez la chienne

1.3.1 Folliculogénèse et maturation ovocytaire

La folliculogénèse comporte une première période de croissance lente, le follicule primordial se transformant en follicule secondaire. Cette période n'est pas sous l'influence des hormones gonadotropes. Pendant l'anœstrus, la croissance folliculaire débute et les follicules atteignent un diamètre maximal de 0,6 à 1,0 mm (Fontbonne, 2008).

La phase de croissance rapide est, quant à elle, sous influence hormonale. Elle mène au follicule tertiaire qui deviendra un follicule ovulatoire ou atresique. Au début du pro-œstrus, plusieurs follicules grandissent pour atteindre une taille de 1,5 à 5 mm de diamètre à la fin du pro-œstrus (Hase *et al.* 2000).

Quelques jours avant l'ovulation, la paroi du follicule s'épaissit, le volume de l'ovaire augmente et à sa surface les follicules matures font protrusion. A ce moment là, les follicules mesurent entre 3 et 8 mm de diamètre (Hase *et al.* 2000).

L'ovulation fait suite à une contraction du follicule qui expulse un ovocyte I immature qui nécessite une maturation dans les oviductes d'au moins 48h avant d'être fécondable (England & Concannon , 2002).

En effet, Reynaud *et al.* (2005) démontrent que les spermatozoïdes ne peuvent pas pénétrer dans l'ovocyte tant qu'il n'a pas achevé sa maturation. L'ovocyte mature, bloqué en métaphase II, reste viable de 5 à 8 jours (Fontbonne, 2008 ; England , 2006).

La mise en place du corps jaune fait suite à l'ovulation et conduit au développement du tissu lutéal autour d'une cavité résiduelle.

1.3.2 Type d'ovulation

L'ovulation chez la chienne est spontanée, ce qui signifie que l'accouplement n'est pas nécessaire pour que l'ovulation ait lieu. D'autre part, la chienne est multipare, on assiste donc à une série de ruptures folliculaires. Il faudrait par conséquent parler de poly-ovulations. Tous les follicules n'étant pas au même stade, au niveau de l'ovaire, les ovulations ne se produisent pas au même moment. Des études ont montré que ces ovulations se déroulaient sur un intervalle d'environ 36 heures (Boyd *et al.* 1993).

1.3.3 Phase lutéale

Il s'agit de la phase de synthèse de progestérone par le corps jaune. Ce dernier est une glande endocrine transitoire dont la vie peut être décomposée en 3 ou 4 phases chez la chienne (Verstegen & Onclin, 1998) (Encadré 1).

Les variations endocrinologiques qui se produisent lors de cette phase lutéale ont des répercussions biologiques diverses) (Choquart , 2002)

Le comportement d'œstrus débute autour du moment de la décharge ovulatoire de LH, pendant que le taux d'œstrogènes diminue et celui de progestérone augmente. La baisse du ratio œstrogènes/progestérone semble être un élément déclenchant du comportement œstral chez la chienne (England & Concannon , 2002).

Le tractus génital subit des modifications :

L'endomètre, l'œdème et la congestion diminuent suite à la chute du taux d'œstrogènes et, la montée de la progestéronémie provoque une dentellisation de la muqueuse utérine préparant l'utérus à la nidation. La progestérone inhibe également la motricité utérine et maintient le col fermé. (England & Concannon , 2002).

La muqueuse vaginale devient plus plissée, moins oedématisée et blanchâtre au moment de la décharge ovulante puis, au moment de la réduction brutale de la kératinisation au début du metœstrus elle se modifie et est constituée de parties épaisses séparées de parties plus fines vascularisées. (England & Concannon , 2002).

1.3.4 Particularités chez la chienne de la phase lutéale

Chez la chienne, il existe une particularité spécifique : la lutéogenèse est initiée durant la phase de pro-œstrus par une lutéinisation pré-ovulatoire du follicule cavitaire, conduisant à une synthèse précoce de progestérone grâce à une réorganisation complexe des cellules folliculaires en cellules lutéales (Lennoz & Rolland, 1975).

Ces cellules lutéales, comme dans les autres espèces, se chargent en graisse colorée par un pigment caroténoïde, la lutéine, qui donne sa couleur au corps jaune. Cependant, chez la chienne, ce dernier prend une couleur plutôt rosée (Lennoz & Rolland, 1975). Il n'y a pas de corrélation entre le nombre de corps jaunes présents au niveau des ovaires et le nombre d'embryons. Ainsi, Sokolowski (1971), a montré, au cours d'une étude portant sur le maintien de la gestation chez des chiennes ovariectomisées à l'aide d'une supplémentation préalable en progestagènes (acétate de médroxyprogestérone, à 100 mg par animal, que :

- sur 9 chiennes étudiées entre les 30 et 40^{ème} jours de gestation, il y avait 55 corps jaunes, et 45 embryons (perte de 18%)
- sur 7 chiennes étudiées entre les 42 et 56^{ème} jours de gestation, il y avait 49 corps jaunes, et 36 fœtus viables (perte de 26,5%). D'autre part, le taux plasmatique en progestérone apparaît être indépendant du nombre de fœtus ou du nombre de corps jaunes fonctionnels.

1.3.5 Particularités de la La lutéolyse chez la chienne

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

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

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

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

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

2. Suivi de la reproduction chez la chienne

2.1 Cytologie vaginale

2.1.1 Méthode de prélèvement

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

a. Prélèvement avec une pipette

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

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

Une goutte du produit de récolte est déposée à l'extrémité d'une lame de microscope. Cette dernière est maintenue verticalement pour permettre l'écoulement du liquide sur l'ensemble de la longueur. Puis l'excédent est essuyé (Holst, 1986 ; Roszel, 1977 ; Guyant, 1988 ; Olson *et al.* 1984 ; England, 1992 ; Baker & Lumsden, 2001).

Cette technique est la moins douloureuse pour l'animal. Néanmoins, le prélèvement avec une pipette peut altérer la morphologie des cellules. La quantité des cellules prélevées peut être insuffisante. Il tend à minorer les comptages cellulaires, ce qui entraîne des pourcentages peu fiables et augmente les index (Evans & Savage, 1970 ; Guyant, 1988 ; Olson *et al.* 1984).

b. Ecouvillonnage

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

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

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

Les lèvres vulvaires peuvent être écartées manuellement avec le pouce et l'index. L'écouvillon est introduit au niveau de la commissure dorsale de la vulve (figures 3 , 4). Puis il est orienté crânio-dorsalement en direction de la colonne vertébrale. Une fois passée au dessus de l'arcade ischiatique, l'instrument est dirigé crânialement sur une quinzaine de centimètres. Au contact de la muqueuse du vestibule ou de la partie caudale du vagin, l'écouvillon subit une rotation. Le mouvement doit être imprimé avec une force suffisante pour assurer un bon contact avec la muqueuse vaginale. Puis l'écouvillon est extrait délicatement des voies génitales (Roszel, 1977 ; Johnston, 1988 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Neveux, 1999).

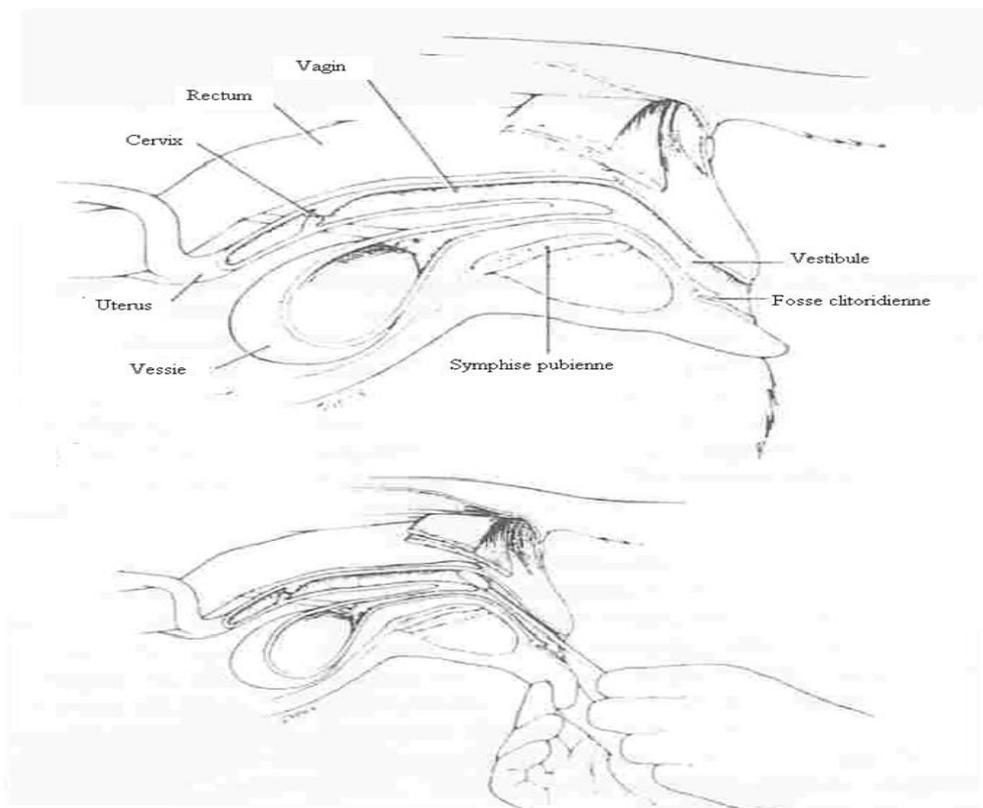


Figure 3 : Rappels anatomiques et technique de prélèvement (Johnston *et al.* 2001).



Figure 4 : Technique de prélèvement par écouvillonnage (Bowen, 2000).

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

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

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

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

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

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

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

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

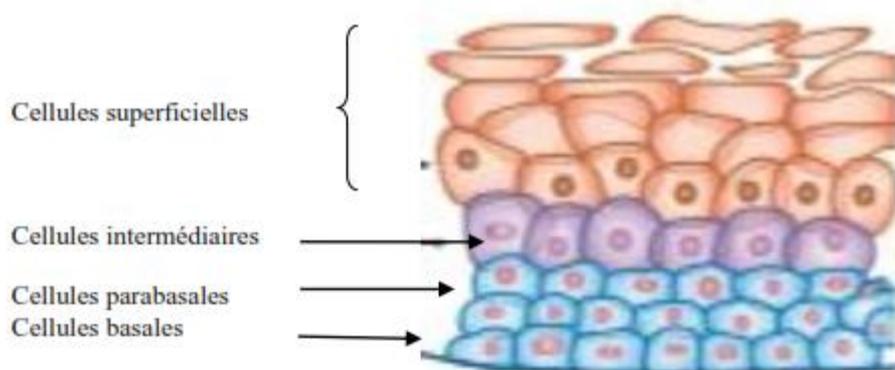


Figure 5 : schéma des différentes couches de l'épithélium vaginal de la chienne (Dumon, 2009)

2.1.2 Fixation du prélèvement

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

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

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

2.1.3 Différentes techniques de coloration

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

a. Coloration de May-Grünwald-Giemsa.

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

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

Ordre de passage	Produits	Temps
1	méthanol	10 passages
2	solution 1	10 passages
3	solution 2	10 passages

Les cellules vaginales, quel que soit leur degré de kératinisation apparaissent uniformément bleu-violet. Elles ne sont alors appréciables que par leurs seuls critères morphologiques (Concannon & Digregorio, 1987 ; Wright & Parry 1989 ; Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001). Cette technique permet une très bonne visualisation des polynucléaires neutrophiles et des hématies (Neveux, 1999) (figure 5,6).

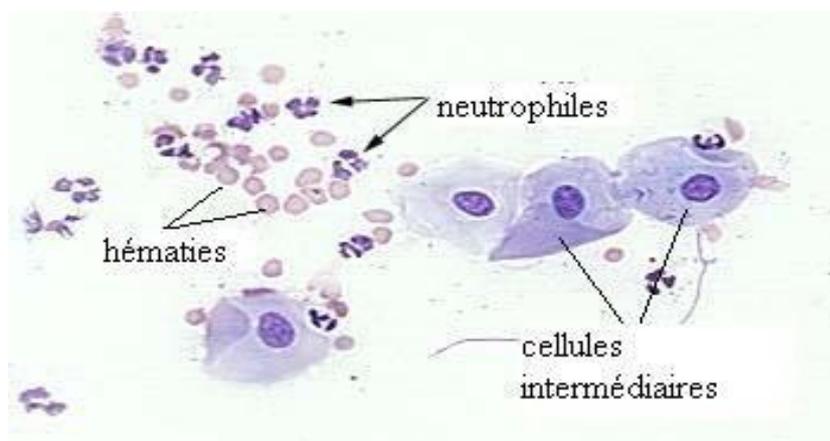


Figure 6 : Frottis vaginal de chienne coloré avec la méthode Diff-Quick ® (Bowen, 2000).

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

b. Bleu de méthylène

Le bleu de méthylène n'est presque plus utilisé à l'heure actuelle. On pratique cette technique en plaçant une goutte de solution de colorant sur la lame, puis une lamelle est apposée.

C'est une coloration rapide et peu coûteuse, grâce à laquelle la visualisation de la morphologie cellulaire est bonne. Cependant elle ne permet pas la conservation des lames. En outre, elle ne met pas en évidence les affinités tinctoriales, et ne colore pas les hématies, ce qui rend parfois l'interprétation difficile (Simmons, 1970 ; Olson *et al.* 1984 ; Guyant, 1988 ; Feldman & Nelson, 1996 ; Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001).

c. Coloration de HarrisShorr

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

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

Ordre de	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). La lecture est aisée, car les cellules sont différenciées selon leur affinité tinctoriale. Les cellules basophiles apparaissent bleues, et les cellules acidophiles rouges orangées (Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001).

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

d. Coloration de Papanicolaou

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

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

Ordre de passage	Produits	Temps
1	alcool à 70°	plonger 10 fois
2	alcool à 50°	plonger 10 fois
3	eau distillée	plonger 10 fois
4	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 7).



Figure 7 : Frottis vaginal au grossissement 1000 pratiqué chez une femme et coloré avec la technique de Papanicolaou. Coloration verte du cytoplasme (cellule parabasale), coloration bleutée du noyau. (Heron , 2004).

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

2.1.4 Observation microscopique

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

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

a. Types cellulaires

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

(issues de la différenciation des cellules parabasales), puis des cellules superficielles (Schutte, 1967). Les cellules de l'épithélium vaginal. Les affinités tinctoriales des cellules seront décrites en fonction de la coloration de Harris Shorr.

a.1 Cellules parabasales

Ce sont les plus petites cellules épithéliales observées sur un frottis. Leur diamètre est de 10 à 20 μm (Concannon & Digregorio, 1987 ; Johnston *et al.* 2001). En effet, les cellules de la couche germinative ne sont que très rarement visualisées (Olson *et al.* 1984 ; Johnston *et al.* 2001).

Leur forme est généralement ronde et uniforme (Olson *et al.* 1984 ; Schutte, 1967; Vaughan, 1996). On peut néanmoins les observer en colonne (c'est-à-dire que le cytoplasme est étiré et que le noyau est excentré) (Neveux, 1999).

Leur noyau est rond et volumineux, et le cytoplasme peu abondant ; le rapport nucléocytoplasmique est donc élevé (Olson *et al.* 1984; Guyant, 1988 ; Feldman & Nelson 1996 ; Vaughan, 1996 ; Johnston *et al.* 2001) (Figure 8).

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

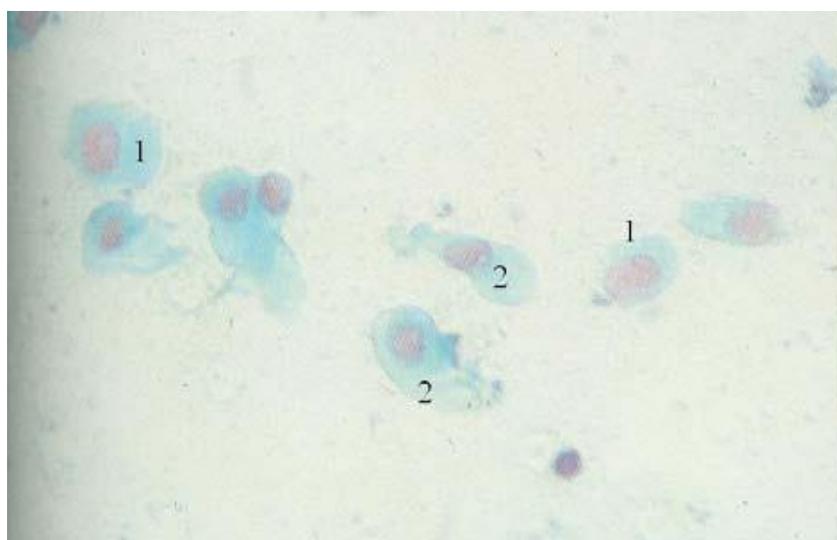


Figure 8 : Cellules parabasales au grossissement 400 (Mialot, 1984).

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

a.2 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.

a.3 Petites cellules intermédiaires

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

Leur forme varie de rond à anguleux. La plupart sont ellipsoïdes (Concannon & Digregorio 1987 ; Johnston *et al.* 2001) (Figure 9).

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

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

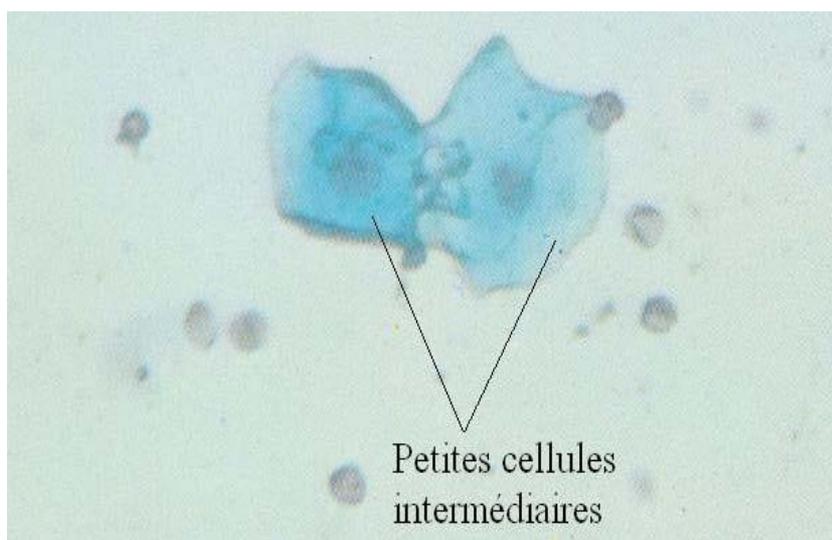


Figure 9: Petites cellules intermédiaires au grossissement x400
(Mialot, 1984).

a.4 Grandes cellules intermédiaires

Elles représentent l'étape intermédiaire entre les plus grandes des petites cellules intermédiaires, d'aspect globalement régulier, et les cellules superficielles, squameuses et irrégulières (Concannon & Digregorio 1987) (Figure 10). Leur diamètre est supérieur à 30µm (Johnston *et al.* 2001).

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

Leur cytoplasme peut afficher soit une basophilie, soit une acidophilie (soit les deux). Le noyau, lui est toujours acidophile (figure 10) (Concannon & Digregorio 1987).

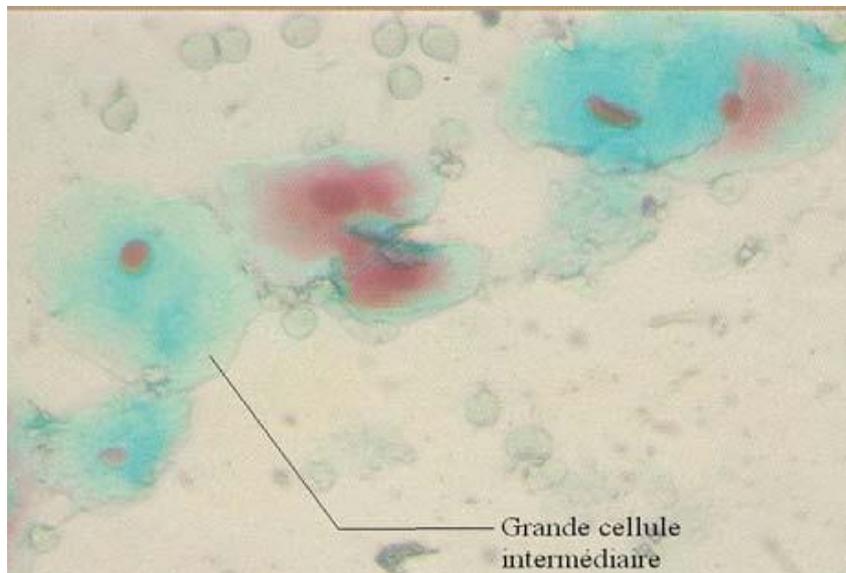


Figure 10 : Grande cellule intermédiaire au grossissement x400

(Mialot, 1984)

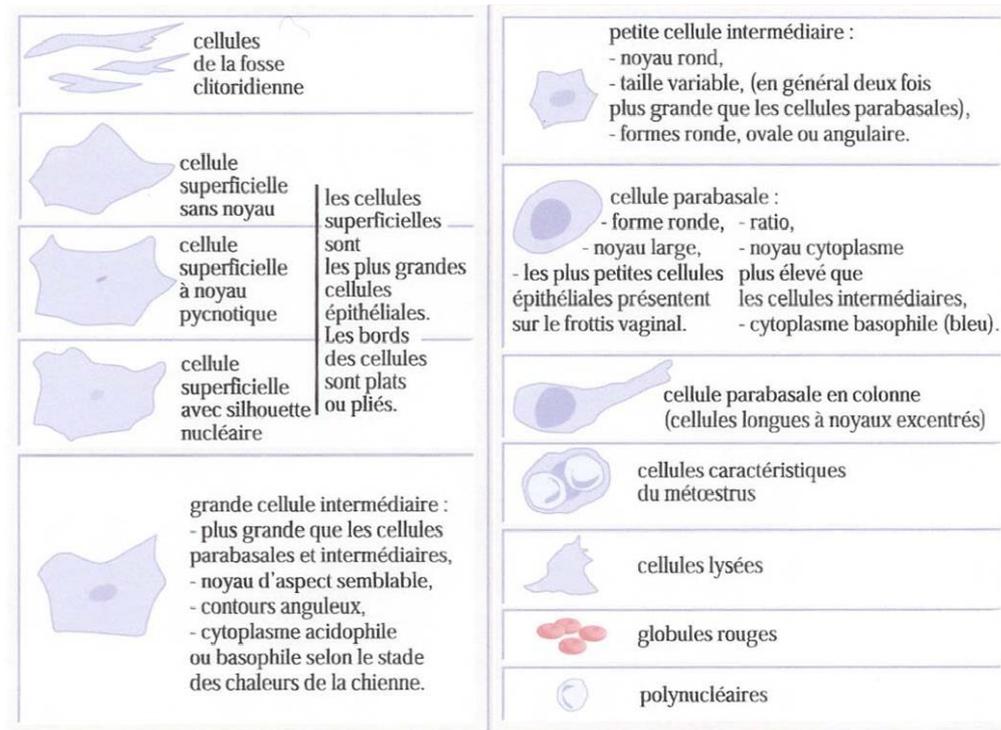


Figure 11 : Les cellules du frottis vaginal (Neveux, 1999).

a.5 Cellules superficielles

Elles sont nommées ainsi en raison de leur position au sein de l'épithélium vaginal (figure 11) (Johnston *et al.* 2001). Il s'agit des plus grandes des cellules vaginales ; leur diamètre est compris entre 30 et 75 μm (Concannon & Digregorio, 1987 ; Vaughan, 1996 ; Johnston *et al.* 2001). Les bords cellulaires sont irréguliers, anguleux et plissés (Olson *et al.* 1984 ; Concannon & Digregorio, 1987).

Elles peuvent présenter un aspect de « corn-flakes » (Vaughan, 1996). Au contraire de ces dernières, le noyau est pycnotique, absent, ou on ne peut distinguer que sa silhouette (Schutte, 1967 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Vaughan, 1996 ; Johnston *et al.* 2001) (figure 12).



Figure 12 : Cellules superficielles kératinisées anucléés au grossissement 400 (Mialot, 1984).

Elles sont également appelées cellules kératinisées. En effet, le phénomène de kératinisation est lié à la dégénérescence qui transforme les cellules d'un épithélium malpighien en cellules mortes. Ceci est reflété par la pycnose nucléaire (Guyant, 1988 ; Johnston *et al.* 2001).

Les cellules ne possédant pas de noyau sont également appelées squames (figure 12) (Concannon & Digregorio 1987 ; Guyant, 1988 ; Johnston, *et al.* 2001).

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

L'ensemble de ces cellules est complètement acidophile. L'intensité de la coloration croît en fonction du stade de dégénérescence. Globalement plus la cellule est sénescence, plus l'acidophilie sera marquée (Johnston *et al.* 2001). Néanmoins certaines squames ne prennent absolument aucune coloration et apparaissent donc transparents. (Concannon & Digregorio, 1987). Ces cellules offrent une protection à l'épithélium vaginal lors de l'accouplement (Guyant, 1988).

b. Autres cellules vaginales

b.1 Cellules « metoestrales »

Il s'agit de cellules parabasales modifiées qui contiennent un ou plusieurs polynucléaires neutrophiles dans leur cytoplasme (figure 13) (Olson *et al.* 1984 ; Guyant, 1988 ; Feldman & Nelson, 1996 ; Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001) (Figures 16). Elles reflètent la propriété de phagocytose de l'épithélium vaginal.

Comme leur nom l'indique, elles sont présentes lors de la phase lutéale du cycle sexuel. Cependant elles peuvent être observées dès que des polynucléaires neutrophiles sont présents (en début de prœstrus, ou en cas de vaginite) (Johnston *et al.* 2001) .

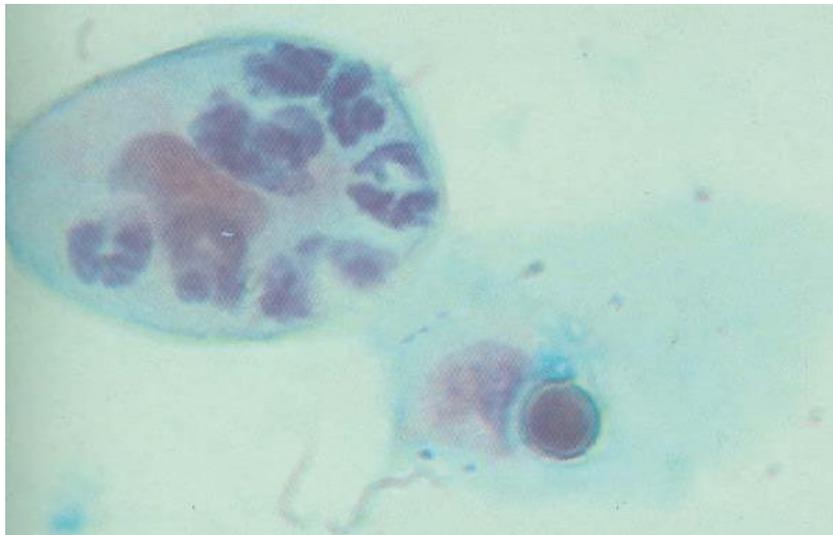


Figure 13 : Cellules metoestrales au grossissement 1000 (Mialot, 1984).

b.2 Cellules spumeuses ou « foam cells »

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

b.3 Les cellules superficielles avec des corps cytoplasmiques

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

Les corps cytoplasmiques peuvent être aisément distingués des bactéries. Bien que les bactéries puissent adhérer aux cellules superficielles, elles sont plus petites et sont souvent observées en position extracellulaire (Johnston *et al.* 2001).

b.4 Cellules épithéliales contenant des grains de mélanine

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

b.5 Cellules néoplasiques

Les cellules anormales peuvent s'exfolier et donc être présentes au sein d'un frottis vaginal. Les types tumoraux les plus fréquemment rencontrés lors d'un frottis sont : les carcinomes à cellules transitionnelles, les tumeurs vénériennes, les carcinomes à cellules squameuses, les métastases d'adénocarcinomes mammaires et les lymphosarcomes (Guyant, 1988 ; Johnston *et al.* 2001).

c. Autres populations cellulaires

c.1 Erythrocytes

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

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

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

c.2 Leucocytes

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

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

c.3 Cellules de la fosse clitoridienne

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

c.4 Spermatozoïdes

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

c.5 Bactéries

Le vagin n'est pas une « chambre » stérile, et il est normal d'y observer différents types de bactéries. Leur quantité est très variable ; Si un grand nombre de micro-organismes est visualisé conjointement avec des PNN dégénérés, il peut s'agir d'un signe de vaginite (Holst, 1986). Les espèces bactériennes les plus fréquemment rencontrées sont : *Escherichia coli*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus canis*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus epidermitis*, *Corynebacterium spp.*, *Klebsiella aerobacter* et *Bacillus spp.* (Platt & Simpson, 1974 ; Hirsch & Wiger, 1977 ; Ling & Ruby, 1978 ; Baba *et al.* 1983).

2.1.5 Variations de la cytologie vaginale au cours du cycle œstral

2.1.5.1 Durant le præstrus précoce

Il s'agit d'un frottis pauci cellulaire (Johnston *et al.* 2001). On visualise des cellules parabasales, des petites et grandes cellules intermédiaires (Feldman & Nelson, 1996) .

Les PNN et les bactéries sont présents en quantité variable (Feldman & Nelson, 1996) ;

Le præstrus est communément déterminé par la présence en grand nombre d'érythrocytes (Feldman & Nelson, 1996) (figure 14). Le fond du frottis est souvent granuleux ou « sale ». Ceci est dû au fait que les sécrétions muqueuses cervicales et vaginales fixent très bien la coloration (Feldman & Nelson, 1996).

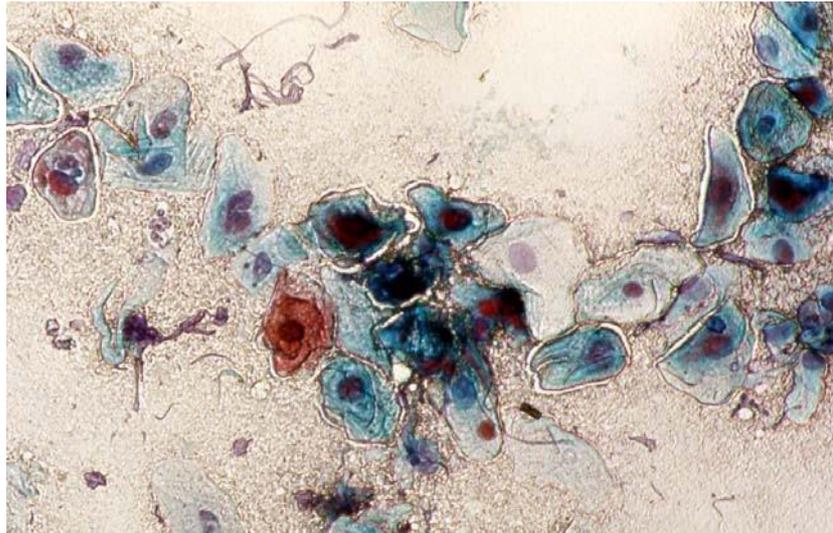


Figure 14 : Frottis de proestrus débutant grossissement 400 (Alain Fontbonne, 1996).

2.1.5.2 Durant le proestrus moyen

Les premiers effets de l'élévation sérique en estrogènes sur le tractus génital sont visualisés (Feldman & Nelson 1996). Le frottis est riche en cellules ; la kératinisation cellulaire débute. La proportion en cellules parabasales et petites intermédiaires diminue progressivement, au profit de celle en cellules superficielles nucléées et anucléées (figure 15) (Feldman & Nelson 1996 ; Johnston *et al.* 2001). La proportion en cellules parabasales par rapport au nombre total de cellules vaginales est de 5 à 30% en début de proestrus ; elle passe à moins de 5% quatre à cinq jours avant le pic de LH (Johnston *et al.* 2001).

Il y a une disparition des PNN. En effet l'épaississement brutal de la muqueuse vaginale empêche la diapédèse des neutrophiles. Ils ne seront plus visualisables jusqu'au metœstrus (Feldman & Nelson 1996) (figures 15). La quantité d'hématie commence à décroître (Feldman & Nelson 1996 ; Johnston *et al.* 2001). Le fond du frottis est variable. Il peut être soit muqueux soit propre (Roszel, 1977 ; Feldman & Nelson, 1996).

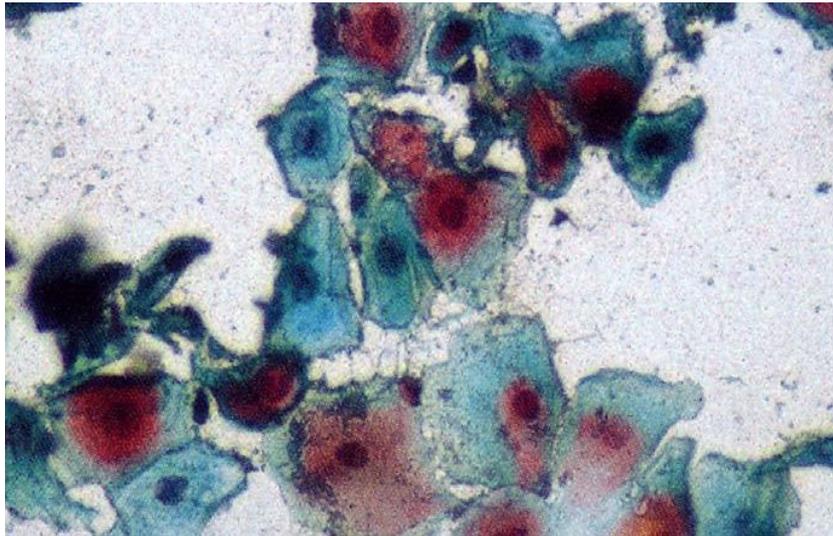


Figure 15 : Frottis de præstrus moyen grossissement 400 (cliché Alain Fontbonne, 1996).

2.1.5.3 Durant le præstrus tardif

Le frottis est riche en cellules (Roszel, 1977). Plus de 80% des cellules vaginales sont des cellules superficielles qui présentent un noyau vésiculaire, pycnotique, ou alors pas de noyau du tout (Feldman et Nelson 1996). Elles forment souvent de larges amas (Roszel, 1977). Le frottis vaginal ne contient plus de PNN (Feldman & Nelson 1996). La présence d'hématies est variable (Feldman & Nelson 1996) (figure 16).

Le fond du frottis est propre (Roszel, 1977). Il n'y a pas de différence majeure entre le præstrus tardif et l'œstrus. En effet les 1 à 8 derniers jours avant la fin præstrus sont typiques de l'œstrus. Généralement durant 4 à 5 jours les deux phases ne peuvent être différenciées uniquement sur la base de la cytologie vaginale (Feldman & Nelson 1996).

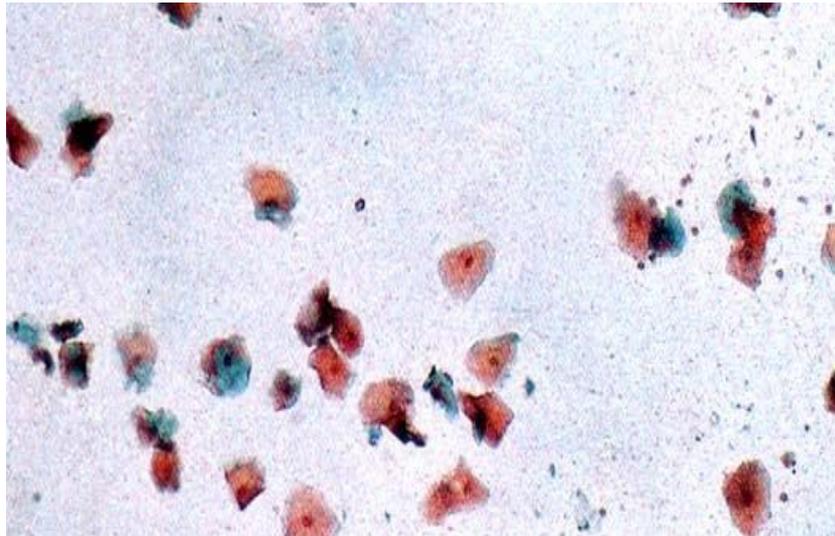


Figure 16 : Frottis de proœstrus tardif grossissement 100 (cliché Alain Fontbonne ,1996).

2.1.5.4 Durant l'œstrus

Pendant toute cette phase et la période tardive de celle qui la précédait (10 à 14 jours), la cytologie vaginale demeure relativement constante (Holst, 1986). Aucune donnée cytologique ne permet d'identifier avec certitude le jour du pic de LH, de l'ovulation ou de la fertilisation. Par ailleurs, les frottis vaginaux sont considérés comme le miroir de l'oestrogénémie (Feldman & Nelson, 1996). Pourtant en début d'œstrus, l'effet oestrogénique est maximal sur les frottis alors que la concentration sérique de ces stéroïdes commence à diminuer (Feldman & Nelson, 1996).

Le frottis est riche en cellules ; la kératinisation maximale survient de 5 à 6 jours avant jusqu'à 2 à 3 jours après le pic de LH et environ 2 jours après le pic d'estrogènes (Concannon, 1986 ; Mestre *et al.* 1990). Théoriquement à la survenue de l'œstrus (et pendant toute cette phase) et du pic de LH, le frottis vaginal est entièrement kératinisé et présente 100% de cellules anucléées (Feldman & Nelson, 1996).

En pratique, un fait aussi simple et prévisible ne peut être constaté chez l'ensemble des chiennes. Généralement pendant l'œstrus, le pourcentage en cellules superficielles n'est jamais inférieur à 60% et est compris entre 80 et 100% (Feldman & Nelson, 1996) (figure 17).

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

- Environ 100% de cellules anucléées,
- Un pourcentage important de cellules kératinisées contenant un noyau dense et bien discernable,

- La présence parmi les cellules superficielles, de grandes cellules intermédiaires (Concannon, 1986 ; Concannon & Digregorio, 1987).

Cependant l'aspect tinctorial du frottis à cette période est très acidophile (figure 17). Le dernier jour précédant la survenue du metœstrus, les cellules superficielles sont regroupées en amas, leur membrane cytoplasmique est difficilement discernable, la coloration cytoplasmique irrégulière et elles prennent un aspect flétri (Holst & Phemister, 1974 ; Olson *et al.* 1984 ; Concannon & Digregorio, 1987).

Les PNN sont absents, très rares ou présentant des formes dégénératives (Schutte, 1967 ; Olson *et al.* 1984 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Guyant, 1988 ; Feldman & Nelson, 1996 ; Baker & Lumdsen, 2001) ; ceci est dû à l'épaississement maximal de la muqueuse vaginale (Guyant, 1988). Néanmoins il a été rapporté, qu'à la fin de l'œstrus (7.7 +/- 3.1 jours après le pic de LH) des petits amas de leucocytes pouvaient être visualisés à nouveau sur les frottis (England, 1992). Il s'agit du premier des effets visualisables du déclin de l'activité des estrogènes sur le vagin (Roszel, 1977).

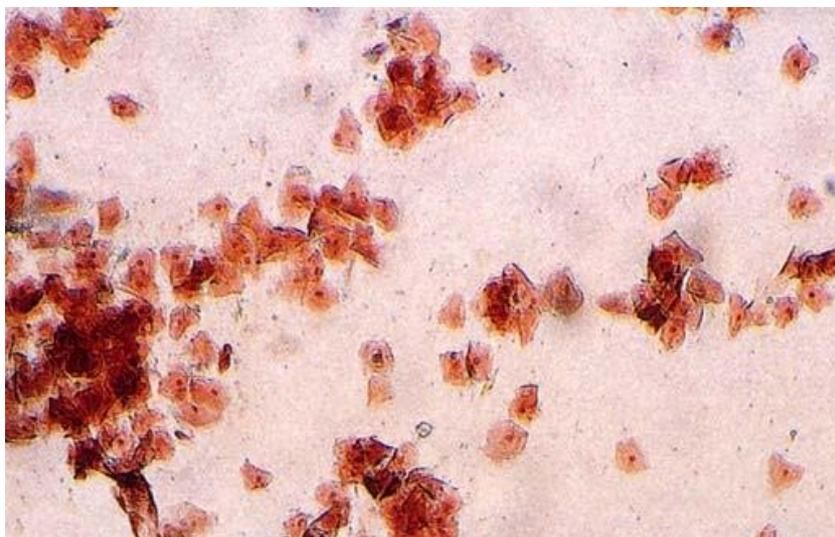


Figure 17 : Frottis d'œstrus grossissement 100 (cliché Alain Fontbonne, 1996).

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

La quantité d'érythrocytes varie en fonction des individus, elle peut être de très abondante à

très faible et cela malgré des écoulements vulvaires toujours présents. Les modifications du mucus vaginal pourraient provoquer leur lyse (Concannon & Digregorio, 1987). Leur absence est constatée chez certaines femelles. (Concannon & Digregorio, 1987). Cependant la plupart des chiennes présentent encore des cellules sanguines sur leurs frottis (Bell & Christie, 1971). Durant toute cette période, le fond du frottis est propre (Schutte, 1967 ; Roszel, 1977 ; Olson *et al.* 1984; Concannon & Digregorio, 1987 ; Wright & Parry, 1989 ; Feldman & Nelson, 1996 ; Johnston *et al.* 2001) (figure 18).

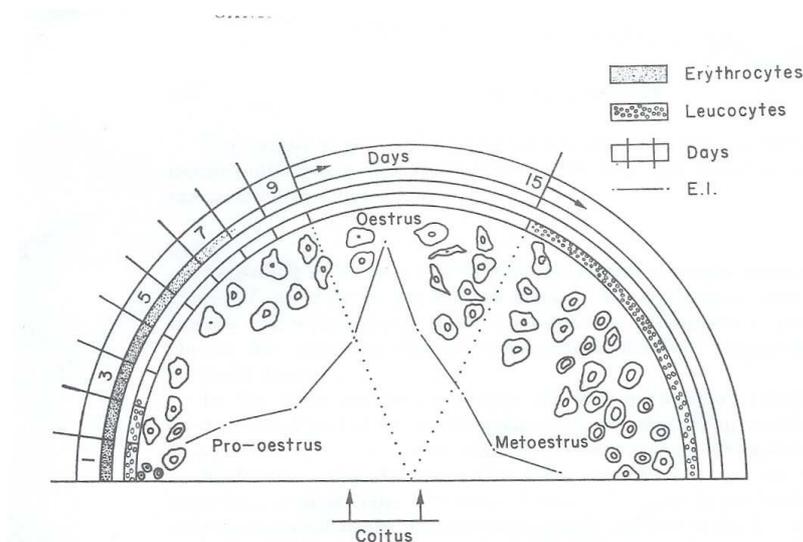


Figure 18 : Représentation schématique de la cytologie vaginale rencontrée lors du proœstrus, de l'œstrus et du metœstrus (Schutte, 1967). *E.I.* : *Index Eosinophilique*.

2.1.5.5 Durant le metœstrus 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 estrogènes à des valeurs basales (Holst & Phemister, 1974 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Feldman & Nelson, 1996 ; Johnston *et al.* 2001) ; Le frottis est riche en cellules (Feldman & Nelson, 1996).

La survenue du metœstrus cytologique correspond au jour où le pourcentage en cellules kératinisées diminue d'au moins 20% (figure 19). Le premier jour cette chute est souvent supérieure à 50%. De façon corollaire, le nombre de cellules des couches profondes de l'épithélium augmente et représentent au moins plus de 10 % (et souvent plus de 50%) des cellules du frottis (Holst & Phemister, 1974) (figure 19). A cet instant l'aspect des cellules superficielles se modifie : elles apparaissent pliées, leur contour s'estompant (Holst &

Phemister, 1974).

En trois jours, la proportion des cellules parabasales et des petites cellules intermédiaires peut représenter jusqu'à 95% des cellules épithéliales (Concannon & Digregorio, 1987 ; Feldman & Nelson, 1996). Dans une étude, les petites cellules vaginales (parabasales et petites intermédiaires) représentaient 63.8 +/- 12.5 % et les grandes cellules intermédiaires ainsi que les superficielles 36.7 +/- 12.8% (Dore, 1978).

On observe simultanément une augmentation du nombre des grandes cellules intermédiaires, dans le cas où ces dernières auraient été rares ou absentes pendant l'œstrus (Concannon & Digregorio, 1987), la coloration est à prédominance basophile (figure 20).

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

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

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

Les hématies sont encore visualisables durant les 18 premiers jours du metœstrus (Olson *et al.* 1984 ; Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001). Dans une étude, 33% des chiennes présentaient encore un grand nombre de ces cellules (de 10 par champs microscopique à une telle quantité que les autres cellules sont masquées).Le fond du frottis est sale, contenant de grands amas de débris cellulaires (Feldman & Nelson, 1996 ; Neveux, 1999).

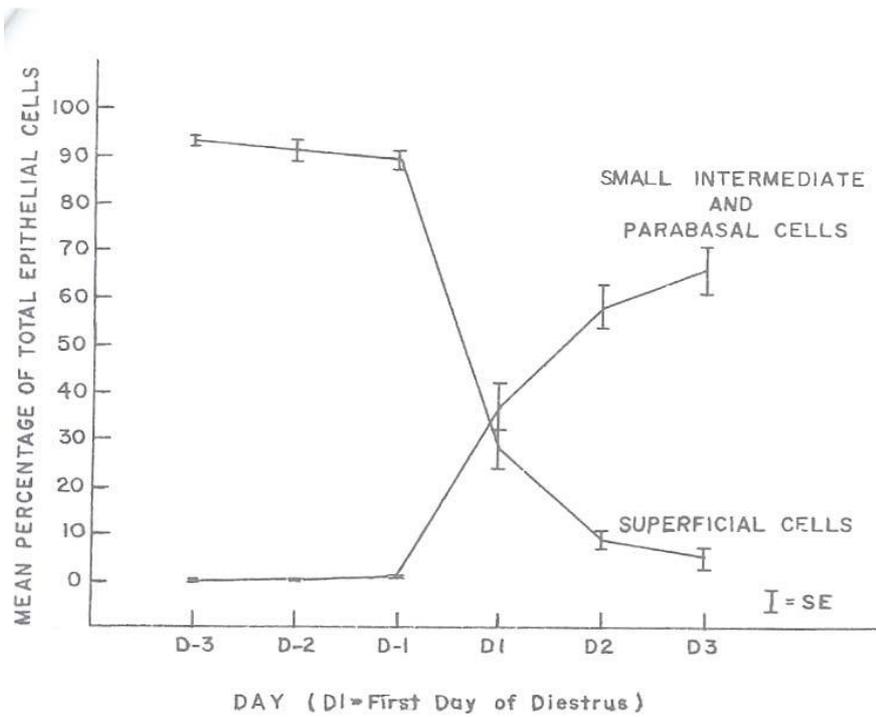


Figure 19 : Schéma typique de la modification des cellules épithéliales vaginales à la survenue du metoestrus (Holst et Phemister 1974).

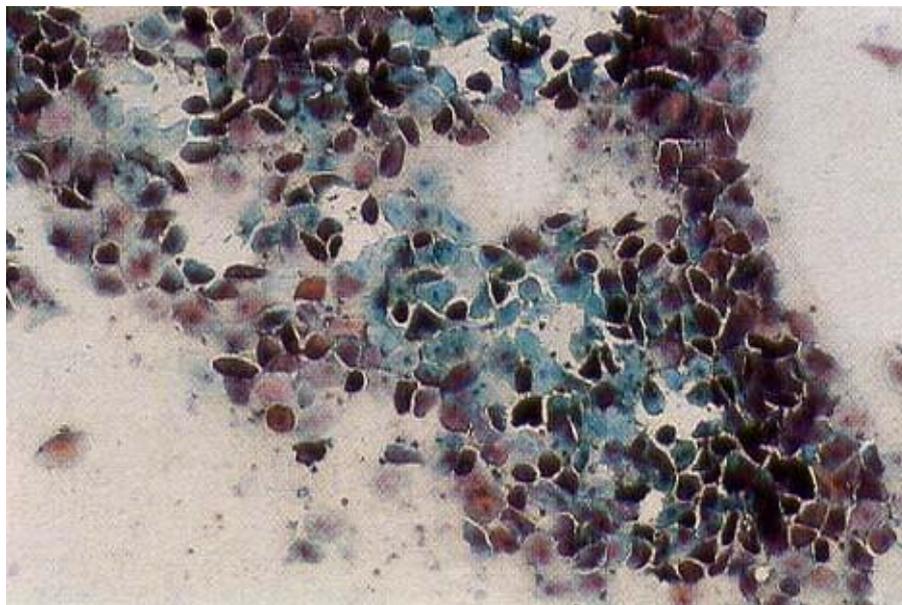


Figure 20 : Frottis de début de metoestrus grossissement 100 (cliché Alain Fontbonne, 1996).

2.1.5.6 Durant le metœstrus moyen et tardif

A la suite des modifications majeures intervenues lors des premiers jours, la cytologie vaginale ressemble à celle de l'anœstrus (Feldman & Nelson, 1996 ; Johnston *et al.* 2001). Les petites cellules vaginales (parabasales et petites intermédiaires) sont prédominantes (figure 21).

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 metœstrus leur quantité diminuait.

Durant le reste du metœstrus, la présence des érythrocytes est rare et aléatoire (figure 21). Le fond du frottis tend à devenir propre (Feldman & Nelson, 1996).

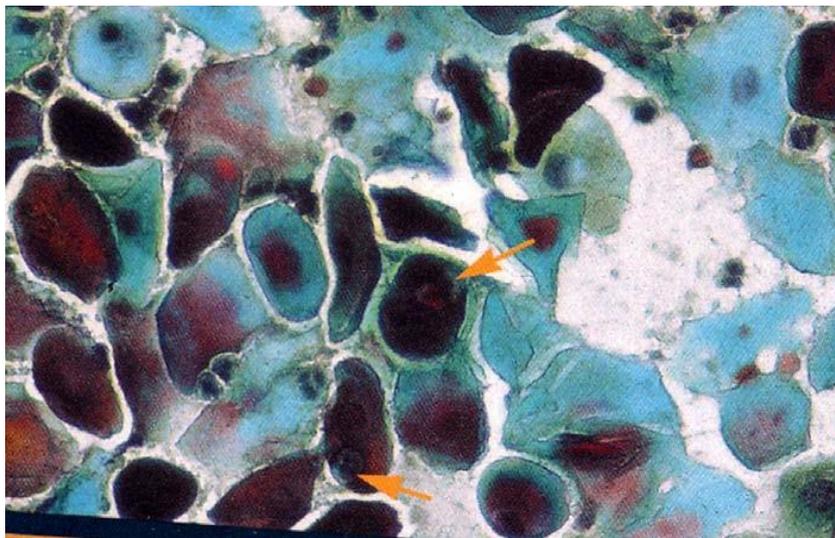


Figure 21 : Frottis de metœstrus grossissement 400 (cliché Alain Fontbonne, 1996).

2.1.5.7 Durant l'anœstrus

Il s'agit d'un frottis paucicellulaire (Post, 1985 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Neveux, 1999). Les cellules parabasales et petites intermédiaires sont prédominantes (Roszel, 1977 ; Olson *et al.* 1984 ; Post, 1985 ; Concannon & Digregorio, 1987 ; Guyant, 1988 ; Feldman & Nelson, 1996 ; Neveux, 1999 ; Johnston *et al.* 2001) (figure 22). Les cellules intermédiaires présentent des granules cytoplasmiques (Roszel, 1977).

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

Les cellules superficielles, pliées, et les squames proviennent du cycle précédent (Concannon & Digregorio, 1987). Le frottis est basophile mais est très peu marqué tinctorialement (Concannon & Digregorio, 1987).

Pendant l'anœstrus, la quantité de leucocytes est très variable entre les individus. Cependant la plupart des frottis présentent des PNN isolés. le fond du frottis est sale (Feldman & Nelson, 1996 ; Neveux, 1999). Les bactéries sont présentes (Olson *et al.* 1984 ; Guyant, 1988 ; Johnston *et al.* 2001), mais en quantité bien inférieure aux autres phases du cycle (Baba *et al.* 1982).



Figure 22 : Frottis d'anœstrus grossissement 100 (cliché Alain Fontbonne, 1996).

2.1.5.8 Durant la transition anœstrus – proœstrus

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

2.1.6 Index cytologiques

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

2.1.6.1 Index éosinophile (IE)

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

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

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

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

2.1.6.1.1 Variations de l'IE au cours du cycle œstral

a. Durant l'anœstrus

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

b. Durant le proœstrus

En début de proœstrus, le nombre de cellules augmente : les cellules parabasales disparaissent en un à deux jours au profit des cellules intermédiaires basophiles, qui sont des cellules de grande taille, polygonales et possédant un noyau proportionnellement plus petit. L'IE est alors inférieur ou égal à 30%. La kératinisation des cellules se traduit par un début de coloration acidophile du frottis. Le frottis prend un aspect sale du fait de la présence de débris cellulaires et de mucus. En milieu de pro-œstrus, le frottis est sale et riche en cellules : le nombre de cellules intermédiaires non kératinisées diminue, celui de cellules superficielles à noyau pycnotique augmente (IE = 50%) (Guerin & Fontbonne, 1997).

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

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

c. Durant l'œstrus

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

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

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

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

d. Durant le métœstrus

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

Les cellules parabasales peuvent être regroupées en amas en début de métœstrus uniquement. Les débris cellulaires sont nombreux. Les neutrophiles affluent en nombre à la fin de l'œstrus, puis leur nombre diminue lors du métœstrus mais ils sont toujours présents. Leur fonction étant d'éliminer tous les débris cellulaires accumulés pendant les chaleurs, leur visualisation certifie que la chienne n'est plus fécondable (Fontbonne, 1996).

2.1.6.1.2 Avantages et inconvénients l'index eosinophile

Même si cet index est uniquement un marqueur de l'effet des estrogènes sur la muqueuse vaginale, certains l'ont utilisé pour prévoir la période optimale de fécondité.

En effet, sa valeur maximale est atteinte entre le 8^{ème} et le 14^{ème} jour du cycle œstral, ce qui correspond à la période de l'œstrus. Schutte (1967) a constaté que plus de 90% des chiennes accouplées lorsque l'IE était maximal étaient gestantes par la suite.

Si l'interprétation des frottis chez la chienne, avec l'IE, facilite la détermination de l'œstrus proprement dit, il est plus délicat de dater exactement le moment de l'ovulation. En effet, les valeurs de l'IE présentent un caractère individuel, difficilement généralisable (Taradach, 1980).

D'après Schutte (1967) 89% des chiennes ont atteint ce pic au 14^{ème} jour du cycle, seules 43 % des chiennes l'avaient atteint au 10^{ème} jour (le jour de l'apparition des pertes vulvaires étant le premier jour du cycle). D'après Taradach (1980), ce pic survient entre le 8^{ème} et le 12^{ème} jour du cycle. Par ailleurs, les valeurs au pic sont très variables entre les individus. Selon l'étude de Schutte (1967) elles étaient comprises entre 56 et 100%, et selon celle de Taradach (1980) elles étaient toujours supérieures à 75%.

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

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

2.1.6.2 Index caryopycnotique (ICP)

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

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

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

2.1.6.2.1 Variation au cours du cycle œstral

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

2.1.6.2.2 Avantages et les inconvénients de L'index caryopycnotique (ICP)

Les avantages de l'ICP sont limités. Il varie globalement comme l'IE et peut être un indicateur de l'œstrus mais pas un moyen sûr de détecter la période optimale d'accouplement (Schutte, 1967). Par ailleurs, cet index est assez difficile à déterminer sur un plan technique. L'architecture du noyau doit être examinée soigneusement. Un noyau en phase de pycnose se contracte, est coloré de façon plus intense ; la morphologie nucléaire « normale » est plus difficile à discerner. Une telle procédure appliquée à plusieurs dizaines de cellules d'une lame est très longue (Schutte, 1967).

2.1.6.3 Index superficiel (IS)

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

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

2.1.6.3.1 Variations au cours du cycle œstral

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

Pendant le metœstrus, si la chienne n'a pas été fécondée, l'IS ne montre des valeurs basales (<10%) que jusqu'à 3 semaines après le début de cette phase. Si la femelle est gestante l'IS devient inférieur à 10%, 4 à 5 jours après le coït (Schutte, 1967). Pendant l'anœstrus l'IS est quasiment nul. La plupart des chiennes présentent un IS plus élevé juste avant le début du proœstrus (Schutte, 1967).

2.1.6.3.2 Avantages et les inconvénients L'index superficiel (IS)

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

2.1.7 Interprétation et détermination de la phase du cycle sexuel

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

Le frottis vaginal d'œstrus commence à être obtenu sur des chiennes avant l'ovulation et cet aspect caractéristique du frottis dépasse en durée les 48 heures optimales de la période fécondante. Ainsi selon Guerin *et al.* (1996), un frottis vaginal typique d'œstrus peut être observé neuf jours avant la période féconde, et seulement 34,7% des chiennes de l'étude avaient un frottis vaginal typique durant moins de deux jours avant saillie ou insémination. Chez certaines races, les images cellulaires obtenues ne sont jamais caractéristiques d'un œstrus. Dans d'autres races, les images évoquant un frottis d'œstrus sont souvent obtenues très précocement au cours des chaleurs, alors que la chienne est loin d'être prête (Fontbonne, 1996).

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

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

Selon Guerin *et al.* (1996), il est fréquent d'observer des chiennes fécondables dont le frottis n'atteint pas un index éosinophilique maximum (souvent inférieur à 80%). Trente huit à 57% des chiennes, selon que la limite d'IE soit fixée à 90 ou 95%, révèlent un frottis non caractéristique d'œstrus au moment de la saillie. Dans de tels cas, se fier au frottis peut être une source d'erreurs et d'échec de la saillie, il est ainsi nécessaire de coupler la réalisation de frottis à des dosages de la progestéronémie réguliers.

2.1.8 Intérêts et limites de la cytologie vaginale

Les frottis vaginaux sont simples à réaliser et peu onéreux, ils permettent de suivre l'évolution de la kératinisation de l'épithélium vaginal au cours des chaleurs en vue de la fécondation.

Leur interprétation est cependant parfois délicate, aussi doit-on les renouveler plusieurs fois au cours d'une période de chaleurs, afin d'apprécier la vitesse d'évolution des changements subis par les cellules. Néanmoins, la cytologie apporte des indications importantes de façon rétrospective (Holst & Phemister, 1974). En effet, un frottis isolé n'a, le plus souvent, que peu d'intérêt dans le suivi des chaleurs d'une lice.

Ainsi la lecture du frottis vaginal reste un caractère subjectif, et on observe souvent des discordances entre l'image du frottis vaginal et le stade réel du cycle de la chienne. En outre, l'indice éosinophilique est souvent inférieur à 80% au moment optimum de fécondation, et certaines chiennes présentent une kératinisation précoce une semaine avant la date de la saillie (Guerin *et al.* 1996).

Enfin, dans certaines races, les frottis vaginaux sont systématiquement discordants avec le dosage de progestéronémie. Les frottis vaginaux présentent donc certains pièges qu'il faut savoir éviter et interpréter en fonction de la clinique.

Selon (Guerin *et al.* (1996), les frottis vaginaux sont de bons indicateurs du déroulement des chaleurs, mais sont insuffisants pour la détermination de la période ovulatoire.

De même Van Haaften *et al.* (1989) rappellent que l'index éosinophilique permet de bien détecter l'œstrus, mais pas l'ovulation. L'utilisation des frottis vaginaux doit donc toujours se faire parallèlement aux dosages de progestérogène (Wright, 1990).

En effet, l'apparition du premier frottis de métœstrus permet de dire que l'on se situe 5 jours après ovulation (Phemister *et al.* 1973). De plus, England & Concannon (2002) rapporte que l'insémination doit être réalisée, idéalement, entre 2 et 4 jours avant l'apparition du frottis de métœstrus.

2.2 Dosages Hormonaux

Ils sont beaucoup plus précis et plus fiables que la cytologie vaginale pour déterminer le moment de l'ovulation. Ainsi, l'ovulation aurait lieu 24 à 96 heures après le pic de LH, la maturation des ovocytes se ferait en 48-72 heures et ceux-ci resteraient fertiles pendant 24 heures (Badinand, 1993).

2.2.1 Dosage de l'œstradiol

L'œstradiol est sécrété par les follicules ovariens en croissance, il augmente d'un niveau basal en début de pro-œstrus jusqu'à atteindre un pic atteignant des valeurs allant de 90 à 353 pmol/ en fin de pro-œstrus, environ 1 ou 2 jours avant, le même jour, voire juste après le pic de LH (Onclin *et al.* 2002 ; De Gier *et al.* 2006). L'ovulation a donc lieu environ 2 à 4 jours après le pic d'œstradiol.

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

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

2.2.2 Dosage de LH

Puisque le pic de LH induit la rupture des follicules pré-ovulatoire, 48h plus tard, le dosage de cette hormone semble être l'examen complémentaire de choix pour détecter l'ovulation. Contrairement à d'autres espèces, le pic de LH est long puisqu'il dure en moyenne 3,3 jours.

Selon Fontbonne *et al.* (2000).. 36 +/- 5 heures d'après l'étude de De Gier *et al.* (2006). Le niveau de base de cette hormone est de l'ordre de 1,4 +/- 0,1 ng/ml, le pic qui est net varie de 7,5 à 45 ng/ml (Guerin ,1998). Dans l'étude de De Gier *et al.* (2006), la concentration plasmatique moyenne de LH est de 18,7 +/- 5,8 ng/ml.

De plus, plusieurs auteurs s'accordent à dire que pour ne pas manquer le pic de LH, il faut réaliser ces dosages au moins deux fois par jour car la durée du pic en lui-même est courte. Fontbonne (2008) détecte le pic de LH par RIA dans seulement 73,6% des cas en réalisant 2 à 3 prises de sang par jour.

Enfin, certaines études ont montré que le pic de H était parfois biphasique et qu'il ne fallait donc pas prendre en compte le premier pic (Jeffcoate & Lindsay, 1989) . Le niveau basal de LH est de $1,4 \pm 0,1$ ng/mL d'après Concannon *et al.* (1975) et Wildt *et al.* (1979).

Le dosage est réalisable par l'emploi de méthodes radio-immunologiques ou immuno 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 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 ,1998).

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

Il existe également depuis peu chez Synbiotics Europe, le WITNESS® LH qui est un test semi-quantitatif de réalisation simple fondé sur la technique d'Immuno-Migration Rapide (R.I.M.). Ce dernier doit être utilisé conjointement avec un dosage de la progestérone plasmatique afin d'identifier l'augmentation de LH pré-ovulatoire, et ainsi la période d'ovulation. (Dictionnaire des médicaments vétérinaires 2007).

Tableau 5: Valeurs du pic de LH selon les auteurs

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

Nous pouvons constater que les valeurs du pic de LH varient beaucoup d'une étude à l'autre et même au sein d'une même étude avec des écarts-types très importants (tableau 5).

Toutefois, pour dater l'ovulation, ce n'est pas la valeur du pic qui nous intéresse mais le moment d'apparition de ce pic. Ainsi en suivant l'évolution de la concentration en LH au cours du cycle, il semble possible de dater le jour d'apparition du pic de LH.

Certaines études ont testé la fiabilité d'un test immuno-enzymatique par rapport à la méthode RIA. Celles-ci ont montré que les résultats étaient très similaires entre les deux méthodes et que le test immuno-enzymatique pouvait être utilisé pour détecter le pic de LH (Nishiyama *et al.* 1999 ; Kützler *et al.* 2003).

2.2.3 Dosage de la progestérone plasmatique

L'une des grandes caractéristiques du cycle de la chienne est la lutéinisation des follicules pré-ovulatoires. En effet, le taux de progestérone plasmatique commence à s'élever rapidement, depuis des valeurs basales, deux jours avant l'ovulation, au moment du pic de LH (figure 23). Cette augmentation rapide est distincte et détectable par une série de dosages du taux de progestérone plasmatique. Ceci permet d'anticiper l'ovulation sur un à deux jours. Si on continue ces mesures, l'ovulation peut être confirmée et la période de fécondation détectée (Baron, 2006).

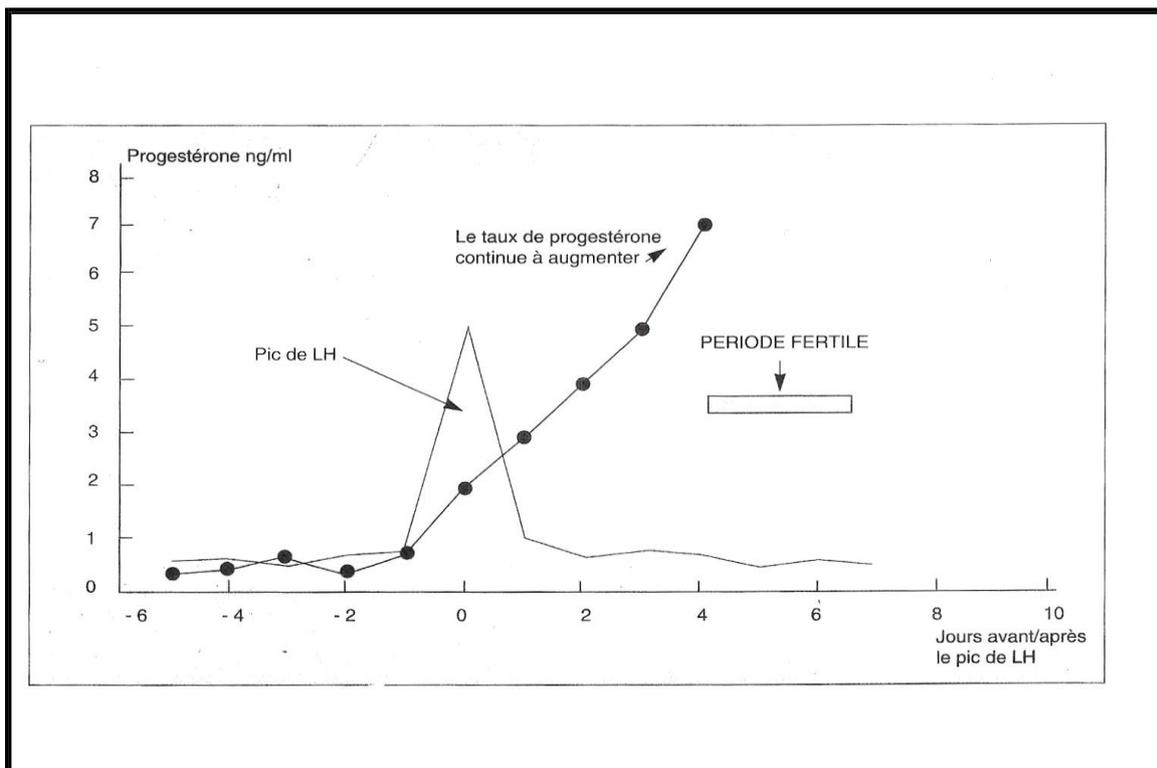


Figure 23 : Correspondance entre le pic de LH et le début de l'augmentation du taux de Progesterone (Baron, 2006)

2.2.3.1 Evolution de la progestéronémie au cours du cycle

a. Jusqu'au milieu du pro-œstrus :

P4 basale se situe entre $<0,2$ ng/ml et $0,3-0,6$ ng/ml selon Concannon (2005), entre 0 et 1 ng/ml selon Goodman (2001).

b. En fin de pro-œstrus :

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

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

La valeur de P4 indiquant la décharge pré-ovulatoire de LH est supérieure à 1 ng/ml selon Arbeiter *et al.* (1), comprise entre 2,0 et 3,0 ng/ml selon Romagnoli (2006) et est égale à $2,02 \pm 0,18$ ng/ml selon Kutzler *et al.* (2003) (figure 23).

Le taux plasmatique de cette hormone passe de moins de 1 ng/mL (valeur de base de 0,5 ng/mL

selon les études de Guerin *et al.* (1996) et Hewitt & England (2000), lors de l'anœstrus à une valeur comprise entre 1 et 2 ng/mL à la fin du pro-œstrus (Hewitt & England, 2000).

c. Entre le pic de LH (J0) et l'ovulation (J2)

P4 est variable mais augmente entre 2 et 5 ng/ml (Concannon, 2005). Puis le taux se situe entre 2 et 4 ng/mL approximativement 2 jours avant l'ovulation, soit au moment du pic de LH (Hewitt & England, 2000). Selon Guerin (1998), ce taux est à environ 1 ng/mL au pic de LH et selon Fontbonne (1993), entre 1 et 2,5 ng/mL.

d. Au moment de l'ovulation

Selon Arbeiter *et al.* (1991) et Fontbonne *et al.* (2000), l'expulsion des ovocytes s'est produite lorsque le taux circulant de progestérone dépasse 5 à 10 ng/ml. Cette valeur se situe entre 4,0 et 10,0 ng/ml selon Romagnoli (2006), entre 1,0 et 8,0 ng/ml selon Goodman (2001).

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

Au moment de l'ovulation, le taux de progestérone plasmatique s'élève de manière significative, de 4 à 10 ng/mL selon Fontbonne (1993), de 5 à 10 ng/mL selon Hewitt et England (2000), de 3 à 8 ng/mL avec une médiane de 5,4 ng/mL selon Wright (1991), seuls Hase *et al.* (2002) donnent des taux de progestérone au moment de l'ovulation qui sont plus bas : 1,88 à 2,81 ng/mL, avec une moyenne de 2,34 ng/mL.

En 1996, Silva *et al.* (1996) considèrent que l'ovulation survient entre 2 et 4 jours après le pic de LH, soit entre 12,6 +/- 6,2 nmol/L (ou 4,2 +/- 2,1 ng/mL) et 32,1 +/- 10,9 nmol/L (ou 10,7 +/- 3,6 ng/mL). Enfin tout récemment, Marseloo *et al.* (2004) ont montré sur 35 chiennes de races différentes que le taux de progestérone plasmatique au moment de l'ovulation est à peu près constant : 6,25 +/- 1,55 ng/mL. Toutes ces valeurs sont donc bien concordantes.

On peut considérer que l'ovulation a bien eu lieu lorsque la valeur seuil maximale a été dépassée, ou lorsque la concentration de progestérone plasmatique atteint 5,44 +/- 0,93 ng/mL par la technique de radio-immunoassay, 4,9 +/- 1,0 ng/mL par le kit de progestérone ELISA selon Bouchard *et al.* (1993).

e. Après ovulation

Après l'ovulation, le taux de progestérone continue d'augmenter. Une valeur de 15 ng/mL semble suffisante pour maintenir une gestation, mais le taux plasmatique de progestérone s'élève généralement au-delà de 50 à 80 ng/mL en un délai variant entre 4 et 20 jours selon les chiennes et les auteurs (Fontbonne, 1993).

f. Deux jours après l'ovulation (J4)

La P4 se situe entre 3 et 8 ng/ml selon Concannon (2005) , entre 10 et 25 ng/ml selon Romagnoli (2006).

g. A J6 après l'ovulation

La P4 se situe entre 6 et 12 ng/ml selon Concannon (11), alors que selon Goodman (37) la valeur de la progestéronémie en fin de période fertile varie entre 4,0 et 20,0 ng/ml.

h. De 15 à 30 jours après la libération de LH

P4 est comprise entre 15 et 90 ng/ml (Chaffaux & Bosse, 1997).

i. Durant le dernier tiers de la gestation

la progestéronémie est comprise entre 4 et 16 ng/ml(Chaffaux & Bosse, 1997).

Selon Guerin (1997) , le profil général de la courbe est constant pour 83% des chiennes. De plus, au vu des résultats similaires obtenus dans les différentes études, la progestéronémie est un témoin fiable de l'ovulation.

Ces conclusions sont confirmées par Wright (1990), qui montre l'intérêt du dosage de progestérone, même s'il affirme que chez certaines chiennes, l'estimation du pic de LH à partir du taux de progestérone peut ne pas donner une bonne estimation du moment de l'ovulation. Il rappelle le cas d'une chienne (1 cas sur 11) pour laquelle les taux de progestérone (2 à 4 ng/mL) indiquaient le pic de LH six jours avant qu'ils n'indiquent l'ovulation (5,5 ng/mL) .

2.2.3.2 Réalisation pratique

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

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

- a) Des *kits quantitatifs* utilisant un test ELISA peuvent être utilisés chez la chienne. Deux exemples sont le kit OVUCHECK ND et le kit DROPPER PROGESTERONE TEST PROCEDURE ND. Ces kits permettent des mesures au-delà des valeurs témoins, avec une fiabilité excellente, mais nécessitent un appareil de lecture optique (spectrophotomètre) pour lequel il faut comparer les valeurs avec celles d'un laboratoire de référence, afin de bien interpréter les résultats. Bien qu'assez simples d'utilisation, le temps requis pour la procédure (une heure minimum) et l'équipement nécessaire rendent cette technique peu abordable pour les vétérinaires praticiens réalisant peu de suivis de chaleurs (Hewitt & England, 2000)

b) Des kits de *tests ELISA semi-quantitatifs* ont été développés (kit PREMATE ND, Vétoquinol et, kit OVULATION TEST ND, BVT), produisant un changement de couleur lors du passage d'une progestéronémie basse à une progestéronémie élevée (Hewitt & England, 2000) .

L'échantillon à doser est comparé à deux standards :un témoin A, rose foncé, correspondant au début de l'augmentation du taux de progestérone (environ 3 ng/mL, moment du pic de LH) (Hewitt & England, 2000).

- un témoin B, rose pâle, correspondant à la valeur supérieure du moment de l'ovulation (10 ng/mL) (Hewitt & England, 2000).

Lorsque l'échantillon est :

- plus foncé ou aussi foncé que A ($P4 < 3$ ng /ml) : phase pré-ovulatoire
- plus clair que A et plus foncé que B ($P4$ entre 3 et 10 ng/ml) : l'œstrus a probablement commencé
- plus clair que le témoin B ($P4 > 10$ ng/ml): phase post-ovulatoire

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

La progestérone peut être dosée par deux autres types de tests. Des *tests radio-immunologiques* (RIA) : On considère que l'ovulation se situe à une valeur d'environ 5 ng/ml, alors que par la méthode immuno-enzymatique cette valeur est de 10 ng/ml (Guerin, 1998). Des *tests par électrochimiluminescence* (CLIA) offrent également une grande précision et les valeurs obtenues peuvent être corrélées à celles obtenues par RIA. La CLIA présente comme avantage de pouvoir faire des dosages en continu permettant un turnover rapide alors que les isotopes utilisés lors de RIA ne le permettent pas (Kutzler *et al.* 2003).

En pratique, en raison du coût des dosages de la progestérone plasmatique, on couple ces dosages avec la réalisation de frottis vaginaux. Ainsi, on utilise les dosages de progestérone à bon escient et il est inutile de débiter les dosages tant que la chienne est toujours en pro-œstrus, à moins que l'on ait des doutes ou des difficultés à interpréter les autres tests (chienne présentant des chaleurs atypiques- ne perdant pas de sang à la commissure vulvaire- refusant systématiquement l'accouplement à toute période- montrant une kératinisation très précoce des frottis vaginaux bien avant l'ovulation ou au contraire une évolution incomplète de ces mêmes frottis qui n'atteignent jamais un aspect caractéristique de frottis d'œstrus).

La valeur de la progestéronémie est un bon critère pour déterminer la date de l'ovulation. L'étude effectuée par Marseloo *et al.* (2004) montre qu'il y a une bonne corrélation entre la valeur de la progestéronémie et les observations faites sur les ovaires. Cependant il est nécessaire d'effectuer des mesures en série car une seule valeur ne peut pas nous permettre de faire la relation avec une phase du cycle en particulier. Selon England & Concannon (2002), si la montée initiale de la progestéronémie indiquant le pic de LH est progressive les prélèvements peuvent être effectués tous les 2 ou 3 jours, néanmoins ils ajoutent que plus les prélèvements sont espacés moins l'estimation des périodes du pic de LH, d'ovulation et de fécondabilité sera précise. Dans le cas d'inséminations artificielles par exemple, England & Concannon (2002) conseillent donc des prélèvements quotidiens afin de pouvoir détecter le pic de LH et l'ovulation. Ainsi les IA peuvent être planifiées 4 à 6 jours après l'obtention d'une progestéronémie supérieure à 2,0 ng/ml, concentration obtenue lors du pic de LH ou juste après (England & Concannon, 2002).

Selon une étude sur les relations temporelles entre les différentes hormones intervenant au cours du cycle sexuelle de la chienne effectuée par De Gier *et al.* (2006) sur 6 Beagles, 3 chiennes ont présenté une montée de la progestéronémie 12 à 4 heures avant le pic de LH et 2 chiennes ont présenté une augmentation concomitante à celui-ci. On peut donc en déduire que la montée brutale du taux de progestérone est un bon indicateur du pic de LH et nous permet donc d'anticiper la date d'ovulation. Cependant, dans cette même étude, la progestéronémie d'une chienne n'a commencé à s'élever que 20 heures après la décharge ovulante de LH, ce qui montre qu'il existe des variations entre les chiennes et que le moyen le plus précis de déterminer le pic de LH reste le dosage de cette hormone (Goodman, 2001).

Les dosages de progestérone ne permettent pas de déterminer la fin de la période de fécondabilité ; dans ce cas, le frottis vaginal est beaucoup plus utile car il peut montrer des signes avant-coureurs de métœstrus indiquant que la chienne n'est plus fécondable.

La période optimale de fécondité survenant de nombreuses heures après l'ovulation, il peut être intéressant de poursuivre le suivi de l'évolution de la progestérone au-delà de 10 ng/ml ; en pratique, en raison de la survie assez longue des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles, le premier accouplement peut se produire lorsque le dosage indique des valeurs supérieures à 15-20 ng/mL, puis être renouvelé 48 heures après (Guerin *et al.* 1996 ; Fontbonne, 1993).

En routine, on réalisera donc de deux à quatre dosages de progestérone par suivi de chaleurs (Guerin, 1997). Ainsi, les dosages de progestérone, du fait de la précision qu'ils représentent, permettent au vétérinaire réalisant des suivis de cycles d'améliorer ses résultats (meilleur taux de réussite en insémination, amélioration de la prolificité du fait d'accouplements réalisés à un moment plus optimal) (Van Haaften *et al.* 1989).

Ces dosages sont essentiels lors :

- d'insémination artificielle avec de la semence fraîche, en cas de comportement anormal des lices (agressivité) ou des étalons (saillies intempestives).
- d'insémination artificielle avec de la semence diluée, réfrigérée ou congelée, qui survit moins longtemps dans les voies génitales de la chienne et nécessite d'être inséminée au meilleur moment.
- de la reproduction de races où la césarienne est quasi-inévitable, afin de prévoir la date d'intervention.
- de chaleurs silencieuses ou discrètes.
- d'anomalies du cycle : chiennes ayant été mises à la saillie à des dates traditionnelles et ne remplissant pas (40% des chiennes n'ovulent pas dans la fourchette habituelle de 10-15 jours) (Van Haaften *et al.* 1989)

2.3 Echographie ovarienne

2. 3.1 Technique

Cette méthode permet de visualiser l'évolution de l'aspect des ovaires au cours du cycle œstral. Pour réaliser cet examen, il est recommandé d'utiliser des sondes linéaires ou curvilinéaires à haute fréquence (8 à 10 MHz) (Concannon, 2001).

La voie d'abord utilisée est la voie abdominale, la sonde étant placée au niveau du flanc soit en décubitus dorso-latéral soit debout lorsque la visualisation des images est trop difficile. L'ovaire se situe au pôle caudal du rein, au niveau de la 5ème vertèbre lombaire (Concannon, 2001).

L'aspect des ovaires varie au cours du cycle, permettant ainsi de distinguer les différentes phases du cycle (Concannon, 2001).

Les sondes échographiques recommandées sont de haute fréquence, linéaires ou linéaires courbes, entre 8 et 10 MHz, car elles permettent de détecter des modifications plus discrètes de la structure ovarienne (England *et al.* 2003).

La chienne doit être debout ou couchée en décubitus dorsolatéral droit ou gauche afin d'examiner respectivement l'ovaire droit puis le gauche. Il n'est pas nécessaire de tondre au préalable l'abdomen de la chienne, une bonne couche de gel échographique suffit (England *et*

al. 2003).

Les ovaires se situent à l'arrière et latéralement aux reins, en avant du 3^{ème} ou 4^{ème} processus lombaire. Tout comme le rein droit par rapport au gauche, l'ovaire droit est plus crânial que l'ovaire controlatéral. On commence en général l'examen par l'ovaire gauche car il est plus facile à trouver (England *et al.* 2003).

2.3.2 Observations

Les ovaires sont difficilement visualisable car ils sont petits et entourés d'une bourse ovarique plus ou moins chargée en tissu adipeux selon l'âge de la chienne. De plus, leur localisation est assez superficielle (England *et al.* 2003).

2. 3.2.1 Pendant l'œstrus

Lors de cette phase, la visualisation des ovaires est difficile. En effet à ce stade, les ovaires ont une échogénicité semblable à celle des structures avoisinantes et les structures folliculaires sont de petite taille, souvent inférieures à 1 mm (Concannon 2001).

Les ovaires sont petits et peu visibles. Ils ont une échogénicité homogène similaire à celle du cortex rénal. Cependant en fin d'œstrus, à 30 jours ou plus du début du pro-œstrus, les ovaires hypoéchogènes tendent à s'accroître et de petites cavités folliculaires d'un à deux millimètres de diamètre peuvent être détectées (England *et al.* 2003).

2.3.2.2 Pendant le præstrus

En début de præstrus les ovaires ont un aspect similaire à celui observé en œstrus. Puis ils deviennent plus visibles et hétérogènes. Ils contiennent de nombreux petits follicules sphériques anéchogènes entourés d'une paroi fine de moins d'un millimètre d'épaisseur. La taille de ces follicules augmente pendant le pro-œstrus, elle passe d'environ deux à trois millimètres de diamètre en début et milieu de præstrus à un peu près cinq millimètres de diamètre en fin de præstrus (England & Concannon, 2002).

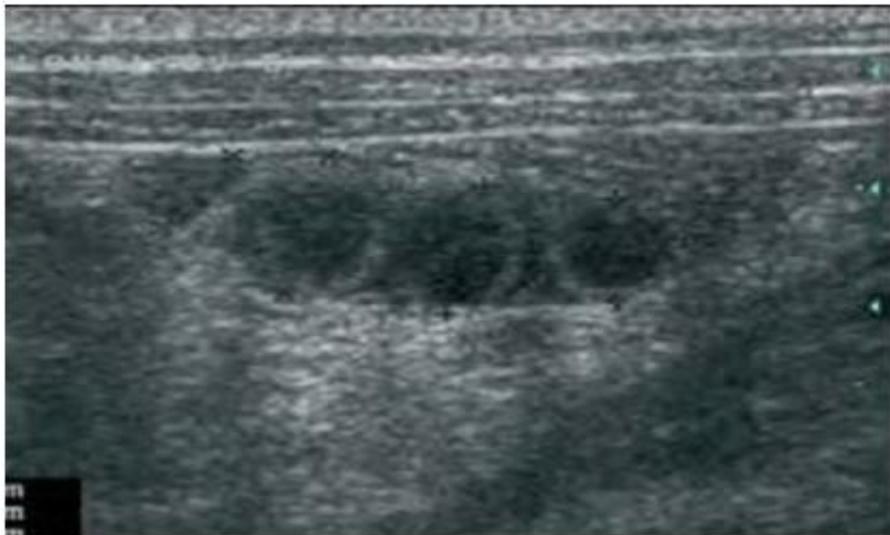
Le développement folliculaire commence lors du præstrus, et se termine lors de l'ovulation. Les follicules, d'abord remplis d'un liquide anéchogène, se transforment en des corps jaunes hypoéchogènes sécrétant des taux élevés de progestérone. L'évaluation échographique de la maturation folliculaire a été bien étudiée. Les kystes folliculaires pré-ovulatoires, anéchogènes, sont identifiés du 2^{ème} au 7^{ème} jour du pro-œstrus, en moyenne (Wallace *et al.* 1992).

De nombreuses petites cavités anéchogènes sont ainsi repérées, elles grossissent, progressivement jusqu'à l'ovulation. Les plus grands follicules se distinguent par une paroi claire distincte du liquide central anéchogène. La taille de ces follicules peut aller d'une taille

microscopique à plus de 1 cm lorsque l'ovulation approche. La surface des ovaires peut être irrégulière, grumeleuse. Lorsque les follicules grossissent, la taille des ovaires augmente également et ils deviennent plus faciles à visualiser (Wallace *et al.* 1992).

2.3.2.3 Période péri-ovulatoire

Pendant le pro-œstrus, les ovaires sont plus facilement visualisables et ils occupent une position caudo-ventrale par rapport aux reins. Les follicules ovariens apparaissent comme de petites structures sphériques anéchogènes entourés d'une paroi fine inférieure à 1 mm (Levy & Fontbonne, 2007). Dans les jours précédant l'ovulation, leur diamètre augmente régulièrement et leur paroi s'épaissit et devient hyperéchogène par rapport au stroma ovarien. Cela correspondrait à la lutéinisation pré-ovulatoire des follicules (figure 24). Leur taille varie de 6 à 9 mm de diamètre selon la race (Fontbonne & Malandain, 2006). L'augmentation de taille des follicules pré-ovulatoires est corrélée à l'augmentation de sécrétion des œstrogènes (Hayer *et al.* 1993).



Figures 24 : Aspect échographique des ovaires en période pré-ovulatoire (Fontbonne & Malandain, 2006).

Le jour de l'ovulation, lorsque l'on peut observer une disparition brutale des images folliculaires, l'ovaire présente une structure d'échogénicité homogène et peut ainsi être difficile à visualiser (figure 25).

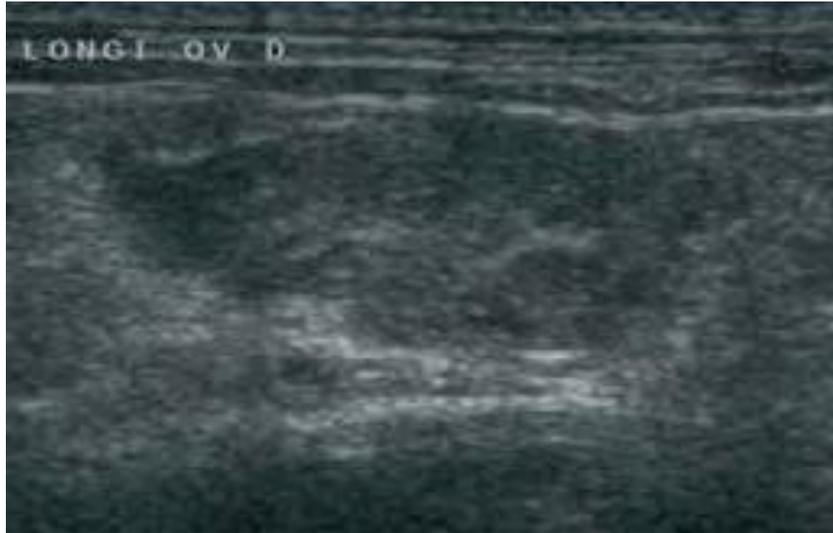


Figure 25 : « collapsus folliculaire » au moment de l'ovulation
(Fontbonne & Malandain, 2006).

En période pré-ovulatoire, les follicules atteignent une taille d'environ six à neuf millimètres (Mellin *et al.* 1976), leur paroi est plus épaisse, environ un millimètre. Ces follicules étant volumineux et nombreux, ils tendent à s'aplatir.

Pendant l'œstrus chez la chienne, l'ovulation peut être détectée lorsque le nombre et la taille des follicules décroît d'un jour à l'autre (Wallace *et al.* 1992). Même si au moins un grand follicule demeure sur un ovaire sur la plupart des chiens (7 sur 10), plusieurs chiens (3 sur 10) ne montraient pas de follicule sur aucun des ovaires le jour de l'ovulation. Dans une autre étude, l'aspect anéchogène des ovaires (follicules) se transforme de façon spectaculaire en un mélange d'hypoéchogénicité et d'hyperéchogénicité entre les jours 2 et 4 post pic de LH (Hayer *et al.* 1993).

Après le 6^{ème} jour suivant le pic de LH, les ovaires sont hypoéchogènes du fait de la présence du corps jaune. Les ovaires changent de forme : ils sont plus bombés et sont fréquemment multilobés. Des structures kystiques anéchogènes peuvent toujours être observées, elles sont indiscernables des follicules ; leur nombre et leur taille sont réduits. Chez la plupart des chiens, ces structures anéchogènes grossissent progressivement, puis décroissent et/ou deviennent plus échogènes (Hayer *et al.* 1993).

Ainsi l'ovulation se traduit par:

Une diminution du nombre de follicules anéchogènes ou leur disparition. Selon une étude effectuée à l'ENVA par Marseloo *et al.* (2004), 45,9% des chiennes (22/48) ont présentée une ovulation incomplète et 37,5% (18/48) une disparition complète des cavités folliculaires.

Un remplacement des structures anéchogènes par d'autres hypoéchogènes plus petites à contours flous. Selon la même étude que précédemment, ce phénomène s'est produit chez 58,3% des chiennes (Marseloo *et al.* 2004).

L'apparition de liquide entre l'ovaire et la bourse ovarique. Ce liquide serait du liquide intra-folliculaire accumulé lors de l'ovulation. Ce phénomène est observable dans les heures qui suivent l'ovulation et concerne 39,6% des chiennes de l'étude évoquées précédemment (Marseloo *et al.* 2004).

Le changement d'échogénicité observé au sein des ovaires au moment de l'ovulation est dû soit à un collapsus folliculaire, soit à une accumulation de sang dans les cavités folliculaires, soit à une prolifération précoce du tissu lutéal dans ces mêmes cavités (England & Concannon ,2002).

Cette apparente échogénicité ne dure que 24 à 48h, car les corps jaunes deviennent rapidement cavitaires. Ces cavités se remplissent d'un fluide qui leur donne un aspect hypoéchogène. A ce stade, ces jeunes corps jaunes peuvent être confondus avec des follicules pré-ovulatoires (England & Concannon ,2002).

Bien que la paroi du corps jaune soit plus épaisse il est très difficiles voire impossible pour un manipulateur inexpérimenté de faire la différence si d'autre échographie n'ont pas été réalisées antérieurement (England & Concannon ,2002).

Fontbonne & Malandain (2006) constate que plusieurs difficultés apparaissent pour détecter l'ovulation:

- dans certains cas, on n'observe pas de disparition brutale des cavités folliculaires (« collapsus folliculaire ») (Wallace *et al.* 1992 ; Hayer *et al.* 1993 ; England & Yeager, 1993)
- dans plus de la moitié des cas, de petites structures hypoéchogènes persistent au moment de l'ovulation. Celles-ci étant plus petites et plus irrégulières que les follicules pré-ovulatoires

- dans 45,9 % des cas, des follicules non-ovulés persistent jusqu'à 3 jours après l'ovulation (figure 26). Il est donc important de ne pas attendre que tous les follicules ovulent pour dater le jour de l'ovulation (Wallace *et al.* 1992 ; Silva *et al.* 1996).

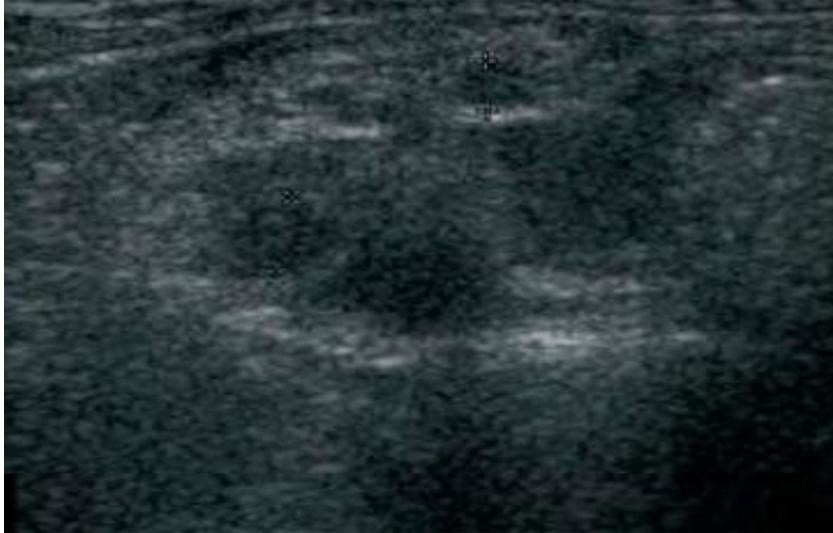


Figure 26 : Aspect échographique des ovaires au moment de l'ovulation : persistance de structures hypoéchogènes juste après ovulation (Fontbonne & Malandain, 2006).

Après l'ovulation, les images folliculaires sont remplacées par des images hypoéchogènes caractéristiques de corps jaunes (figure 27), paroi plus épaisse que celle des follicules avec une zone anéchogène plus petite que celle des follicules qui se comble au cours de la maturation du corps jaune (Boyd *et al.* 1993 ; Renton & Boyd ,1992).

Des aires multifocales, anéchogènes, hypoéchogènes ou même hyperéchogènes sont présentes en début de métœstrus, représentant le corps jaune, ou peut-être le corps hémorragique (hayer *et al.* 1993).



Figure 27 : Aspect échographique des ovaires après ovulation
(Fontbonne & Malandain, 2006).

On peut observer, dans certains cas, dans les heures qui suivent l'ovulation, une accumulation de liquide entre l'ovaire et la bourse ovarique (figure 28) qui correspondrait au liquide intra-folliculaire accumulé après expulsion de l'ovocyte lors de l'ovulation (Fontbonne & Malandain, 2006 ; Eker & Salmanoglu , 2006) .



Figure 28 : Aspect échographique des ovaires après ovulation : accumulation de liquide entre l'ovaire et la bourse ovarique (Fontbonne & Malandain, 2006).

2.3.3 Intérêts et limites

L'échographie ovarienne constitue une méthode précise de détection de l'ovulation. Les études de Marseloo *et al.* (2004) ont démontré qu'elle permettait d'améliorer de plus de 10% le moment précis de l'ovulation par rapport au seul dosage de la progestérone. Ainsi sur 48 chiennes de 36 races différentes, le jour de l'ovulation a été déterminé de façon nette chez 44 d'entre elles soit 91,7%.

C'est une méthode non invasive, mais qui requiert une certaine expérience car les ovaires sont difficiles à visualiser. De plus chez certaines chiennes l'obtention d'images de bonne qualité est rendue difficile soit du fait de leur format (races géantes), soit du fait de leur physionomie (obésité), soit du fait de leur épaisseur de peau (ex. Chow Chow et Sharpei) (Marseloo *et al.* (2004).

Il existe cependant un désaccord entre les différents auteurs concernant la possibilité de détecter avec précision l'ovulation à l'aide de l'échographie, car les follicules ne s'affaissent pas après l'ovulation chez la chienne (England & Allen, 1989).

La détection échographique de l'ovulation chez la chienne nécessite des examens journaliers, avec un appareil très performant, pour pouvoir identifier les changements d'aspect des ovaires. La corrélation avec d'autres méthodes telles que les frottis vaginaux ou les dosages de progestérone peut être très utile (Nyland & Mattoon, 2002).

Il peut parfois être difficile de différencier les follicules pré-ovulatoires et les jeunes corps jaunes (Hayer *et al.* 1993 ; England *et al.* 2003). Ainsi il apparaît nécessaire d'effectuer un examen échographique quotidien pour ne pas manquer la transition entre les follicules pré-ovulatoires et les jeunes corps jaunes (England & Yeager, 1993 ; Silva *et al.* 1996 ; Fontbonne & Malandain, 2006).

Dans son étude, Fontbonne & Malandain, (2006) démontre que l'examen échographique des ovaires augmente de seulement 10% la précision de détection de l'ovulation par rapport au dosage de la progestérone. Dans cette étude, l'ovulation était détectée dans 93,7% des cas grâce à l'examen échographique et durait moins de 24h. Il estime que la détection de l'ovulation peut être réalisée avec un échographe de qualité standard, en effectuant un examen quotidien, pour les chiennes de poids inférieur à 25kg. En revanche, pour les plus grands gabarits ou pour les chiennes obèses, il semble nécessaire d'utiliser un échographe de qualité supérieure.

Ainsi selon Silva *et al.* (1996) et England & Yeager (1993), l'ovulation ne peut être détectée par échographie, car les ovaires ont un aspect hétérogène similaire avant et après ovulation. D'après Hayer *et al.* (1993), l'échographie n'est utile que pour suivre le développement des follicules et du corps jaune, mais au moment de l'ovulation, il n'y a que très rarement (2 cas sur 15 suivis échographiques journaliers) des modifications claires et significatives des images échographiques. Selon Boyd *et al.* (1993), l'utilisation d'échographes de haute qualité donnait des résultats satisfaisants sur un petit lot de chiennes pour la prédiction du moment de l'ovulation.

De plus, des études plus récentes montrent qu'avec un appareil et un imageur performants, la détection de l'ovulation est possible, bien que difficile ; cependant elles insistent sur le fait que l'échographie ovarienne a encore aujourd'hui un intérêt limité en pratique, en particulier lorsqu'on compare cette méthode aux dosages de progestérone plus accessibles (Hase *et al.* 2000 ; England & Concannon, 2002 ; England *et al.* 2003).

Enfin, les données les plus récentes prouvent que le jour de l'ovulation peut être déterminé avec une bonne précision en réalisant des échographies ovariennes journalières à l'aide d'une sonde de 7,5 MHz. Environ 10% des chiennes, toutes races confondues, l'échographie, même réalisée qu'une fois par jour, peut augmenter la précision de la détection de l'ovulation, comparée à des seuls dosages de progestérone (Fontbonne & Malandain , 2006) .

Ainsi pour résumer, on considère que l'ovulation a eu lieu quand les images sphériques anéchogènes et de grande taille disparaissent pour être remplacées par des structures d'échogénicité croissante

2.4. Aperçus sur l'induction de l'œstrus par l'utilisation des antiprolactiniques (agoniste de la dopamine) :

La bromocriptine est un peptide de la famille des alcaloïdes dérivé de l'ergot de seigle, est un agoniste dopaminergique et inhibiteur de la sécrétion de la prolactine qui est utilisé notamment dans le traitement des tumeurs de la glande hypophyse ainsi que dans la maladie de Parkinson chez l'être humain.) (Pierson & Buff, 2009).

a) Indication chez l'espèce canine :

- Induction des chaleurs
- Interruption de la gestation.
- Traitement de la pseudo-gestation.
- Tariessement de la sécrétion lactée (Pierson & Buff, 2009)

b) Posologie :

En fonction de la catégorie de poids des chiennes la posologie était de :

- 1,25 mg/j en deux prises pour les chiennes dont le poids est de 15 à 20 kg.
- 2,5 mg /j en deux prise pour les chiennes dont le poids est de plus de 25 kg (Pierson & Buff, 2009).

L'induction des chaleurs chez a chienne se réalise dans le cas d'impubérisme depuis 24 mois ou dans le cas d'absence de chaleurs depuis plus de 10 mois. L'utilisation de substances dopaminergiques est recommandée en première intention lors d'anœstrus pathologique (>7mois d'interoestrus). (Pierson & Buff, 2009)

Les antiprolactiniques sont des agonistes dopaminergiques qui inhibent la sécrétion de la prolactine via une sécrétion de dopamine ou une suppression de la sécrétion de sérotonine or l'utilisation de certains antiprolactiniques lors de pseudo-lactation diminue l'intervalle interœstral des chiennes traitées. (Pierson & Buff, 2009).

Contrairement à la bromocriptine (Parlodel®, molécule dopaminergique) ou à la cabergoline (Galastop®, une molécule anti-sérotoninergique et dopaminergique), le metterolol (Contralac®, une molécule anti-sérotoninergique) n'induit pas d'œstrus. L'effet dopaminergique central des antiprolactiniques qui semble agir favorablement au cours de cet effet induisant la chaleur. Leur efficacité dans le déclenchement de l'œstrus dépend de la dose, de la durée du traitement (Beijerink, 2003 ; De Gier ,2008 ; Pierson & Buff, 2009).

Les deux anti-prolactiniques les plus utilisés sont la cabergoline à la dose de 5µg / kg / jour jusqu'à l'obtention du proœstrus, habituellement pendant 3 semaines et la bromocriptine 20-50 µg / kg deux fois par jour jusqu'à l'obtention du porestrus, habituellement pendant 4 semaines (Beijerink, 2003 ; De Gier ,2008 ; Pierson & Buff, 2009).

Le vomissement était le seul effet secondaire lié au traitement observé chez cinq chiennes, ce symptôme disparaissant après 10 jours de traitement. Pierson & Buff (2009) rapportent que les effets secondaires les plus observés sont les vomissements survenant entre 3% et 25% après un traitement avec des anti-prolactiniques.

D'autre part, nous n'avons pas observé de décoloration des poiles, liée à l'utilisation de la bromocriptine, contrairement à la cabergoline, qui induit une décoloration transitoire du pelage chez 25% des chiennes qui reçoivent cette molécule pendant 14 à 45 jours (De Gier *et al.*2008 ; Pierson & Buff, 2009).

Ainsi la métergoline (Contralac®, molécule anti-sérotoninergique) n'induit pas d'œstrus, contrairement à la bromocriptine (Parlodel®, molécule dopaminergique) ou à la cabergoline (Galastop®, molécule à la fois anti-sérotoninergique et dopaminergique). Il semblerait donc que l'effet sur le cycle ne serait pas dû à l'action antiprolactinique mais bien dopaminergique. (Pierson & Buff, 2009) ; Leur efficacité dans le déclenchement de l'œstrus dépend de la dose, de la durée du traitement et du stade d'anœstrus.

L'utilisation de certains antiprolactiniques pendant la pseudo-lactation diminue l'intervalle inter-œstral des chiennes traitées (Beijerink, 2003 ; De Gier, 2008 ; Pierson & Buff, 2009). L'utilisation d'agonistes dopaminergiques en anticipation de l'œstrus (moins de 7 mois après la dernière chaleur) est très décevante (Fontbonne, 2008).

Les effets secondaires les plus fréquents sont des vomissements et une décoloration transitoire du pelage. A approximativement 25 % des chiennes qui reçoivent de la cabergoline pendant 14 à 45 jours développeront une décoloration du poil. Les vomissements représentent également un effet secondaire fréquent : ils surviennent dans 3 à 25% des cas (Pierson & Buff, 2009)

Les deux protocoles les plus utilisés sont :

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

La cabergoline à la dose de 5µg/kg/j jusqu'à l'obtention du proœstrus (généralement pendant 3 semaines). (Pierson & Buff, 2009)

La bromocriptine 20-50 µg/kg, deux fois par jour jusqu'à l'obtention du proœstrus. (Pierson & Buff, 2009).

3. Gestation

3.1. Facteurs influençant la durée de gestation

3.1.1. Intervalle ovulation-insémination

Selon une étude de Tsutsui *et al.* (2006) sur la relation entre l'accouplement ou l'ovulation et la durée de gestation, il existe une corrélation négative entre le nombre de jours séparant la saillie de l'ovulation et la durée de gestation apparente. L'étude porte sur 36 chiennes Beagle âgées de 2 à 10 ans séparées en 5 groupes de 5, 7, 8, 7 et 9 femelles. Celles-ci ont été inséminées une seule fois de 1 à 5 jours après l'ovulation respectivement suivant les groupes. Le premier jour où la progestéronémie plasmatique excède 2 ng/ml est considéré comme celui de l'ovulation. La durée de gestation est calculée du jour de l'ovulation à la mise bas. La durée de gestation apparente obtenue pour les 5 groupes est de : 63,4 +/- 0,6, 61,6 +/- 0,7, 60,8 +/- 0,7, 59,7 +/- 0,6 et 59,1 +/- 0,3 jours ; ce qui montre bien que plus la saillie est tardive plus la durée de gestation apparente est courte. Alors que la durée de gestation réelle varie de 61 à 66 jours avec une

moyenne de 63,9 +/- 0,2 jours et ne diffère pas selon les groupes (Tsutsui *et al.* 2006), ceci dépend sans doute du moment où les ovocytes sont fécondés (figure 29).

3.1.2. Race

D'après l'étude d'Arbeiter *et al.* (1991), il n'y a pas de différence entre les races. Selon une étude de Linde-forsberg *et al.* (1999), sur l'insémination artificielle chez le chien (527 IA) il existe des variations interraciales de 3 à 6 jours : le Berger Allemand aurait une durée de gestation plus courte que les autres races (Linde-Forsberg, 2002). Par contre, une autre étude de ce même auteur effectuée en 1998 indique qu'il n'y a pas d'influence de la race sur la durée de gestation (Linde-forsberg *et al.* 1997).

Okkens *et al.* Réalisent deux études sur l'influence de la race sur la durée de la gestation :

La première, en 1993, porte sur 77 chiennes de races différentes, dont 5 races comptant au moins 5 animaux, et dont la durée de gestation est mesurée de la saillie à la mise bas. Les chiennes sont inséminées une seule fois au début de l'ovulation, dès que la progestéronémie dépasse 5-6 ng/ml. Les auteurs concluent que le Berger Allemand (9 chiennes) a une gestation plus courte que les autres races, 60,1 +/- 0,5 jours.

La deuxième, en 2001, porte sur 113 chiennes provenant de 6 races différentes. Le protocole de mise à la reproduction est le même que précédemment. Cette étude montre que le West Highland White Terrier a une durée de gestation significativement plus longue (62,8 +/- 1,2 jours) que celles du Berger Allemand (60,4 +/- 1,7 jours), du Labrador Retriever (60,9 +/- 1,5 jours) et du Doberman (61,4 +/- 1,0 jours).

Eilts *et al.* (2005) effectuèrent une étude sur 308 chiennes provenant de 4 races différentes. Ils étudièrent l'influence de l'âge, la parité, la taille de la portée et la race sur la durée de la gestation. Cette dernière fût mesurée depuis le pic de LH déduit du premier jour du diœstrus cytologique ou du premier jour d'augmentation brutale de la progestéronémie. Cette étude a mis en évidence une durée de gestation plus courte chez le Labrador Retriever (62,9 +/- 1,3 jours) que chez le Berger Allemand (63,6 +/- 2,1 jours), le Golden Retriever (64,7 +/- 1,5 jours) et le Hound (66,0 +/- 2,8 jours).

3.1.3. Age de la chienne

Selon l'étude d'Eilts *et al.* (2005) l'âge de la chienne n'a pas d'influence sur la durée de gestation.

3.1.4. Poids de la chienne avant la gestation

D'après une étude de Kutzler *et al.* (2003) sur 63 chiennes appartenant à 19 races différentes et portant sur la prédiction de la date de parturition à partir de la montée initiale de la

progestéronémie indiquant le pic de LH, le poids de la chienne n'affecte pas la durée de la gestation.

3.1.5. Taille de la portée

D'après Linde-Forsberg *et al.* (1998), Kutzler *et al.* (2003) et Tsutsui *et al.* (2006), la taille de la portée n'affecte pas la durée de gestation.

D'autres études montrent le contraire :

Celle d'Hekerman *et al.* (1993) montrent que la taille de la portée est corrélée négativement avec la durée de gestation apparente pour les chiennes ayant mis bas jusqu'à 7 chiots. A partir de 8 chiots il n'y a plus de corrélation entre la taille de la portée et durée de gestation. Okkens *et al.* (2001) confirment qu'il y a une corrélation négative entre la taille de la portée et la durée de gestation. Mais cette fois-ci, cela concerne les chiennes ayant jusqu'à 13 chiots. L'étude d'Eilts *et al.* (2005) montrent que les chiennes ayant des portées de 4 chiots ou moins ont une durée de gestation significativement plus longue.

3.1.6. Parité

Selon Tsutsui *et al.* (2006) ; Eilts *et al.* (2005) et Okkens *et al.* (2001) , la parité n'a pas d'effet sur la durée de la gestation. Holst & Phemister (1974) remarquent sur 108 gestationssuivies, que la taille de la portée influence la date du part. Les chiennes qui mettent bas avant le 56^{ème} jour de gestation ont des portées plus grandes que la moyenne, alors que les portées nées après le 58^{ème} jour sont de petite taille. La durée de la gestation est corrélée négativement avec la taille de la portée. (Bernard, 2002 ; Gradil *et al.* 2000 ; Million, 2004).

3.1.7. Mode d'insémination : intra-vaginale et intra- utérine

Selon une étude réalisée par Linde-Forsberg *et al* (1999) sur 327 inséminations artificielles effectuées chez 276 chiennes de 76 races différentes, la durée de gestation apparente moyenne à compter de la première insémination est plus longue lors d'insémination intra-vaginale (62,7 +/- 2,7 jours) que lors d'insémination intra-utérine (61,2 +/- 2,1 jours)

			Durée de la gestation
Saillies multiples	J-7	J8	57 à 72 jours
Saillie unique	J0	J8	57 à 65 jours
Pic de LH	J0		65 +/- 1 jour
Ovulation	J2		63 +/- 2 jours
Fécondation	J5	J8	57 à 60 jours
1° jour du Métoestrus cytologique		J8	57 +/- 2 jours

Figure 29 : Durée de la gestation chez la chienne : variation suivant le repère choisie pendant la chaleur (J0= jour du pic de LH). (Concannon & Lein, 1989).

Dans notre étude, nous avons choisi le jour coïncidant avec la dernière saillie fécondante pour définir le premier jour de la gestation. Il faut souligner que la détermination du début de la gestation (J0) varie chez les auteurs que nous citons selon les repères choisis par chacun d'eux à savoir : Dernière saillie, et pic de LH, ou début du métœstrus cytologique et ovulation ou jour du métœstrus comportemental.

Dans la suite de notre étude, nous indiquerons le repère choisi pour définir le jour J0 de la gestation comme suit:

- J0-LH: le pic de L H
- J0-PS: la première saillie
- J0-DS: la dernière saillie
- J0-OV: l'ovulation
- J0-MET: le début du métœstrus cytologique.
- J0-METO: le début du métœstrus.

3.2. Déroulement de la gestation

Evans & Christensen (1979) et Concannon *et al.* (1989) décrivent la gestation en 3 périodes: La période de l'embryoblaste ou période de vie libre, de J2-LH à J18-LH (Evans & Christensen, 1979), de J12-LH à 15 -LH soit J6-DS à J10 -DS (Concannon *et al.* 1989). Pendant laquelle l'œuf migre le long des cornes utérines jusqu'à son site d'attachement. Elle se déroule entre le

moment de la fécondation entre J4-LH et J9-LH correspondant à J0-DS et J7-DS (Concannon *et al.* 1989) et l'immobilisation de l'œuf dans l'utérus vers J16-LH et J18-LH. (Holst & Phemister , 1974) (Concannon *et al.* 1989).

La période embryonnaire elle s'étend de J19-LH à J35-LH (Evans & Christensen, 1979) : elle commence lors de l'implantation qui se situe entre J17-LH et J19-LH correspondant à J9-DS et J22-DS. Jusqu'à J23-LH et J35-LH correspondant à J26-DS et J38- DS. (Concannon *et al.* 1989), comprend la mise en place des annexes et l'organogenèse, jusqu'à ce que l'embryon ait acquis les caractères externes de son espèce. Il est alors nommé fœtus.

La période fœtale est la phase de croissance et de maturation du fœtus, elle s'étend de J35- LH à la mise bas (Evans & Christensen, 1979 ; Concannon *et al.* 1989).

Evans & Christensen (1979) décrivent avec précision le développement de l'embryon et du foetus. Le début de la gestation cité est la saillie, et la durée de la gestation est de 60 à 63 jours (le jour J0 se situerait pendant la phase de maturation des ovules).

Concannon *et al.* (1989) décrivent avec précision le déroulement des différents événements d'un cycle sexuel fécond et une gestation chez la chienne par rapport au pic pré ovulatoire de LH et a la dernière saillie fécondante.

3.2.1. Période de l'embryoblaste

3.2.1.1. Période tubaire

a. Fécondation

Selon l'étude de Reynaud *et al.* (2005), la fécondation a lieu dans la partie distale de l'oviducte à partir de 90 heures, avec des ovocytes au stade métaphase 2. La pénétration d'ovocytes immatures par les spermatozoïdes reste exceptionnelle (3 ovocytes au stade métaphase 1, 72 heures après ovulation). La fécondation aboutit à la formation d'un embryon à 2 cellules vers 112 heures post ovulation. Des embryons au stade 4 et 8 cellules étaient également visibles au même moment.

La fécondation a lieu entre J4-LH et J9-LH soit J0-DS et J7-DS dans la portion terminale des oviductes (Concannon *et al.*, 1989) .La segmentation (divisions successives de la cellule œuf initiale) aboutit à la formation d'une Morula de 8-16 cellules dans la portion terminale des oviductes vers J2-met. La formation des morulas de 8-16 cellules dans l'oviducte s'effectue selon (Concannon *et al.* 1989) (12) entre J8-LH et J10-LH soit entre J3-DS et J14-DS. Concannon *et al.* (1989) évoquent la possibilité d'une retenue des œufs dans les trompes

jusqu'à l'ouverture de la jonction tubo-utérine à J10-LH.

b. Nidation

La nidation est tardive chez la chienne. Les embryons restent libres dans l'oviducte entre 168 et 240 heures (soit 7 à 10 jours) après l'ovulation puis descendent dans l'utérus au stade de morula (8 à 16 cellules) ou de blastocyste (32 cellules). (Reynaud *et al.* 2005).

Pendant 1 à 2 jours les embryons descendent et remontent activement la corne utérine ipsilatérale puis, les 2 jours suivant ils flottent d'une corne utérine à l'autre jusqu'à l'implantation. Selon les auteurs, la date d'implantation n'est pas tout à fait la même :

- Selon Romagnoli (2006) , l'implantation débute 13 à 15 jours après l'ovulation.
- Selon Concannon (2002) , elle débute autour du 18^{ième} jour après le pic de LH par une congestion utérine (pré-implantation), puis autour du 21^{ième} jour le trophoblaste s'attache à l'endomètre, enfin elle s'achève autour du 22^{ième} jour.

Les embryons peuvent s'implanter dans la corne opposée au lieu de l'ovulation, leur répartition est équidistante dans l'utérus avec une distribution identique dans les deux cornes (Crepel , 1998).

3.2.1.2 Période utérine

Vers J10-LH, les œufs passent dans l'utérus, ils ont atteint le stade Blastocyste de 32 à 46 cellules (Concannon *et al.* 1989) (figure 30). Ce dernier se définit par la présence de 3 régions:

1. Le trophoblaste: revêtement cellulaire de l'œuf.
2. L'embryoblaste sous la forme d'un amas cellulaire excentré.
3. Le blastocoele ou lécithocèle : cavité liquidienne centrale.

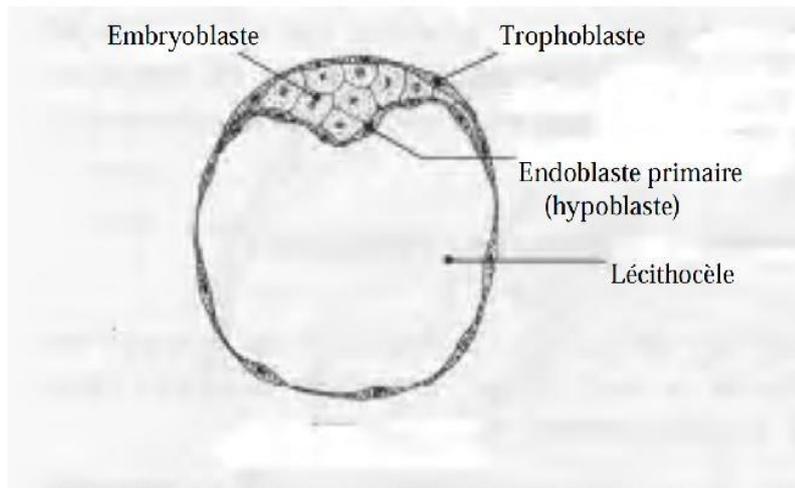


Figure 30 : Blastocyste uni laminaire chez les Mammifères (Barone, 1978)

Les œufs se répartissent de manière homogène entre les deux cornes utérines (Shimizu *et al.* 1990). Pendant les trois premiers jours de la période utérine, les blastocystes descendent le long de la corne ipsilatérale, et par l'intermédiaire du corps utérin, certains oeufs remontent la corne controlatérale, avant de s'immobiliser à espaces réguliers les uns des autres (Concannon *et al.* 1989). Le trophoblaste concourt rapidement aux échanges nutritifs entre l'œuf et le milieu utérin (Concannon *et al.* 1989).

L'œuf s'immobilise au stade de la ligne primitive entre J16-LH et J18-LH (Concannon *et al.* 1989) , soit entre J9-DS et J22-DS (Concannon *et al.* 1989). J11-MET (Holst & Plemister, 1971). Il a une forme elliptique de 2,5 mm de long.

Un œdème de l'endomètre marque le site d'implantation et délimite une petite cavité piriforme autour de l'œuf. La zone pellucide se désagrège, le trophoblaste entre en contact avec la muqueuse utérine et le processus d'implantation commence (Concannon *et al.* 1989).

Ces sites sont visibles à l'œil nu lors de l'observation externe de l'utérus seulement entre J20-LH et J25-LH (Concannon *et al.* 1989) soit J12-DS et J28-DS, et forment alors des renflements d'à peine 1 cm de diamètre (Concannon *et al.* 1989), le Blastocyste mesure alors 3 mm de diamètre (Concannon *et al.* 1989).

3.2.2 Période embryonnaire

3.2.2.1 Mise en place des annexes embryonnaires

Les annexes de l'embryon regroupent l'allantoïde, la vésicule vitelline, le sac amniotique et le Chorion

a. Chorion et la croissance de l'œuf

Le chorion provient du trophoblaste doublé sur sa face profonde par le mésoblaste extra embryonnaire. Le feuillet externe du mésoblaste se lie à lui de façon intime à partir de J18-LH (Concannon *et al.* 1989) soit J10-DS: stade de la ligne primitive (Concannon *et al.* 1989).

L'implantation est dite centrale (figure 31): elle s'établit sur la zone de contact initiale qui existe entre le chorion et l'endomètre maternel. Elle est annoncée par la formation de courtes villosités choriales sur toute la surface de l'œuf, à l'exception de ses extrémités (en regard de la lumière utérine) et de l'aire embryonnaire (dépourvue de revêtement trophoblastique jusqu'à la fermeture de l'amnios) cela c'effectue entre J17-LH et J19-LH (J9-DS et J22-DS) (Concannon *et al.* 1989).

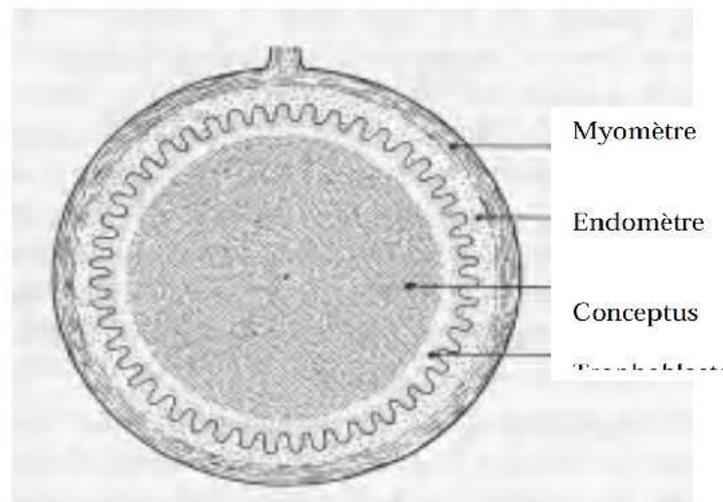


Figure 31: Implantation centrale de l'œuf (Barone, 1978).

Dés lors, l'accroissement du sac chorial devient inégal, il prend entre J20-LH et 25-LH soit la forme d'un citron (Evans & Christensen, 1979) ; entre J12-DS et J28-DS (Concannon *et al.* 1989) (figure 32).

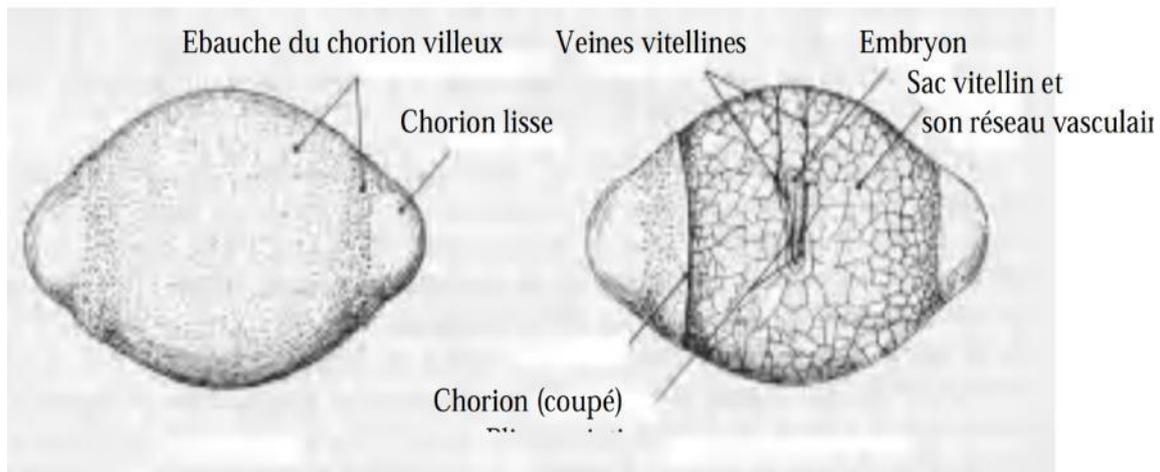


Figure 32 : Premiers stades de formation des annexes embryonnaires chez la chienne J20-LH (Barone, 1978) soit J12-DS (Concannon *et al.* 1989).

A gauche la répartition du chorion villosité et du chorion lisse, **A droite** le réseau vasculaire du placenta chorion-vitellin transitoire.

Les régions polaires dépourvues de villosités choriales déterminent le chorion lisse et s'allongent plus rapidement que la bande intermédiaire du chorion villosité. Celui-ci conserve la forme d'une ceinture autour de la partie moyenne de l'ampoule, et définit l'emplacement du placenta zonaire.

Vers la moitié de la gestation, chacune de ces trois régions choriales occupera le tiers de la longueur de l'œuf (Barone, 1978).

Par la suite, l'ampoule va s'accroître par l'extension de ses régions aplacentaires, où le chorion lisse est simplement apposé contre l'endomètre maternel, tandis que la ceinture placentaire ne s'élargira que très modérément.

b. Vésicule vitelline et l'allantoïde

Ces deux enveloppes sont étroitement liées dans leur évolution. La vésicule vitelline, dérivée de l'endoblaste, se développe de façon rapide et précoce. Vers J17-LH et J19-LH (Concannon *et al.* 1989) soit J9-DS et J22-DS (dès l'implantation), elle occupe la place du blastocœle, et s'applique contre le chorion (Concannon *et al.* 1989).

A J21-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J13-DS (Concannon *et al.* 1989), un réseau vasculaire s'étend sur sa surface. Il est issu du mésoblaste extra embryonnaire et relié à l'embryon par les vaisseaux vitellins. La vésicule vitelline occupe la quasi-totalité de

l'ampoule (figure 33).

Elle plaque ses vaisseaux contre le chorion et forme avec lui la première ébauche placentaire. Il s'agit du placenta chorio-vitellin transitoire, qui assure les échanges foeto-maternels durant les premiers jours de l'implantation, de J21-LH à J23-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J13-DS à J15-DS (Concannon *et al.* 1989). Il sera rapidement relayé dans sa fonction par l'allantoïde.

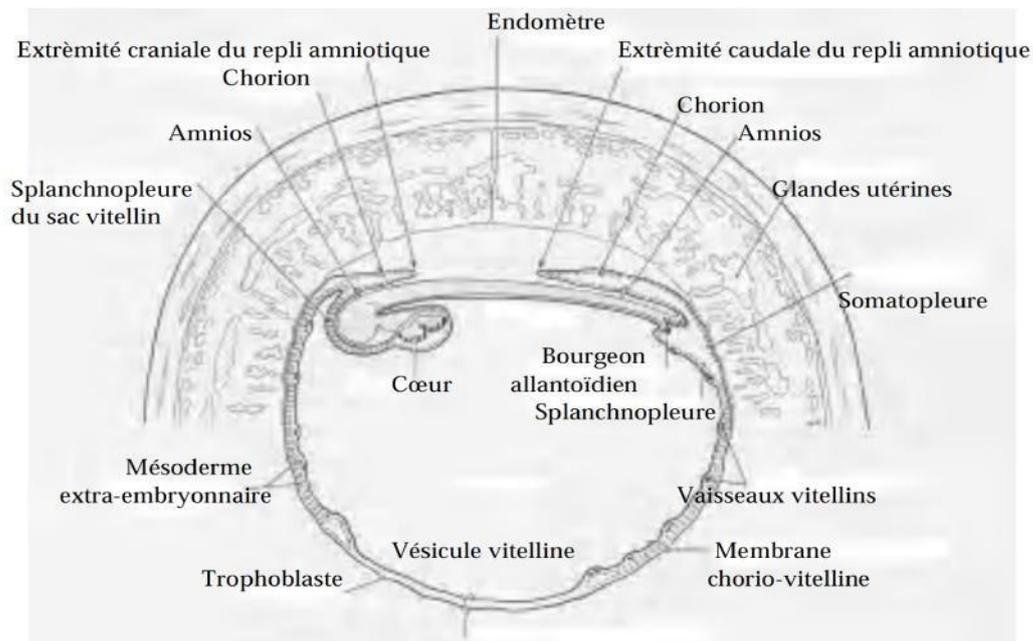


Figure 33 : Embryon 16 somites, de 4,5mm de long à J21-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J13-DS (Concannon *et al.* 1989). Vue de l'utérus et du placenta, sur une section de l'ampoule dans l'axe longitudinal de l'embryon. Le sac vitellin remplit la cavité utérine, des extensions du mésoderme extra embryonnaire sont observées entre le chorion et la vésicule vitelline. Le sac amniotique se forme par plissement des bords du disque embryonnaire, et le bourgeon allantoïdien fait son apparition. (Evans & Christensen, 1979).

L'allantoïde naît de l'extrémité caudale de l'embryon. Son développement et celui des vaisseaux qui la recouvrent est très rapide : à J21-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J13-DS (Concannon *et al.* 1989), le bourgeon allantoïdien forme un petit sac sphérique sous l'embryon (Schéma N°4), mais dès J23-LH et J25-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J15-DS et J17-DS (Concannon *et al.* 1989) son extension est considérable.

L'allantoïde s'intercale entre la vésicule vitelline et le chorion, et refoule progressivement le vitellus au centre de l'œuf avec l'embryon. Elle prend ainsi une disposition en séreuse avec un

feuillet chorial et un feuillet vitellin. (Evans & Christensen, 1979).

Dans un premier temps, le sac allantoïdien n'occupe que la partie moyenne de l'ampoule. Il forme une large ceinture, et apporte ses vaisseaux embryonnaires au chorion villositéux. La vésicule vitelline reste au contact du chorion lisse de part et d'autre de l'allantoïde, aux apex de l'œuf (Evans & Christensen, 1979).

Ensuite l'allantoïde continue son extension, elle s'insinue plus loin entre le chorion lisse et le vitellus. Le vitellus est finalement isolé du chorion sauf en deux zones. En effet, il garde jusqu'à la mise bas un point d'ancrage à chaque extrémité de l'ampoule. (Evans & Christensen, 1979).

A J28-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J20-DS (Concannon *et al.* 1989), l'allantoïde est le sac embryonnaire le plus externe de l'œuf. La vésicule vitelline se vide en partie de son liquide sa paroi, qui reste bien vascularisée, se plisse. Elle prend la forme d'un cylindre flasque, allongé suivant le grand axe de l'œuf et plaqué contre la face ventrale de l'embryon et de son amnios (figure 34,35).

c. Amnios

Dés J20-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J12-DS (Concannon *et al.* 1989), le sac amniotique se forme par plissements: les bords du disque embryonnaire se soulèvent et forment des plis qui se rejoignent dorsalement à l'embryon entre J21-LH et J23- LH (Evans & Christensen, 1979) soit J13-DS et J15-DS (Concannon *et a.* 1989).

L'amnios produit et renouvelle le liquide amniotique qui sera en partie résorbé par le fœtus. Ce dernier se trouve isolé et protégé par la répartition égale des charges sur toute la surface de son corps, évitant les chocs et les pressions locales (Evans & Christensen, 1979).

d. Placenta

Le placenta chorio-allantoïdien définitif remplace le placenta chorio-vitellin à partir du 13^{ème} jour du métœstrus comportemental (Barrau *et al.* 1976), soit vers J23-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J15-DS (Concannon *et al.* 1989).

Une fois les membranes choriale et allantoïdienne adossées, les villosités choriales prennent un développement exubérant. Le trophoblaste forme des lames dans lesquelles s'engagent des vaisseaux allantoïdiens. Ces lames s'enfoncent profondément dans l'endomètre, et prolifèrent en un réseau complexe, jusqu'à envahir le conjonctif et à englober le réseau vasculaire maternel, qui est seul respecté.

Un placenta endothélochorial, dans lequel les vaisseaux utérins sont directement au contact du trophoblaste, semble complètement établi vers J25-OV (Pollet & Viaud, 1988) ou J35-LH (Holst & Phemister, 1974) soit J27-DS (Concannon *et al.* 1989).

Vers J26-MET (Barrau *et al.* 1976) , une bande particulière de teinte verdâtre se forme de part et d'autre de l'anneau placentaire, à la jonction entre les chorions lisse et villos. Elle résulte de la destruction localisée de tissus maternels et fœtaux dans une zone particulière du trophoblaste (Barrau *et al.* 1976). L'hémoglobine y est transformée en un pigment vert, l'utéroverdine, qui vaut à cette région du placenta l'appellation de « bordure verte » ou « bande des hématomes marginaux » (Figure 42).

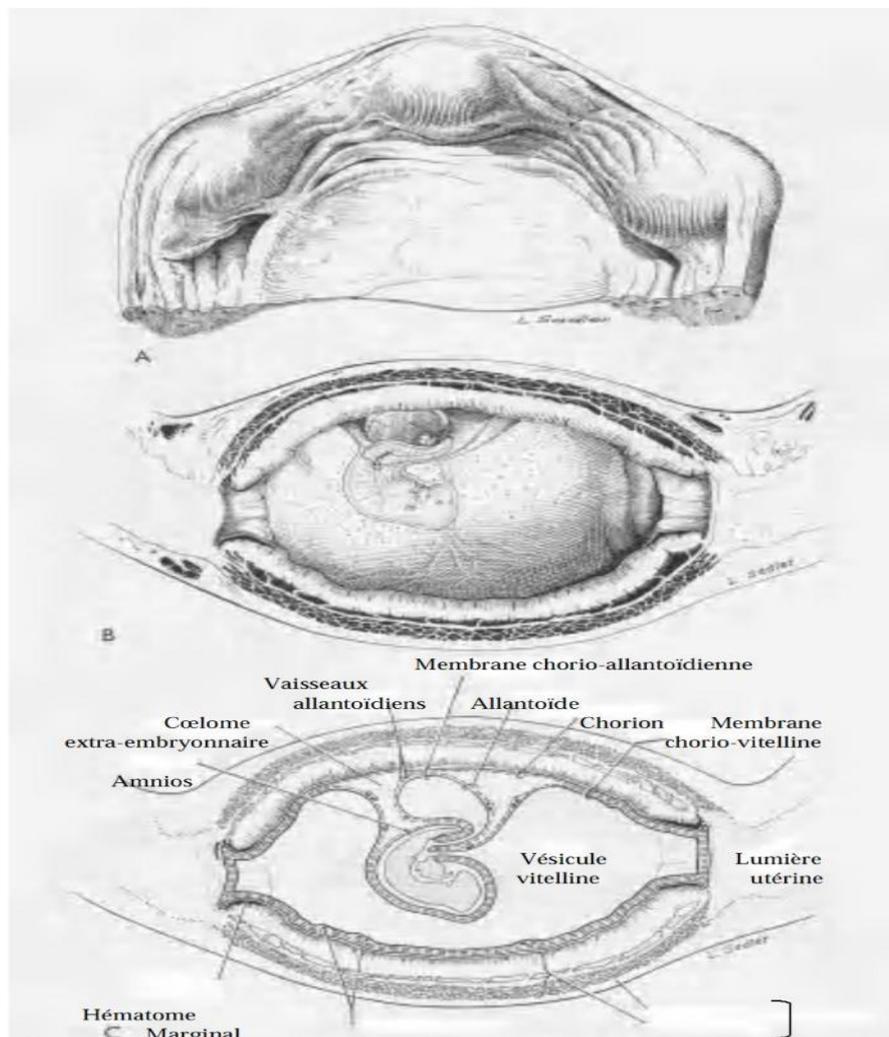


Figure 34 : Utérus et l'embryon à J23-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J15-DS (Concannon *et al.* 1989).

A - Vue externe

B -Section longitudinale sur un embryon de 32 somites.

C -Section schématique, avec la description des différentes membranes et du placenta.

f. Cordon ombilical

Il se délimite à partir de J23-LH, lorsque la cavité amniotique est formée. Il se scinde en une partie amniotique courte de 2 cm de long (Barone, 1978) soit J15-DS (Concannon *et al.* 1989), sur laquelle il est recouvert par l'amnios, et une partie allantoïdienne plus étendue, du hile de l'amnios jusqu'au placenta 10 cm de long à terme (Barone, 1978).

Au début du développement, sa structure est assez lâche : l'anneau ombilical reste largement ouvert, la future cavité péritonéale de l'embryon se continue au-delà de l'ombilic dans le cordon, une anse intestinale s'y trouve engagée, au sommet de laquelle est inséré le conduit vitellin.

Vers J30-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J22-LH (Concannon *et al.* 1989), l'anneau ombilical de l'embryon se resserre, l'intestin est refoulé dans la cavité abdominale de l'embryon, et le conjonctif du cordon devient plus dense. Le conduit vitellin accompagne les artères et les veines vitellines qui s'oblitérent rapidement, tout comme le conduit allantoïdien. Les vaisseaux ombilicaux restent les constituants les plus importants du cordon. Ils ont une disposition spiralée qui semble les protéger des étirements.

Les artères ombilicales naissent de l'aorte et deviennent collatérales des artères iliaques internes du fœtus. Elles longent la vessie fœtale et l'ouraqué, parcourent le cordon pour gagner le chorion villositaire, qu'elles irriguent largement (Evans & Christensen, 1979).

La veine ombilicale gauche persiste tandis que la droite s'oblitére. Ses deux racines drainent les veines placentaires, qui sont plus nombreuses et volumineuses que les artères correspondantes (Evans & Christensen, 1979). Elles s'unissent dans le cordon, où la veine ombilicale prend une disposition médiane. Après avoir franchi l'ombilic, elle se dirige crânialement, pénètre dans le foie et se divise en deux branches:

L'une alimente le réseau veineux hépatique et reçoit la veine porte.

L'autre évite le foie et gagne directement la veine cave caudale. C'est le canal d'Arantius

3.2.2.2 Développement de l'embryon

a. Délimitation de l'embryon

Le bourgeon embryonnaire garde une forme elliptique plane jusqu'au stade de la ligne primitive J18-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J10-DS (Concannon *et al.* 1989). Il se modèle ensuite par l'incurvation de ses bords qui le soulèvent et l'isolent de ses annexes. La région céphalique s'enroule la première et prend d'emblée un volume important du fait du développement précoce de l'ébauche de l'encéphale.

Le pli céphalique est rapidement suivi du repliement ventral des régions caudales et latérales. L'embryon s'individualise en se soulevant dans la cavité amniotique, et l'anneau ombilical, encore largement ouvert, se dessine (Evans & Christensen, 1979).

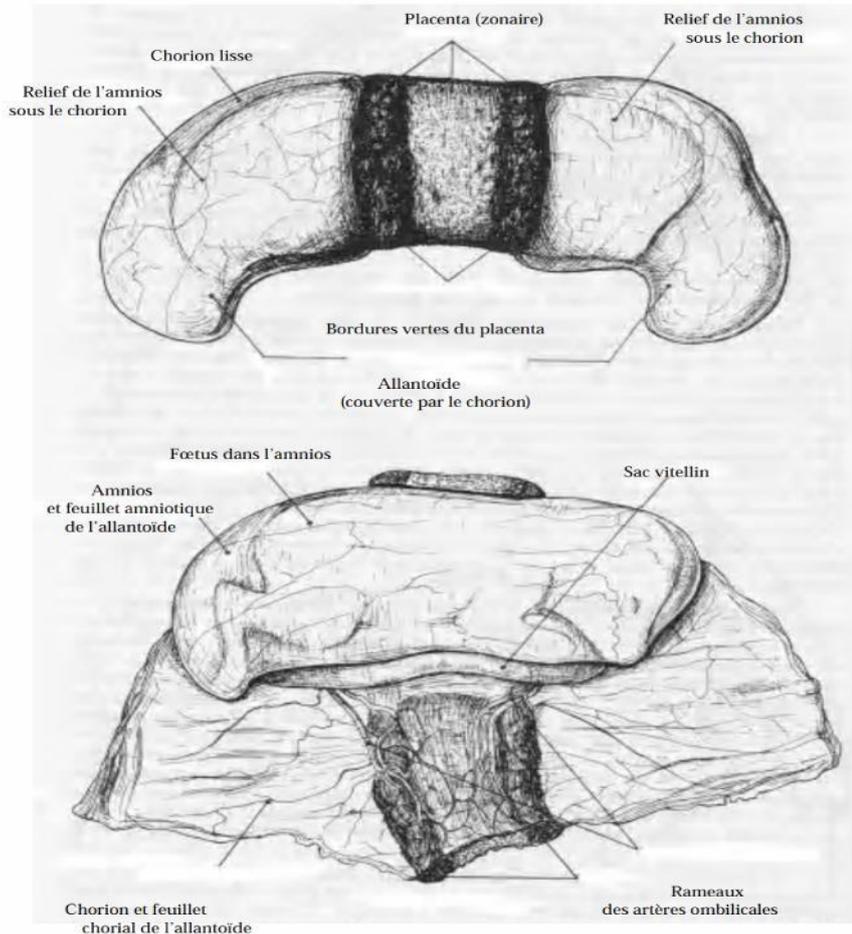


Figure 35: Annexes fœtales à la fin du développement du chiot. (Barone, 1978).

b. Etapes du développement embryonnaire

Les feuillets germinatifs se différencient suivant une séquence crânio-caudale (Houillon, 1968) L'ectoderme est à l'origine de l'épiderme, du système nerveux avec un développement précoce des vésicules encéphaliques, il participe aussi à la formation des arcs branchiaux, des bourgeons dentaires, des bourgeons des membres.

L'endoderme est destiné à produire l'épithélium de tout le tube digestif et de ses glandes annexes, et l'épithélium de l'appareil respiratoire, la vessie urinaire, en association avec le mésoderme qui assure notamment la fixation des différents organes.

Le mésoderme engendre l'appareil circulatoire (l'ébauche cardiaque est très vite fonctionnelle), les tissus conjonctifs (dont l'os) et musculaires. La partie glandulaire de l'appareil uro-génital est également d'origine mésodermique.

Evans & Christensen (1979) et Concannon *et al.* (1989) décrivent-les séquences du développement embryonnaire comme suit:

A J21-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J13-DS (Concannon *et al.* 1989), le pli céphalique est fortement marqué, et s'enroule autour du bulbe cardiaque proéminent. Les arcs branchiaux 1, 2 sont présents.

A J23-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J15-DS (Concannon *et al.* 1989) : L'embryon est allongé perpendiculairement au grand axe de l'ampoule. Son extrémité crâniale s'incurve momentanément vers la droite.

L'organogenèse est déjà bien avancée, on peut distinguer les ébauches des membres thoraciques, les processus mandibulaires et maxillaires, les arcs branchiaux 1, 2,3, le bulbe hépatique bien marqué, les placodes optiques et cristalliniennes (figure 36).

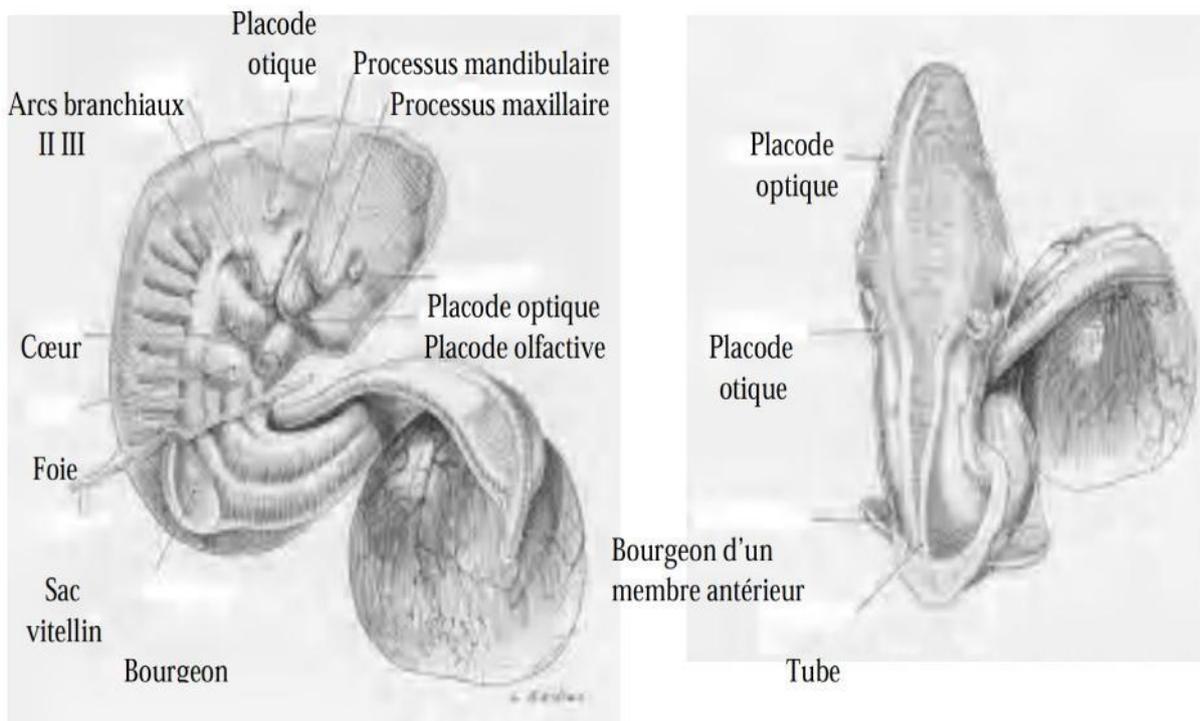


Figure 36: Embryon à J23-LH (Evans & Christensen, 1979).

Soit J15-DS (Concannon *et al.* 1989). Présence des bourgeons des membres antérieurs et de l'allantoïde en développement (Evans & Christensen, 1979). A – Vu latérale. B- Vue dorsale.

A J25-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J17-DS (Concannon *et al.* 1989) : On observe sur l'embryon de 14 mm environ, les conduits auditifs, les yeux formés, les bourgeons des 4 membres qui ont l'aspect de palettes indifférenciées, les crêtes mammaires, la lame dentaire, les éléments vertébraux chondrifiés.

A J28-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J20-DS (Concannon *et al.* 1989) : Les maquettes cartilagineuses des os frontaux, mandibulaires et maxillaires commencent à s'ossifier.

A J30-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J22-DS (Concannon *et al.* 1989): Sur l'embryon de 19 mm de long les paupières et les oreilles externes sont formées, ainsi que les poils tactiles sur le museau et les sourcils. Les membres thoraciques se sont différenciés et les doigts sont distincts. Le tubercule génital est proéminent.

A J33-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J25-DS (Concannon *et al.* 1989): L'embryon mesure 29 mm de long La minéralisation osseuse se poursuit en de nombreux points: les os nasaux, incisifs, palatins, zygomatiques, pariétaux, la portion médiane des côtes 4 à 10, la diaphyse des os longs, humérus, radius, ulna et fémur, tibia, fibula. Les lames palatines fusionnent. Les doigts sont visibles sur les membres postérieurs. L'embryon a acquis les caractères externes de son espèce, la période embryonnaire se termine.

3.2.3 Période fœtale

Evans & Christensen (1979) décrivent les séquences du développement du fœtus en se référant essentiellement à l'évolution du squelette et de la dentition, que nous aborderons ici.

3.2.3.1 Dentition

La lame dentaire est initiée dès J25-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J17-DS (Concannon *et al.* 1989) sur l'embryon de 12-16 mm de long elle produit les bourgeons dentaires qui sont presque tous présents à J32-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J24-DS (Concannon *et al.* 1989).

Evans & Christensen (1979) observent un développement plus avancé des Canines, P.M.3 Inf. et P.M.4 Inf. par rapport aux autres dents.

La calcification des dents de lait débute vers J42-DS (Williams & Evans, 1978) (56) pour P.M.3 Inf. et P.M.4 Inf. Elle a lieu ensuite vers J45-DS sur les Canines et sur P.M.3 Sup., puis entre J45-DS et J48-DS sur les incisives supérieures. Les Incisives inférieures se minéralisent juste après J51-DS) avec P.M.2 Sup., P.M.2 Inf. et P.M.4 Sup. (Williams & Evans, 1978).

3.2.3.2 Ossification

a. L'ossification enchondrale

La majeure partie du squelette se construit à partir d'une maquette cartilagineuse, élaborée par le mésoderme embryonnaire. Cette maquette prend la forme de l'os futur dont elle occupe exactement la place. (Barone, 1978).

Progressivement, le tissu cartilagineux est remplacé par le tissu osseux qui se minéralise et donne à l'os son efficacité fonctionnelle. Ce processus d'ossification enchondrale débute dans la région centrale de la maquette cartilagineuse, dans le noyau d'ossification primaire, et évolue de manière centrifuge à partir de ce centre. Souvent, ce noyau primaire ne suffit pas à former la totalité de l'os. Il est alors complété par l'apparition de noyaux d'ossification secondaires, qui entrent en fonction plus tardivement (après la naissance), s'étendent moins et finissent par se souder à lui (Barone, 1978).

Par exemple, un os long sera élaboré à partir de :

- un noyau d'ossification primaire diaphysaire, qui élabore la diaphyse osseuse du centre de la maquette cartilagineuse vers ses extrémités. (Barone, 1978).
- un ou plusieurs centres d'ossifications secondaires épiphysaires, qui ont une croissance radiaire à partir du centre de leur espace d'ossification. (Barone, 1978).
- des cartilages de conjugaisons, zone cartilagineuses qui séparent les centres d'ossification, régulent la croissance osseuse, et ne s'ossifient qu'à la fin de celle-ci. (Barone, 1978).

b. Ossification membraneuse

Certains os sont construits à partir d'une maquette fibreuse et non plus cartilagineuse. Evans & Christensen (1979) notent une ossification plus précoce de ces os membraneux sur la face (os nasal, incisif, palatin, zygomatique, maxillaire, mandibulaire...), et le crâne (os frontal, pariétal, interpariétal). La minéralisation peut être mise en valeur par une coloration différentielle du squelette du fœtus. Le rouge alizine colore les tissus ossifiés et le bleu alican colore le cartilage embryonnaire. Après coloration des fœtus prélevés, Evans & Christensen (1979) observent que l'évolution de l'ossification est assez homogène au sein d'une même portée, alors que des différences notables en taille et en poids sont observées (figure 37).

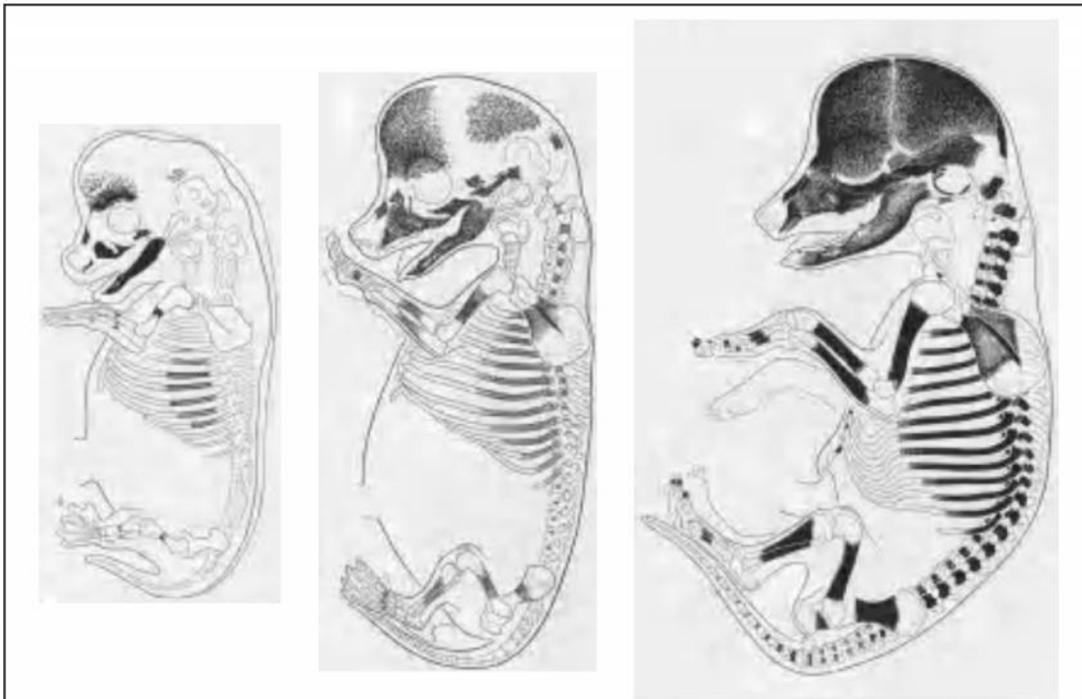


Figure 37 : Evolution de l'ossification sur une vue latérale du squelette (Evans & Christensen, 1979).

A - Embryon à J30-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J22-DS (Concannon *et al.* 1989).

B – Fœtus à J40-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J32-DS (Concannon *et al.* 1989).

C - Fœtus à J45-LH (Evans & Christensen, 1979). Soit J37-DS (Concannon *et al.* 1989)

c. Crâne

L'ossification débute symétriquement à J28-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J20-DS (Concannon *et al.* 1989), sur la face par l'os maxillaire et mandibulaire et sur le crâne par l'os frontal.

A J32-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J24-DS (Concannon *et al.* 1989), les os incisif, palatin, zygomatique et pariétaux se minéralisent à leur tour.

A J40-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J32-DS (Concannon *et al.* 1989). Les mâchoires et les arcades zygomatiques sont bien ossifiées.

A J45-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J37-DS (Concannon *et al.* 1989), la fontanelle entre les frontaux et les pariétaux est relativement étroite, elle se soudera avant la naissance.

L'os interpariétal fait une brève apparition, c'est une petite lame osseuse superficielle située entre les pariétaux et l'os supra occipital; il fusionne avec ce dernier vers J45-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J37-DS (Concannon *et al.* 1989), mais peut parfois conserver son individualité chez l'adulte.

d. Vertèbres

À J25-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J17-DS (Concannon *et al.* 1989), le rachis est déjà constitué d'éléments cartilagineux qui ont la morphologie des vertèbres.

Leur minéralisation commence à J38-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J30-DS (Concannon *et al.* 1989), Chaque vertèbre possède trois noyaux d'ossification, un sur le corps vertébral et un sur chaque arc vertébral.

A J43-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J35-DS (Concannon *et al.* 1989), les centres de toutes les vertèbres sont actives, excepté les vertèbres caudales et les arcs vertébraux du sacrum qui s'ossifient plus tard. (Evans & Christensen, 1979).

e. Sternum

Il se modèle à partir de deux barres mésodermiques qui fusionnent dans le plan médian vers J25-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J17-DS (Concannon *et al.* 1989), toujours suivant une séquence crânio-caudale. Chaque sternum possède un seul noyau d'ossification. La minéralisation commence à partir de J40-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J32-DS (Concannon *et al.* 1989), avec de grandes variations dans la séquence d'ossification d'un fœtus à l'autre, au sein d'une même

portée (Evans & Christensen , 1979), La première sternèbre peut ne pas se calcifier, Les 7ème et 8ème possèdent souvent deux points d'ossification excentrés, du fait d'un défaut de leur soudure (figure 38).

Enfin, l'appendice xiphoïde qui représente la 8ème sternèbre est l'élément le plus variable quant à sa morphologie : il peut être ovoïde, présenter une fissure, un foramen, une fourche suivant la manière dont les barres sternales ont fusionné (Evans & Christensen, 1979).

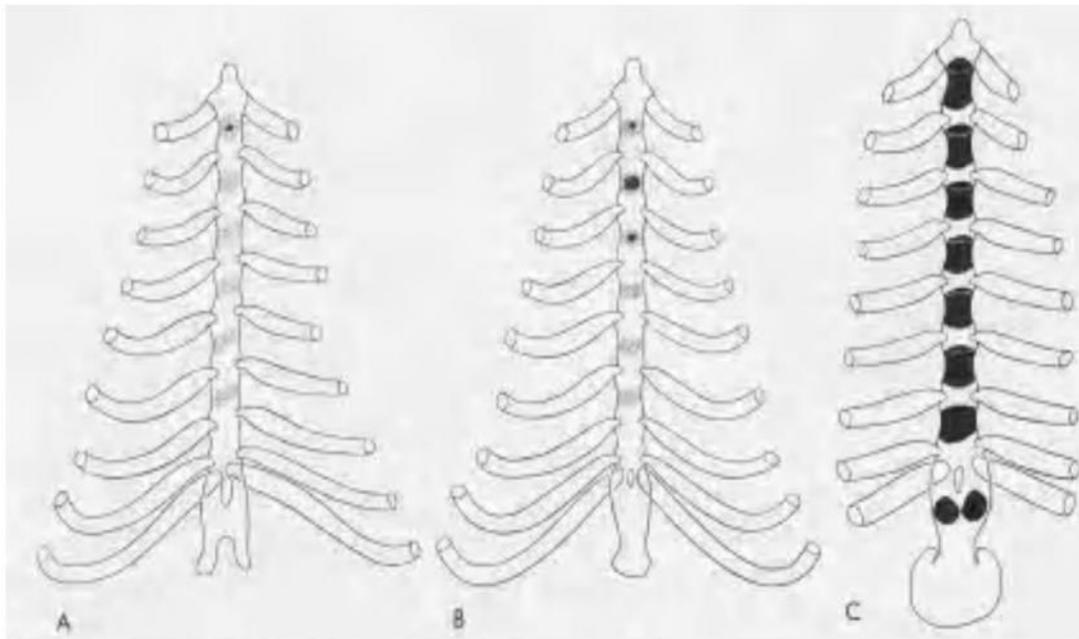


Figure 38: Ossification des sternèbres (Evans & Christensen, 1979).

A et B- début de l'ossification enchondrale.

C- Stade plus avancé de la minéralisation, ossification originale du xiphisternum, due à un défaut de fusion des deux dernières hémis sternèbres.

f.Cotes

La minéralisation commence à J31-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J23-DS (Concannon *et al.* 1989), à partir d'un noyau d'ossification situé en région médiane de la côte. Vers J40-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J32-DS (Concannon *et al.* 1989), la portion dorsale de toutes les côtes est ossifiée (Evans & Christensen, 1979).

g.Membres

La maquette cartilagineuse des membres thoraciques et pelviens est complète respectivement à J30-LH et J35-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J22-DS et J27-DS, (Concannon *et al.* 1989) et se minéralise dès J35-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J27-DS (Concannon *et al.* 1989).

A J35-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J27-DS (Concannon *et al.* 1989), les trois centres d'ossification de chaque scapula et les noyaux diaphysaires des os longs sont actifs. Les os longs ne développent pas de centre épiphysaire avant la naissance (figure 39).

Les noyaux d'ossification de la ceinture pelvienne sont observés à J40-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J32-DS (Concannon *et al.* 1989) sur l'ilium, à J45- LH (Evans & Christensen, 1979) soit J37-DS (Concannon *et al.* 1989) sur les ischions, et peu avant la naissance sur le pubis. Les os du carpe et du tarse (excepté le talus et le calcaneus) ne s'ossifient pas avant la naissance (Evans & Christensen, 1979).

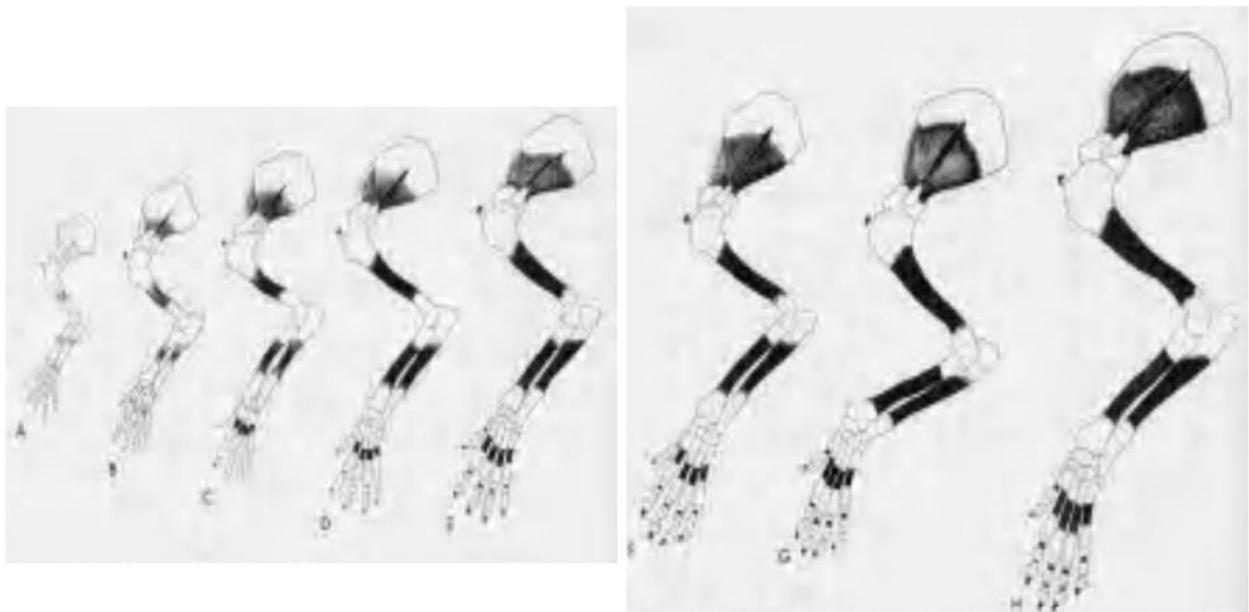


Figure 39 : Ossification progressive du membre thoracique et de l'épaule
(Evans & Christensen, 1979).

3.2.3.3 Calendrier de la période fœtale

Evans & Christensen (1979) décrivent les séquences du développement fœtal: A J35-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J27-DS (Concannon *et al.* 1989): Les ampoules utérines mesurent 43 x 74 mm, la largeur du placenta est égale à la longueur du fœtus, environ 35 mm. Les paupières ferment les yeux; la détermination externe du sexe est possible; les barres sternales ont fusionné; l'os temporal s'ossifie ainsi que la scapula et la partie moyenne des côtes 2 à 13. A J37-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J29-DS (Concannon *et al.* 1989): Fœtus = 47 mm. Ossification de la première côte, des arcs neuraux de C1 à C4 et du centre de l'ilium.

A J38-LH (Evans & Christensen ,1979) soit J30-DS (Concannon *et al.* 1989) : Foetus = 53 mm. Ossification du crâne, des centres vertébraux de C2 à L6, des arcs vertébraux de C1 à T8, des métacarpes.

A J39-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J31-DS (Concannon *et al.* 1989): Foetus = 60 mm. Ossification des centres et des arcs vertébraux jusque Si et des phalanges distales des doigts 1, 2 des antérieurs et des doigts 2 des postérieurs.

A J40-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J32-DS (Concannon *et al.* 1989) : Les ampoules utérines mesurent 54 x 81 mm, la largeur du placenta est encore semblable à la longueur du foetus, 65 mm. Les paupières sont soudées, la hernie ombilicale est résorbée, les doigts sont pourvus d'ongles.

A J42-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J34-DS (Concannon *et al.* 1989): Foetus =70 mm. Ossification de la dent de l'axis, des centres des vertèbres caudales, des sternèbres 1 à 5, des phalanges distales 1 à 5 et proximales 3 et 4 de tous les doigts.

A J43-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J35-DS (Concannon *et al.* 1989): Foetus = 76 mm. Ossification des dernières vertèbres caudales, des sternèbres 1 à 7, des phalanges proximales 1 à 5 des antérieurs, 2 à 5 des postérieurs.

A J45-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J37-DS (concannon *et al.* 1989) : L'utérus se plie et perd progressivement sa forme en chapelet, le foetus est nettement plus long que le placenta il mesure Foetus = 86 mm.

L'os interpariétal se minéralise indépendamment puis fusionne avec le supra occipital. Ossification des centres vertébraux de C1 jusque C17 et de leurs arcs de C1 à S3, des phalanges moyennes et des ischions.

A J50-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J42-DS (Concannon *et al.* 1989): A l'inspection de l'utérus qui s'est fortement élargi, les ampoules ne peuvent plus être discernées; les foetus adjacents sont en contact. Foetus = 107 mm. Le corps est bien proportionné ; les métacarpes, les phalanges des membres thoraciques et toutes les sternèbre sont ossifiés.

A J57-LH (Evans & Christensen, 1979) soit J49-DS (Concannon *et al.* 1989): Foetus = 150 mm. Ossification du talus et des ailes du sacrum.

Pour obtenir ces séquences du développement embryonnaire et fœtal des chiots, Evans & Christensen (1979) ont pratiqué l'exérèse chirurgicale de fœtus, à des stades déterminés de la gestation, tout en permettant le développement normal du reste de la portée.

Des techniques d'investigations non invasives et faciles à mettre en œuvre, nous permettent actuellement de suivre le déroulement de la gravidité et d'évaluer l'âge des petits en nous référant au calendrier gestationnel décrit par Evans & Christensen (1979). L'échographie tient une place de choix dans ces techniques. Exemple d'un calendrier de gestation selon Concannon (2000) (tableau 6).

Tableau 6 : Déroulement des différents évènements d'une gestation chez la chienne

(Concannon , 2000).

Jours de LH	Evénements et évolution des paramètres cliniques	Jours ovulation
0	Décharge ovulante de LH	-2
2	Ovulation 38 à 58 heures après le pic de LH	0
5	Maturation ovocytaire dans l'oviducte distal Si saillie :Fécondation	3
6	Si saillie : embryon à 1-2 cellules Sinon : ovocytes matures toujours fécondables	4
7	Si saillie : embryon à 2 cellules Sinon :Début de dégénérescence ovocytaire	5
8	Si saillie : embryon à 4 cellules Sinon :saillie tardive donnant de petite portées	6
9	Si saillie : embryon à 4-8 cellules Sinon : saillie rarement fécondante	7
10	Embryon à 8-16 cellules dans l'oviducte	8
11	Embryon à 16-32 cellules (Morula)	9
12	Entré de la Morula entourée de sa zone pellucide dans la corne utérine	10
16	Croissance des embryons et amincissement des la zone pellucide	14
17	Arrêt de la migration	15
18	Vésicules>1mm de diamètre décelables à l'échographie	16
20	La zone pellucide a disparue	18
22	Dilatation utérine visible à l'échographie L'embryon est attaché à l'endomètre, l'invasion par le trophoblaste débute	20
23	Embryon bien visible à l'échographie	21
24	Cornes utérines d'environ 1 cm de diamètre palpables	22
25	Battements cardiaques bien détectables à l'échographie	23
28	Placenta zonaire visible à l'échographie, Relaxine bien détectable	26
30	Cornes utérines de 3 cm de diamètre bien palpable	28
34	Mise en évidence d'une anémie maternelle	32
36	Bourgeons des membres visibles à l'échographie	34
42	L'embryon commence à être plus long que le placenta	40
46	Première détection radiographique : carné et colonnes vertébrales	44
58	Bassin, membres et possiblement les dents détectables à la radiographie	56
60	Dents visibles à la radiographie / progestéronémie > 3 ng/ml	58
62	Déclin de la progestéronémie / la chienne commence à faire son nid	60
63	Parturition précoce / gestation courte (intervalle normal)	61
64	parturition précoce / gestation normale P4< 2ng/ml 12 à 24 heures avant la mise bas	62
65	Date moyenne de parturition	63
66	Mise bas tardive(intervalle normal)	64

3.3 Modifications physiologiques de la chienne gestante

Un certain nombre de modifications physiologiques surviennent chez la chienne gestante, il ne faut pas les confondre avec un état pathologique: (Dumon & Fontbonne , 1992) .

3.3.1 Modification hématologiques

Une anémie normocytaire et normochrome survient progressivement 7 à 9 semaines après les chaleurs et est plus marquée chez les chiennes gestantes. Elle devient maximale près du terme et dure encore 8 à 12 semaines après la mise bas. Elle se traduit par une baisse de l'hémoglobine qui peut aller jusqu'à 20-40% et par une baisse de l'hématocrite qui peut aller jusqu'à 29-35%. Cette anémie de gestation est en partie due à l'hémodilution provoquée par l'augmentation du volume plasmatique (Dumon & Fontbonne , 1992). Une leucocytose modérée est présente (jusqu'à 17000 globules blancs/mm³).

3.3.2 Modifications biochimiques

Augmentation du cholestérol sanguin 3 à 8 semaines après l'œstrus que la chienne soit gestante ou non. Augmentation des protéines totales (PT) 3 à 8 semaines après l'œstrus que la chienne soit gestante ou non.

Diminution de la calcémie 50 jours après l'ovulation. Cette hypocalcémie ne doit pas être compensée par des suppléments calciques car cela provoque une mise au repos des mécanismes compensateurs de la calcémie avec un risque élevé pour la chienne de présenter une éclampsie (hypocalcémie + convulsions) à la mise bas, moment où la lactation débute (Dumon & Fontbonne , 1992) .

3.3.3 Modifications cardio-vasculaires

Augmentation de la volémie

Augmentation du débit cardiaque de 40% pour compenser la volémie et la pression de perfusion placentaire. Augmentation de la fréquence respiratoire pour couvrir les besoins métaboliques du fœtus, la consommation d'oxygène augmente de 20% (Dumon & Fontbonne , 1992).

3.3.4 Modifications hormonales

Augmentation de la résistance à l'insuline en metœstrus, encore plus marqué quand la chienne est gestante. Celle-ci résulte des hauts taux circulants de progestérone durant cette période et peut favoriser l'apparition d'un état pré-diabétique (Dumon & Fontbonne , 1992).

3.3.5 Modification comportementales

La chienne peut devenir « collante » ou distante.

Une diminution de la prise alimentaire peut être observée vers trois semaines de gestation puis à partir de la 5^{ème} semaine les besoins énergétiques sont multipliés par 1,2 à 1,7, en fonction de la taille de la portée, il faut alors augmenter progressivement les apports journaliers de 15 à 60%.

Une semaine avant la mise bas, la chienne « gratte le sol » avec ses antérieurs, ceci est en rapport avec la reprise de l'activité contractile de l'utérus (Dumon & Fontbonne , 1992).

3.3.6 Modification physiques

Une augmentation du poids corporel de 20 à 55% (en moyenne 35%) s'observe surtout vers le deuxième mois (Dumon & Fontbonne , 1992).

POINTS IMPORTANTS

- Nidation tardive
- Placenta endothélio-chorial
- Durée de la gestation: 63 jours après l'ovulation
- Pas de relais de sécrétion de progestérone placentaire chez la chienne gestante
- Nombreuses modifications physiologiques chez la chienne gestante.

3.4 Diagnostic et suivi de la gestation

Il n'y a pas de signes cliniques précoces de gestation. Aucun diagnostic clinique n'est possible avant 19 à 21 jours après la fécondation. Certains examens permettent un diagnostic précis de la gestation, d'autres servent seulement d'indices (figure 47) Il existe trois méthodes de diagnostic assez précoces : la palpation, l'échographie et le dosage de la relaxine, et une méthode plus tardive: la radiographie.

3.4.1 Signes physiques liés à la gestation

a. Modifications comportementales

La chienne peut devenir « collante » ou distante.

Une diminution de la prise alimentaire peut être observée vers trois semaines de gestation ; puis à partir de la 5^{ème} semaine les besoins énergétiques sont multipliés par 1,2 à 1,7, en fonction de la taille de la portée, il faut alors augmenter progressivement les apports journaliers de 15 à 60%.

Une semaine avant la mise bas, la chienne « gratte le sol » avec ses antérieurs, ceci est en rapport avec la reprise de l'activité contractile de l'utérus (Fontbonne, 2003).

On peut observer chez les chiennes gestantes une augmentation de l'appétit qui correspond à l'anabolisme gravidique, avec dans certains cas, une modification des goûts alimentaires (Tainturier & Alain, 2005).

Durant la seconde moitié de la gestation, on note parfois un degré variable de pollakiurie. Enfin, plus tardivement, au début du stade contemporain des prodromes du part, la femelle a tendance à s'isoler dans un lieu écarté pour y mettre bas dans la tranquillité .Le caractère de l'animal peut changer, la femelle devenant plus calme, ou plus craintive, cherchant la solitude. (Tainturier & Alain, 2005).

Une anorexie ou une hyporexie transitoire de quelques jours peut être constatée vers le 28^{ème} jour. (Concannon & Verstegen 2004).Ce signe peut être favorable mais n'est pas présent chez toutes les chiennes (Fontbonne, 2003). Une augmentation moyenne de 40% de la prise alimentaire peut être observée après 5 semaines (Fontbonne, 2003 ; Concannon, 2005).

b. Changements d'aspect de la femelle

- Prise de poids :

La prise de poids varie de 20 à 55% (13) avec une moyenne de 35% (Fontbonne, 2003).

Outre la stimulation de l'appétit, l'anabolisme gravidique se traduit par une augmentation, souvent sensible, des dépôts adipeux sous cutanés dans la région abdominale, celle-ci semblant bien visible chez les primipares (Yves Piedvache & Luky, 2006).

Cette adipose, associée à l'élévation de la masse utérine, engendrera une augmentation de poids corporel. Celui-ci est toutefois assez tardif, ne devenant perceptible qu'à partir de la cinquième semaine, sa rapidité étant par ailleurs fonction du nombre de fœtus portés par la mère. On peut citer des variations pondérales de 1 kg pour une chienne de 4,5 kg environ, voire 7 kg pour une chienne pesant 27 kg (Tainturier & Alain, 2005).

La silhouette abdominale s'arrondit du fait de la distension de cette région. Ces modifications sont manifestes lorsque la chienne est examinée debout de trois-quarts avant, de trois-quarts arrière et de profil. On peut ainsi apprécier les rapports respectifs des diamètres thoracique et abdominal (Tainturier & Alain, 2005).

L'augmentation du volume de l'abdomen (tout comme l'augmentation du poids corporel) est manifeste à partir de la cinquième semaine de gestation. Mais chez les chiennes de grand format, les femelles déjà grasses et celles qui portent juste un ou deux petits, l'appréciation de ces transformations est beaucoup plus délicate (Royal *et al.* 1979).

Les glandes mammaires subissent des modifications caractéristiques, surtout appréciables chez les primipares. Au J35-LH soit J27-DS jour de la gestation, on peut observer sur une peau dépigmentée, l'apparition d'une coloration rose claire au niveau des mamelons en saillie qui s'allongent et deviennent turgescents (Tainturier & Alain, 2005).

Ultérieurement, vers le J45-LH soit J37-DS jour la longueur des tétines s'est encore accrue, et une coloration peut apparaître sur tout ou partie des mamelons (Tainturier & Alain, 2005).

Aux alentours du 50ème jour, l'hypertrophie des mamelles est devenue très nette et s'accroît graduellement jusqu'au terme. Deux ou trois jours avant la mise bas, une sécrétion aqueuse peut sourdre des tétines (Royal *et al.* 1979).

Chez les multipares, ces transformations ne sont plus observées, l'hypertrophie mammaire débute environ une semaine avant le terme, et du lait peut être recueilli par pression des tétines dans les jours qui précèdent la mise bas (Royal *et al.* 1979).

Les autres modifications de l'habitus concernent une intensification de la ventilation pulmonaire. La fréquence des mouvements respiratoires, qui est normalement de l'ordre de 16 à 18 pour une chienne adulte, s'accélère sensiblement (Tainturier & Alain, 2005).

Ces signes physiologiques accompagnent la gestation, mais ils se révèlent à eux seuls, très insuffisants pour permettre un diagnostic de gestation. Ils ne permettent qu'une simple présomption relativement tardive, de l'état gravidique (Tainturier & Alain, 2005). Un certain nombre de modifications physiologiques surviennent chez la chienne gestante, il ne faut pas les confondre avec un état pathologique:

- Modifications cardio –vasculaire :

Augmentation du débit cardiaque de 40% pour compenser la volémie et la pression de perfusion placentaire (Dumon & Fontbonne, 1992). Augmentation de la fréquence respiratoire pour couvrir les besoins métaboliques du fœtus, la consommation d'oxygène augmente de 20%. (Fontbonne, 2003).

3.4.2 Témoins biologiques de la gestation

La chienne présente une anémie normocytaire normochromique physiologique principalement en raison de l'augmentation du volume plasmatique. Cela facilite la circulation sanguine dans les vaisseaux place taux (Concannon, 2005).

L'hématocrite commence à chuter à partir du 25^{ième} jour après le pic de LH, il est inférieur à 40% en fin de gestation et peut atteindre une valeur de 31% au terme. L'hématocrite redevient normal dans un intervalle de 1,5 à 3 mois après la mise bas (Concannon, 2005). Une thrombocytopenie peut être associée à cette anémie physiologique. (Concannon, 2005).

a. Paramètres biochimiques

Une anémie normocytaire et normochrome survient progressivement 7 à 9 semaines après les chaleurs et est plus marquée chez les chiennes gestantes. Elle devient maximale près du terme et dure encore 8 à 12 semaines après la mise bas. Elle se traduit par une baisse de

l'hémoglobine qui peut aller jusqu'à 20-40% et par une baisse de l'hématocrite qui peut aller jusqu'à 29-35%. Cette anémie de gestation est en partie due à l'hémodilution provoquée par l'augmentation du volume plasmatique. (Concannon, 2005).

Une leucocytose modérée est présente (jusqu'à 17000 globules blancs/mm³). (Concannon, 2005).

Augmentation du cholestérol sanguin 3 à 8 semaines après l'œstrus que la chienne soit gestante ou non.

Augmentation des protéines totales (PT) 3 à 8 semaines après l'œstrus que la chienne soit gestante ou non. (Concannon, 2005).

Diminution de la calcémie 50 jours après l'ovulation. Cette hypocalcémie ne doit pas être compensée par des suppléments calciques car cela provoque une mise au repos des mécanismes compensateurs de la calcémie avec un risque élevé pour la chienne de présenter une éclampsie (hypocalcémie + convulsions) à la mise bas, moment où la lactation débute. (Concannon, 2005).

Des électrophorèses sur le plasma sanguin de chiennes gestantes révèlent des variations qui peuvent être résumées comme suit (Royal *et al.* 1979). Une diminution de l'albumine, un accroissement des globulines, exceptionnellement une augmentation de globuline, et jamais d'élévation du taux des globulines.

Ces estimations deviennent utilisables à partir de J40-LH soit J32-DS (Concannon *et al.* 1989) de la gestation.

Par ailleurs, il faut signaler qu'au cours de certaines affections utérines telles que les métrites, la métrorragie ou les pyromètres, une augmentation régulière des Alpha 2 et des Gamma globulines pourra être remarquée (Royal *et al.* 1979).

La chute du nombre des hématies, consécutive à l'œstrus est d'environ 17 %. Elle atteint 33 % lors de fécondation (Royal *et al.* 1979). Cette réduction des globules rouges serait décelable dès la 3^{ème} semaine de gestation (Royal *et al.* 1979).

Le taux d'hémoglobine subit une baisse proportionnelle à celle du nombre des érythrocytes. Parallèlement, on assiste à l'apparition d'une leucocytose assez importante. Elle devient nette à partir de la 4^{ème} semaine (Royal *et al.* 1979).

La chienne peut présenter une hypo albuminémie (Concannon, 2005).

La concentration des protéines totales peut également être diminuée, ce qui provoque une baisse de la pression oncotique. Le calcium peut être diminué. (Concannon, 2005).

De nombreuses protéines de l'inflammation tels que la protéine C-réactive, l'haptoglobine, l'acide glycoprotéique, la céruloplasmine et le fibrinogène ont un taux qui augmente dès le début de la placentation. Cela est dû à la réaction inflammatoire qui survient au niveau de l'endomètre lorsque celui-ci est érodé par le trophoblaste (Romagnoli,2006) .

Le fibrinogène est produit par le foie, son taux normal varie entre 100 et 150 mg/dl. Chez la chienne gestante, le taux monte à des valeurs se situant entre 250 et 300 mg/dl autour du 25-28^{ième} jour après l'ovulation. Une valeur de 300 mg/dl au 28^{ième} jour est considérée comme apportant 100% de précision dans un diagnostic de gestation (Romagnoli,2006).

L'haptoglobine et la céruloplasmine sont liées respectivement au fer et à l'hémoglobine. Le taux normal en haptoglobine est de 35-50 mg/dl, chez la femelle gestante il est de 75-100 mg/dl vers le 18-20^{ième} jour après l'ovulation (Romagnoli, 2006).

Chez une femelle en bonne santé, l'augmentation des concentrations des facteurs de l'inflammation est un indicateur indirect de l'implantation et peut être utilisé en pratique dans le diagnostic de gestation. Bien sûr, il est nécessaire de faire un bilan sanguin avant la mise à la reproduction pour connaître les valeurs de départ (Romagnoli, 2006) .

b. Dosages hormonaux

- ***Relaxine***

le dosage de la relaxine à l'aide des kits de dosage Reprocheck © ELISA (dosage quantitatif) ou Witness Relaxin © (immuno-migration qualitative) (Synbiotics), est une méthode fiable et précise. Le test ELISA peut être positif à partir de 20-23 jours et le test WITNESS à partir de 26-30 jours (Concannon & Verstegen, 2004). En effet, le placenta débute la sécrétion de l'hormone entre le 24^{ième} et le 28^{ième} jour suivant la décharge ovulante, jusqu'au part. Son taux atteint un maximum de 4 à 6 ng/ml, 2 à 3 semaines avant la mise bas, et reste élevé jusqu'au part (Romagnoli, 2006) .La concentration de cette hormone peut varier suivant les races, ainsi une chienne Labrador aura un taux plus élevé que celui d'une chienne Beagle. L'intensité du signal est également

dépendante de la taille de la portée. Ce dernier est important plus le signal sera élevé. Selon Concannon (2005), le test est plus fiable et donne moins de faux négatifs après le 30^{ième} jour. Selon Fontbonne (2003), la fiabilité est optimale après 25 jours. Si le résultat du test est négatif il faut le refaire une semaine plus tard.

- ***Prolactine***

Le taux de cette hormone augmente à partir du 25^{ième} jour après le pic de LH selon Romagnoli (2006) et à partir du 30^{ième} jour selon Concannon & verstegen (2004), jusqu'à la lactation. Chez la femelle non gestante son taux est faible (< 2ng/ml) lors de la deuxième moitié du diœstrus alors que chez la chienne gestante sa concentration augmente lors de la dernière semaine de gestation à une valeur d'environ 40 ng/ml puis à environ 100 ng/ml 1 à 2 jours avant la mise bas. Le pic de prolactine est supérieur à 100 ng/ml et il a lieu 1 à 2 jours après la parturition. La prolactine induit le développement mammaire et à la lactogénèse lors des 30 derniers jours de gestation alors que la progestérone inhibe la lactation. La chute de la progestéronémie au moment de la mise bas, et la montée de la prolactinémie, provoque la synthèse et la sécrétion de lait (Concannon & verstegen,2004) .

- ***Progestérone***

Comme nous l'avons vu précédemment, le dosage de la progestérone est utilisé dans la détermination de la date d'ovulation. Il ne peut être utilisé pour diagnostiquer une gestation car la progestéronémie d'une chienne gestante est similaire à celle d'une chienne non gestante. Cependant, lors du suivi de la gestation, cette hormone peut être dosée afin de vérifier qu'il n'y a pas d'insuffisance lutéale. En effet, si la progestéronémie est inférieure à 4-5ng/ml avant le 55^{ième} jour cela peut provoquer l'avortement puisque la progestérone est la seule hormone nécessaire au maintien de la gestation (Concannon, 2005).

- ***Oestrogènes***

Leur concentration est très variable et leur dosage ne procure aucune information utile (Concannon, 2005).

3.4.3 Datation échographique de la gestation

Il existe différentes manières d'établir la chronologie des événements d'une gestation. Le jour servant de point de départ peut varier. Voici selon Concannon (2000), une liste de J0 dont la fiabilité est décroissante :

- Pic de LH déterminé par le dosage de la LH plasmatique
- Pic de LH déterminé par la mesure de P4 par RIA ou ELISA
- Ovulation déterminée par échographie ovarienne
- Pic de LH ou ovulation déterminés par un kit ELISA de mesure de P4
- Pic de LH déterminé par le dosage de LH urinaire ou plasmatique à l'aide d'un kit LH
- Pic de LH et/ou ovulation déduit par la mise en évidence de la fin de l'œstrus cytologique
- Ovulation déterminé par vaginoscopie
- Ovulation déduit à partir du moment où la vulve s'assouplit.

Plusieurs études, qui traitent toutes du suivi de la gestation de la chienne dans le tableau récapitulatif ci-dessous (tableau 7).

Tableau 7: Protocoles expérimentaux des différents auteurs cités

AUTEURS ET ARTICLES	ANIMAUX	JOUR J0 DE LA GESTATION	SONDE ECHOGRAPHIQUE UTÉRINE.	FREQUENCE DES EXAMENS
YEAGER AE., CONCANNON PW.1990.	16 chiennes Beagles	Pic de LH (J0-LH)	Sectorielle 7,5 MHz	Quotidiens de J15-LH à J25-LH
ENGLAND GCW. et COLL.1990	50 chiennes	Pic de LH (J0-LH)	Sectorielle: 5 MHz Linéaire: 7,5 MHz	Chaque 3 jours
ENGLAND GCW., ALLEN WE.1990.	1 ^{er} groupe : 6 2 ^{ème} groupe: 36	Pic de LH, calculé à 65j du pré-partum (J0-LH)	Sectorielle: 5 MHz Linéaire: 7,5 MHz	Fréquente entre J20 et J30.
POLLET T., VIAUD F. 1988.	Berger allemand Yorkshire	La saillie (J0-S)	Linéaire: 5MHz Sectorielle: 3,5 MHz	Non signalé
TOAL RL. et COLL. 1986 .	55 chiennes	Première saillie (J0-PS)	Sectorielle : 3 et 5 MHz	Chaque jour
SHILLE VM., GONTAREK J. 1985 .	9 Greyhounds	Ovulation calculée à 63j du pré-partum (J0-OV)	Linéaire: 3 MHz	Hebdomadaire
CARTEE .RE. ROWELS T. 1984 .	118 chiennes en consultation	Dernière saillie observée. (J0-DS)	Sectorielle:3,7 et 10 MHz	Chaque 2 jours
INABA T., ET COLL.1984.	2 Beagles	Ovulation (J0-OV)	Linéaire 5MHz	Fréquente
BONDESTAM S.ET COLL.1984.	145 chiennes en consultation	Dernière saillie (J0-DS)	Linéaire 2,4 MHz	Chaque 1à 2 jours
STOWATER JL ET COLL. 1989.	6 Bergers Allemands	Dernière saillie (J0- DS)	Sectorielle:5 et 7, 5 MHz	Non signalé
CONCANNON P.W., MC CANN J.P., TEMPLE M. (1989)	8 chiennes	Pic de LH (J0-LH) et Dernière saillie (J0- DS)	Sectorielle 7,5 MHz	Quotidiens

3.4.3.1 Diagnostic précoce de la gestation

Inaba *et al.* (1984) visualisent les premières vésicules embryonnaires à J24-OV.

Shille & Gontarek (1985) effectuent le premier diagnostic à J19-OV.

England *et al.* (1990) effectuent les premiers diagnostics précoces de gestation ont lieu à J21-LH et J22-LH, le diamètre externe des vésicules embryonnaires est de 0,9 à 1,1 cm, ce qui correspond à la taille des ampoules palpées à ce stade d'après Concannon *et al.* (1989) à J21-LH et J22-LH soit J13-DS et J14-DS.

Yeager & Concannon (1990), sur 2 femelles, identifient les premiers sacs embryonnaires sont observés à J17-LH et J18-LH, Soit J9-DS et J10-DS d'après Concannon *et al.* (1989).

Les vésicules anéchogènes sont alors de très petite taille: 1 mm de diamètre. Sur les 13 autres chiennes, les ampoules sont visualisées à J19-LH ou J20 -LH plus aisément: le sac anéchogène oblong mesure 1 à 2 mm de large sur 2 à 4 mm de long (il est entouré d'une ceinture chorale de 3 mm environ). Les auteurs observent une croissance exponentielle des sacs embryonnaires entre J17-LH et J25-LH, Soit J9-DS et J17-DS d'après Concannon *et al.* (1989).

Ce qui amène la largeur de la vésicule embryonnaire à 5 mm entre J22-LH et J24-LH Soit J14- DS et J16-DS d'après Concannon *et al.* (1989).

Les résultats de ces différentes études sont concordants. Nous retiendrons que dans le cadre de ces expérimentations, le diagnostic échographique de gestation est rendu possible à partir de J12-DS Soit J20-LH, et que dans des conditions optimales d'examen, la découverte des ampoules peut même être plus précoce et se situer entre J9-DS et J10-DS soit J17-LH et J18- LH.

D'autres études rapportent des résultats qui peuvent paraître assez différents des précédents.

La variation des dates est essentiellement due au choix du premier jour de la gestation:

Cartee & Rowles (1984) suivent les gestations de chiennes de différentes races présentées en consultation par leur propriétaire. Un premier diagnostic de gestation positif est donné à J7- DS et l'embryon devient visible à 10 jours après la dernière saillie observé.

Pollet & Viaud (1988), notent que la gestation est suivie à partir de J16-S.

Stowater *et al.* (1989) échographient les vésicules embryonnaires anéchogènes pour la première fois entre J11-DS et J25-DS.

Les conclusions de ces études sont en fait compatibles avec les précédentes:

Yeager & Concannon (1990) qui indiquent que le premier diagnostic de gestation est

possible à J19-LH et J20-LH, précisent également que ce résultat correspond à une découverte des ampoules entre J13 et J21 après la première saillie dans le même groupe de chiennes, et que le diagnostic le plus précoce a lieu 10 jours après la dernière saillie.

3.4.3.2 Vitalité des fœtus

- *Les signes de vitalité des fœtus*

Ces signes sont donnés par l'activité cardiaque et la mobilité des foetus.

Yeager & Concannon (1990), détectent les battements du coeur entre J23- LH et J25-LH ce qui correspond entre J15-DS à J17-DS, d'après Concannon *et al.* (1989) qui mesure alors entre 1 et 4 mm. Ils sont reconnus comme un mouvement de tremblement au centre de l'embryon.

Shille & Gontarek (1985) les observent dès J20-OV.

D'autres études indiquent que ce signe de la vitalité des embryons est apprécié plus tardivement:

Inaba *et al.* (1984) échographient les battements cardiaques à J48-OV et les premiers mouvements des fœtus à J40-OV.

Cartee & Rowles (1984) repèrent les premiers battements du cœur des embryons à J28- DS et la mobilité des fœtus entre J34-DS et J37-DS.

England *et al.* (1990) échographient les mouvements cardiaques 33 jours avant la mise bas (soit J32-LH).

Description des embryons, que fait Evans & Christensen (1979) à ces stades de la gestation : Bulbe cardiaque proéminent à J21-LH et Concannon *et al.* (1989) :

Bulbe cardiaque proéminent à J14-DS à J17-DS soit J22-LH à 25-LH.

- *Les signes de mortalité fœtale*

Chez un fœtus suffisamment développé, l'absence de battements cardiaques sera évidemment le premier signe de mortalité.

Il sera très facilement interprété à partir des stades où les cavités cardiaques sont échographiées, soit à partir de J40-LH d'après England *et al.* (1990), 32-DS (Concannon *et al.* (1989) et entre J35-LH et J40-LH soit J27-DS et 32-DS d'après Concannon *et al.* (1989).

Chez l'embryon plus jeune et tant que le cœur n'est échographié que par ses pulsations, l'interprétation de ce seul signe sera plus subjective.

Davidson *et al.* (1986) ont suivis la gestation de chattes par échographie. Durant une laparotomie pratiquée entre J21 et J31 de la gestation. Sur plusieurs femelles, certains fœtus sont euthanasiés sans ouvrir l'utérus et en maintenant les ampoules intactes.

L'examen échographique postopératoire des chattes permet de suivre l'évolution de ces ampoules. Les différences entre les fœtus morts et vivants apparaissent immédiatement: à ce stade de la gestation (de J31 à J38), Le jour du début de la gestation na pas était cité par l'auteur.

Les fœtus vivant, la tête et le tronc sont très bien différenciés, les bourgeons des membres sont échographiés ainsi que les battements cardiaques et les mouvements.

Les fœtus morts apparaissent immédiatement inertes, et perdent dans les 24 heures leurs contours morphologiques caractéristiques. Ensuite la masse corporelle va en diminuant et se condense en un amas ovoïde d'échogénicité hétérogène.

Une involution utérine a été détectée sur une chatte avec la formation de plis de la paroi utérine à l'intérieur de l'ampoule et la disparition du fœtus 9 jours après la laparotomie. Des radiographies pratiquées dans les 7 jours qui suivent la chirurgie ne donnent aucun renseignement sur la mortalité des fœtus.

3.4.3.3 Dénombrement des fœtus

Bondestam *et al.* (1984) ont effectué ce comptage sur 77 chiennes gestantes de toutes races; il se révèle exact chez 58 femelles, soit dans 75% des cas. Ils observent que la précision de l'examen augmente à mesure que la gestation approche du terme, et que les portées de grande taille ont tendance à être sous-estimées, tandis que les portées de petite taille sont surestimées.

Différentes raisons expliquent ces erreurs selon Toal *et al.* (1986), la sous-estimation intervient lorsqu'une ampoule reste en dehors du champ de la sonde ou est éliminée du décompte car elle semble avoir été retenue au précédant mouvement de balayage, également lorsqu'une ampoule est masquée par un artéfact de réverbération ou une ombre acoustique de gaz intestinal en début de gestation. La portée est surestimée quand un fœtus est compté deux fois lors des différents balayages de la sonde, mais Toal *et al.* (1986) mentionnent également la mort fœtale avec résorption de l'ampoule pendant la première moitié de la gestation, ou le cannibalisme de la mère à la naissance quand un petit est mort-né.

Toal *et al.* (1986) comparent la précision de la palpation trans-abdominale, la radiographie et l'échotomographie dans l'estimation de la taille de la portée:

La palpation abdominale apparaît comme le moyen le moins fiable dans ce domaine, quelque soit le nombre des fœtus ou le stade de la gestation.

La radiographie offre la meilleure précision, mais il faut attendre les 45 jours de gestation (première saillie), pour pouvoir pratiquer l'examen et compter les squelettes sur le cliché de profil.

L'échographie donne des résultats intermédiaires, 33 chiennes gestantes sont échographiées, le dénombrement des fœtus est exact dans 36% des cas. Toal *et al.* (1986) retrouvent la même tendance que Bondestam *et al.* (1984) ont sous-estimé les portées de grande taille et inversement; Toal *et al.* (1986) observent que la précision augmente à mesure que la gestation progresse : 0% avant J23 (première saillie), 20% entre J24 et J33, 38% entre J34 et J42, et 50% après J43 (la précision de la radiographie avoisine les 100% pendant cette dernière période), la grande taille des fœtus permet de les identifier plus facilement, surtout dans les portées de petite taille. En revanche, lorsque les fœtus sont nombreux, leur chevauchement et l'intrication des ampoules rendent leur comptage très difficile. Un double balayage de l'abdomen longitudinal puis transversal permet d'affiner le diagnostic, mais il apparaît que les portées de 6 chiots ou plus ne peuvent pas être évaluées avec précision. Shille & Gontarek (1985) arrivent à une conclusion semblable, puisqu'ils estiment que le dénombrement des foetus ne peut être fiable que sur des portées de 4 chiots maxima.

England & Allen (1990) ont pratiqués des échographies entre J28-LH et J32- LH sur 16 chiennes gestantes; 10 (2/3) d'entre elles avaient une portée de plus de 5 chiots. La précision du comptage était de 32% (1/3), et celui-ci n'était exact que sur des chiennes gestantes de 1 à 5 petits ce qui corrobore les résultats de Toal *et al.* (1986).

Concannon *et al.* (1989) précisent que c'est entre J28-LH et J35-LH Soit J36- DS et J41- DS, que le dénombrement des fœtus est le plus facile et que les différentes parties du corps fœtale deviennent clairement visible à l'échographie, à partir du J40-LH. Soit J32-DS après la saillie fécondante.

3.4.3.4 Période embryonnaire

L'ampoule anéchogène persiste pendant un laps de temps assez court, tant que l'embryon est insuffisamment individualisé (tableau 8).

La durée de cette période est de 3 jours entre:

- J19-LH et J21-LH, Soit J11-DS et J13-DS (Concannon *et al.* 1989).
- J20-LH et J22-LH Soit J12-DS et J14-DS, (Yeager & Concannon , 1990).
- J7-DS et J9-DS, soit J14-LH et J17-LH (Cartee & Rowles , 1984).
- Mais certains auteurs mentionnent une période plus longue, entre J24-OV et J31-OV (Inaba *et al.* 1984) ou entre (J11-DS et J15-DS) et (J16-DS et J24-DS) (Stowater *et al.* 1989).

L'ampoule embryonnée, contenant l'embryon sous une forme encore mal définie, s'observe à partir de :

- J23-LH et J25-LH, Soit J15-DS et J17-DS (Yeager & Concannon, 1990).
- J17-DS (Stowater *et al.* 1989).
- J10-DS, (Cartee & Rowles, 1984).
- J32-OV, (Inaba *et al.* 1984).
- J19-LH et J22-LH Soit J10-DS et J25-DS. (Concannon *et al.* 1989).

La distinction entre la tête et le tronc est manifeste sur une coupe longitudinale de l'embryon à partir de:

- J35-LH et J40-LH Soit J27-DS et J32-DS (Concannon *et al.* 1989).
- J35-LH (England *et al.* 1990). Soit J27-DS, (Concannon *et al.* 1989).
- J34-DS et J37-DS, (Cartee & Rowles, 1984).
- 1 semaine après la première visualisation de l'embryon, (Stowater *et al.* 1989).

Mobilité de l'embryon s'observe à des périodes très variables suivant les auteurs:

- J20-OV, (Shille & Gontarek , 1985).
- J28 -DS, (Cartee & Rowles , 1984).
- J30-LH (England *et al.* 1990) .Soit J22-DS (Concannon *et al.* 1989).
- J40 -OV, (Inaba *et al.* 1984).
- Entre J28-LH et J35-LH Soit J20-DS et J27-DS (Concannon *et al.* 1989).

Tableau 8 : Première détection échographique de différents stades du développement embryonnaire et de la parturition (Yeager & Concannon, 1990).

	Moyenne +/- écart type (intervalle) du jour de la première observation	
	<u>après le pic de LH</u>	<u>après la première saillie</u>
Ampoule anéchogène (n=13)	19,5 +/- 0,2 (18 à 20)	16,9 +/- 0,7 (15 à 21)
Masse embryonnaire (n=13)	23,5 +/- 0,2 (23 à 25)	20,9 +/- 0,5 (18 à 24)
Battements cardiaques (n=13)	24,2 +/- 0,2 (23 à 25)	21,3 +/- 0,5 (19 à 25)
Parturition (n=11)	64,7 +/- 0,2 (63 à 66)	32,3 +/- 0,5 (59 à 66)

3.4.3.5 Période fœtale

Selon England & Allen (1989) à J40-LH, les contours de l'embryon sont bien nets, la tête et le corps se différencient. A partir de J40-LH le crâne et les vertèbres génèrent des cônes d'ombre, les gros vaisseaux, les cavités cardiaques ainsi que les valvules sont échographiés. Après J45-LH le foie, les poumons et l'estomac sont visualisés. Dans les 10 derniers jours, la vessie, les reins, le cordon ombilical et ses vaisseaux et la vésicule biliaire (pour une chienne sur quatre) sont observés.

England *et al.* (1990) précisent qu'à J30-pp (J40-LH) ; J32-DS selon Concannon *et al.* (1989).

Les contours de l'embryon sont bien nets, la tête et le corps se différencient à partir de J25-pp (J40-LH) le crâne et les vertèbres génèrent des cônes d'ombre, les gros vaisseaux, les cavités cardiaques ainsi que les valvules sont échographiés.

Après J20-pp (J45-LH) selon England *et al.* (1990) ; J37-DS selon Concannon *et al.* (1989). Le foie, les poumons et l'estomac sont visualisés. Dans les 10 derniers jours, la vessie, les reins, le cordon ombilical et ses vaisseaux et la vésicule biliaire (pour une chienne sur quatre) sont observés.

Cartee & Rowles (1984) indiquent à partir de J42-DS, le foie, l'estomac et le cœur sont échographiés ; à J43-DS, les vertèbres sont hyperéchogènes ; à J47-DS les mêmes centres

d'ossification sont plus nets, mais n'engendrent pas encore de cône d'ombre. à partir de J49-DS, l'aorte est visualisée ainsi que les orbites et la bouche.

Selon Inaba *et al.* (1984) : il faut attendre J48-OV pour observer l'estomac, les battements et les cavités cardiaques.

Selon Bondestam *et al.* (1984) : les fœtus sur lesquels sont visualisés l'estomac, la vessie, la veine ombilicale et la faux cérébrale dans le plan médian du crâne, sont âgés d'au moins 40 jours après la dernière saillie.

Selon Stowater *et al.* (1989) : le foie, le cœur et les poumons sont mis en évidence entre J32-DS et J39-DS, et l'estomac et la vessie sont échographiés le même jour ou les jours suivants.

Selon Concannon *et al.* (1989), les différentes parties du corps fœtale ainsi que les organes internes deviennent clairement visibles à l'échographie à partir du J40-LH ; J32- DS. La mesure de la longueur de la colonne vertébrale permet de dater l'âge du fœtus.

A 35 jours -ovulation, les doigts et les organes génitaux vont commencer à se différencier. Sa longueur va atteindre 35 mm environ (Evans, 1993 ;Tainturier *et al.* 1998).

A 40 jours – ovulation, alors qu'il fait 65 mm de longueur, les paupières du fœtus vont se souder et les ongles vont apparaître (Evans, 1993 ; Tainturier *et al.* 1998).

Les résultats de ces différentes études indiquent qu'il faut attendre Jusqu'a 30 jours après la dernière saillie soit environ 40 jours après le pic de LH de gestation pour observer les organes internes et le squelette du fœtus.

Cependant il existe des variations parfois importantes entre les différents calendriers gestationnels (les caractéristiques des échographes, la fréquence des examens, le repère J0 choisi, en sont des causes probables Cependant, nous retrouvons régulièrement le même ordre d'apparition des signes de la croissance fœtale: L'ampoule anéchogène/ l'embryon ovaire/ la différenciation morphologique de l'embryon tête tronc/ parmi les organes abdominaux le coeur/ les poumons et le foie/ l'estomac/ la vessie (tableau 9 , 10) .

Tableau 9 : Développement embryonnaire du chiot

(Tainturier *et al.* 1998 ; Corre & Rozenbaum, 2004).

Age en jours depuis l'ovulation	Caractères reconnaissables à l'échographie
J22-J24	Sphère de 3mm de diamètre plaquée contre le placenta, qui évolue très rapidement: s'allonge et s'éloigne du placenta. Apparition des bourgeons des membres Le cœur est fonctionnel et ses battements observables (cavités cardiaques non visibles)
J28	Le cou se dessine → individualisation de la tête, l'embryon prend la forme d'un 8
J29	Le corps s'allonge, les premiers centres d'ossification sont actifs sur les os de la face et du crâne
J30	Les membres antérieurs sont formés
J35	Les membres postérieurs sont formés → 4 membres entourent le tronc. Différenciation des doigts et des organes génitaux Les deux hémisphères cérébraux se forment. L'ensemble des os de la face s'ossifie (os maxillaires, mandibulaires et nasaux) → le museau est formé. Le fœtus effectue ses premiers mouvements (ondulations). Début d'ossification des côtes.
J35-J37	Les arcades zygomatiques s'ossifient → les orbites sont formés, la tête prend la forme d'un crâne canin
J38	Différenciation de la région costale et de la région abdominale. L'estomac et la vessie sont observables.
J40	La maquette cartilagineuse du squelette s'ossifie progressivement, les centres d'ossification sont pleinement actifs sur quasiment tous les os. Les vertèbres et les côtes s'individualisent. Soudure des paupières Intestin rentré dans l'abdomen Apparition des griffes
J42	La limite entre les poumons et le foie est franche. Le foie est différenciable de la masse intestinale.
J44	La vésicule biliaire devient visible
J45-J50	L'ossification du squelette s'accroît. Pigmentation et apparition des poils.

Tableau 10 : calendrier gestationnel chez la chienne(Choquart, 2002)
 (Basé sur le suivi de la gestation de 8 chiennes avec un échographe Aloka 500)

Age en jours depuis le pic de LH	Caractères reconnaissables à l'échographie
J21	Ampoules anéchogènes de 2 mm de diamètre.
J22-J23	Ampoules anéchogènes de 4 mm de diamètre x 4 à 6 mm de long.
J24	Embryons ovalaires : longueur < 5 mm / Battements cardiaques discernables
J27	Différenciation entre les chorions villeux et lisse.
J28	Embryon ovalaire , longueur : 10 mm .
J29	Allantoïde et de la vésicule vitelline échographiées simultanément.
J30	Embryon en forme de 8.
J31	Premières ossifications du crâne sur les pariétaux et les frontaux.
J34	Membres antérieur
J35	Membres postérieurs / Premiers signes de mobilité en ondulation / Ossification du crâne et de la face : tête d'insecte.
J37	La vésicule vitelline vide forme un épais cordon dans l'axe de l'ampoule
J38	Estomac : 3 mm de diamètre.
J39	Longueurs fœtus = placenta / Plastron costal et scapulas échogènes.
J40	Ossification des zygomatiques : aspect de la tête caractéristique du chiot / vessie irrégulièrement échographiée : 3 mm de diamètre.
J41	Distinction poumons-foie / veine ombilicale / rachis avec 2 noyaux d'ossification par vertèbre
J43	Ilium
J44	Côtes distinctes / 1° sternèbres.
J46	Vésicule biliaire, diamètre : 3mm/ 3 noyaux d'ossification par vertèbre.
J47	Cônes d'ombre des vertèbres.
J51	8 sternèbres échogènes / Ischions.
J52	Vésicule biliaire ovale.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

1. Objectifs de l'étude

Dans un premier temps l'objectif de ce travail est de déterminer le moment de l'ovulation ainsi que les différents remaniements au niveau de la muqueuse vaginale et de l'ovaire au cours des différentes phases du cycle, par la lecture des frottis vaginaux, l'échographie des ovaires ainsi que le dosage de la progestérone.

Dans un second temps vérifier l'efficacité d'un traitement orale à base de la bromocriptine (Parlodel® 2.5mg) pour l'induction des chaleurs, utiliser chez des chiennes en période d'œstrus tardif ainsi que pour l'anticipation de l'œstrus chez un autre groupe de chienne en période de metœstrus tardif.

Dans un troisième temps, établir un calendrier gestationnel par un suivi échographique de la gestation afin de décrire et dater les étapes du développement embryonnaire et fœtal à partir du jour de la dernière saillie.

2. Lieu de l'étude :

La clinique de pathologie des carnivores, situé à l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret est consacré à la formation pédagogique des étudiants vétérinaires ainsi qu'à la réalisation de soins et de prise en charge médicale des carnivores domestiques, le volée suivi de la reproduction des carnivores domestiques à était récemment introduit il comprend le suivi de la gestation , des chaleurs et l'insémination artificielle essentiellement chez l'espèce canine.

Les chiens et les chiennes présentés pour consultation appartiennent à des propriétaires (amateurs et professionnels) résidant dans la wilaya de Tiaret et ses environs. D'autres sont gardés en permanence et élevés au niveau de l'institut pour des recherches en reproduction canine (échographie, dosage hormonale, suivi de gestationetc.)

Pour notre étude, un dossier était créé pour chaque nouvel animal où sont consignés quotidiennement les commémoratifs notamment la date d'apparition des chaleurs, nombre de chaleurs par année, régularité du cycle, le mode de fécondation (accouplement naturel ou Insémination artificielle), la parité, nombre de chiots, antécédents pathologiques.

Les interprétations des frottis vaginaux, les résultats des examens échographiques sont notés cela va de même avec les résultats du dosage de la progestéronémie, ce dernier est réaliser au niveau un laboratoire privé après expédition des tubes de prélèvements.

3. Durée de l'étude

L'étude s'est étalée sur une période débutant de janvier 2011 jusqu'au moi de janvier 2016

4. Matériel et méthodes

4.1 Animaux

Le nombre total des chiennes concernées par cette étude est de 95 chiennes de différentes races âgées de 6 mois à 10 ans avec un poids de 10 à 35kg, dont 24 chiennes ont eu au moins une gestation antérieure. Notons que dans cet effectif 19 chiennes étaient de race berger de l'atlas. Les animaux étaient déparasités et correctement vaccinée. et ne présentait aucune atteinte de leur état général.

4.2 Répartition de l'échantillon en fonction des paramètres étudiés :

- 39 chiennes de différentes races âgées de 6 mois à 10 ans (poids de 10 à 35 kg), présentaient des chaleurs naturelle régulièrement en consultation sur rendez-vous étaient concernées par un suivi de leurs chaleurs en utilisant la cytologie vaginale et l'échographie des ovaires à partir du 5^{ème} jours du proœstrus et durant l'œstrus, nous avons choisi comme marqueur du début des chaleurs le jours de l'apparition des pertes vulvaires vue que c'est un repère facile à déterminer en clinique et facile à interprété par le propriétaire, ce suivi était effectuer sur des chiennes ayant des chaleurs naturelles
- 08 chiennes de race berger de l'atlas âgées de 2 ans (poids de 14 à 16 kg), qui présentaient un anœstrus tardif (>5mois), ont reçus traitement inducteur des chaleurs par l'usage de la Bromocriptine (Parlodol® 2.5mg) par voie orale à la posologie de 40 µg/kg soit 0.04 mg/kg de poids vif, deux fois par jours, le retour des chaleurs étaient suivi à partir du 5^{ème} jours du proœstrus et durant l'œstrus par lecture des frottis, échographie des ovaires et dosage de la progestérone. Leurs gestations étaient également suivies par échographie.
- 11 chiennes de race berger de l'atlas âgées de 4 ans (poids de 15 à 16 kg), qui étaient en phase de metœstrus tardif (fin du metœstrus), ont reçus un traitement inducteur des chaleurs par l'usage de la Bromocriptine (Parlodol® 2.5mg) par voie orale à la posologie de 20 µg/kg soit 0.02 mg/kg de poids vif, deux fois par jours, leurs chaleurs étaient suivies à partir du 5^{ème} jours du proœstrus et durant l'œstrus par cytologie vaginale, échographie des ovaires.

- Un diagnostic et suivi de la gestation par échographie, sur 37 chiennes de différentes races âgées de 8 mois à 5 ans (poids de 10 à 35kg), ramenées régulièrement par leurs propriétaires sur rendez-vous. Les 08 chiennes berger de l'atlas dont les chaleurs étaient induites par la bromocriptine étaient également concernées par le suivi de la gestation. de ce fait le nombre total était de 58 chiennes. Dans ce cas le repère choisi pour déterminé le jour du début de la gestation (J0) est le jour de la dernière saillie (J0-DS) étant donné que toutes nos chiennes étaient soumises à de multiples saillies naturelles contrôlés.

4.3 Suivi des chaleurs

4.3.1 Animaux concernés

39 chiennes de différentes races âgées de 6 mois à 10ans avec un poids de 10 à 35kg, reçus sur rendez-vous. Leur chaleurs (naturelles) étaient suivies par cytologie vaginale et échographie des ovaires.

Chez 19 autres chiennes de race berger de l'atlas, un traitement inducteur des chaleurs à été entrepris par l'usage (hors AMM) d'un antiprolactinique dont le principe actif est la bromocriptine commercialisé sous le nom de Parlodel® 2.5mg en pharmacie humaine.

4.3.2 Techniques

Les examens étaient effectués tous les 1 à 2 jours à partir du 5^{ème} jour du proœstrus (le jour du début des chaleurs était déterminé par le moment du début des pertes vulvaires) et durant l'œstrus jusqu'au moment où l'ovulation était diagnostiquée.

4.3.3 Protocole d'induction des chaleurs

La molécule choisie pour l'induction de chaleur était la bromocriptine un antiprolactinique agoniste dopaminergique, disponible dans la pharmacie de l'homme connue sous le nom de Parlodel ® 2,5 mg, qui était la seule molécule antiprolactinique à être commercialisée en Algérie sous forme de comprimé boîte 30.

08 chiennes âgées de 2 ans (poids de 14 à 16 kg), nullipares et ont présenté leur chaleurs pubertaire entre 6 et 9 mois .Toutes n'ont montré aucun retour en chaleur de plus de 5 mois (anœstrus tardif). La bromocriptine était administrée à la posologie de 40 µg/kg soit 0.04 mg/kg de poids vif, deux fois par jours par voie orale, le retour des chaleurs étaient suivies par

lecture des frottis, échographie des ovaires et dosage de la progestérone. Leurs gestations étaient également suivies par échographie.

11 chiennes âgées de 4 ans (poids de 15 à 16 kg), ont présenté leur première chaleur pubertaire entre 6 et 8 mois ont eu une gestation antérieure et avaient présentée leur dernière chaleur depuis 3 mois. Toutes étaient en phase de metœstrus tardif (fin du metœstrus) et ont reçus ce traitement par voie orale à la posologie de 20 µg/kg soit 0.02 mg/kg de poids vif, deux fois par jours, afin d'anticiper l'œstrus ; les chaleurs étaient suivies par cytologie vaginale, échographie des ovaires.

4.3.4 Cytologie vaginale

Une fois que la chienne présentait des pertes vulvaires ce qui indiquait le début des chaleurs (proœstrus) un suivi cytologique était réalisé tout les 1 à 2 jours et ceci à partir du 6^{ème} jour du début du proœstrus (les jours du début des chaleurs était déterminé par le début des pertes vulvaires) et durant l'œstrus. Cela va de même pour les examens échographiques et le dosage de la progestérone. Les résultats de chaque examen effectué étaient notés sur des fiches individuelles pour chaque animal (figure 41, 42,43).

Pour chaque visite, après écouvillonnage, un frottis vaginal était préparé sur des lames (lames P-O) paquet de 50 lames (Reproduction Canine.eu, EARL le parangon du Roi, Bouhey – France). Fixé au cyto-fixateur (cyto RAL) aérosol de 75 ml (Reproduction canine.eu, EARL le parangon du Roi, Bouhey – France) .Coloré ensuite avec le trichrome d'Harris-Shorr (Kits Diañoestrus-RAL R&B, Reproduction canine.eu, EARL le parangon du Roy, Bouhey – France).

Nous avons également utilisé en supplément pendant l'œstrus afin d'évaluer la kératinisation cellulaires, la coloration May-Grünwald.Giems (Kits RAL. MGG 555, Reproduction canine.eu, EARL le parangon du Roy, Bouhey – France).

L'indice éosinophilique (IE), la présence ou l'absence d'érythrocytes et de leucocytes ainsi que les pourcentages en cellules parabasales, petites intermédiaires, grandes intermédiaires et superficielles étaient déterminées. Le frottis était ensuite numéroté et conservé.

Les lames étaient lues à l'aide d'un microscope binoculaire (S-350 OPTIKA) appartenant à l'institut des Sciences vétérinaires de Tiaret, muni d'un grossissement x40, x100. Les frottis étaient d'abord visualisés au grossissement x 40 ou x100 dans leur totalité.

Ceci nous donnait les informations suivantes :

- la coloration majoritaire du frottis (acidophile ou basophilie) ;
- la densité cellulaire.
- la présence d'érythrocytes et de polynucléaires neutrophiles (PNN) ;
- l'aspect du fond du frottis.

Pour un « typage » cellulaire sur un minimum de 10 à 20 cellules ; les lames étaient ensuite observées à un grossissement plus fort x100, dans les zones du frottis où les cellules formaient le moins d'amas.

Durant la lecture des frottis vaginaux, un intérêt particulier a été réservé à la détermination de l'indice éosinophilique (IE) qui représente le pourcentage des cellules réellement kératinisées par rapport à celles qui pourraient l'être mais ne le sont pas (gros polychromatophiles intermédiaires et cellules basophiles). Les petites cellules intermédiaires et les cellules parabasales ne sont pas prises en compte.

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

4.3.4.1 Matériel utilisé préparation et examen des frottis

- Lames pour examen microscopique dimensions (26x76 mm /1mm -1.2mm).
- Ecouillons non stériles et stériles.
- Fixateur Cytologique pour frottis (Cyto-RAL flacon de 150 ml).
- Eau distillée pour rinçage des lames.
- Microscopes optiques binoculaires de marque S-350 OPTIKA.
- Appareille photo numérique pour prise de photos des frottis.

4.3.4.2 Colorant et coloration

La coloration Harris Shorr, constitue la méthode de coloration principale par l'utilisation d'un Kits Diañoestrus-RAL A&B (coloration de Shorr-Hématoxyline stabilisée); destiné à la détermination période d'ovulation chez la chienne (figure 40).

Contenu des kits :

Fiche descriptive du principe de coloration.

Kit Diañoestrus A (coffret de coloration)

1. Hématoxyline stabilisée, flacon de 100 ml

2. Différenciateur, flacon de 100 ml
3. Colorant de Shorr, flacon de 100 ml

Kit Diagnoestrus B (coffret de rinçage)

1. Solution de rinçage N°1, flacon de 100 ml
2. Solution de rinçage N°2, flacon de 100 ml
3. Solution de rinçage N°3, flacon de 100 ml

La coloration May-Grünwald Giemsa (**Kit-Ral 555**), était réservée pour confirmer le stade de kératinisation complète qui correspond à l'approche de l'ovulation du pic de LH, et pour confirmer ou infirmer la présence d'une éventuelle infection vaginale par la mise en évidence d'un nombre anormalement élevé de polynucléaires.



Figure 40 : kits de coloration utilisé durant le sui des chaleurs, a gauche RAL 555(May-Grünwald Giemsa) ; à droite kit diagno-oestrus A et B (colloration Hariss Shoor) (Dr Slimani khaled mabrouk).



Figure 41: écouvillonnage vaginale en vue de la réalisation d'un frottis
(Dr Slimani khaled mabrouk).

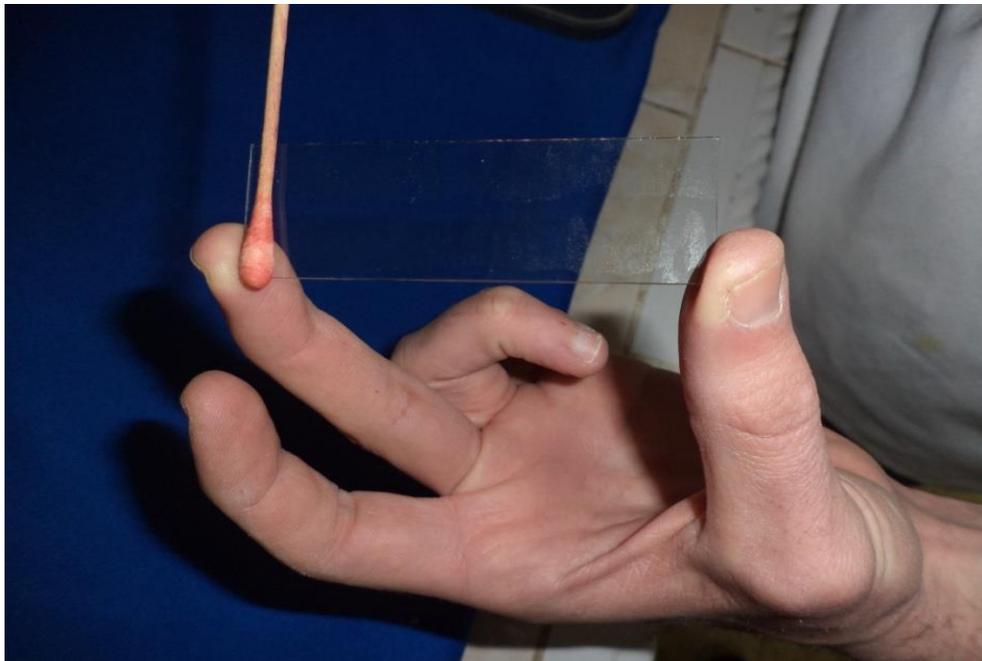


Figure 42 : étalement avant coloration (Dr Slimani khaled mabrouk).



Figure 43 : Fixation du frottis avant coloration (Dr Slimani khaled mabrouk).



Figure 44 : lecture au microscope des frottis vaginaux (Dr Slimani khaled mabrouk).

4.3.5 Examen échographique des ovaires

Une fois les frottis réalisés, la chienne est conduite dans une salle calme aménagée spécialement pour l'examen échographique. Après une tonte large de l'abdomen de l'ombilic jusqu'à la région pubienne et de part et d'autre des chaînes mammaires, la chienne était mise en décubitus dorsal, une sédation était parfois nécessaire pour certaines chiennes fortement agitées ;

La détermination de l'aspect échographique des ovaires ainsi que leurs diamètres était obtenu en réalisant des coupes longitudinales et transversales en utilisant un échographe transportable de marque IMAGO.S muni d'une sonde électronique sectorielle avec une fréquence de 3.5 à 6 MHz. Les échographies des ovaires étaient effectuées à partir du 5^{ème} jour du proestrus (le début des chaleurs était déterminé par le début des pertes vulvaires) et durant toute la période de l'œstrus. Les examens échographiques étaient effectués en moyenne durant 9 jours (figure 45).

Durant les examens échographiques les étapes suivantes étaient respectées :

- un repérage topographique des deux ovaires.
- évaluation de la taille de chaque ovaire sur des coupes longitudinales.
- détermination de l'aspect échographique des ovaires.

4.3.5.1 Caractéristique du dispositif

- Ecran de 6.5"
- Clavier tactile
- Boîtier magnésium
- Batterie interchangeable

Modes d'imagerie

- B, B+B
- B+M mode
- Zoom
- Focus
- Mesure et table
- Sauvegarde de clip ou d'image

Périphériques:

- USB
- Antenne bluetooth

Applications cliniques

- Générale
- Gynécologique

- Obstétrique
- Abdominale

4.3.5.2 Sondes

Sonde sectorielle convexe mécanique à balayage sectorielle.

4.3.5.3 Enregistrements

Les enregistrements photographiques étaient réalisés grâce à une clé USB de Type ADATA 8 GB connecté à l'échographe via un port USB.



Figure 45 : Examen échographique durant les chaleurs (Dr Slimani khaled mabrouk).

4.3.6 Dosage de la progestérone

Il concernait 8 chiennes toutes de race berger de l'atlas chez lesquelles un traitement d'induction des chaleurs à été appliqué. Le dosage de la progestérone était réalisé au nombre de 4 à 5 dosages par chiennes toutes les 24 à 48h à partir du 5^{ème} jours du proœstrus jusqu'au jour où l'ovulation est détectée par un pic de progestéronémie. Le sang était collecté de la veine radiale, dans des tubes de prélèvement contenant de l'héparine, ces prélèvements étaient datés et identifiés par attribution d'un numéro correspondant au dossier de la chienne concernée. Le prélèvement était ensuite acheminé sans délais pour analyse en utilisant pour cet effet un analyseur Elecsys1010 Roche©, appartenant à un laboratoire privé le dosage était quantitatif.

Ses prélèvements étaient renouvelés en fonction de l'évolution du taux de la progestérone et de l'interprétation des lectures des frottis et des images échographiques des ovaires.

4.3.7 Résultats

Dans le premier groupe composé de 39 chiennes nous avons constaté ce qui suit :

Chez 100% (39/39) une évolution chronologique positive et corrélée était constatée entre la progression du diamètre des ovaires et celle l'indice éosinophilique durant la période comprise entre le 5^{ème} jour du præstrus et le milieu de l'œstrus qui coïncide avec la période ovulatoire.

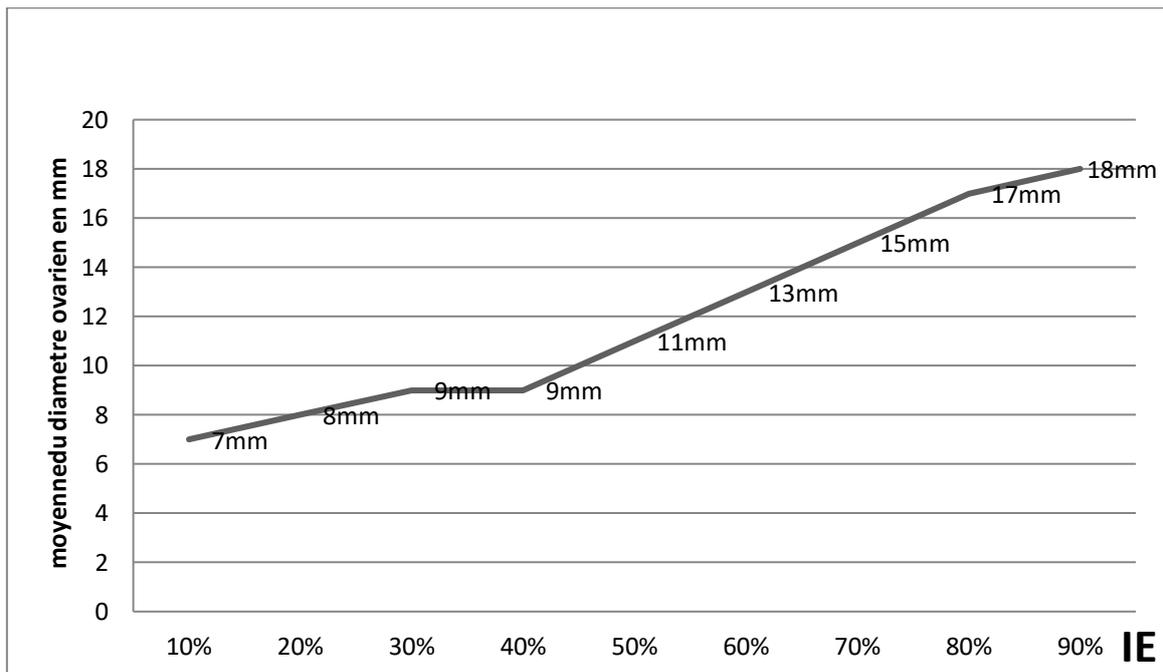


Figure 46 : évolution chronologique du diamètre des ovaires et l'index éosinophilique (IE) à partir du 5^{ème} jour de præstrus jusqu'au jour de l'ovulation chez 39 chiennes.

Vers le milieu de l'œstrus, la moyenne du diamètre des ovaires était de 18.04+/-1.69 mm (millimètres) correspondant à un pic de l'indice éosinophilique supérieur ou égal 80% chez 100% (39/39) des chiennes ; cette augmentation du diamètre des ovaires associés au changement de son aspect échographique était en corrélation avec le pic de l'indice éosinophilique à l'approche du moment de l'ovulation (figure 46, figure 55).

Le moment de l'expression du pic de l'indice éosinophilique (IE) en rapport avec le début des chaleurs (Le jour de l'apparition des pertes vulvaires était le jour du début des chaleurs) était variable d'une chienne à l'autre ainsi 48.7 % (19/39) des chiennes ont manifesté ce pic au 7^{ème} jour du cycle ; 20.5 % (8/39) des chiennes au 5^{ème} jour du cycle et 7.6 % (3/39) respectivement au 8^{ème} ; 10^{ème} ; 11^{ème} et le 15^{ème} (Figure 47).

Le moment de l'ovulation détecté par l'estimation de l'indice éosinophilique et l'évolution du diamètre des ovaires, se produisait en moyenne au 10^{ème} +/- 2 jours du cycle, avec des ovulations allant du 6^{ème} au 16^{ème} jour des chaleurs, 64.1% (25/39) des chiennes ont ovulé entre le 12^{ème} et le 16^{ème} jour des chaleurs.

100% (39/39) des chiennes ont présenté entre le 5^{ème} jour du proœstrus et le milieu de l'œstrus un aspect de plus en plus anéchogène de l'ovaire celui-ci présentait une surface irrégulière, grumeleuse accompagnée d'une augmentation de sa taille. L'ovulation était détectée lorsque l'aspect anéchogène des ovaires (follicules) se transformait en un mélange d'hypoéchogénicité et d'hyperéchogénicité accompagné d'un changement de la surface de l'ovaire qui devenait plus bombés et multilobés (figure 55).

Dans le groupe qui comprenait 8 chiennes berger de l'atlas les résultats étaient comme suit : Avant le début du traitement, toutes nos chiennes présentaient un anœstrus tardif, confirmé par la cytologie vaginale et le dosage de la progestérone plasmatique et échographie des ovaires (Photo31). Avant le début du traitement, toutes nos chiennes avaient un anœstrus confirmé par cytologie vaginale et dosage de la progestérone dans le plasma. Dans ce cas, il s'agissait d'un anœstrus tardif (plus de 5 mois après la dernière chaleur). La cytologie a révélée de petits amas de cellules parabasales avec absence de globules rouges et de leucocytes. Le taux de progestérone était en moyenne inférieur à 2 nmol / L. L'échographie abdominale de l'appareil génital n'a révélé aucune anomalie particulière au niveau des ovaires ni aucune anomalie de l'utérus.

Le proœstrus était systématiquement induit chez 100% (8/8) des chiennes. Le moment de l'apparition des pertes vulvaires était variable d'une chienne à l'autre, de sorte que 25% (2/8) des chiennes ont montré des pertes vulvaires au 21^{ème} jour du traitement. 37.5% (3/8) ont présenté les chaleurs au 35^{ème} jour du traitement. 37.5% (3/8) des chiennes ont montré des chaleurs après 40 jours de traitement, la moyenne d'apparition des pertes vulvaire était de 32 ± 10 jours (figure 47, 48 ,52)



Figure 47 : Perte vulvaire observée chez les chiennes après 35 jours de traitement par la bromocriptine (Parlodel® 2,5 mg) administration orale (Dr Slimani khaled mabrouk).

100% (8/8) des chiennes ont présenté une corrélation chronologique positive entre l'évolution de l'index éosinophilique et l'augmentation du diamètre des ovaires pendant la période située entre le 5^{ème} jour du proœstrus et le milieu de l'œstrus qui coïncide avec la période de l'ovulation. Le diamètre des ovaires était égal à 19 ± 2.07 mm et correspondait à un indice éosinophile égal ou supérieur à 80% chez 100% (8/8) des chiennes au moment de l'ovulation (figure 49).



Figure 48 : écouvillons de præstrus (Dr Slimani khaled mabrouk)..

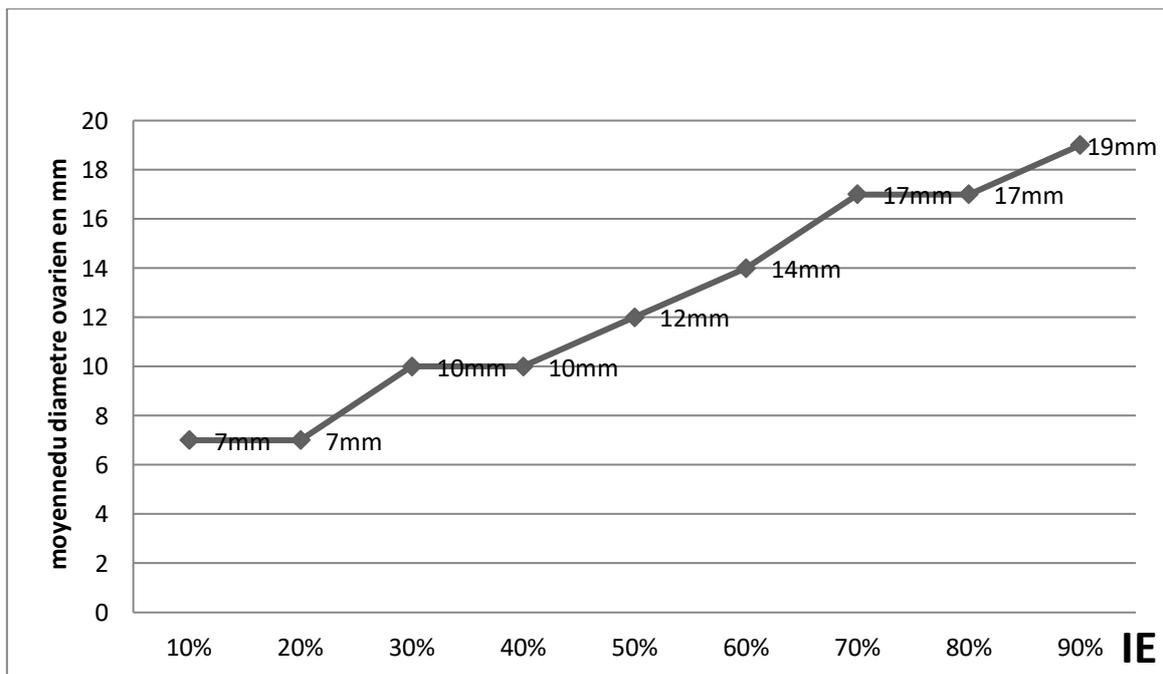


Figure 49: évolution chronologique de l'index éosinophilique (IE) et le diamètre des ovaires à partir du 5^{ème} jour de præstrus jusqu'au jour de l'ovulation.

87.5% (7/8) des chiennes ont présenté une corrélation positive entre la progression du taux de progestérone et celle de l'index éosinophile (IE) pendant la période située entre le 5^{ème} jour du proestrus et le milieu de l'œstrus qui coïncide avec le moment d'ovulation (figure 50).

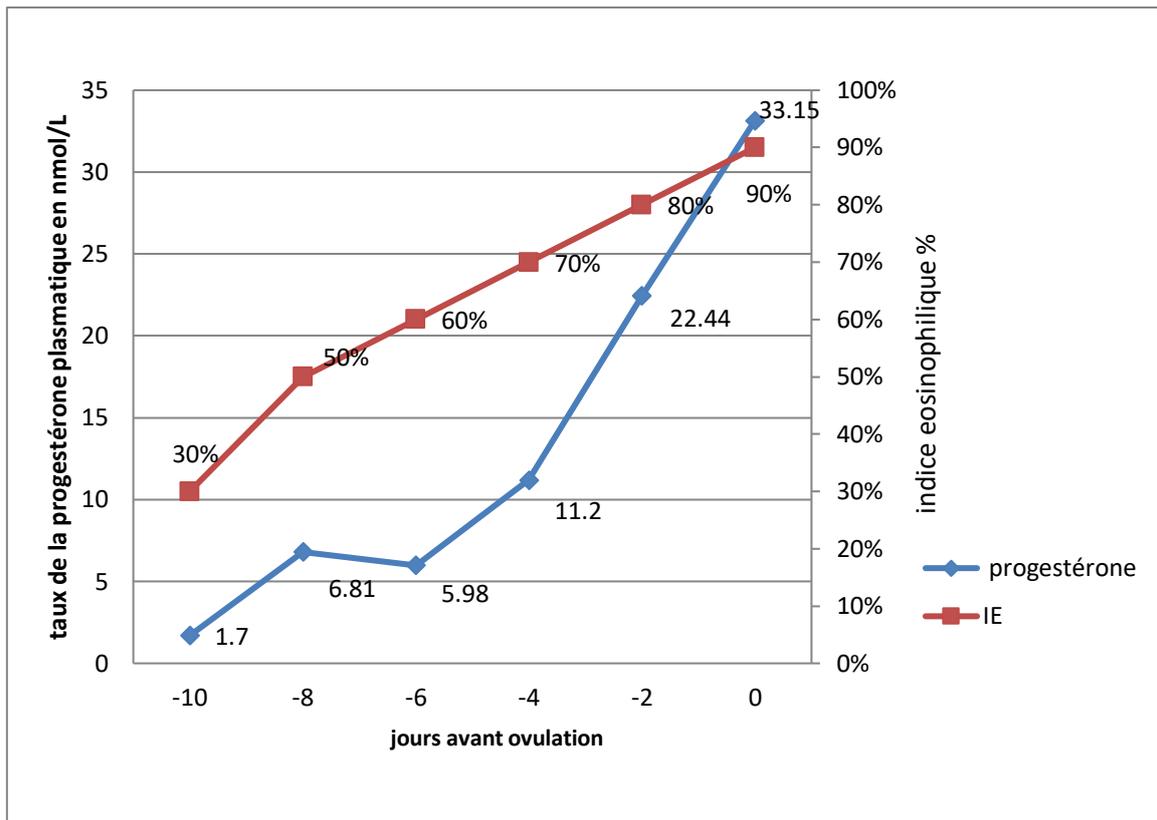


Figure 50 : Évolution chronologique du taux de la progestérone et de l'index éosinophilique (IE) à partir du 5^{ème} jour du præstrus jusqu'au jour de l'ovulation

Le taux de progestérone au moment de l'ovulation était situé entre 21.04+/-14.53 nmol / L et 33.15+/-15.16 nmol / L chez 87.5 (7/8) des chiennes (Figure 58). À l'exception d'une chienne qui présentait un niveau de progestérone stable à 9 nmol / L, pendant toute la période des chaleurs et cela indépendamment de la progression de l'index éosinophilique.

Il est à noter que les cellules acidophiles kératinisées qui reflètent l'index éosinophilique (IE) étaient déjà présentes lorsque la progestéronémie était à un niveau basal chez 100% (8/8) les chiennes. Lorsque le taux de progestérone était de 1.70+/-0.84 nmol / L, l'index éosinophilique présentait un pourcentage qui avoisinait 30% (figure 50).

87. 5% (7/8) des chiennes ont présenté une évolution chronologique positive entre les taux de la progestérone et le diamètre des ovaires entre le 5^{ème} jour du præstrus et le milieu de l'œstrus (coïncidant l'ovulation) (figure 51). Excepté une chienne qui avait un taux de progestérone stable de 9 nmol / L et cela indépendamment de l'augmentation du diamètre de l'ovaire et de l'évolution l'index éosinophilique.

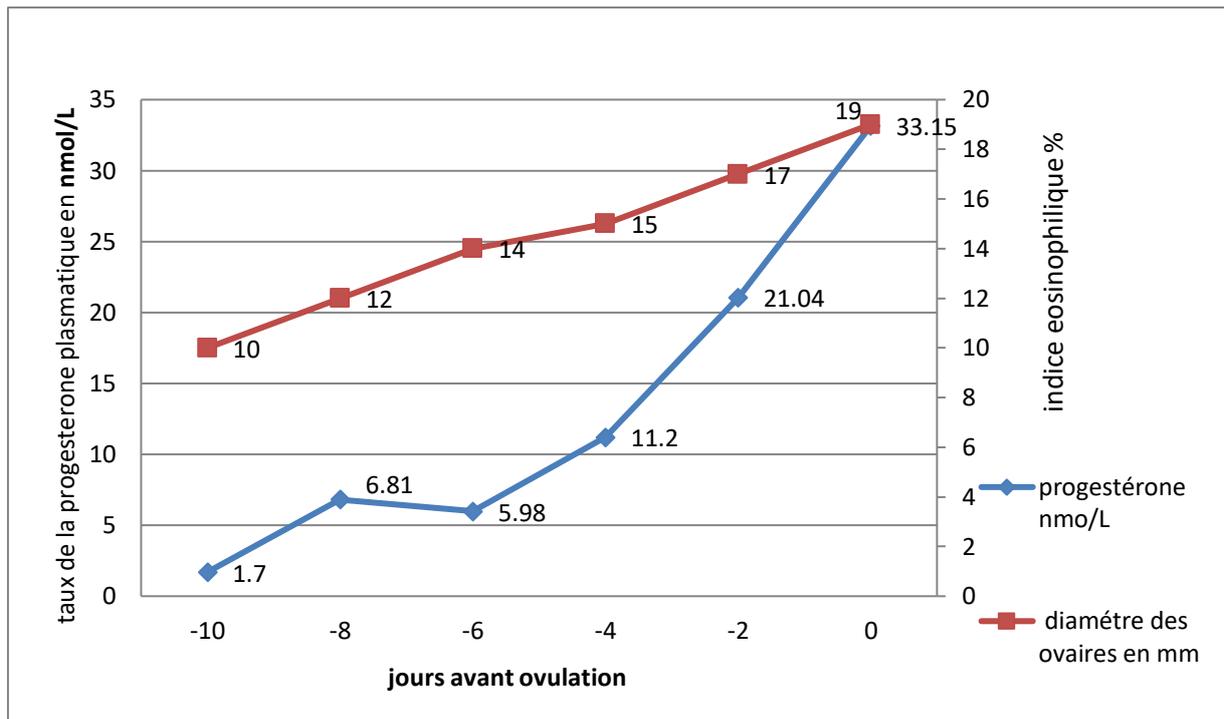


Figure 51 : évolution chronologique de la progestéronémie et du diamètre des ovaires à partir du 5^{ème} jour du proœstrus jusqu'au jour de l'ovulation.

Une variabilité dans le moment de l'expression du pic de l'indice éosinophile a été observée, ainsi 75% (6/8) des chiennes exprimaient ce pic entre le 12^{ème} et le 15^{ème} jour des chaleurs, 12.5% (1/8) des chiennes au 10^{ème} jour des chaleurs et 12.5% (1/8) des chiennes au 20^{ème} jour des chaleurs. 75% (6/8) des chiennes ont ovulé entre le 12^{ème} et le 15^{ème} jour des chaleurs en moyenne au 13^{ème} +/- 0.5 jour des chaleurs. Une chienne (1/8) du groupe à ovulée au 20^{ème} jour des chaleurs (figures 51 ; 52,53).



Figure 52 : Vue d'un frottis vaginal de proestrus au grossissement x40, qui montre des cellules intermédiaires majoritaires devenant progressivement acidophiles (cellules subissant une kératinisation), un fond sale et la présence de globules rouges dans un frottis coloré avec le trichome de Harris Shorr. L'indice éosinophile > 40 %. CAK: cellules acidophiles kératinisées; CGI: cellules grandes intermédiaires; GR: globules rouges. (Dr Slimani khaled mabrouk).

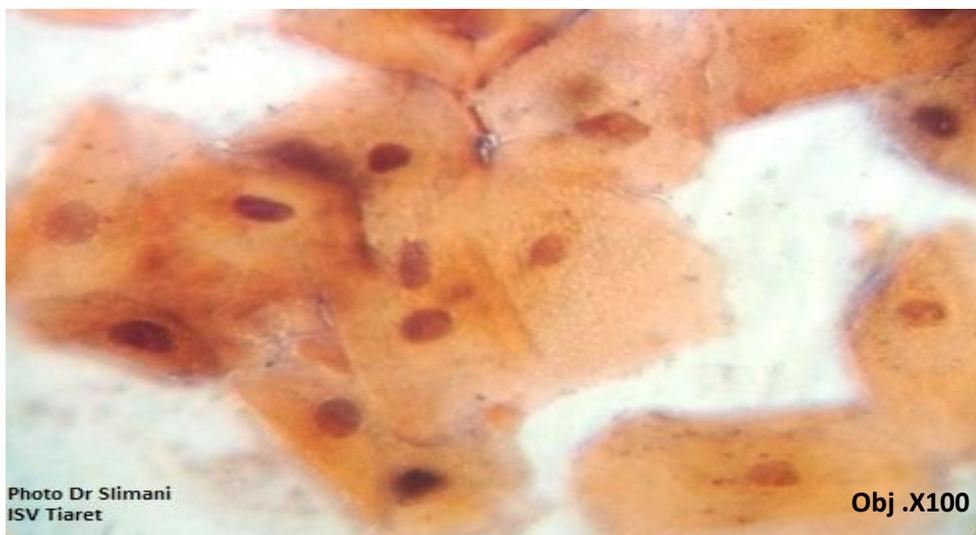


Figure 53: Une vue d'un frottis vaginal d'œstrus à un grossissement de x100 qui montre des amas de grandes cellules très angulaires et acidophiles (cellules kératinisées) avec un petit noyau, ± pycnotique. L'indice éosinophile > 80%. (Dr Slimani khaled mabrouk).

Entre le 5^{ème} jour de proœstrus et le milieu de l'œstrus, 87.5% (7/8) des chiennes montraient une apparence de plus en plus anéchogène de leurs ovaires avec une surface irrégulière accompagnée d'une augmentation de leur volume (figure 54,55).À l'exception d'une chienne qui présentait un cycle anovulatoire avec un taux de progestérone stable et un aspect échographique caractéristique d'une période pré ovulatoire sans que cette dernière ne se produise.

Il faut signaler que 87,5% (7/8) des chiennes ont présenté des chaleurs fertiles avec des gestations. Ces gestations ont été confirmées par échographie en moyenne au jour 12 après la dernière saillie.

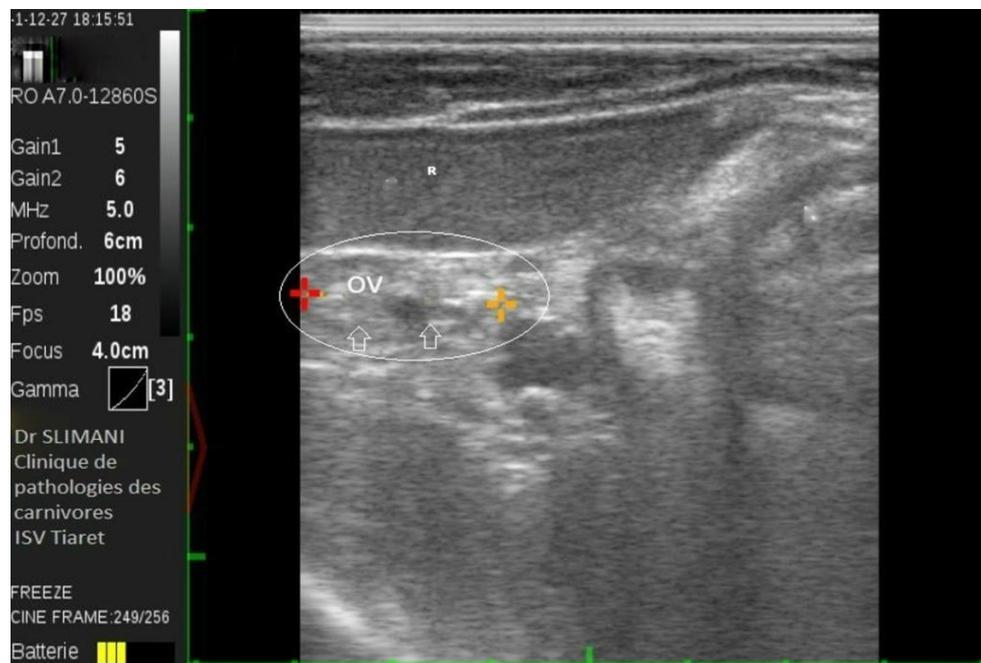


Figure 54: Vue échographique longitudinale de l'ovaire, stroma ovarien hyperéchogène et présence d'une petite cavité hypoéchogène, diamètre ovarien de 17mm. Cet aspect échographique indique l'absence d'une activité ovarienne liée à un anœstrus. OV: ovaire; R: rate. (Dr Slimani khaled mabrouk).



Figure 55 : vue échographique en coupe longitudinale de l'ovaire en période pré-ovulatoire montrant un parenchyme de texture homogène dominé par un stroma ovarien hypoéchogène à la main présence d'une petite cavité hypoéchogène (follicules pré-ovulatoires), diamètre de l'ovaire avoisine les 23mm .Cet aspect échographique indique la présence d'une activité folliculaire liée à un œstrus. OV: ovaire; F: follicule. (Dr Slimani khaled mabrouk).

Dans le groupe qui comprenait 11 chiennes berger de l'atlas les résultats étaient comme suit : Avant le début du traitement, toutes nos chiennes présentaient un stade de metœstrus tardif (fin) confirmé par cytologie vaginale. La cytologie a révélé un frottis basophile avec peu d'agrégats de petites cellules intermédiaires et parabasales ainsi que des leucocytes avec absence de globules rouges. Cet aspect en cellulaire du frottis ressemble fortement à un début d'anœstrus. Le diamètre des ovaires était de $11.7 \text{ mm} \pm 1.28 \text{ mm}$ et l'aspect échographique des ovaires était comparable à celui du cortex rénal.

Le prœstrus était systématiquement induit chez 81.8% (9/11) des chiennes. Le début d'apparition des pertes vulvaires des étaient variable d'une chienne à l'autre. Ainsi, 22.2% (2/9) des chiennes ont présenté ces pertes après 26 jours de traitement. 33.3% (3/9) après 40 jours et 44.4% (4/9) après 48 jours de traitement, avec une moyenne de 40 ± 8 jours.

81.8% (9/11) de nos chiennes ont présenté une corrélation chronologique positive entre l'éosinophile et l'augmentation du diamètre des ovaires au cours de la période située entre le 5^{ème} jour du prœstrus et le milieu de l'œstrus qui coïncide avec la période de l'ovulation. Le diamètre des ovaires était égal à $18.4 \pm 1.69 \text{ mm}$ et correspondait à un indice éosinophile autour de 90% chez 81.8% (9/11) des chiennes au moment de l'ovulation. Deux chiennes n'ont

pas présenté de pertes vulvaires et l'examen des ovaires et les frottis vaginaux n'ont montré aucun changement indiquant l'induction des chaleurs.

Une variabilité dans le moment d'expression du pic de l'indice éosinophilique a été observée. 33.3% (3/9) des chiennes ont exprimé ce pic entre 6^{ème} et le 11^{ème} jour des chaleurs, 55.5% (5/9) des chiennes entre le 12^{ème} et le 15^{ème} jour des chaleurs et 11.1% (1/9) des chiennes entre le 18^{ème} jour et le 20^{ème} jour des chaleurs.

Pour déterminer l'existence d'un remaniement ovarien induit par ce traitement et pour estimer le moment de l'ovulation, nous nous sommes basés sur les changements échographiques qui se produisaient dans l'ovaire (l'augmentation du volume et de l'aspect du stroma ovarien) et le moment d'expression du pic de l'indice éosinophilique ; de ce fait 81.8% (9/11) des chiennes ont montré une apparence de plus en plus anéchogène de leurs ovaires avec une surface irrégulière accompagnée d'une augmentation de leur volume entre le 5^{ème} jour du proœstrus et les 6 premiers jours de l'œstrus 81.8% (9/11) des femelles ont ovulé approximativement entre le 14^{ème} +/- 1 jour et le 16^{ème} jour +/- 1 jour des chaleurs.

Nous avons déterminé cliniquement la durée des deux phases de chaleur, à savoir le proœstrus et l'œstrus, afin d'identifier les particularités, sachant qu'il s'agit de la chaleur induite par un traitement. 55.55% (5/9) des chiennes ont présenté un proœstrus. Avec une durée de 11 +/- 2.4 jours; 44.44% (4/9) des chiennes ont présenté un proœstrus d'une durée de 6 ± 1,4 jours. 77% (7/9) des chiennes avaient un œstrus d'une durée de 8 +/- 1.5 jours, 22.22% (2/9) des chiennes ont présenté un œstrus d'une durée de 12 jours. Le taux de la gestation était de 100% (9/9) des chiennes, cette dernière était diagnostiquée par échographie à partir du 3^{ème} jour après le dernier accouplement.

4.3.8 Discussion

4.3.8.1 Protocole du suivi des chaleurs

D'abord, les chiennes incluses dans l'étude étaient à grands nombre soit 39 chiennes de différentes races étant donné l'activité de la clinique qui reçoit différentes races de chiens.

La chienne dont le suivi des chaleurs comprenait un dosage de la progestérone, étaient toutes des races de chien atlas bergers. Ce choix est basé sur le fait qu'il y a peu ou pas d'étude concernant la reproduction dans cette race de chien en Algérie.

Concernant le dosage de la progestérone, la non-disponibilité au niveau de notre établissement d'équipement nécessaire pour le dosage hormonal nécessaire, il fallait donc réaliser un dosage quantitatif dans un laboratoire privé dont l'équipement était étalonné en fonction de l'espèce canine et qui exigés de réaliser le dosage que sur 8 chiennes. Il fallait également coïncider le moment du prélèvement avec la disponibilité dans le temps du laboratoire. De ce fait le nombre des animaux concernés par le dosage de la progestérone était de 8 chiennes.

Durant cette étude 500 lames étaient rassemblées, des ajustements ont dû être effectués au cours de la lecture, car des frottis ont dû être éliminés pour cause de problème de coloration et certains pour cause d'un défaut d'écouvillonnage vu que certaines chiennes étaient agitées voire agressives et rendez la tâche difficile. Ces deux faits nous ont amenés à éliminer 33 lames.

La résolution de l'écran de l'échographe utilisé pour la visualisation des ovaires n'a pas permis d'observer correctement le follicule ovarien, nous avons donc fait référence à la détermination du diamètre de l'ovaire dans son intégralité plutôt que de déterminer celle des follicules ovulatoires.

4.3.8.2 Durée des chaleurs et moment de l'ovulation

64.1% (25/39) des chiennes du groupe I ont ovulé entre le 12^{ème} et le 16^{ème} jour après le début des chaleurs avec une moyenne au 10^{ème} +/- 2 jours après le début des chaleurs ; 75% (6/8) des chiennes ont ovulé entre le 12^{ème} et le 15^{ème} jour des chaleurs en moyenne au 13^{ème} +/- 0.5 jour des chaleurs, cela semble en accord avec l'étude de Van Haaften (1989) qui confirme que les chiennes ovulent en moyenne au 12^{ème} jour des chaleurs.

Cependant Badinand (1993) rapport qu'il existe une variabilité du moment de l'ovulation d'une chienne à l'autre et d'un cycle à l'autre pour une même chienne. Van Haaften *et al.* (1989) citent un intervalle de 6 à 21 jours. England & Concannon (2002) rapportent que l'ovulation peut avoir lieu entre le 5^{ème} et 30^{ème} jour après le début des chaleurs ; cette variabilité était constatée chez nos deux groupes de chiennes avec un intervalle allant du 6^{ème} au 16^{ème} jour des chaleurs dans le groupe 1 et de du 12^{ème} au 20^{ème} jour après le début des chaleurs.

Nous avons constaté un léger écart de données entre les groupes I et II quant à l'estimation du moment de l'ovulation par l'estimation de l'indice éosinophilique, cela peut s'expliquer par l'existence d'une grande variabilité dans le moment de l'expression du pic de l'indice éosinophilique et la durée de maintien d'un indice éosinophilique élevé, ce qui peut amener à surestimer ou sous-estimer dans le temps le moment de l'ovulation; Plusieurs auteurs confirment cette observation; England & Concannon (2002) on peut avoir un IE proche de 100% et être entre 9 et 2 jours avant le moment l'ovulation. Chez certaines races, les images cellulaires obtenues ne sont jamais caractéristiques d'un œstrus. Dans d'autres races, les images évoquant un frottis d'œstrus sont souvent obtenues très précocement au cours des chaleurs, alors que la chienne est loin d'être prête (Fontbonne, 1996).

Guerin *et al.* (1996) montrent que les frottis vaginaux sont de bons indicateurs du déroulement des chaleurs, mais sont insuffisants pour la détermination de la période ovulatoire. De même Van Haften *et al.* (1989) rappellent que l'index éosinophilique permet de bien détecter l'œstrus, mais pas l'ovulation. D'après Concannon *et al.* (1989), l'index éosinophilique peut atteindre des valeurs maximales pendant une large période allant de 8 jours avant à 2-3 jours après le pic de LH.

Cela va de même pour la détermination de la taille des ovaires pour situer le moment de l'ovulation chez les chiennes du groupe I par rapport au groupe II; cela est probablement lié à l'existence de difficultés en ce qui concerne la détermination exacte de l'ovulation; Chez nos chiennes, nous avons remarqué que l'aspect des ovaires en période pré-ovulatoire est difficilement différenciable de la période post ovulatoire. Il peut parfois être difficile de différencier les follicules pré ovulatoires et les jeunes corps jaunes (Hayer *et al.* 1993; England *et al.* 2003). Notant également que la taille de certaines de nos chiennes et leur poids, rendaient le repérage des ovaires difficiles.

La qualité de l'image échographique fournie par notre matériel échographique ne permettait pas de visualiser clairement les follicules nous nous sommes référés à l'évolution de la taille des ovaires et le changement de leur aspect échographique. On considérait donc que l'ovulation a eu lieu quand les images sphériques anéchogènes et de grande taille disparaissent pour être remplacées par des structures de petite taille rendant l'ovaire moins hypoéchogène que durant la période pré ovulatoire. Ces observations sont en accord avec celles de Concannon *et al.* (2001) qui recommande d'utiliser des sondes linéaires ou curvilinéaires à haute fréquence (8 à 10 MHz) pour mieux visualiser le remaniement ovarien à l'ovulation.

Fontbonne & Malandain (2006) constatent que dans certains cas, on n'observe pas de disparition brutale des cavités folliculaires, ils démontrent que l'examen échographique des ovaires augmente de seulement 10% la précision de détection de l'ovulation par rapport au dosage de la progestérone. Ils estiment également que la détection de l'ovulation peut être réalisée avec un échographe de qualité standard, en effectuant un examen quotidien, pour les chiennes de poids inférieur à 25 kg. En revanche, pour les plus grands gabarits ou pour les chiennes obèses, il semble nécessaire d'utiliser un échographe de qualité supérieure. D'après Hayer (1993), l'échographie n'est utile que pour suivre le développement des follicules et du corps jaune, mais au moment de l'ovulation, il n'y a que très rarement (2 cas sur 15 suivis échographiques journaliers) des modifications claires et significatives des images échographiques.

Cela nous amène dans notre étude à mettre le point sur les limites que présente l'étude des frottis et l'échographie des ovaires qui restent fiables dans le diagnostic des chaleurs mais pas assez précis dans la détection du moment de l'ovulation, d'où la nécessité de combiner ces deux techniques au dosage de la progestérone. L'utilisation des frottis vaginaux doit donc toujours se faire parallèlement aux dosages de progestérone (Wright, 1990).

Le cas d'une chienne du groupe II illustre bien cette nécessité d'associer l'étude du frottis et l'examen échographique au dosage de la progestérone, vu que cette dernière a présenté une courbe de la progestéronémie stable comprise entre 8.78 nmol/L et 9 nmol/L durant toute la période du suivi malgré un indice éosinophilique et un diamètre ovarien qui progressé dans le temps, l'aspect échographique des ovaires indiquant un état pré ovulatoire. En écartant des déficiences liées à une erreur de dosage par la réalisation de plusieurs dosages comparatifs ; cette chienne présentait un cycle anovulatoire.

Durant le suivi des chaleurs chez l'ensemble des chiennes, aucune discordance entre les images des frottis et le stade réel du cycle, n'a été constaté. Toutes nos chiennes de l'étude ont présenté une courbe de l'indice éosinophilique corrélée entre la progression de l'indice éosinophilique et le stade du cycle associée à une évolution chronologique positive de l'indice éosinophilique et l'évolution de la taille des ovaires ; Contrairement à Guerin (1997) qui mentionne qu'on observe souvent des discordances entre l'image du frottis vaginal et le stade réel du cycle de la chienne.

L'absence de cette discordance a permis de déterminer le passage du proœstrus à l'œstrus en accord avec Guerin *et al.* (1996) qui citent que les frottis vaginaux sont de bons indicateurs du déroulement des chaleurs, mais sont insuffisants pour la détermination de la période ovulatoire. De même Van Haaften *et al.* (1989) rappellent que l'index éosinophilique permet de bien détecter l'œstrus, mais pas l'ovulation.

Nous n'avons pas constaté deux pics de kératinisation comme le mentionnent Hewitt & England (2000), selon eux, il y a généralement au cours des chaleurs deux pics de kératinisation. Nous avons constaté chez toutes nos chiennes une évolution de l'indice éosinophilique durant l'œstrus similaire aux observations de Guerin (1997) qui mentionne que le premier jour d'œstrus présente un index éosinophilique de 20 à 50%, il est supérieur à 50% le deuxième jour.

Le moment de l'expression du pic de l'indice éosinophilique (IE) en rapport avec le début des chaleurs (Le jour de l'apparition des pertes vulvaires étant le premier jour du cycle) était variable d'une chienne à l'autre. Le premier groupe, le moment de l'expression du pic de l'indice éosinophilique (IE) en rapport avec le début des chaleurs (Le jour de l'apparition des pertes vulvaires était le jour du début des chaleurs) était variable d'une chienne à l'autre, 48.7 % (19/39) des chiennes ont manifesté ce pic au 7^{ème} jour du cycle ; 20.5 % (8/39) des chiennes au 5^{ème} jour du cycle et 7.6 % (3/39) respectivement au 8^{ème} ; 10^{ème} ; 11^{ème} et le 15^{ème}. Dans le groupe II, 75% (6/8) des chiennes exprimaient ce pic entre le 12^{ème} et le 15^{ème} jour des chaleurs, 12.5% (1/8) des chiennes au 10^{ème} jour des chaleurs et 12.5% (1/8) des chiennes au 20^{ème} jour des chaleurs.

4.3.8.3 Suivi des chaleurs après induction

4.3.8.3.1 Dans le cas des chiennes présentant un anœstrus tardif

a. Durée de la chaleur et moment d'ovulation

La cytologie vaginale a révélée de petits amas de cellules parabasales avec absences de globules rouges et de cellules leucocytaires ce profil cellulaire indiquait un anœstrus sur frottis lu en utilisant un grossissement de x100 pour toutes les 8 chiennes. L'examen clinique a montré que toutes les chiennes étaient en bonne santé. Le frottis d'un anœstrus est pauvre en cellules (Neveux, 1999). Les cellules parabasales et les petites cellules intermédiaires sont

prédominantes sur des frottis d'anœstrus (Concannon & Digregorio ,1987 ; Concannon ,2011).

L'examen échographique n'a révélé aucune anomalie particulière sur les ovaires qui était d'une échogénicité très homogène et proche à celle du cortex rénal, ainsi qu'aucune anomalie de l'utérus n'a été détectée chez toutes les chiennes avant le début du traitement. Au cours de l'anœstrus, les ovaires ont une échogénicité similaire à celle des structures voisines et les structures folliculaires sont petites, souvent inférieures à 1 mm (Concannon *et al.* 2002). Les ovaires sont petits et pas très visibles. Ils ont une échogénicité homogène similaire à celle du cortex rénal. Cependant, à la fin de l'anœstrus, à 30 jours ou plus du début du proœstrus, les ovaires hypoéchogènes ont tendance à augmenter et de petites cavités folliculaires de un à deux millimètres de diamètre peuvent être détectées (England *et al.* 2003). Le niveau sanguin de la progestérone dans le sérum sanguin était inférieur à 2 nmol / L ce qui confirmait la présence d'un anœstrus pour toutes les chiennes.

L'induction de la chaleur chez la chienne est réalisée en cas d'impubérisme pendant 24 mois ou en cas d'absence de chaleur pendant plus de 10 mois. L'utilisation de substances dopaminergiques est recommandée comme traitement de première intention de l'anœstrus pathologique (> 7 mois d'interœstrus) (Pierson & Buff, 2009).

Chaque chienne a reçu la dose orale prescrite de 1.25 mg / 15 kg de poids corporel par jour jusqu'à l'apparition de pertes vulvaires. Les antiprolactiniques sont des agonistes dopaminergiques qui inhibent la sécrétion de prolactine par la sécrétion de dopamine ou la suppression de la sécrétion de sérotonine. L'utilisation de certains antiprolactiniques pendant la pseudo-lactation diminue l'intervalle inter-œstral des chiennes traitées (Beijerink, 2003 ; De Gier ,2008 ; Pierson & Buff, 2009). L'utilisation d'agonistes dopaminergiques en anticipation de l'œstrus (moins de 7 mois après la dernière chaleur) est très décevante (Fontbonne, 2008).

Pendant la période de traitement, chaque chienne était consultée tous les 15 jours; ce contrôle incluait la réalisation de frottis vaginaux afin de détecter tout changement dans la structure cellulaire de la muqueuse vaginale.

Au cours des 15 derniers jours avant l'apparition des chaleurs, de petites cellules intermédiaires et de grandes cellules intermédiaires sont apparues progressivement sur le frottis, indiquant des changements évidents dans la muqueuse vaginale qui témoignent de

l'existence d'un remaniement ovarien induit par la molécule administrée. Guerin *et al.* (1996) rapportent que les frottis vaginaux sont de bons indicateurs dans la surveillance des chaleurs mais sont insuffisants pour la détermination de la période ovulatoire. De même, Van Haaften *et al.* (1989) souligne que l'index éosinophilique permet de bien détecter l'œstrus mais pas l'ovulation.

Contrairement à la bromocriptine (Parlodel®, molécule dopaminergique) ou à la cabergoline (Galastop®, une molécule anti-sérotoninergique et dopaminergique), le metterolol (Contralac®, une molécule anti-sérotoninergique) n'induit pas d'œstrus. L'effet dopaminergique central des antiprolactiniques qui semble agir favorablement au cours de cet effet induisant la chaleur. Leur efficacité dans le déclenchement de l'œstrus dépend de la dose, de la durée du traitement (Beijerink, 2003 ; De Gier ,2008 ; Pierson & Buff, 2009).

Nous avons noté l'apparition des pertes vulvaires indiquant le début des chaleurs à différents moments du traitement ; 25% (2/8) des chiennes ont présenté des pertes vulvaires après 21 jours de traitement ; 37,5% (3/8) ont montré les chaleurs après 35 jours. 37,5% (3/8) ont présenté des pertes vulvaires au 40^{ème} jour du traitement, avec une moyenne de 32 +/- 10 jours (figure 47, 48 ,52). Le proœstrus et l'œstrus ont été confirmés par lecture des frottis vaginaux et l'augmentation de l'indice éosinophilique était compatible avec la manifestation de la chaleur (Photos 52 ,53).

Dumon (1992) rapporte que les chaleurs est obtenue après 30 à 40 jours de traitement par la bromocriptine (Parlodel®) à la posologie de 20 µg / kg deux fois par jour. Son efficacité dans le déclenchement de l'œstrus dépend de la dose, de la durée du traitement et du stade anœstrus.

Les deux antiprolactiniques les plus utilisés sont la cabergoline à la dose de 5µg / kg / jour jusqu'à l'obtention du proœstrus, habituellement pendant 3 semaines et la bromocriptine 20-50 µg / kg deux fois par jour jusqu'à l'obtention du proœstrus, habituellement pendant 4 semaines (Beijerink, 2003 ; De Gier ,2008 ; Pierson & Buff, 2009).

Une corrélation chronologique positive a été observée entre l'index éosinophilique et l'augmentation du diamètre des ovaires au cours de la période située entre le 5^{ème} jour du proœstrus et le milieu de l'œstrus qui coïncide avec la période d'ovulation. Le diamètre des ovaires était égal à 19 +/- 2,07 mm et correspondait à un indice éosinophilique égal ou supérieur à 80% chez 100% (8/8) des chiennes au moment de l'ovulation.

Une corrélation positive a été observée entre la progression du taux de progestérone et l'indice éosinophilique (IE) au cours de la période située entre le 5^{ème} jour du proestrus et le milieu de l'oestrus qui coïncide avec la période d'ovulation.

Le niveau de progestérone au moment de l'ovulation était situé entre $21,04 \pm 14,53$ nmol / L et $33,15 \pm 15,16$ nmol / L chez 7 femelles. A l'exception d'une chienne qui présentait un taux de progestérone stable de 9 nmol/L durant toute la période de chaleurs indépendamment de l'augmentation de l'indice éosinophilique.

England & Concannon (2002) rapportent que l'ovulation peut se produire entre le 5^{ème} et le 30^{ème} jour après le début de la chaleur. L'utilisation des frottis vaginaux doit être complétée par la détermination du taux de progestérone (Wright ,1990; Concannon ,2011).

Fontbonne & Malandain (2006) montrent que l'examen échographique des ovaires n'augmente que de 10% la précision de la détection de l'ovulation par rapport au dosage de la progestérone. Ils estiment également que la détection de l'ovulation peut être réalisée avec un échographe de qualité standard en pratiquant un examen quotidien pour les chiennes de poids inférieur à 25 kg. Par contre pour les chiennes grandes ou obèses, il semble nécessaire d'utiliser un échographe de qualité supérieure.

Marseloo (2004) rapportent qu'il existe une bonne corrélation entre les valeurs de la progestérone et l'aspect échographique des ovaires au cours du suivi des chaleurs.

Le vomissement était le seul effet secondaire lié au traitement observé chez cinq chiennes, ce symptôme disparaissant après 10 jours de traitement. Pierson & Samuel (2009) rapportent que les effets secondaires les plus observés sont les vomissements survenant entre 3% et 25% après un traitement avec des antiprolactiniques.

D'autre part, nous n'avons pas observé de décoloration des poiles, liée à l'utilisation de la bromocriptine, contrairement à la cabergoline, qui induit une décoloration transitoire du pelage chez 25% des chiennes qui reçoivent cette molécule pendant 14 à 45 jours (De Gier *et al.* 2008 ; Pierson & Samuel, 2009).

Les ovulations se sont produites entre le 12^{ème} et le 15^{ème} jour de chaleurs. 75% (6/8) des femelles ont ovulé entre le 12^{ème} et le 15^{ème} jour des chaleurs lors du 13^{ème} jour des chaleurs. Les femelles ovulent en moyenne au 12^{ème} jour des chaleurs (Van Haaften *et al.* 1989).

12.5% (1/8) des femelles ont ovulé au 20^{ème} jour des chaleurs. Dans une étude sur les chiennes de toutes races (nombre non déterminé), seulement 13.3% des femelles ovulent entre la 16^{ème} et la 25^{ème} des chaleurs (Doucet & Vannimendus 2001).

Il y a une variabilité dans le moment de l'ovulation d'une chienne à l'autre et d'un cycle à l'autre pour la même chienne (Badinand *et al.* 1993).

Van Haaften (1989) rapportent un intervalle de 6 à 21 jours de l'ovulation. England & Concannon (2002) rapportent que l'ovulation peut se produire entre le 5 et le 30^{ème} jour après le début des chaleurs. Cette variabilité a été observée chez nos chiennes avec un intervalle d'ovulation de 12 à 20 jours après le début des chaleurs.

Nous n'avons pas observé de différence significative entre l'évolution de l'index éosinophile et celle du niveau de progestérone pendant la chaleur, sauf pour une chienne qui présentait un niveau de progestérone stable située entre 8.78 nmol / L et 9 nmol / L durant toute la période de chaleurs malgré une évolution significative de son index éosinophilique et du diamètre de ses ovaires qui indiquait l'approche de l'ovulation. Ceci nous amène à conclure que l'index éosinophile ainsi que le diamètre des ovaires sont de bons témoins pour la détermination des phases de la chaleur mais pas de l'ovulation.

Plusieurs auteurs confirment cette observation, England & Concannon (2000) rapportent que l'on peut avoir un indice éosinophile proche de 100% et se situer entre 9 et 2 jours avant l'ovulation. Chez certaines races, les frottis obtenus ne sont jamais caractéristiques d'un œstrus. Chez d'autres races, les frottis caractéristiques de l'œstrus sont souvent obtenus très tôt pendant les chaleurs où la femelle est loin d'être prête à ovuler (Fontbonne, 1993).

Guerin (1996) rapportent que les frottis vaginaux sont de bons indicateurs dans la surveillance des chaleurs mais sont insuffisants pour la détermination de la période ovulatoire. De même, Van Haaften (1989) soulignent que l'indice éosinophile permet de bien détecter l'œstrus, mais pas l'ovulation.

Il était facile de suivre avec précision l'évolution du diamètre des ovaires au cours du præstrus et de l'œstrus; cependant, la distinction échographique des follicules pré-ovulatoires était difficile. Il en va de même pour la différenciation entre la phase pré-ovulatoire et post-ovulatoire. Il peut parfois être difficile de distinguer les follicules pré-ovulatoires et le corps jaune (Hayer *et al.* 1993 ; England *et al.* 2003). De ce fait, il est nécessaire de combiner ces

deux techniques avec le dosage de la progestérone. L'utilisation des frottis vaginaux doit être complétée par la détermination du taux de progestérone (Wright ,1990).

Il est important de noter que la taille et le poids de certaines chiennes ont rendu difficile la localisation des ovaires lors des examens échographiques, ajoutant à cela la qualité de l'image échographique qui n'a pas permis de visualiser clairement les follicules. Ce fait nous obligeait à nous concentrer sur la détermination de la taille et de l'aspect échographique des ovaires. Au cours de cette étude, nous avons déterminé le moment de l'ovulation où les grandes formes sphériques anéchogènes disparaissaient et laissé place à de petites structures qui rendaient l'ovaire moins hypoéchogène que pendant la période pré-ovulatoire (figure 55). Concannon *et al.* (2001) recommande d'utiliser sectorielle avec une fréquence élevée (8 à 10 MHz) pour visualiser le changement de l'ovaire pendant l'ovulation.

Fontbonne & Malandain (2006) notent que dans certains cas la disparition des cavités folliculaires, ne s'observe pas. Ils montrent que l'examen échographique sur les ovaires n'augmente que de 10% la précision de détection de l'ovulation par rapport au dosage de la progestérone. Ils estiment également que la détection de l'ovulation peut être réalisée avec un échographe de qualité standard en pratiquant un examen quotidien pour les chiennes de poids inférieur à 25 kg. Par contre pour les chiennes grandes ou obèses, il semble nécessaire d'utiliser un échographe de qualité supérieure. Hayer (1993) notent que l'échographie n'est utile que pour suivre le développement des follicules et du corps jaune mais qu'au moment de l'ovulation il y a très rarement des modifications claires et significatives des images échographiques.

Les populations cellulaires observées sur les frottis vaginaux correspondaient parfaitement à la phase de chaleur de toutes nos chiennes. Toutes nos chiennes avaient une évolution chronologique appositive de l'index éosinophilique et du diamètre des ovaires. Guerin (1997) indique l'existence de différences entre les frottis cervicaux et l'étape réelle du cycle de la chienne. Dans une autre étude, Guerin (1997) rapporte que les frottis cervicaux sont de bons indicateurs de la chaleur mais insuffisants pour la détermination de la période ovulatoire. Van Haaften (1989) précisent que l'indice éosinophile permet de bien détecter l'œstrus mais pas l'ovulation.

Selon Hewitt & England (2000), il y a habituellement deux pics de kératinisation durant les chaleurs. Cela n'a pas été observé chez nos chiennes. Toutes nos chiennes ont présenté durant l'œstrus une évolution de l'index éosinophilique similaire aux observations de Guerin (1997)

qui rapporte que l'index éosinophilique est de 20 à 50% le premier jour de l'œstrus et qu'il devient supérieur à 50% au deuxième jour.

Le moment d'expression du pic de l'indice éosinophilique était variable d'une chienne à l'autre. 75% (6/8) exprimaient ce pic entre le 12^{ème} et le 15^{ème} jour des chaleurs et 12.5% (1/8) des chiennes à le 10^{ème} jour des chaleurs et 12.5% (1/8) des femelles au 20^{ème} jour des chaleurs. Dans une étude, Schutte (1967) rapporte que 89% des chiennes ont exprimé ce pic au 14^{ème} jour du cycle. 43% ont présenté ce pic au 10^{ème} jour du cycle. Ce pic de l'index éosinophilique apparaît entre le 8^{ème} et le 12^{ème} jour du cycle (Taradach, 1980).

b. Dosage de la progestérone

Nous avons pris comme seuil un niveau de progestérone de 23 nmol / L qui indique une ovulation. Le taux de progestérone au moment de l'ovulation chez 7 chiennes était compris entre 21.04 +/- 14.53 nmol / l et 33.15 +/- 15.16 nmol / l. Au moment de l'ovulation, les taux de la progestérone augmentent significativement de 4 à 10 ng / ml (12.72 nmol / L à 31.8 nmol / L) (Fontbonne, 1993). Le niveau de progestérone au moment de l'ovulation est passé de 5 à 10 ng / ml (15.9 nmol / L à 31.8 nmol / L) (Fontbonne, 1993).

Dans une étude sur 35 chiennes de différentes races, Marseloo *et al.* (2004) rapportent que la progestérone au jour de l'ovulation était à des niveaux constants de 6.25 +/- 1.55 ng / ml. Ce taux de progestérone est de 7.52 +/- 0.33 (ou 23.91 nmol / L +/- 1.04 nmol / L) (Wildt *et al.* 1979). Il est de 6 à 8 ng / ml (ou 19.08 nmol / L à 25.44 nmol / L) (Jeffcoate & Lindsay, 1989). Ce taux est de 7 à 9 ng / ml (ou 22.26 nmol / L à 28.62 nmol / L) (De Coster *et al.* 1979).

Nous notons que toutes ces valeurs sont donc concordantes, de sorte que l'ovulation peut être considérée comme survenue lorsque la valeur seuil maximale a été dépassée. Nous avons également noté que nos chiennes avaient une variation individuelle claire du niveau de la progestérone pendant le proœstrus jusqu'à l'ovulation. Buff & Salesse (2000) rapportent qu'il existe de très grandes variations individuelles du niveau de progestérone chez les chiennes.

87.5% (7/8) des chiennes de ce groupe présentaient une évolution chronologique positive du taux de progestérone avec l'augmentation de l'index éosinophile et celle du diamètre des ovaires à partir des 5^{ème} jours du proœstrus jusqu'au moment de l'ovulation. Marseloo *et al.* (2004) rapporte qu'il existe une bonne corrélation entre les valeurs de la progestérone et l'aspect échographique des ovaires au cours du suivi des chaleurs.

87.5% (7/8) des chiennes ont montré une courbe de progestérone qui correspond aux courbes standard des espèces canines de toutes les races (Van Haaften, 1989 ; Badinand *et al.* 1993).

Une chienne dans ce groupe avait des niveaux inchangés de progestérone pendant toute la durée des chaleurs (8.44 nmol / L et 9 nmol / L), ce qui correspond à un cycle anovulatoire. Fontbonne (1996) qui mentionne que chez certaines races, les frottis vaginaux sont systématiquement discordants avec le dosage de la progestérone.

4.3.8.3.2 Dans le cas des chiennes présentant un metœstrus tardif

a. Durée de la chaleur et moment d'ovulation

La cytologie vaginale a montré que toutes nos chiennes avaient metœstrus tardif (fin metœstrus). Le frottis du metœstrus tardif ressemble à celui de l'anœstrus et le frottis est basophile (Feldman & Nelson ,1996 ; Johnston *et al.* 2001). Dans l'étude Dore (1978), les petites cellules vaginales (parabasales et petits intermédiaires) représentent 83 +/- 11% des cellules contre 16.7 +/- 11.8% pour les grandes cellules intermédiaires et les cellules superficielles. Les cellules parabasales apparaissent cuboïdes et colonnaires (Dore, 1978). Les ovaires n'étaient pas très visibles à ce stade du cycle pendant l'anœstrus et les ovaires ont une échogénicité homogène similaire à celle du cortex rénal (Concannon *et al.* 2002). À la fin de l'anœstrus, les ovaires hypoéchogènes ont tendance à grossir (England *et al.* 2003).

Avec le dosage de bromocriptine utilisé, les chaleurs ovulatoires ont été induites en moyenne après 40 ± 8 jours de traitement avec un taux de grossesse de 100%. Nous avons noté plusieurs observations similaires à celles citées dans la bibliographie. Ces méthodes d'induction de l'œstrus peuvent nécessiter plus de 30 jours de traitement avant le début du traitement, en fonction du stade d'avancement de l'anœstrus (Kutzler, 2005).

Dans l'étude Dumon (1992), la chaleur est obtenue après 30 à 40 jours de traitement par la bromocriptine (Parlodel®) à raison de 20 µg / kg deux fois par jour. L'utilisation de certains antiprolactiniques au cours de la pseudo-lactation diminue l'intervalle d'intérêt des femelles traitées (Beijerink *et al.* 2003 ; De Gier *et al.* 2008 ; Pierson & Buff , 2009). Par ailleurs, d'autres études indiquent que l'utilisation d'agonistes dopaminergiques en prévision de l'œstrus (moins de 7 mois après la dernière chaleur) est très décevante.

Les traitements thermiques d'induction (tous non indiqués sur l'étiquette) sont d'autant plus efficaces que la chienne est en anœstrus et que cette dernière est avancée. Les

antiprolactiniques par voie orale induisent de la chaleur en 4 à 30 jours avec des taux de grossesse de 60 à 100%. Administrés sous œstrus, ils induisent une croissance folliculaire. Administrés dans le dioestrus, ils raccourcissent la durée de vie des corps jaunes, en raison du rôle lutéotrope de la prolactine, mais n'induisent pas d'œstrus dans les semaines qui suivent (Gobello, 2006 ; De Gier *et al.* 2008).

Leur efficacité dans le développement de l'œstrus dépend de la dose, de la durée du traitement et du stade de l'œstrus (Beijerink *et al.* 2003 ; De Gier *et al.* 2008 ; Pierson & Buff, 2009). L'administration d'agonistes de la dopamine induit avec succès un œstrus fertile et une ovulation spontanée chez la plupart des chiennes à différents stades de l'œstrus. Cet œstrus survient plus tôt chez les chiennes à la fin ou au milieu de l'œstrus (Verstegen *et al.* 1999).

Le suivi de l'évolution de l'indice éosinophilique ainsi que celui du diamètre des ovaires ont montré qu'ils étaient positivement corrélés au cours de la période comprise entre le 5^{ème} jour du œstrus et le milieu de l'œstrus. Des modifications de l'aspect ultrasonore des ovaires et une augmentation significative de leur diamètre ont indiqué l'approche du moment de l'ovulation, à savoir un diamètre ovarien de 18,4 +/- 1,69 mm et un indice éosinophilique d'environ 90% situé approximativement entre le 14 jour et le 16 +/- 1 jour de chaleur. Ceci est similaire aux observations de plusieurs auteurs, les chiens ovulent en moyenne le 12^{ème} jour de chaleur (Van Haften *et al.* 1989). 12,5% (1/8) des chiennes ont ovulé le 20^{ème} jour de chaleur. Dans une étude portant sur des chiennes de toutes races (nombre indéterminé), seules 13,3% des chiennes ovulent entre le 16 et le 25^e jour de chaleur (Doucet & Vannimendus, 2001).

L'ovulation peut survenir entre le cinquième et le trentième jour après le début des chaleurs (England & Concannon, 2002). Le temps d'ovulation varie d'une chienne à l'autre et d'un cycle à l'autre pour le même chien (Cirit *et al.* 2007). Toutes les chiennes dont l'œstrus a été induit par ce traitement ont développé une grossesse. Après insémination artificielle ou projection naturelle, des taux de grossesse de 83% ont été rapportés après l'induction de l'œstrus par la bromocriptine (Zöldág *et al.* 2001). Après insémination artificielle, des taux de grossesse de 75% ont été obtenus à la suite de l'induction de l'œstrus par la cabergoline (Cirit *et al.* 2007).

L'estimation du moment de l'ovulation était basée uniquement sur la détermination de l'indice éosinophilique et de l'échographie des ovaires, de sorte que le moment de sa manifestation était estimé à peu près. L'utilisation du frottis vaginal doit être complétée par la détermination

des niveaux de progestérone, car les frottis vaginaux sont de bons indicateurs pour la surveillance de la chaleur, mais sont insuffisants pour déterminer la période ovulatoire (Concannon, 2011 ; Guerin *et al.* 1996 ; Van Haaften *et al.* 1989 ; Wildt *et al.* 1979).

Le suivi de l'évolution du diamètre ovarien au cours du pro-œstrus et de l'œstrus était facile; Cependant, la distinction échographique des folécules pré-ovulatoires était difficile, de même que la différenciation entre les phases pré-ovulatoire et post-ovulatoire.

La différenciation échographique entre les follicules pré-ovulatoires et le corps jaune est parfois difficile (Hayer *et al.* 1993 ; England *et al.* 2003). L'utilisation du frottis vaginal et de l'échographie des ovaires doit être complétée par la détermination du niveau de progestérone afin de localiser correctement l'ovulation (Van Haaften *et al.* 1989).

Il est important de noter que la taille et le poids de certaines de nos chiennes et la qualité de l'échographie ne permettent pas de visualiser clairement les follicules. C'est pourquoi nous avons dû nous concentrer sur la détermination de la taille et de l'apparence des ovaires. Fontbonne & Malandin (2006) montrent que l'examen échographique des ovaires n'augmente que de 10% la précision de la détection de l'ovulation par rapport au test à la progestérone, et que la détection de l'ovulation peut être réalisée à l'aide d'un système à ultrasons. Qualité standard en effectuant un examen quotidien des chiennes de moins de 25 kg. Par contre, pour les chiennes de grande taille ou obèses, il est nécessaire d'utiliser un appareil à ultrasons de meilleure qualité. Cela a également été rapporté par Hayer *et al.* (1993). Concannon *et al.* (2001) recommandent d'utiliser une sonde linéaire sectorielle à haute fréquence (8-10 MHz) pour visualiser le changement ovarien pendant l'ovulation.

Selon Hewitt & England (2000), il existe généralement deux pics de kératinisation pendant la chaleur, cela n'a pas été observé chez nos chiennes. Toutes nos chiennes ont présenté au cours de l'œstrus une évolution de l'indice éosinophilique semblable aux observations de Guérin (1997) qui indique que l'indice est compris entre 20 et 50% le premier jour d'œstrus et qu'il dépasse 50% le deuxième jour.

Le moment d'expression du pic d'indice éosinophilique était variable d'une chienne à l'autre entre 12 et 20 jours de chaleur. Dans une étude, Schutte (1967) rapporte que 89% des chiennes ont exprimé ce pic le 14^e jour du cycle. 43% des chiennes ont montré ce pic le 10^{ème} jour du cycle. Ce pic de l'indice éosinophilique apparaît entre le 8^{ème} et le 12^{ème} jour du cycle (Taradach , 1980).

En ce qui concerne la durée des deux phases thermiques, proœstrus et œstrus, nous n'avons observé aucune différence de durée d'expression avec la chaleur naturelle. Le proœstrus peut durer de 3 à 21 jours avec une moyenne de 7 jours; l'œstrus peut durer de 3 à 21 jours avec une moyenne de 11 jours (Wildt *et al.* 1979, Concannon, 2011).

Comme tout traitement chimique, nous voulions vérifier si la bromocriptine était susceptible d'induire des effets indésirables sur nos animaux, de sorte que les vomissements étaient le seul effet secondaire observé chez cinq femelles, ce symptôme disparaissant après 10 jours de traitement. Pierson & Buff (2009) rapportent que les effets secondaires les plus courants sont les vomissements, qui surviennent dans 3 à 25% des cas après un traitement par des antiprolactiniques. La bromocriptine provoque souvent des vomissements au début du traitement et peut également provoquer une anorexie (Kutzler, 2005 ; Kutzler, 2007). Par contre, nous n'avons pas observé de décoloration des cheveux associée à l'utilisation de bromocriptine, contrairement à la cabergoline, qui induit une décoloration cutanée transitoire chez 25% des chiennes recevant cette molécule pendant 14 à 45 jours (De Gier *et al.* 2008 ; Pierson & Buff, 2009).

5. Diagnostic et suivi échographique de la gestation

Le suivi échographique de la gestation était effectué sur un nombre total de 37 chiennes réparties comme suit :

Huit chiennes de race berger de l'atlas âgées de 2 ans avec un poids de 14 à 16 kg étaient gardées en permanence au niveau du chenil du service de pathologie des carnivores ayant subi un traitement inducteur des chaleurs par l'usage de la Bromocriptine (Parlodol® 2.5mg) par voie orale, leurs chaleurs étaient suivies par cytologie vaginale, échographie des ovaires et dosage de la progestérone, elles étaient mise en contact avec un mâle pendant la période de reproduction (multiples saillies naturelle contrôlées) accompagné d'un suivi de l'évolution de leur gestation..

Une chienne de ce groupe n'a pas fait l'objet du suivi de gestation vue quelle à développée des chaleurs anovulatoires. Un diagnostic et suivi de gestations par échographie sur 30 chiennes de différentes races âgées de 8 mois à 5ans avec un poids de 10 à 35kg, ramenées régulièrement par leurs propriétaires sur rendez-vous pour diagnostic et suivi de leurs gestations, toutes ont subi des saillies naturelles multiples contrôlées, signalons que ces dernière n'ont subi aucun suivi des chaleurs au niveau de notre service .

5.1 Protocole de mise en reproduction

5.1.1 Suivi des chaleurs:

Effectuer uniquement pour le groupe des 8 chiennes gardées au niveau du service de pathologie des carnivores, par cytologie vaginale, échographie des ovaires et dosage de la progestérone, après traitement inducteurs des chaleurs (voir partie expérimentale suivi des chaleurs).

5.1.2 Saillie

Lorsqu'une chienne entre en œstrus et présente un indice éosinophilique supérieur ou égale à 80% avec un aspect échographique des ovaires qui indiquait l'approche de l'ovulation et des taux de progestérone avoisinant ou supérieurs les 23 nmol/L le moment de l'ovulation ce qui coïncide avec le milieu de l'œstrus, elle est présentée toute les 24 heures, à un mâle plusieurs jours de suite pour des saillies naturelles contrôlées, la moyenne des saillies étaient de 1 à 2 saillies /jours pendant une durée de 4 à 5 jours. Les saillies ont eue lieu dans une salle calme séparé du chenil où les chiennes étaient gardées, et afin de ne pas stressé les animaux la même personne contrôlée les saillies.

Durant la mise en reproduction des chiennes et en fonction de la race de la chiennes, 2 males des mêmes races des chiennes ont été utilisés pour la saillie, âgés de 4 ans et d'un poids estimé à 16 et 20 kg. Les males en question étaient gardés dans une salle isolée loin des femelles, pour une courte période correspondant aux saillies. La qualité de la semence des chiens en question était vérifié (mobilité et détection d'éventuelle anomalie).

5.1.3 Choix du repère déterminant le début de la gestation (J0) :

Le moment de la dernière saillie (DS) était le repère choisi pour définir le jour du début de la gestation (J0-DS) étant donné que toutes nos chiennes étaient soumises à de multiples saillies naturelles contrôlés. Nous avons jugé utile d'évaluer approximativement le moment du pic de LH afin d'établir un rapport entre le jour de la dernière saillie et le pic de LH vu que de nombreux auteurs se basent sur le pic de LH pour déterminer le début de la gestation, cela en se basant sur les critères suivants :

- " La décharge de LH a lieu en fin de pro-œstrus ou en début d'œstrus.
- " L'œstrus dure en moyenne 08 jours.
- " Un pic pré ovulatoire de LH, a lieu 48 heures avant l'ovulation.

- " La période fertile s'étend le plus souvent sur 8 jours entre le pic de LH et la fin de L'œstrus cytologique.
- " La période de fécondation qui se situe entre le 4ème et le 8ème jour après le pic de LH.

5.1.4 Matériel échographique

Il s'agissait d'un échographe transportable muni d'une sonde sectorielle mécanique avec une gamme de fréquences de 3,5- 5 MHz, et d'une autre à balayage linéaire de 3,5- 5 MHz, qui permettait d'avoir des images en coupe transversale ,frontale et sagittale à été utilisée durant toute la période de la gestation sur la totalité de notre effectif. La fréquence choisie pour les examens était de 5 MHz.

a) Caractéristiques de l'appareil :

Marque DRAMINSKI (Animal profil), portatif.

- Imagerie en mode B et B + B.
- Écran grand LCD 6,4 pouces avec haut contraste,
- Mémoire jusqu'à 200 images (avec l'enregistrement de n° de l'animal et la date de l'examen),
- Boucle vidéo (ciné loup),
- Zoom double
- Clavier de membrane, très facile à nettoyer,
- Possibilité de connecter l'appareil à un ordinateur via USB 2.0.

b) Les sondes utilisées durant notre suivi:

Principalement à balayage sectorielle pour la grande majorité des examens échographiques et parfois des coupes sont obtenues à l'aide de sondes à balayage linéaires. Il s'agissait d'une sonde mécanique sectorielle et d'une autre sonde linéaire avec gamme de fréquences de 3,5- 5,0 MHz.

c) Enregistrement des images :

Les enregistrements photographiques étaient réalisés en connectant l'appareil à un mode de stockage externe via un port USB en utilisant une clé *USB* de type ADATA 16 GO, les images sont par la suite transférées sur un ordinateur pour traitement.

5.1.5 Réalisation de l'examen échographique

5.1.5.1 Préparation et contention

La chienne est conduite dans une salle calme aménagée spécialement pour l'examen échographique et après une tonte large de l'abdomen de l'ombilic jusqu'à la région pubienne et de part et d'autre des chaînes mammaires, la chienne était mise en décubitus dorsal, une sédation était parfois nécessaire pour certaines chienne fortement agitées. Lorsque l'échographie est longue et le ventre très volumineux, la chienne se tourne dans une position intermédiaire entre le décubitus dorsal et latéral sans que l'opérateur soit gêné.

5.1.5.2 Echographie

Les échographies sont pratiquées à partir du 10^{ème} jour après la dernière saillie ; Leur fréquence est d'une échographie tous les 1 à 2 jours jusqu'à l'approche de la mise bas (figure 56).

Nous nous sommes donc efforcés à partir de J10-DS de limiter à 1 jour, l'intervalle qui séparait le jour où un élément ne pouvait pas être échographié et le jour où ce même élément était visualisé sur notre écran. Pour les organes cavitaires, nous avons arbitrairement fixé à 5 millimètres, le diamètre seuil à partir duquel une vésicule anéchogène pouvait être prise en compte sur notre écran même s'il était possible de la deviner préalablement.

Ainsi les données recueillies était formulées en calculant la moyenne +/- SD (standard déviation).

Durant les échographies les étapes suivantes ont étaient respectées :

- a. Un repérage topographique de la vessie, des reins, du rectum et des gros vaisseaux lombaires, de la chienne.
- b. Une recherche des ampoules dans l'aire périe vésicale en balayant la région pré-pubienne tout en inspectant les culs de sacs péri vésicaux et entre la vessie et les reins en plaçant la sonde latéralement aux chaînes mammaires.
- c. Un examen de l'ampoule suivant son axe longitudinal et transversal pour un examen des annexes et un suivi du développement de l'embryon.
- d. Un examen du fœtus suivant son axe transversal et longitudinal pour déterminer son évolution avec visualisation de différents organes et des parties anatomiques.



Figure 56 : salle aménagée pour la réalisation des examens échographiques

4.5.2.3 Localisation des ampoules

Dans un premier temps, nous échographions les organes abdominaux qui forment des repères topographiques. Il s'agit des reins, de la vessie, des gros vaisseaux lombaires.

Dans un deuxième temps, les ampoules sont recherchées dans l'aire péri-vésicale, en effectuant un balayage lent de la région prébupienne en plaçant la sonde latéralement aux chaînes mammaires.

Enfin, nous identifions les ampoules situées plus crânialement le long des cornes utérines, par un balayage de l'abdomen entre la vessie et les reins, entre les chaînes mammaires et latéralement à celles-ci, les conceptus sont plutôt recherchés entre la masse intestinale et la paroi abdominale.

5.1.5.3 Identification des l'ampoule

Pendant la première moitié de la gestation, l'échogénicité des différentes structures de l'œuf est examinée. Une fois que l'embryon est bien individualisé, nous procédons à des coupes échographiques suivant les axes longitudinal et transversal de l'ampoule pour examiner les annexes, puis de l'embryon pour définir les étapes de son développement.

Pendant la deuxième moitié de la gestation, les annexes sont en place, le suivi du développement fœtal était le plus intéressant, ainsi que le dénombrement de la portée. Un à deux conceptus de la même portée, sont examinés avec précision à chaque échographie. Un

balayage suivant les axes transversal et longitudinal du fœtus était nécessaire pour déterminer (visualisation de différents organes, leur croissance, les battements cardiaques, la minéralisation du squelette etc.)

5.1.5.3 Tableaux d'étude

Les différentes données sont répertoriées dans un tableau qui constitue un calendrier gestationnelle qui rapport les différents évènements du développement embryonnaire et fœtale.

5.2 Résultats

5.2.1 Diagnostic précoce de la gestation

Le diagnostic échographique précoce de la gestation était possible à J12-DS chez 2,70 % (1/37) une chienne et à J13-DS chez 8,10 % (3/37) chiennes, à J14-DS (+/-1J) chez 91,89% (34/37) (tableau 11).

Tableaux 11 : diagnostic précoce des ampoules sur un effectif de 37 chiennes

J-DS	Diamètre de l'ampoule (diagnostic précoce)	médiane	Répartition en fonction l'effectif étudié
J12-DS	4mm à 7 mm	5,5mm	2,70%
J13-DS	4mm à 7 mm	5,5mm	8,10 %
J14-DS (+/-1J)	10 et 20 mm	15mm	91,89%

5.2.2 Echographies durant la période embryonnaire

Rappelons que la période embryonnaire s'étend de J19-LH à J35-LH (EVANS HE et Christensen 1979), elle commence lors de l'implantation qui se situe entre J17-LH et J19-LH correspondant à J9-DS et J22-DS, jusqu'à J23-LH et J35-LH correspondant à J26-DS et J38-DS (Concannon *et al.* 1989), elle comprend la mise en place des annexes et l'organogenèse, jusqu'à ce que l'embryon ait acquis les caractères externes de son espèce vers J35-LH soit J27-DS (Concannon et al 1989), il est alors nommé fœtus.

a. Description des ampoules

a.1 Localisation topographique

Les ampoules échographiées étaient toutes dans l'espace péri vésical, la taille des ampoules était située de 4 à 7 millimètres à J12 et à J13-DS, leur repérage par échographie était difficile. D'autres ampoules d'un diamètre de 10 à 20 millimètres étaient observées à J14-DS (+/-1J), se trouvaient en superficie au dessus de la masse intestinale (le diamètre de l'ampoule comprenait celui de la vésicule anéchogène avec l'épaisseur de l'enveloppe échogène qui l'entourait) (figure 87).

a.2 Aspect échographique des ampoules

Les ampoules étaient constituées d'une cavité anéchogène sphérique centrale qui représente la vésicule vitelline, elle est entourée par une ceinture d'échogénicité modérée et uniforme qui est l'image du chorion en formation.

L'embryon n'était pas encore visible entre J12-DS et J14-DS (+/-1J). Sur les gestations diagnostiquées à ce stade, nous avons distingué 2 types d'images.

Les plus petites ampoules embryonnaires observées chez 10,81 % (4/37) des chiennes, elles étaient constituées d'une vésicule vitelline de 2 mm à 3 mm de diamètre, entourée d'un chorion de 3 mm à 4 mm d'épaisseur.

Entre J12-DS et J14-DS (+/-1J). Les petites ampoules échographiées étaient toutes dans l'espace péri vésical, fortement rapprochées de la de la vessie (figure 87).

Les ampoules de plus grandes tailles observées à J14-DS (+/- 1J) chez 91,89% (34/37) des chiennes et présentaient une vésicule anéchogène qui mesurait 4 à 7 mm de diamètre, entourée d'une enveloppe échogène de 5 à 8 mm d'épaisseur. Les ampoules étaient toutes dans l'espace péri vésical. Nous avons identifié deux à quarts ampoules chez 81,08% (30/37) des chiennes, sur une même image échographique. L'embryon n'était pas encore visible à ce stade.

A 13-DS (+/- 0,5 J), sur 5 gestation soit chez 13,51% (5/37) des chiennes, nous avons pu identifier 4 ampoules qui se trouvées dans un espace très restreint.

a.3 Diagnostic différentiel

Les ampoules embryonnaires ne doivent pas être confondues avec des éléments vasculaires ou intestinaux échographiés.

Une anse intestinale en coupe transversale donne une image échographique circulaire: la muqueuse et la musculuse forment un anneau hypoéchogène, entouré de la séreuse plus échogène (visible dans le plan perpendiculaire aux ultrasons), la lumière intestinale vide est un point hyperéchogène sans cône d'ombre associé. Le contenu intestinal forme une masse hyperéchogène, le péristaltisme intestinal le fait évoluer et sa migration peut être suivie un court instant sur l'écran (figure 87).

Les vaisseaux sous lombaires sont fréquemment échographiés dorsalement à la vessie. En coupe transversale, l'aorte et la veine cave caudale forment deux anneaux dont la paroi est fine et échogène et dont le contenu reste anéchogène. L'aorte est pulsatile. Lorsque ces vaisseaux sont échographiés en coupe transversale. Ils ne peuvent ainsi pas être confondus avec une ampoule embryonnaire (figure 88,89).

b. Echographie de l'embryon

L'évolution échographique de l'embryon a pu être suivie qu'à partir de J16-DS (+/-1J) chez 100% (37 sur 37) des chiennes (approximativement à J24-LH) (figure 88,89).

Entre J12-DS et J14-DS (+/-1J) (soit J20-LH et J23-LH), aucune image de l'embryon n'a pu être obtenue.

A J16-DS (+/-1J) (soit J24-LH) l'embryon était détecté sur l'écran sous la forme d'un point hyperéchogène plaqué contre le chorion, de 5 à 15 mm de diamètre.

Entre J17-DS (+/-1J) et J18-DS (+/-1J) (soit J25-LH et J26-LH) les battements cardiaques étaient reconnaissables, sous forme de mouvements pulsatiles très rapides d'un point hyperéchogène au centre de l'embryon. A ce stade le cœur n'est pas encore délimité (figure 90,91).

Entre J19-DS (+/-1J) et J20-DS (+/-1J) (soit J27-LH et J28-LH) les embryons avoisinaient les 10 mm de long il avait un aspect ovalaire à J19-DS (+/-1J) (figure 92,93).

AJ20-DS (+/-1J) ont pouvait repérer plusieurs ampoules à la fois sur l'écran, les embryons étaient accolés à une vésicule sphérique anéchogène (l'allantoïde en formation).

Entre J20-DS (+/-1J) et J21-DS (+/-1J) les embryons prenaient légèrement une forme d'un 8, ils mesuraient environ 4 mm à 6mm de long sur 2 mm à 4 mm de large à cette période les contours restaient mal définis dû à l'évolution des annexes embryonnaires autour d'eux.

Les embryons visualisé à cette période semblaient tous sont situés dans la partie médiane de l'œuf, et leurs battements cardiaques étaient nettement observés.

Entre J21-DS (+/-1J) et J22-DS (+/-1J) (soit J29-LH et J30-LH), la forme de 8 des embryons se définissaient nettement. Les deux boucles qui formaient un 8 étaient de taille et de densité quasi semblables. À cette période l'activité cardiaque en croissance était plus facilement repérable, la vésicule vitelline se rétractait par rapport au développement de l'embryon et prenait la forme d'une ligne échogène qui traversait l'ampoule (figure 94,95). Les bourgeons des membres antérieur sent étaient repérable à partir de J22-DS (+/-1J) (soit J30-LH).

A J24-DS (+/-1J) (soit J32-LH), les hémisphères cérébraux étaient détectés sous la forme petites poches anéchogène symétrique les bourgeons des membres postérieurs étaient également visibles (figure 96,97).

A partir de J25-DS (+/-1J) (soit J33-LH), une densification des contours du crâne témoignait d'une ossification des os frontaux et pariétaux. Entre J23-DS (+/-1J) et J26-DS (+/-1J) (soit J32-LH et J34-LH) les membres antérieurs et postérieurs apparaissaient nettement sur l'écran sous forme de points isolés et hyperéchogènes de part et d'autre de l'embryon (figure 98,99).

À partir J26-DS (+/-1J) l'embryon présentait la forme externes de son espèce, de ce fait il était considéré à cette période comme fœtus (figure100, 101).

c. Mise en place des annexes

c.1 Chorion

Entre J17-DS (+/-1J) et J20-DS (+/-1J) (soit J25-LH et J28-LH), le chorion était visible et entourait complètement l'œuf.

À partir de J19-DS (+/-1J) (soit J27-LH), le chorion lisse et villosité étaient différenciable simultanément avec une croissance en longueur de l'ampoule (figure 92,93).

A partir de J20-DS (+/-1J), sur une coupe longitudinale de l'ampoule, l'extrémité du placenta formaient un bourrelet d'échogénicité marquée.

Entre J22-DS (+/-1J) et J25-DS (+/-1J) (soit J30-LH et J33-LH), la ceinture placentaire était deux fois plus longue l'embryon (figure 94, 95).

Entre J30-DS (+/-1J) et J33-DS (+/-1J) (soit J38-LH et J41-LH), le fœtus était plus long que le placenta (figure 105, 106, 107,108).

c.2 Vésicule vitelline et l'allantoïde

De J14-DS (+/-1J) jusqu'à J18-DS (+/-1J) (soit J25-LH), le liquide vitellin occupait toute l'ampoule.

Entre J19-DS (+/-1J) et J21-DS (+/-1J) (soit J27-LH et J29-LH), les deux annexes se partageaient l'espace anéchogène de l'œuf sous deux aspect :

- Une poche anéchogène délimitée par une membrane échogène au milieu de l'ampoule et plaquée contre l'embryon (l'allantoïde en formation) (figure 92,93).
- Une ligne régulière échogène qui divise l'œuf en deux parties toutes deux anéchogènes qui représentaient la limite entre les deux vésicules allantoïdienne et vitelline.

Entre J20-DS (+/-1J) et 24-DS (+/-1J) (soit J28-LH et J32-LH), les deux annexes embryonnaires étaient échographiées simultanément (figure 94, 95, 96,97).

À partir de J25-DS (+/-1J) (soit J33-LH), le sac vitellin était vidé de son contenu et formait une poche tubulaire flasque, les parois du sac se plissent et flottent à la manière d'un voile.

À J27-DS (+/-1J) (soit J35-LH), la vésicule vitelline était encore plus large que l'embryon (figure 102).

c.3 Amnios

Était Visualisée à partir de J27-DS (+/-1J) (soit J35-LH), de manière irrégulière avec une échogénicité moindres que la membrane vitelline vue que sa paroi était plus fine que la paroi vitelline qui est richement vascularisée.

5.2.3 Échographie durant la période fœtale

a. Évolution des annexes fœtales

a.1 Chorion

Entre J27-DS (+/-1J) et J42-DS (+/-1J) (soit J35-LH et J50-LH), les ampoules devenaient coalescentes par leurs chorions lisses en fonction de la taille de la portée ;

A J32-DS (+/-1J) (soit J40-LH) l'épaisseur du placenta avoisinait les 3 à 4 mm.

A J37-DS (+/-1J) (soit J45-LH) l'épaisseur du placenta mesurait 6 à 9 mm.

Entre J35-DS (+/-1J) et J38-DS (+/-1J), le chorion villos se séparait du chorion lisse et formait une saillie, les zones de décollement correspondaient aux endroits de formation des hématomes marginaux (appelés bordure verte) (figure 111,112,113,114,115,116,117).

A partir de J47-DS (+/-1J) (soit J55-LH) le diamètre abdominal du fœtus se rapprochait du diamètre interne de la ceinture placentaire. Les eaux fœtales étaient refoulées vers la périphérie de l'ampoule (figure 125,126).

a.2 La vésicule vitelline

A J29-DS (+/-1J) (soit J37-LH), la vésicule vitelline était vidée de son liquide et sa paroi était épaissie par la formation (d'un réseau vasculaire) (figure 103,104).

A J32-DS (+/-1J) (soit J40-LH), le sac vitellin se rétractait au dépend de la croissance importante du fœtus, chez certaines chiennes le sac vitellin rétracté, était difficile à repérer (figure 109,110).

b. Echographie du fœtus

b.1 Mobilité du fœtus

Jusqu'à J20-DS (+/-1J) (soit J28-LH) les fœtus étaient immobiles.

De J21-DS (+/-1J) à J25-DS (+/-1J), de lentes ondulations du corps étaient repérées et constituaient les premiers mouvements du fœtus.

Entre J27-DS (+/-1J) et J35-DS (+/-1J) (soit J35-LH et J43-LH), des mouvements de type saccadés étaient observés sur les fœtus.

À partir de J29-DS (+/-1J) (soit J37-LH), les mouvements saccadés des membres étaient facilement repérables, les mouvements des mâchoires étaient observés vers J35-DS (+/-1J) (soit J43-LH).

b.2 Identification des régions anatomiques et des organes cavitaires

À partir de J29-DS (+/-1J) (soit J37-LH), le cœur était échographié au sein de l'aire pulmonaire (figure 103,104).

Entre J29-DS (+/-1J) (soit J37-LH) et J40-DS (+/-1J) (soit J48-LH) les différentes cavités cardiaques apparaissent progressivement (figure 103, 119).

À partir de J30-DS (+/-1J) (soit J37-LH) Les poumons, le foie et le diaphragme étaient visualisés (figure 105, 106, 107,108).

À J35-DS (+/-1J) (soit J43-LH), le cœur était divisé sur son axe longitudinale en deux cavités distinctes qui correspondaient aux ventricules (figure 111,112).

À partir de J40-DS (+/-1J) (soit J48-LH), toutes les cavités cardiaques étaient bien différenciées (figure 118,119).

Entre J30-DS (+/-1J) et J35-DS (+/-1J) (soit J38-LH et J43-LH), l'estomac était repérable, sous la forme d'une sphère anéchogène de 3 à 7 mm de diamètre, à gauche en partie moyenne du corps (figure 105, 112).

Entre J32-DS (+/-1J) et J35-DS (+/-1J) (soit J40-LH et J43-LH), la vessie était échographiée sous la forme d'une sphère anéchogène en région périnéale de l'abdomen (figure 109, 110,111, 112), sa taille était variable.

Entre J35-DS (+/-1J) et J40-DS (+/-1J) (soit J43-LH), les organes génitaux ainsi que les doigts (phalanges) étaient différenciés. On pouvait alors distinguer plus au moins facilement le sexe du fœtus. Nous avons apprécié la détection des organes génitaux des fœtus chez 8 chiennes ; ainsi leur détection était facile chez 6 chiennes entre J35 et J40-DS (Figure 57).

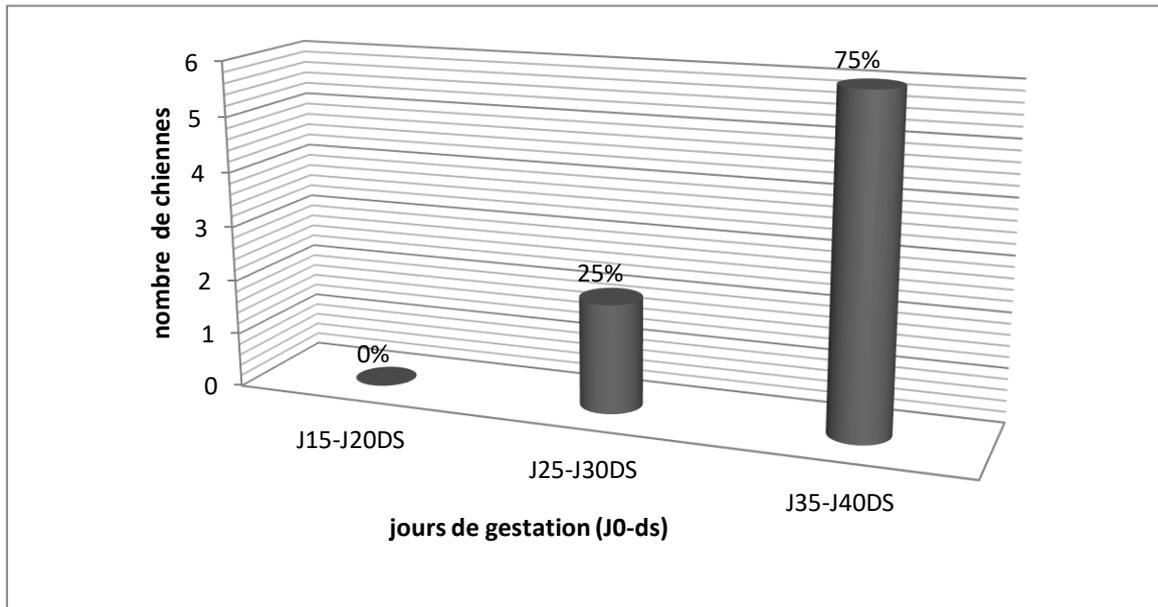


Figure 57 : moment de détection des bourgeons génitaux par échographie durant les suivis de gestation de 8 chiennes (J0-DS)

À partir de J35-DS (+/-1J) (J43-LH), les poumons étaient fortement échogènes comparés au foie, qui apparaissait moins échogène, ce dernier occupait un volume important dans l'abdomen du fœtus (figure 111,112).

Entre J29-DS et J30-DS (soit J37-LH et J38-LH), une poche anéchogène située à droite du plan médian et juste en avant de l'estomac était détectée dans l'aire hépatique et correspondait à la vésicule biliaire (figure 103,108).

Vers J38-DS (soit J46-LH), la vésicule biliaire mesurait plus de 4 mm de diamètre et devenait facilement réparable (figure 116,117)

A partir J43-DS (+/-1J) (soit J50-LH) la vésicule biliaire prenait une forme ovale (figure 120,121).

A partir J45-DS (+/-1J) (soit J53-LH) les masses intestinales étaient d'une échogénicité très hétérogène et les reins se distinguaient facilement du foie, et plus nettement durant les 15 derniers jours de la gestation (figure 123, 124, 125,126).

b.3 Gros vaisseaux

À partir J30-DS (+/-1J) (soit J38-LH), l'aorte était visualisée sous forme d'une petite cavité anéchogène à proximité des cavités cardiaques (figure 105, 106, 107,108).

À partir de J37-DS (+/-1J) (soit J45-LH) la veine cave caudale, la veine ombilicale, étaient échographiés sur des coupes transversales et longitudinales du fœtus (figure 115).

b.4 Squelette

L'ossification se déroulée d'une façon progressive durant l'évolution du fœtus

- ***Tête***

À J25-DS (+/-1J) (soit J33-LH), la faux du cerveau (falx cérébri) formait une lame échogène dans le plan médian du crâne (figure 98, 99).

Entre J26-DS (+/-1J) et J29-DS (+/-1J), le crâne prenait une forme ovale en coupe frontale avec présence deux arcs hyperéchogènes qui le délimitait latéralement (les os frontaux et pariétaux en ossification). Cette configuration du crâne permettait de visualisé les deux vésicules anéchogène (les hémisphères cérébraux) séparés par une épaisse lame échogène (la faux du cerveau).

La densification des os du crane était nettement prononcée entre J35-DS (+/-1J) (soit J43-LH) et J44-DS (+/-1J) (soit J52-LH).

Il est à noter que précocement entre J20-DS (+/-1J) et J25-DS (+/-1J) (soit J28-LH et J33-LH), chez 27,02 % (10 /37) des chiennes et à J30-DS (+/-1J) (soit J38-LH) chez le reste de l'effectif, les os de la face en cours de minéralisation était visible sur des coupes transversale sous la forme d'un cône hyperéchogène. A ce stade l'ensemble du crâne prenait l'aspect d'une tête d'insecte (figure 105, 106, 107,108).

A J30-DS (+/-1J) (soit J38-LH) les arcades zygomatiques sont marquées par un simple trait hyperéchogène qui se densifie progressivement et forment un arc de cercle à l'emplacement des orbites.

A partir de J32-DS (+/-1J) (soit J40-LH), une coupe longitudinale de la tête montrait un aspect d'un crâne de chien (figure 109, 110).

Une coupe longitudinale de la tête entre J32-DS (+/-1J) et J43-DS (+/-1J) (soit J40-LH et J51-LH) permettait la distinction nette des os de la face et du crâne, (figure109, 121).

- ***Rachis***

À partir de J29-DS (+/-1J) (soit J38-LH), sur une échographie longitudinale le rachis dessinaient une forme d'échelle et sur une coupe transversale les vertèbres étaient repérées par deux, puis trois points hyperéchogène (figure103, 104).

À partir de J38-DS (+/-1J) (soit J46-LH) l'ossification du centre du corps vertébral était observée, la minéralisation des vertèbres était dans le sens crânio-caudale (figure 116, 117).

- ***Côtes***

Chez 67,56 % (25/37) des chiennes la minéralisation du plastron costal était repérable à partir de J26-DS (+/-1J) (soit J34-LH).

Entre J28-DS (+/-1J) et J31-DS (+/-1J) (soit J36-LH et J39-LH) les cotes devenaient progressivement hyperéchogène sous la forme de cônes d'ombres qui encadrait le thorax (figure 103, 110).

A partir de J35-DS (+/-1J) (soit J43-LH), les cotes en ossification formaient des cônes d'ombre prononcés, qui gênaient considérablement l'examen (Photos 87,88), la portion ventrale des cotes de nature cartilagineuse n'était pas encore matérialisée. L'hyperéchogénicité des cotes s'étendait dorsalement en se rapprochant des vertèbres thoracique partir J42-DS (+/-1J) (soit J50-LH).

- ***Sternum***

Entre J34-DS (+/-1J) et J40-DS (+/-1J) (soit J42-LH et J48-LH), les sternèbres devenaient hyperéchogènes dans le sens crânio-caudale (figure 118, 119).

- ***Os de la ceinture scapulaires***

A partir J31-DS (+/-1J) (soit J39-LH), les scapulas formaient deux traits hyperéchogènes de part et d'autre des premières côtes, à partir de J35-DS (+/-1J) (soit J43-LH), elles formaient des cônes d'ombres (figure 109, 110, 111,112).

- ***Bassin***

A partir J34-DS (+/-1J) (soit J42-LH), les iliums dessinaient deux longues barres hyperéchogènes de part et d'autre du sacrum, qui était bien visible à J35-DS (soit J43-LH) (Photos 87,88).

Les ischions étaient visualisés à partir de J44-DS (+/-1J) (soit J52-LH) chacun formaient, un trait moitié hyperéchogène dans le prolongement de l'ilium correspondant .Le pubis n'a pas été observé (figure 122, 123).

- ***Os longs***

Vers J26-DS (+/-1J) (soit J43-LH) l'ossification des os longs des membres, était marquée par la présence d'un centre d'ossification diaphysaire hyperéchogène (figure 100,101).

A J30-DS (+/-1J) (J38-LH), l'ossification des os long était plus étendue sur la longueur de l'os (figure 105, 106, 107,108).

Vers J43-DS (+/-1J) (soit J50-LH) les extrémités des diaphyses s'évasaient (figure 120,121).

L'ossification des épiphyses n'était pas constatée.

5.2.4 Réalisation d'un calendrier gestationnel

Nous avons rassemblé les résultats dans un tableau, qui indique les dates à partir desquelles les tissus ou organes désignés pouvaient être échographiés. Nous avons construit une table qui indique les dates (standard déviation) à partir desquelles différents tissus, régions ou organes ont pu être échographiés.

Il est à noter que des variations de plus au moins 1 à 2 jours concernant le moment d'observation échographique d'un phénomène de développement (embryonnaire ou fœtale) étaient observés durant le suivi, en comparaison avec les observations de différents auteurs, cela peut s'expliquer par la variation de la durée de la gestation d'une chienne à une autre.. D'après les examens échographiques ; les différents événements et les modifications anatomiques qui caractérisent le développement embryonnaire et fœtal observé à partir du jour de la dernière saillie choisi pour déterminer étaient rassemblés sous la forme d'un calendrier gestationnel.

5.2.5 Dénombrement des fœtus

A J22-DS l'ampoule était encore de taille réduite entre 25 mm et 30 mm de long, plusieurs pouvaient être visualisés simultanément sur l'écran.

A J30-DS les fœtus mesuraient moyenne 50 à 60 mm de long, et occupaient toute la largeur de l'écran, les ampoules étaient échographiées les unes après les autres suivant le balayage échographique.

Un dénombrement des fœtus effectué sur 7 chiennes montrait que plus la portée est inférieure à 5 chiots plus le dénombrement est exacte, alors qu'il était plus difficile lorsque la portée est supérieure à 5 chiots, avec une sous-estimation systématique. Plus la gestation avançait dans le temps plus l'évaluation de la taille de la portée se rapprochait de l'exactitude. Ce dénombrement effectué sur trois périodes de la gestation nous a permis d'évaluer la taille de la portée avec exactitude sur 57 % (4 / 7) chiennes plus aisément à J30-DS .Vers J40-DS les fœtus étaient grands, très mobiles, leur ossature engendrait la formation de cônes d'ombre, et les eaux fœtales étaient refoulées aux extrémités des ampoules (tableau 12).

Tableau 12 : évaluation de la taille de la portée, comparée au nombre de chiots nés évaluation réalisée sur un effectif de 7 chiennes

Taille de la portée	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Vers J22-DS (soit J30-LH)	3	3 2	2	2	3	2	4
Vers J30-DS (soit J38-LH)	2	4 3	3	3	4	2	4
Vers J40-DS (soit J48-LH)	2	4 5	3	5	5	3	6
A la naissance	2	5 5	3	4	7	3	7

5.2.6 Durée de la gestation

Une estimation de la durée de la gestation par rapport à la taille de la portée sur 8 chiennes gardées au niveau de notre service a révélé que la durée de la gestation est en corrélation négative avec la taille de la portée (figure 58).

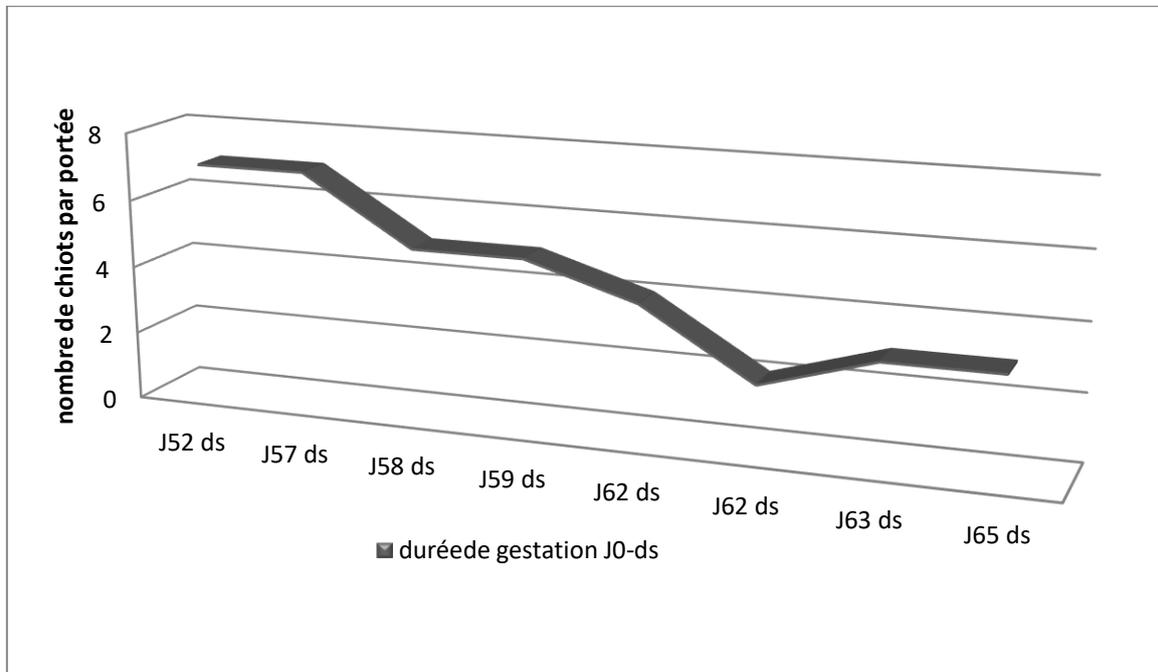


Figure 58 : variation de la durée de la gestation (repère choisie J0-DS) en fonction du nombre de la portée sur un effectif de 8 chiennes.

La durée de la gestation chez nos chiennes calculée à partir de la dernière saillie ne présentait pas une variation significative selon les races ainsi la durée de la gestation estimée sur 37 chiennes était de $59 \pm 3,8$ jour.

5.2.7 Signes physiques liés à la gestation

5.2.7.1 Modifications comportementales

100% (37/37) les chiennes présentaient une augmentation de l'appétit associée à une nette prise de poids, entre la 2^{ème} et 6^{ème} semaines de gestation.

91,89% (34 sur 37) des chiennes présentaient une réduction de l'appétit durant les 15 derniers jours avant mise bas. Une anorexie durant 3 à 4 jours avant la mise bas était constatée chez 10,81 % (4/37) des chiennes.

81,08 % (30/37) des chiennes présentaient une tendance à préférer les aliments liquides particulièrement le lait essentiellement durant la dernière semaine avant mise bas ainsi que durant la première semaine après la mise bas.

83,78% (31/37) des chiennes montraient un comportement dominé par une anxiété et une agitation avec souvent une anorexie durant les 3 derniers jours de la gestation.

Les chiennes primipares soit 72,79% (27/37) de l'effectif étudié, développaient une dysorexie avec une légère diarrhée durant la première semaine post mise-bas cela est probablement liée à des spasmes intestinaux suite à une vacuité inhabituelle post mise bas de la cavité abdominale vu que les chiennes sont primipares ; les matières fécales ont retrouvées leur aspect normal par la suite.

La miction normale durant toute la période de leur gestation chez la totalité de nos chiennes

5.2.7.2 Modifications anatomiques durant la gestation

100% (37/37) présentaient une nette augmentation progressive du poids entre la 2^{ème} la 6^{ème} semaine de la gestation.

Une adipose sous cutanée au niveau de la région abdominal était nettement visible au delà de la 6^{ème} semaine de la gestation chez nos chiennes multipares soit 29,72% (11/37). Un peut plus précocement entre la 4^{ème} et les 5^{ème} semaines chez les chiennes primipares qui représentaient 72,79 % (27/37) de l'effectif totale.

L'hypertrophie des mamelles était constatée chez les chiennes primipares qui représentaient 72,79 % (27/37) de l'effectif total à partir de J30-DS +/- 2J, ce développement mammaire était constaté plus tardivement chez les chiennes multipares à savoir 20 jours avant la mise bas.

La disproportion entre la taille de l'abdomen et celle du thorax était difficile à apprécier chez les chiennes ayant une portée de moins de 3 chiots.

100% (37/37) des chiennes présentaient une modification de la fréquence respiratoire, constater particulièrement à partir de J31-DS +/-1J. L'intensité de ce signe était en corrélation positive avec la taille de la portée.

100% (37/37) des chiennes présentaient une sécrétion lactée (liquide blanc séreux) qui était détectée à partir de J45-DS +/-3J et un peut plus précocement au environ de J40-DS +/-2J chez les primipares qui constituaient 72,79% (27/37) de l'effectif total.

5.2.7.3 Autres observation

Nous avons également observé chez les 8 chiennes gestante gardée au niveau de l'institut que la durée d'une mise bas était variable en fonction de la taille de la portée et variée entre 6 à 16 heures (la durée était plus élevée chez les primipares) et que cette durée était également en corrélation avec le nombre de chiots expulsés.

Dans la plus part des cas la mise bas était entre coupée de plusieurs phases de repos durant lesquelles la chienne ne présentait pas de contraction ces phase était d'une durée entre 15 à 120 minutes, ces phases qui correspondes à l'espace-temps entre l'expulsion d'un chiot et un autres subissait un raccourcissement de plus en plus que la mise bas progressait dans le temps.

5.3 Discussion

5.3.1 Diagnostic précoce de la gestation

Nous avons observé les premières ampoules embryonnaires à J12-DS chez une chienne soit 2,70 % des cas, à J13-DS (+/- 1J) chez 8,10 % (3/37) des chiennes, à J14-DS (+/- 1J) chez 91,89% (34/37) des chiennes. Englande *et al.* (1990) effectue les premiers diagnostics précoces de gestation à J21-LH (J0-pic de LH) et à J22-LH, le diamètre externe des vésicules embryonnaires est de 0,9 à 1,1 cm, ce qui correspond à la taille des ampoules palpées à J13-DS et à J14-DS (Concannon & Lein, 1989).

Sur 2 femelles Concannon & Lein (1989) identifient les premiers sacs embryonnaires entre J9-DS et J10-DS et les vésicules anéchogènes étaient de très petite taille de 1 millimètre de diamètre. Sur 13 chiennes, Concannon & Lein (1989) observent une croissance exponentielle des sacs embryonnaires entre J9-DS et J17-DS le sac anéchogène mesuré de 1 à 2 mm de large sur 2 à 4 mm de long (il est entouré d'une ceinture chorale de 3 mm environ).

Durant un suivi des chiennes de différentes races, un premier diagnostic de gestation positif est donné à J7-DS et l'embryon devient visible à 10 jours après la dernière saillie observée (Cartee *et al.* 1984) . Stowater *et al.* (1989) échographie les vésicules embryonnaires anéchogènes pour la première fois entre J11-DS et J25-DS. Pollet & Viaud (1988) note que la gestation est suivie à partir de J16-DS.

D'autres études rapportent des résultats qui peuvent paraître assez différents des précédents. La variation des dates est essentiellement due au choix du premier jour de la gestation ,

Yeager & Concannon (1986) indique nt que le premier diagnostic de gestation est possible à J19-LH et à J20-LH, précise également que ce résultat correspond à une découverte des ampoules entre J13 et J21 après la première saillie dans le même groupe de chiennes, et que le diagnostic le plus précoce à lieu 10 jours après la dernière saillie.

Nous retiendrons que dans le cadre de notre étude, le diagnostic échographique de la gestation était possible à partir de J12-DS et avec certitude à partir de J14-DS (+/- 1J). Nos résultats sont en accord avec ceux des auteurs précédents, avec de légères variations liées à influence de certains facteurs, citant la durée variable d'une gestation à une autre, les caractéristiques de l'échographe et de la sonde que nous avons utilisée.

5.3.2 Vitalité des fœtus:

a. mouvements cardiaques

Les premières pulsations cardiaques étaient détectées entre J17-DS (+/- 1J) et J18-DS (+/- 1J), ces battements cardiaques étaient sous forme de mouvements pulsatiles réguliers et très rapides d'un point hyperéchogène au centre de l'embryon, alors que le cœur n'était pas encore délimité, nos résultats se rapprochent ceux de nombreux auteurs.

Concannon & Lein (1989) détectent les battements du cœur entre J15-DS et J17-DS, ils sont reconnus comme un mouvement de tremblement au centre de l'embryon. Plus tardivement selon Cartee *et al.* (1984) qui repère les premiers battements du cœur des embryons à J28- DS et la mobilité des fœtus entre J34-DS et J37-DS. England *et al.* (1990) échographie les mouvements cardiaques 33 jours avant la mise bas. Concannon & Lein (1989) indique que le bulbe cardiaque est proéminent à J14-DS et à J17-DS.

b. Mouvements fœtaux

Entre J21 (+/- 1J) et J25-DS (+/- 1J) les premiers mouvements étaient repérés sous la forme de lentes ondulations du corps, et à partir de J27-DS (+/- 1J), les fœtus étaient animés de mouvements saccadés, vers J35-DS (+/- 1J) des mouvements des membres, puis des mâchoires étaient observées, ces observations correspondent à celles de Cartee *et al.* (1984) et Concannon & Lein (1989) qui signalent que la mobilité fœtale est repérable à partir de J27-DS.

c. Signes de mortalité fœtale

Sont facilement interprétées à partir des stades où les cavités cardiaques sont échographiées à partir de J32-DS selon Concannon *et al.* (1989) et que nous avons repérés précocement à partir de J29-DS (+/- 1J). Ainsi, une mort fœtale chez une chienne était identifiée à J30-DS dont l'absence d'activité cardiaque sur un cœur déjà délimité a constitué le premier élément de détection associé à une inertie du fœtus.

5.3.3 Dénombrement des fœtus

Sur 77 chiennes gestantes de toutes races Bondestam *et al.* (1984) effectuent un comptage qui se révèle exact chez 58 femelles, soit dans 75% des cas il observe que la précision de l'examen augmente à mesure que la gestation approche du terme, et que les portées de grande taille ont tendance à être sous-estimées, tandis que les portées de petite taille sont surestimées.

Ainsi, un comptage des fœtus à trois périodes de la gestation effectué sur 7 de nos chiennes montrait que plus la portée est inférieure à 5 chiots plus le dénombrement est exact et plus difficilement lorsque la portée est supérieure à 5 chiots, avec une sous-estimation systématique et que plus à gestation avance, plus l'évaluation de la taille de la portée se rapproche de l'exactitude. Nous avons pu évaluer la taille de la portée avec exactitude chez 57% (4/7) chiennes et cela plus aisément entre J30-DS et J40-DS.

Il est à signaler qu'au début de la gestation avant J22-DS (soit J30-LH), les ampoules sont petites et se ressemblent. Compter deux fois la même ampoule, ou oublier l'une d'elles semble assez facile quelque soit la taille de la portée.

La période intermédiaire située autour de J30-DS nous a paru la plus intéressante, car les fœtus étaient bien différenciés, peu mobiles, leur taille permet encore de les observer quasi entiers sur l'écran, les eaux fœtales les englobent totalement et les isolent bien les uns des autres. Les portées de grande taille restaient difficiles à dénombrer; lorsque l'utérus décrivait des circonvolutions, les ampoules les plus superficielles masquaient celles qui se situent plus profondément dans l'abdomen, et la taille de la portée était sous-estimée. En fin de gestation vers J47-DS (soit J55-LH) et après, il nous a paru délicat de dénombrer les portées de grande taille du fait de la raréfaction des eaux fœtales, de la gêne procurée par les cônes d'ombre et de l'intrication des fœtus. En revanche, les portées de petite taille pouvaient être confortablement inspectées à ce stade.

Ces résultats correspondent aux conclusions auxquelles aboutissent Bondestam *et al.* (1984) et Toal *et al.* (1986) qui citent que l'estimation de la taille de la portée est d'autant plus fiable que celle-ci est petite et la limite serait une portée de 4 à 5 chiots. Concannon *et al.* (1989) précisent que c'est entre J28-LH et J35-LH, et entre J20-DS et J27-DS que le dénombrement des fœtus est le plus facile et que les différentes parties du corps fœtal deviennent clairement visibles à l'échographie, à partir de J40-LH, et à partir de J32-DS.

5.3.4 Datation de la gestation

5.3.4.1 Données morphologiques et anatomiques

La plupart des modifications échographiques du développement que nous avons mentionnées précédemment dans les résultats, reflètent les étapes décrites par (Evans & Christensen, 1979) et (Concannon *et al.* 1989) lors de leur son étude anatomique (le modelage du corps, la croissance de certains organes internes ou la minéralisation osseuse).

a. Période embryonnaire

Plusieurs auteurs citent que la durée de cette période est située entre J11-DS et J13-DS (Concannon & Lein, 1989) entre J20-LH et J22-LH, entre J12-DS et J14-DS (Yeager & Concannon, 1986 ; Yeager & concannon, 1990) , entre J7-DS et J9-DS (Cartee *et al.* 1984), Stowater *et al.* (1989) mentionnent une période plus longue à savoir entre J16-DS et J24-DS.

L'ampoule contenant l'embryon sous une forme encore mal définie, s'observe entre J23-LH et J25-LH, entre J15-DS et J17-DS (Yeager & Concannon, 1986 ; Yeager & concannon, 1990) et à J17-DS (Stowater *et al.*1989), à J10-DS (Cartee *et al.* 1984), entre J19-LH et J22-LH, entre J10-DS et J25-DS (Concannon *et al.*1989). Nos résultats ont suggéré qu'avant J14-DS (+/-1J) l'embryon n'était pas encore visible à ce stade, l'évolution échographique de l'embryon a pu être suivie qu'à partir de J16-DS (+/-1J) qui apparaissait sous la forme d'un point hyperéchogène plaqué contre le chorion, de 2 à 3 mm de diamètre.

La distinction entre la tête et le tronc se manifeste sur une coupe longitudinale de l'embryon entre J35-LH et J40-LH, à J35-LH, à J27-DS, entre J34-DS et J37-DS et à 1 semaine après la première visualisation de l'embryon (Stowater *et al.* 1989).

Cette distinction avait été observée plus précocement entre J21-DS (+/-1J) et J22-DS (+/-1J), l'embryon présentait à cette période une tête volumineuse et un corps indifférencié les deux boucles du 8 étaient de taille et de densité quasi semblable.

b. Période fœtale

À J32-DS et à J40-LH les contours de l'embryon sont bien nets, la tête et le corps se différencient, le crâne et les vertèbres génèrent des cônes d'ombre, les gros vaisseaux, les cavités cardiaques ainsi que les valvules sont échographiées (Concannon *et al.* 1989 ; England *et al.* 1990). À J35-DS (+/-1J) le cœur était divisé sur son axe longitudinal en deux cavités distinctes qui correspondait aux ventricules.

Le foie, les poumons et l'estomac, sont visualisés après J37-DS et à J45-LH ; dans les 10 derniers jours, la vessie, les reins, le cordon ombilical et ses vaisseaux et la vésicule biliaire sont observés (Concannon *et al.* 1989 ; England *et al.* 1990).

Cartee *et al.* (1984) indiquent qu'à partir de J42-DS, le foie, l'estomac et le cœur, sont échographiés, les doigts et les organes génitaux, à J43-DS, les vertèbres sont hyperéchogènes, à 47-DS les mêmes centres d'ossification sont plus nets, mais n'engendrent pas encore de cône d'ombre, à partir de J49-DS, l'aorte est visualisée ainsi que les orbites et la bouche.

Les vertèbres en coupe transversale étaient repérées par deux, puis trois points hyperéchogènes, le centre d'ossification du corps vertébral s'observe plus tardivement que ceux des arcs vertébraux et elles engendrent des cônes d'ombre à partir de J38-DS (+/-1J). Les arcades zygomatiques étaient marquées par un simple trait hyperéchogène, peu perceptible à J29-DS (+/-1J). La coupe transversale ou longitudinale de la tête prenait l'aspect d'un crâne de chien à partir de J30-DS (+/-1J). La coupe longitudinale de la tête à J32-DS (+/-1J) et à J43-DS (+/-1J) permettait de visualiser nettement les os de la face et du crâne.

Bondestam *et al.* (1984) indiquent que les fœtus sur lesquels sont visualisés l'estomac, la vessie, la veine ombilicale et la faux cérébrale dans le plan médian du crâne, sont âgés d'au moins 40 jours après la dernière saillie. À 35 jours post ovulation, entre J29-DS et J35-DS, les doigts et les organes génitaux vont commencer à se différencier (Inaba *et al.* 1984). Le foie, le cœur et les poumons, sont mis en évidence entre J32-DS et J39-DS, et l'estomac et la vessie sont échographiés le même jour ou les jours suivants (Stowater *et al.* 1989).

Les différentes parties du corps du fœtus ainsi que les organes internes deviennent clairement visibles à l'échographie à J40-LH et à J32-DS (Concannon *et al.*1989).

Nos observations indiquent qu'entre J30-DS (+/-1J) et J35-DS (+/-1J) l'estomac était réparable de 3 à 6 mm de diamètre, sous forme d'une sphère anéchogène située dorsalement à gauche dans la partie moyenne du corps, et en arrière du plastron costal. Entre J32-DS (+/-1J) et J35-DS (+/-1J) la vessie était échographiée sous forme d'une sphère anéchogène à l'extrémité caudale de l'abdomen, avec une variation de sa taille en plus ou en moins d'une échographie à l'autre. Les organes génitaux étaient nettement repérables entre J35-DS (+/-1J) et J40-DS (+/-1J).

À J37-DS (+/-1J) le tronc brachiocéphalique, la veine cave caudale, la veine ombilicale étaient échographiées, sur des coupes transversales et longitudinales du fœtus. À partir de J45-DS (+/-1J), la masse intestinale et les reins se distinguaient du foie et plus nettement durant les 15 derniers jours de la gestation. L'intestin était d'une échogénicité très hétérogène par rapport au tissu hépatique, et les reins occupaient un volume important entre l'estomac et le bassin de part et d'autre du plan médian.

Ainsi les résultats de ces différentes études indiquent qu'il faut attendre 40 jours de gestation pour observer les organes internes et le squelette du fœtus. Ce qui concorde avec nos résultats concorde avec la plus part des auteurs, mais il semble que les différents événements du développement fœtal que nous avons déjà cités soit plus précoce que celles citées par Cartee *et al.* (1984).

La durée de la gestation est en corrélation négative avec la taille de la portée (Bondestam *et al.*1984 ; Gradil *et al.* 2000 ; Million, 2004) ; nous avons retenu que durant les suivis que la taille de la portée avait une influence sur la durée de la gestation ainsi des chiennes dont la portée était de plus de 5 chiots avait des durée de gestation inférieures ou égales à 56 jours par rapport à d'autres dont la taille de la portée était de deux à trois chiots et dont la gestation était d'une durée supérieur ou égale à 60 jours.

Il est à noter également qu'il existe des variations parfois importantes entre les différents calendriers gestationnels établis par différents auteurs et le calendrier que nous avons établi ainsi les caractéristiques des échographes, la fréquence des examens, le repère J0 choisi, la taille de la portée, la durée de la gestation en sont des causes probables cependant, nous

avons retrouvé régulièrement le même ordre d'apparition des signes de la croissance fœtale: l'ampoule anéchogène / l'embryon ovalaire/ la différenciation morphologique de l'embryon tête tronç/ parmi les organes abdominaux le cœur/ les poumons et le foie/ l'estomac/ la vessie.

5.3.4.2 Calendrier gestationnelle

La qualité des images échographique fournis par le type d'échographe utilisé pour le suivi de la gestation joue un rôle important dans la datation des événements qui marquent le développement embryonnaire et fœtal. Pour vérifier cela nous avons échographié le même fœtus le même jour avec notre échographe utilisé pour cette étude et deux autres appareils en à remarquer ce qui suit :

En coupe frontale sur l'écran de l'échographe MSU1 (Smart Mechanical Ultrasound) nous avons observé le plastron costal sous la forme d'un liséré échogène continu de part et d'autre du thorax. Sur l'écran d'un 'échographe KR-1000 ainsi que sur celui de l'échographe DRAMINSKI Animal profil nous pouvions au même stade de différencier nettement les côtes les unes des autres sur la même coupe frontale, grâce à un pouvoir de résolution supérieur et un plus fort grossissement que l'échographe MSU1 (Smart Mechanical Ultrasound) ; comme les caractéristiques de l'échographe influencent considérablement la définition de l'image obtenue, certains éléments tels que les cônes d'ombre issus du tissu osseux fœtal ou les vésicules anéchogène (vitellus, estomac, cœur...) apparaîtront à des dates plus au moins variables suivant le matériel échographique employé.

Ce la nous amène à conclure qu'un calendrier gestationnel (tableau 13 ,14) tel que nous l'avons construit, ne pourra être utilisé qu'avec la caractéristique de l'échographe qui a permis de l'élaborer, ou un appareil qui présente les mêmes caractéristiques.

D'autres facteurs interviennent également , ainsi pendant la première moitié de la gestation, la race et le nombre de fœtus, influençait peu les caractères morphologiques et biométriques, mais cela n'empêche pas quelques variations, par exemple, nous avons remarquer qu'une vésicule de 18 jours d'une chienne Berger allemand avait la taille d'une ampoule de 23 jours d'une femelle de race berger d'atlas , cela va de même pour les grandes races de plus de 30 kg par rapport aux petites races de moins de 25 kg.

En revanche, durant la deuxième moitié de la gestation, cette variation était bien marquée vue que la croissance des fœtus dépendait fortement de leur nombre et de leur race. La taille du fœtus peut aller du simple au double, même à l'intérieur d'une même race.

Il est également important de mentionner que la durée de la gestation présentait une influence sur le moment à partir duquel un événement qui caractérise le développement embryonnaire et fœtal était observé ce qui fait que ces événements apparaîtront, par exemple à des dates plus précoces dans une gestation d'une courte durée de 53 jours par rapport à une gestation d'une durée de 60 jours ou plus.

Tableau 13 : datation échographique de la gestation, effectuée sur 37 chiennes de différentes races, par usage d'un échographe DRAMINSKI Animal profil de J10-DS à J25-DS.

J0-dernière saillie (DS)	observation échographique / mm (millimètre)
J10+/-1-DS	Utérus dilaté, hypertrophie de l'endomètre, ampoule non visible.
J13+/-1-DS	l'ampoule anéchogène de 4 à 7 mm de diamètre
J14+/-1-DS	l'ampoule anéchogène de 10 à 20 mm de diamètre
J16+/-1-DS	l'embryon de forme ovulaire de 5 à 10 mm de longueur sur une coupe frontale battements cardiaques non détectables Les battements cardiaques forment de légères adulations au centre de l'embryon
J17+/-1-DS	Le chorion entoure complètement l'œuf l'embryon est accolé au chorion avec début de formation des annexes
J19+/-1-DS	embryon de forme ovulaire de 10 mm de longueur en coupe frontale le chorion villosité et le chorion lisse deviennent nettement différenciables
J20+/-1-DS	l'embryon présente la forme d'un 8, ses contours restent mal définis
J21+/-1-DS	l'allantoïde et la vésicule vitelline sont échographiées simultanément l'embryon est nettement sous la forme d'un 8
J22+/-1-DS	vésicule vitelline est rétractée l'embryon mesure environ 15 mm à 20 mm de long en coupe frontale les bourgeons des membres antérieurs forment de deux points échogène les hémisphères cérébraux sont visibles
J24+/-1-DS	le crâne est hyperéchogène sur les pariétaux (ossification) les bourgeons des membres postérieurs forment deux points échogènes l'ossification des os frontaux et pariétaux est nette
J25+/-1-DS	les bourgeons des membres antérieurs forment des points hyperéchogènes les bourgeons des postérieurs forment des points isolés hyperéchogènes

Tableau14 : datation échographique de la gestation, effectuée sur 37 chiennes de différentes races, par usage d'un échographe DRAMINSKI Animal profil de J26-DS à J50-DS.

J0-dernière saillie	observation échographique / mm (millimètre)
26+/-1J-DS	L'ossification des os de la face forme des points hyperéchogènes L'embryon mesure 25 à 35 mm de long à acquis les caractères externes de son espèce (fœtus) début d'ossification des côtes et des os longs du fœtus
27+/-1J-DS 29+/-1J-DS	la vésicule vitelline est encore plus large que le fœtus. le cœur est délimité est échographié au sein de l'aire pulmonaire. la vésicule vitelline est vide et forme un épais cordon dans l'axe de l'ampoule le rachis en début d'ossification dessine une forme d'échelle Le diamètre de l'ampoule avoisine les 40 à 50 mm L'ensemble du crane à un l'aspect d'une tête d'insecte
30+/-1J-DS	L'estomac forme une poche anéchogène de 3mm à 7mm de diamètre l'ossification des os long est plus nettement visible. annexes bien développées, membrane allantoïde visible
31+/-1J-DS	La longueur du fœtus est égale à celle du placenta. le plastron costal, les scapulas sont nettement hyperéchogènes
32+/-1J-DS	L'ossification des zygomatiques est visible. un aspect de la tête caractéristique du chiot est visible la vessie est échographiée avec une taille variable. mouvements saccadés des fœtus sont détectables
35+/-1J-DS	La distinction des poumons, du foie et de la vésicule biliaire est facile Les rachis sont visibles avec 2 noyaux d'ossification par vertèbre L'ilium et les bourgeons génitaux dédeviennent nettement visibles cœur est divisé sur son axe longitudinale en deux cavités distinctes qui correspondent aux ventricules
36+/-1J-DS	Les cotes et les sternèbres en ossification forment des cônes d'ombre des mouvements des membres, puis des mâchoires sont observées
37+/-1J-DS	la veine cave caudale et la veine ombilicale sont distinguées l'une de l'autre
38+/-1J-DS	la vésicule biliaire forme une sphère anéchogène de 3 mm à 5 mm. les vertèbres présentent 3 noyaux d'ossification hyperéchogènes.
39+/-1J-DS 40+/-1J-DS 43+/-1J-DS	les vertèbres forment des cônes d'ombre. les cavités cardiaques sont bien différenciées. les sternèbres et les os de la mâchoire sont hyperéchogènes.
44+/-1J-DS	les diaphyses des os longs ossifiés, s'évasent la vésicule biliaire prend une forme ovale. Les ischions sont sous la forme d'un trait hyperéchogène. Fœtus mesure environ de 10+/-1 cm de longueur
45+/-1J-DS 50+/-1J-DS	La masse intestinale, les reins, cordon ombilical sont repérés les bourgeons dentaires et la peau des fœtus sont repérés.

5.3.5 Signes physiques liés à la gestation

5.3.5.1 Modifications comportementales

100% (37/37) des chiennes présentaient une augmentation de l'appétit associée à une nette prise de poids, entre la 2^{ème} et 6^{ème} semaines de gestation. Tainturier & Allain, (2005) indiquent une augmentation de l'appétit qui correspond à l'anabolisme gravidique est observée chez les chiennes gestantes, avec dans certains cas, une modification des goûts alimentaires.

Les mêmes auteurs signalent que durant la seconde moitié de la gestation, un degré variable de pollakiurie peut parfois être observé et que plus tardivement à l'approche du part, la femelle a tendance à s'isoler dans un lieu écarté pour y mettre bas dans la tranquillité et le caractère de l'animal peut changer, la femelle devenant plus calme, ou plus craintive, cherchant la solitude, Au cours de notre étude aucune pollakiurie n'a été constatée, la totalité de nos chiennes ont présenté une miction normale durant toute la période de leur gestation.

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 (Bondestam *et al.* 1984 ; Gradil *et al.* 2000 ; Million, 2004).

Par contre des modifications du comportement comme le mentionnaient différents auteurs, ont bien été observés chez nos chiennes gestantes, ainsi 83,78% (31/37) des chiennes montraient un comportement dominé par une anxiété et une agitation avec souvent une anorexie durant les 3 derniers jours de la gestation.

91,89% (34/37) des chiennes ont présentaient une réduction de l'appétit durant les 15 derniers jours avant la mise bas. Une anorexie durant 3 à 4 jours avant la mise bas était constatée chez 10,81% (4/37) des chiennes.

81,08% (30/37) des chiennes développaient une tendance à préférer les aliments liquides particulièrement le lait essentiellement durant la dernière semaine avant la mise bas ainsi que durant la première semaine après la mise bas.

Les chiennes primipares qui représentaient 72,79 % (27/37) de l'effectif étudié, développaient une dysorexie avec une légère diarrhée durant la première semaine post mise-bas cela est probablement liée à des spasmes intestinaux suite à une vacuité inhabituelle post mise bas de la cavité abdominale vue que les chiennes sont primipares ; les matières fécales ont retrouvées leur aspect normal par la suite. Ainsi la plus part de nos observations concorde avec les données des différents auteurs

5.3.5.2 Modifications anatomiques de la femelle

Des dépôts adipeux sous-cutanés dans la région abdominale sont particulièrement visibles chez les primipares et sont liés à la stimulation de l'appétit, et l'anabolisme gravidique (Yves Piedvache, & Luky, 2006).

À partir de la cinquième semaine, une adipose sous cutanée responsable d'une augmentation de poids corporel est associée à l'élévation de la masse utérine (Tainturier & Allain, 2005). Lorsque la chienne est examinée debout de trois-quarts avant, de trois-quarts arrière et de profil, on peut remarquer une silhouette abdominale ronde du fait de la distension de cette région (Tainturier & Allain, 2005).

Royal *et al.* (1979), citent que l'augmentation du volume de l'abdomen tout comme l'augmentation du poids corporel se manifeste à partir de la 5^e semaine de gestation. L'appréciation de ces transformations est beaucoup plus délicate chez les chiennes de grands formats, les femelles déjà grasses et celles qui portent juste un ou deux petits.

En accord avec ces différentes études, toute nos chienne soit 100% (37 /37) ont présenté une nette augmentation progressive du poids entre la 2^{ème} la 6^{ème} semaine de la gestation, une adipose sous cutanée remarquable dans la régions abdominal était nettement visible au de la de la 6^{ème} semaine de la gestation chez nos chiennes multipares soit 29,72% (11/37) et un peut plus précocement entre la 4^{ème} et la 5^{ème} semaine chez les chiennes primipares soit 72,97 % (27/37) chiennes.

La disproportion entre la taille de l'abdomen et celle du thorax était difficile à apprécier chez les chiennes de notre effectif ayant une portée de moins de 3 chiots.

Chez les primipares, une augmentation du tissu adipeux en région abdominale est souvent observée. Néanmoins, l'augmentation de poids n'est souvent appréciable qu'à partir de la 5^e

semaine et est fonction du nombre de fœtus. Une hypertrophie du tissu mammaire apparaît environ 7 jours avant le terme (Bondestam *et al.* 1984 ; Gradil *et al.* 2000 ; Million, 2004) .

Une dépigmentation de la peau avec apparition d'une coloration rose claire au niveau des mamelons en saillie qui s'allongent et deviennent turgescents, est appréciables particulièrement chez les primipares J35-LH, J27-DS (Tainturier & Allain, 2005). La longueur des tétines est encore accrue, et une coloration peut apparaître sur tout ou une partie des mamelons vers J45-LH, J37-DS (Tainturier & Allain, 2005).

L'hypertrophie des mamelles et l'apparition d'une coloration rose de la peau, étaient constatées chez les chiennes primipares 72,97% (27/37) de l'effectif total à partir de J30-DS (+/- 2J), ce développement mammaire était constaté plus tardivement chez les chiennes multipares à savoir 20 jours avant la mise bas.

100% (37/37) des chiennes ont présenté une sécrétion lactée (liquide blanc séreux) qui était détectée à partir de J45-DS (+/-3J) et un peu plus précocement au environ de J40-DS (+/-2J) chez les primipares qui représentaient 72,97% (27/28) de l'effectif total.

L'hypertrophie des mamelles devient très nette aux alentours du 50^{ème} jour de gestation et s'accroît graduellement jusqu'au terme, deux ou trois jours avant la mise bas, une sécrétion aqueuse peut sortir des tétines, ces transformations tardives été particulièrement observée chez les multipares (Royal *et al.* 1979).

Les modifications de l'habitus concernent une intensification de la ventilation pulmonaire, ainsi la fréquence des mouvements respiratoires, qui est normalement de l'ordre de 16 à 18 battements par minute, pour une chienne adulte, s'accélère sensiblement (Tainturier & Allain, 2005).

100% (37/37) chiennes ont présentées une modification de la fréquence respiratoire, constater particulièrement à partir de J31-DS (+/-1J). L'intensité de ce signe était en corrélation positive avec la taille de la portée.

5.3.6 Durée de la gestation et facteurs influençant

a. Taille de la portée

Chez nos chiennes gestantes gardées au niveau de notre institut jusqu'à leur mise bas, la durée de la gestation était corrélée négativement avec la taille de la portée plusieurs auteurs confirment cette observation ainsi Bernard, (2002) ; Gradil *et al.* (2000) ; Million, (2004) qui citent que la durée de la gestation soit corrélée négativement avec la taille de la portée.

L'étude d' Hekerman *et al.* (1993), montre que la taille de la portée est corrélée négativement avec la durée de gestation apparente pour les chiennes ayant mis bas jusqu'à 7 chiots. Okkens *et al.* (2001) confirment qu'il y a une corrélation négative entre la taille de la portée et la durée de gestation. Mais cette fois-ci, cela concerne les chiennes ayant jusqu'à 13 chiots.

L'étude d'Eilts *et al.* (2005) montre que les chiennes ayant des portées de 4 chiots ou moins ont une durée de gestation significativement plus longue.

Holst & Phemister (1974) remarquent sur 108 gestations suivies, que la taille de la portée influence la date du part. Les chiennes qui mettent bas avant le 56ème jour de gestation ont des portées plus grandes que la moyenne, alors que les portées nées après le 58ème jour sont de petite taille.

Alors que d'autres auteurs, Linde-Forsberg *et al.* (1999), Kutzler *et al.* (2003) et Tsutsui *et al.* (2006), citent que la taille de la portée n'affecte pas la durée de gestation.

b. Parité

Aucune influence de la parité sur la durée de la gestation n'a été constaté chez toutes nos chiennes ainsi Tsutsui *et al.* (2006), Eilts *et al.* (2005) et Okkens *et al.* (1993), notent que la parité n'a pas d'effet sur la durée de la gestation.

c. Race

Etant donné que notre suivi de la gestation était effectué sur 37 chiennes de différentes races nous n'avons pas relevé l'existence d'un effet de la race sur la durée de la gestation vu que la durée de la gestation chez nos chiennes calculée à partir de la dernière saillie ne présentait pas une variation significative selon les races ainsi la durée de la gestation estimée sur 37 chiennes

était de $59 \pm 3,8$ jour, nôtre observation correspond à celle de l'étude d'Arbeiter et al. (1991) qui citent qu'il n'y a pas de différence entre les races.

Par contre d'autres études démontrent le contraire :

Selon une étude de Linde-forsberg *et al.* (1993), sur l'insémination artificielle chez le chien (527 IA) il existe des variations interraciales de 3 à 6 jours : le Berger Allemand aurait une durée de gestation plus courte que les autres races. (46) Par contre, une autre étude de ce même auteur effectuée en 1998 indique qu'il n'y a pas d'influence de la race sur la durée de gestation.

Okkens *et al.* (1993) et en (2001) réalisent deux études sur l'influence de la race sur la durée de la gestation :

La première, porte sur 77 chiennes de races différentes, dont 5 races comptant au moins 5 animaux, et dont la durée de gestation est mesurée de la saillie à la mise bas. Les chiennes sont inséminées une seule fois au début de l'ovulation, dès que la progestéronémie dépasse 5-6 ng/ml. Les auteurs concluent que le Berger Allemand (9 chiennes) a une gestation plus courte que les autres races ($60,1 \pm 0,5$ jours).

La deuxième, porte sur 113 chiennes provenant de 6 races différentes. Le protocole de mise à la reproduction est le même que précédemment. Cette étude montre que le West Highland White Terrier a une durée de gestation significativement plus longue ($62,8 \pm 1,2$ jours) que celles du Berger Allemand ($60,4 \pm 1,7$ jours), du Labrador Retriever ($60,9 \pm 1,5$ jours) et du Doberman ($61,4 \pm 1,0$ jours).

Eilts *et al.* (2004) effectuèrent une étude sur 308 chiennes provenant de 4 races différentes. Ils étudièrent l'influence de l'âge, la parité, la taille de la portée et la race sur la durée de la gestation. Cette dernière fût mesurée depuis le pic de LH déduit du premier jour du diœstrus cytologique ou du premier jour d'augmentation brutale de la progestéronémie. Cette étude a mis en évidence une durée de gestation plus courte chez le Labrador Retriever ($62,9 \pm 1,3$ jours) que chez le Berger Allemand ($63,6 \pm 2,1$ jours), le Golden Retriever ($64,7 \pm 1,5$ jours) et le Hound ($66,0 \pm 2,8$ jours).

d. Age de la chienne

Malgré la l'importante variation de l'âge chez nos chiennes, ce derniers ne semblait pas influencer la durée de la gestation, cela est en accord avec l'étude d'Eilts *et al.* (2005) qui démontre que l'âge de la chienne n'a pas d'influence sur la durée de gestation.

Poids de la chienne avant la gestation :

Nous n'avons pas relevé une influence du poids de nos chiennes sur la durée de la gestation.

D'après une étude de Kutzler *et al.*(2003) sur 63 chiennes appartenant à 19 races différentes et portant sur la prédiction de la date de parturition à partir de la montée initiale de la progestéronémie indiquant le pic de LH, le poids de la chienne n'affecte pas la durée de gestation.

CONCLUSION

L'utilisation de la *bromocriptine* (*Parlodel*®) pendant la fin du *metæstrus* pour anticiper le retour de l'œstrus, et par conséquent raccourcir l'intervalle *interœstral* chez la **chienne est intéressante**. Ce protocole permet d'induire des chaleurs *ovulatoires* en moyenne après **40 jours** de traitements par voie orale.

L'utilisation de cette même substances dans le cas de l'*anoestrus* tardif peut induire des chaleurs *ovulatoires* après une moyenne de **3 semaines** de traitement avec l'obtention de chaleurs fertiles et une gestation normale, ce moyen mérite d'être exploité sur un plus grand nombre de chiennes afin **de mieux confirmé** son effet dans l'induction **des chaleurs chez** la chienne ce qui permet de l'inclure dans les protocoles visant à gérer la reproduction chez l'espèce canine .Ce traitement constitue ainsi une alternative intéressante aux autres protocoles d'induction faisons appel à l'usage des hormones ce qui s'avère coûteux et n'est pas apprécié par les propriétaires.

L'utilisation de la cytologie vaginale et de l'échographie des ovaires reste une technique indissociable du dosage de la progestérone pour le suivi des chaleurs et le diagnostic précis du moment de l'ovulation.

L'écographie reste un outil précieux et indispensable en reproduction des carnivores domestiques qui doit être maîtrisée par le clinicien exerçant en médecine des carnivores domestique, car il offre l'avantage de suivre avec précision l'évolution clinique de la gestation chez la chienne.

Nous avons daté avec précision le développement embryonnaire et fœtal à partir du jour de la dernière saillie. Nous avons constaté que la race de chiennes étudiées, la durée de la gestation, la taille de la portée, le repère choisie pour déterminer le début de la gestation, ainsi que l'équipement utilisé sont des facteurs qui influencent fortement les données d'un calendrier de la gestation; de ce fait, de légères variations qui n'affectent en aucun cas les données fournies par le calendrier sont à signaler lorsque

ANNEXES

1. Illustrations cytologies des différentes phases du cycle œstral :

a. Prœstrus début (précoce)

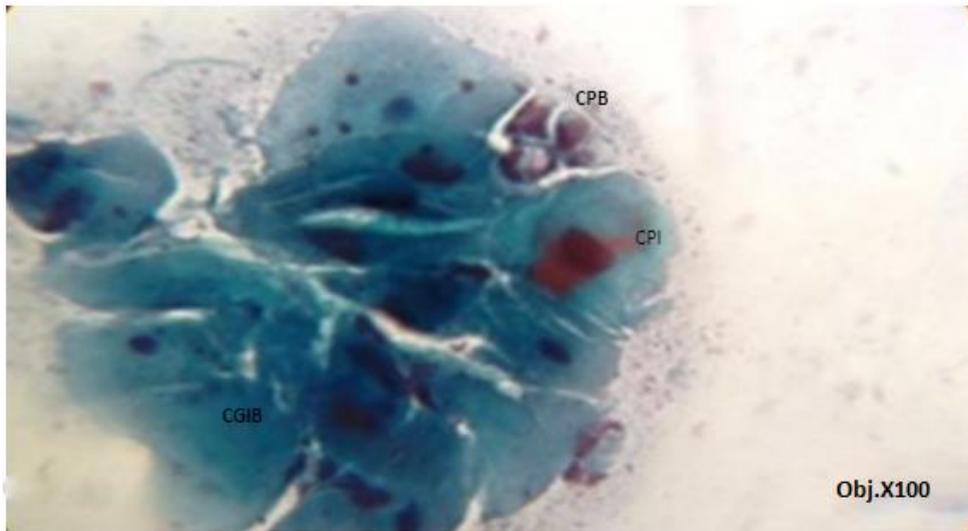


Figure 59 : Vue d'un frottis vaginal de prœstrus (début), coloré au trichome de Harris Shorr, au grossissement x100, riche en cellules, fond sale, cellules intermédiaires majoritaires encore basophiles en amas, indice éosinophilique < 30%. CPB: cellule parabasale basophile ; CGIB: cellules grande intermédiaire basophile. CPI: cellule petite intermédiaires (Dr Slimani khaled mabrouk).

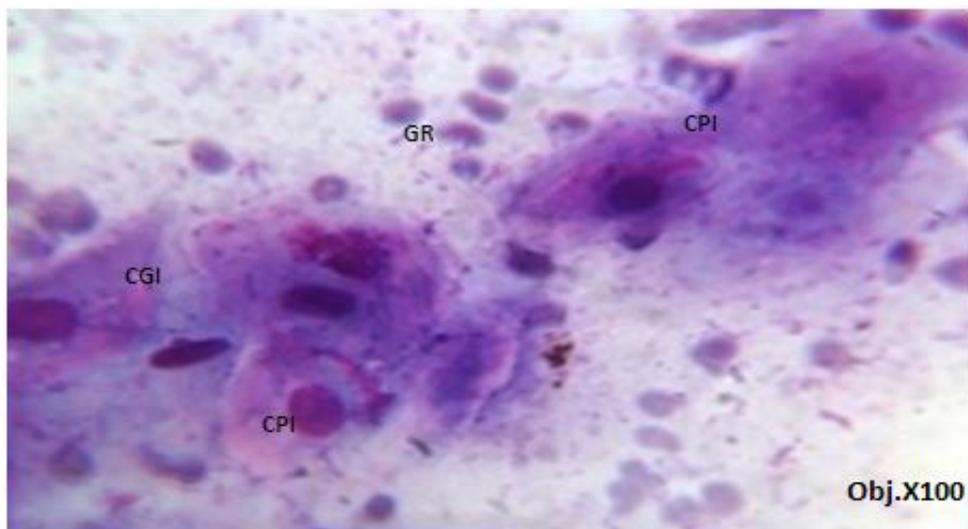


Figure 60: Vue d'un frottis vaginal de prœstrus (début), coloré au May-Grünwald Giemsa , au grossissement x100, riche en cellules, fond sale, cellules petites intermédiaires majoritaires , présence de globules rouges . CPI: cellule petite intermédiaire ; CGI: cellules grande intermédiaire ; GR : globule rouge (Dr Slimani khaled mabrouk).

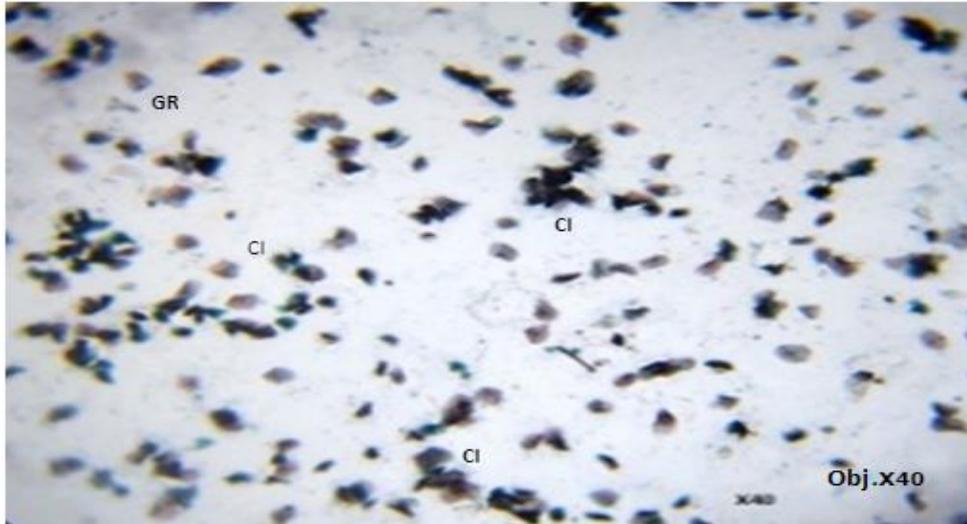


Figure 61 : Vue d'un frottis vaginal de proëstrus (début), coloré au trichome de Harris Shorr , au grossissement x40, riche en cellules, fond sale, cellules petites intermédiaires majoritaires , présence de globules rouges, indice éosinophilique < 30%. CI: cellules intermédiaires ; GR : globule rouge (Dr Slimani khaled mabrouk).

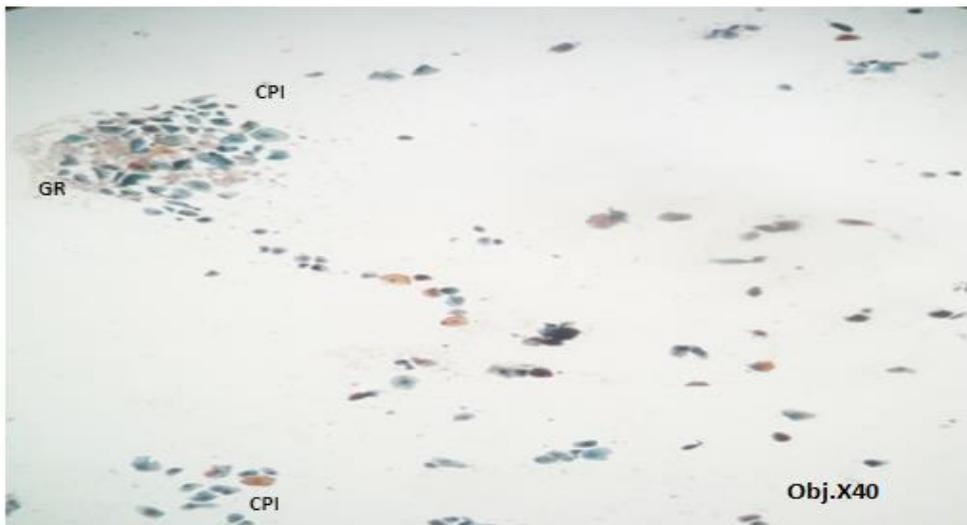


Figure 62: Vue d'un frottis vaginal de proëstrus (début), coloré au trichome de Harris Shorr , au grossissement x40, riche en cellules, fond sale, cellules petites intermédiaires majoritaires , présence de globules rouges , indice éosinophilique < 30%. CPI: cellules petites intermédiaires ; GR : globule rouge (Dr Slimani khaled mabrouk).

b. Præstrus (milieu) :

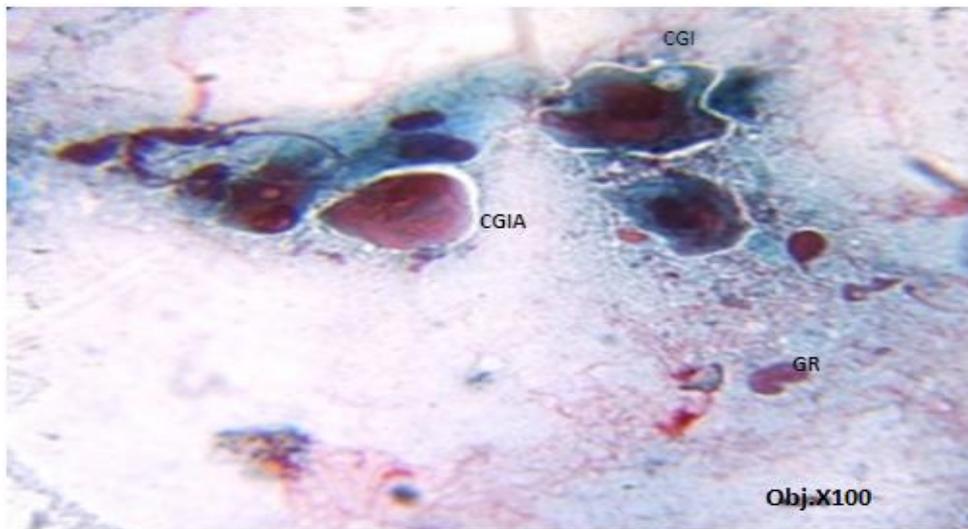


Figure 63: Vue d'un frottis vaginal de præstrus (milieu), coloré au trichome de Harris Shorr , au grossissement x100, riche en cellules, fond sale, cellules grandes intermédiaires majoritaires , présence de globules rouges, indice éosinophilique > 40%. CGI: cellules grandes intermédiaires acidophiles ; GR : globules rouges (Dr Slimani khaled mabrouk).

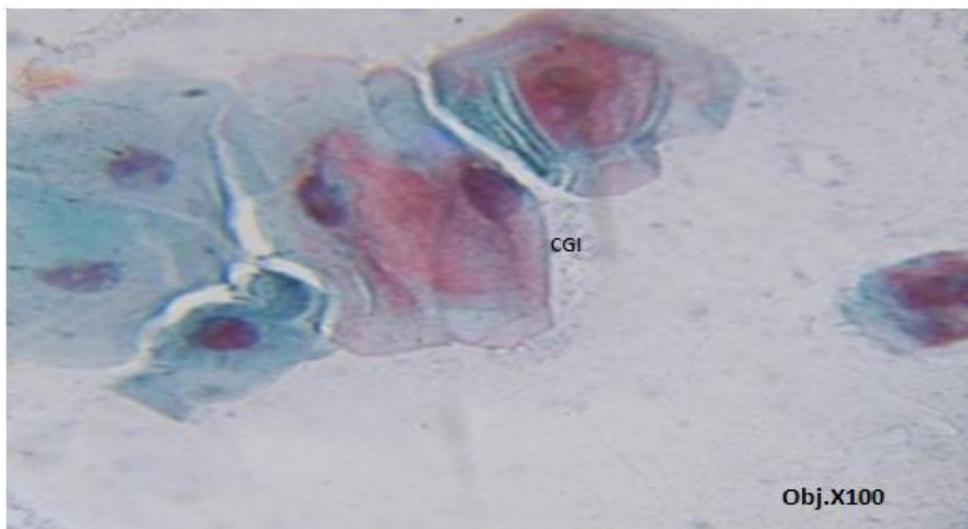


Figure 64 : Vue d'un frottis vaginal de præstrus (milieu), coloré au trichome de Harris Shorr, au grossissement x100, riche en cellules, fond sale, cellules grandes intermédiaires majoritaires à tendance acidophile, indice éosinophilique > 40%. CGI: cellules grandes intermédiaires.
(Dr Slimani khaled mabrouk).

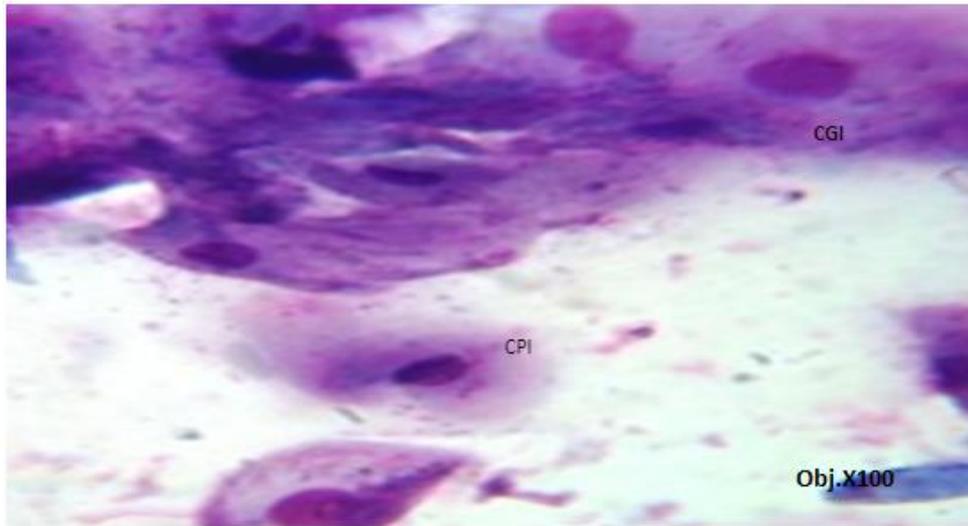


Figure 65 : Vue d'un frottis vaginal de præstrus (milieu), coloré au May-Grünwald Giemsa, au grossissement x100, riche en cellules, fond sale, cellules grandes intermédiaires majoritaires, présence de globules rouges. CPI: cellules petites intermédiaires ; CGI : cellules grandes intermédiaires (Dr Slimani khaled mabrouk).

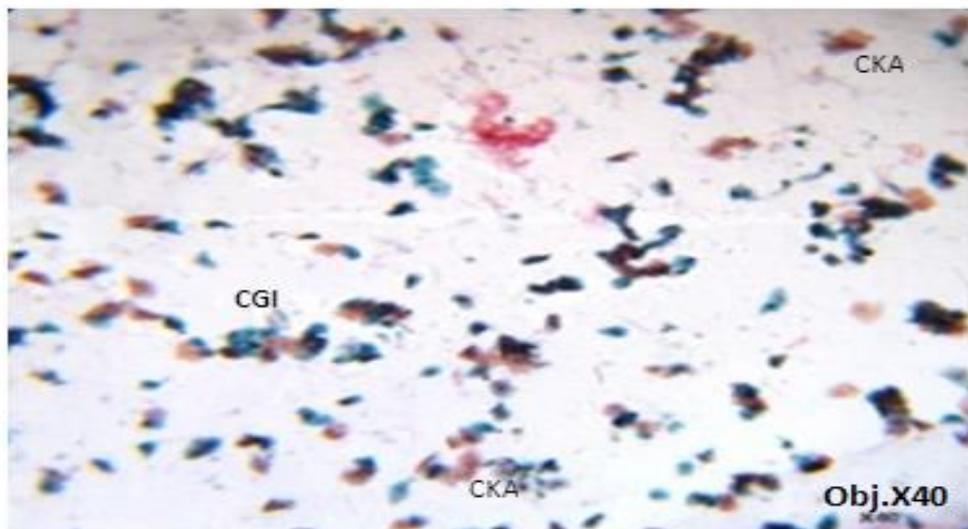


Figure 66 : Vue d'un frottis vaginal de præstrus (milieu), coloré au trichome de Harris Shorr, au grossissement x40, riche en cellules, fond sale, cellules grandes intermédiaires majoritaires, indice éosinophilique > 40 %. CGI: cellules grandes intermédiaires. ; CKA: cellules kératinisées acidophiles ; CGI: cellules grandes intermédiaires (Dr Slimani khaled mabrouk).

c. Præstrus (fin)

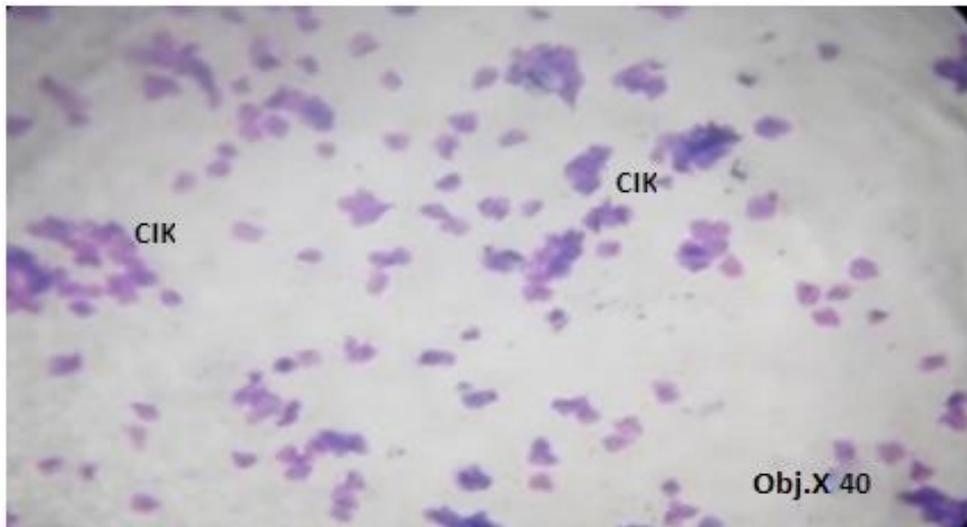


Figure 67: Vue d'un frottis vaginal de præstrus (fin), coloré au May-Grünwald Giemsa, au grossissement x40, riche en cellules, fond sale, cellules superficielles kératinisées et cellules grandes intermédiaires majoritaires . CIK: cellules intermédiaires kératinisées (Dr Slimani khaled mabrouk).

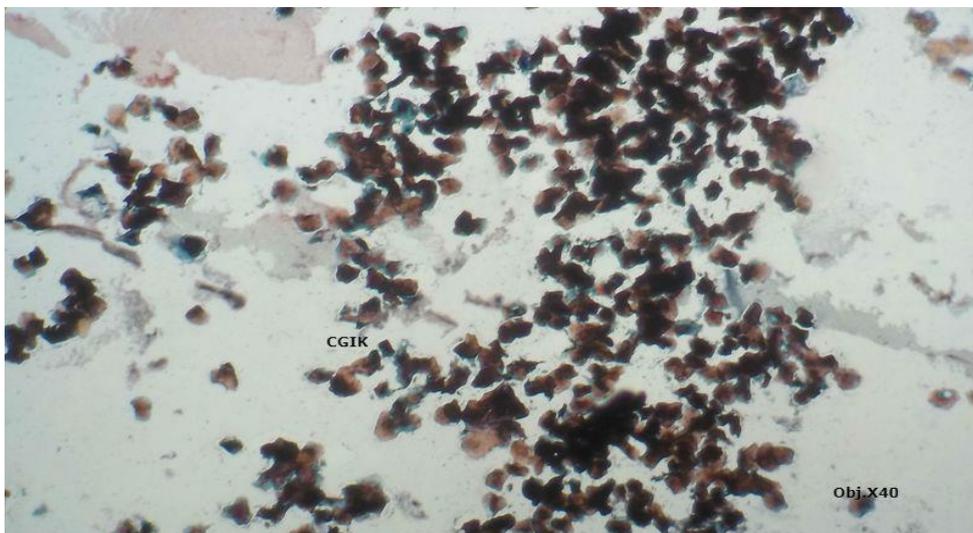


Figure 68: Vue d'un frottis vaginal de præstrus (fin), coloré au trichome de Harris Shorr ,au grossissement x40, riche en cellules, fond sale, cellules superficielles kératinisées et cellules grandes intermédiaires majoritaires , indice éosinophilique <60 %. CGIK: cellules grandes intermédiaires kératinisées (Dr Slimani khaled mabrouk).

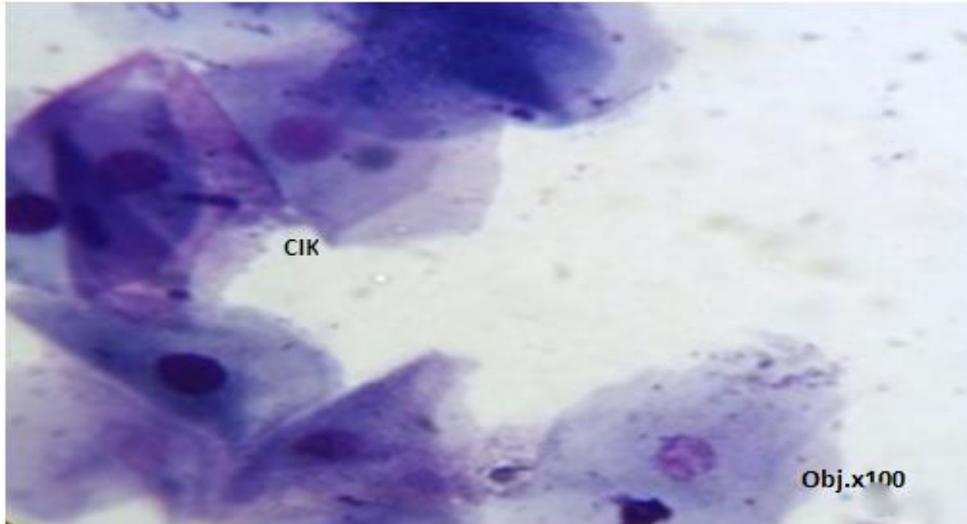


Figure 69: Vue d'un frottis vaginal de præstrus (fin), coloré au May-Grünwald Giemsa, au grossissement x100, riche en cellules, fond sale, cellules superficielles kératinisées et cellules grandes intermédiaires majoritaires ; CIK: cellules intermédiaires kératinisées (Dr Slimani khaled mabrouk).

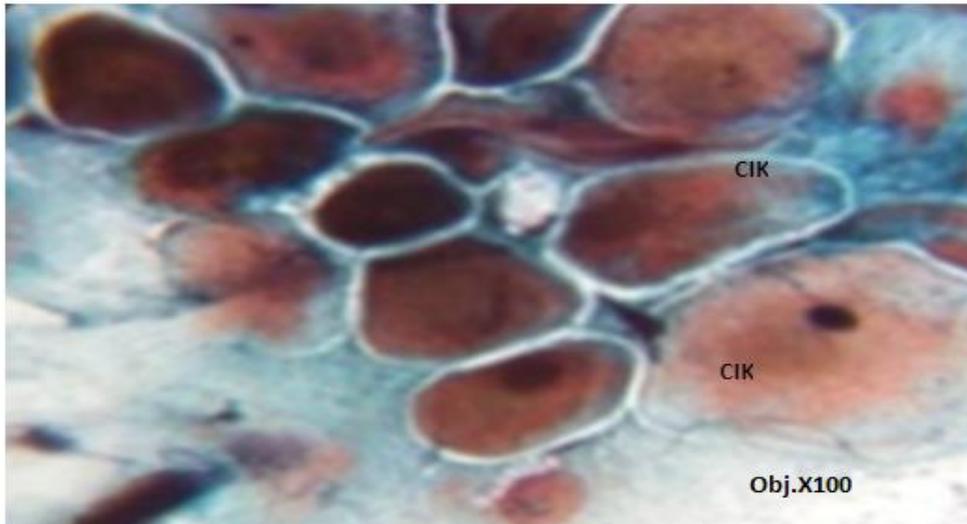


Figure 70 : Vue d'un frottis vaginal de præstrus (fin), coloré au trichome de Harris Shorr ,au grossissement x100, riche en cellules, fond sale, cellules superficielles kératinisées et cellules grandes intermédiaires majoritaires , indice éosinophilique <60 %. CIK: cellules intermédiaires kératinisées (Dr Slimani khaled mabrouk).

d. Œstrus

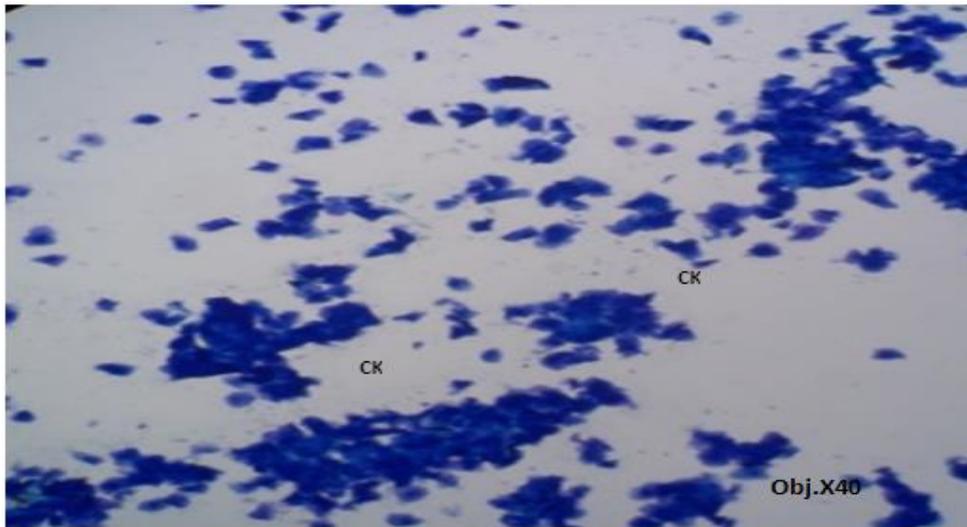


Figure 71 : Vue d'un frottis vaginal d'œstrus, coloré au May-Grünwald Giemsa, au grossissement x40, frottis riche en cellules, fond propre, hématies absentes ou rares, cellules superficielles kératinisées majoritaires, présence d'amas de cellules kératinisées anucléées.
CK : cellules superficielles kératinisées (Dr Slimani khaled mabrouk).

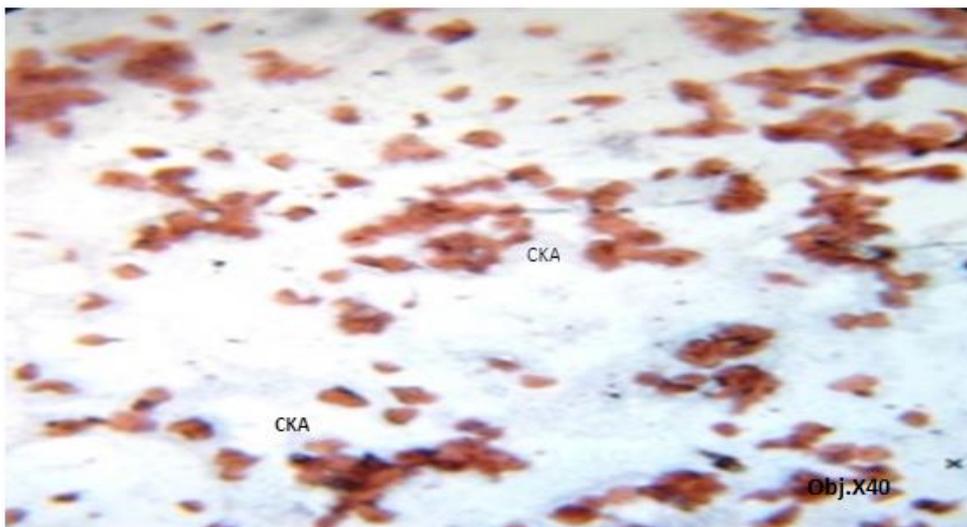


Figure 72: Vue d'un frottis vaginal d'oestrus, coloré au trichome de Harris Shorr, au grossissement x40, frottis riche en cellules, fond propre, hématies absentes ou rares, cellules superficielles kératinisées majoritaires, présence d'amas de cellules kératinisées anucléées, indice éosinophilique > 80%. CKA : cellules superficielles kératinisées acidophiles
(Dr Slimani khaled mabrouk).

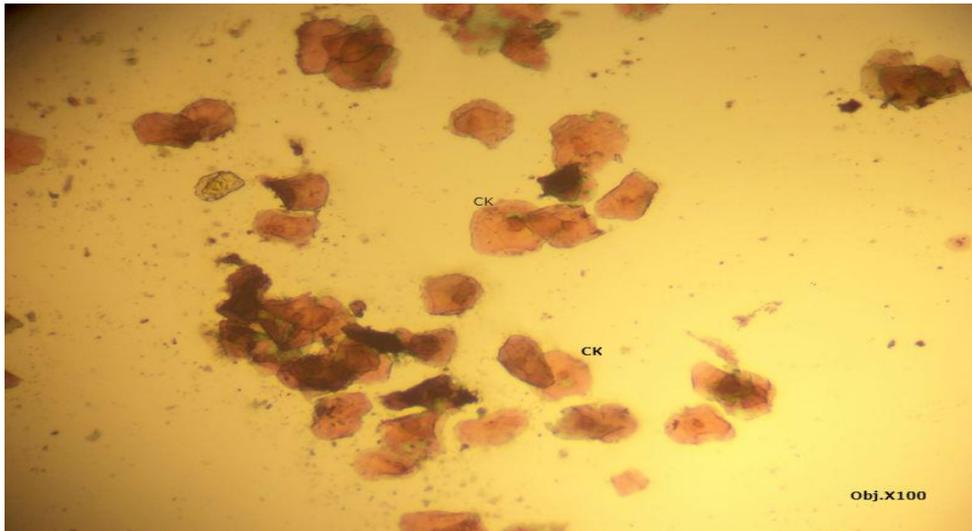


Figure 73 : Vue d'un frottis vaginal d'œstrus, coloré au trichome de Harris Shorr, au grossissement x100, frottis riche en cellules, fond propre, rares globules rouges , cellules superficielles kératinisées majoritaires, présence d'amas de cellules kératinisées anucléées, indice éosinophilique > 80%. CK : cellules superficielles kératinisées.
(Dr Slimani khaled mabrouk).

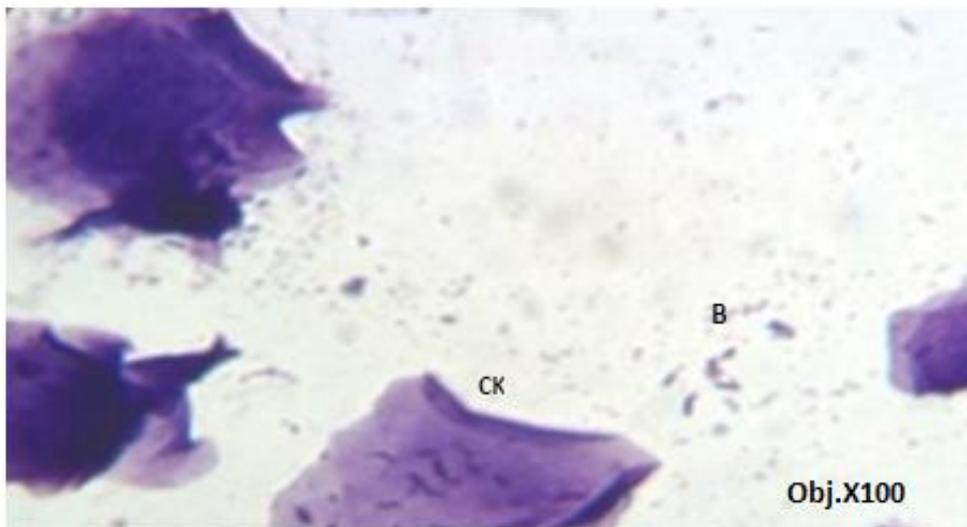


Figure 74 : Vue d'un frottis vaginal d'œstrus, coloré au May-Grünwald Giemsa, au grossissement x100, fond propre, hématies absentes ou rares, cellules superficielles kératinisées majoritaires, CK : cellules superficielles kératinisées à noyau petit, ± pycnotique, voire absent ; B : bactéries (Dr Slimani khaled mabrouk).

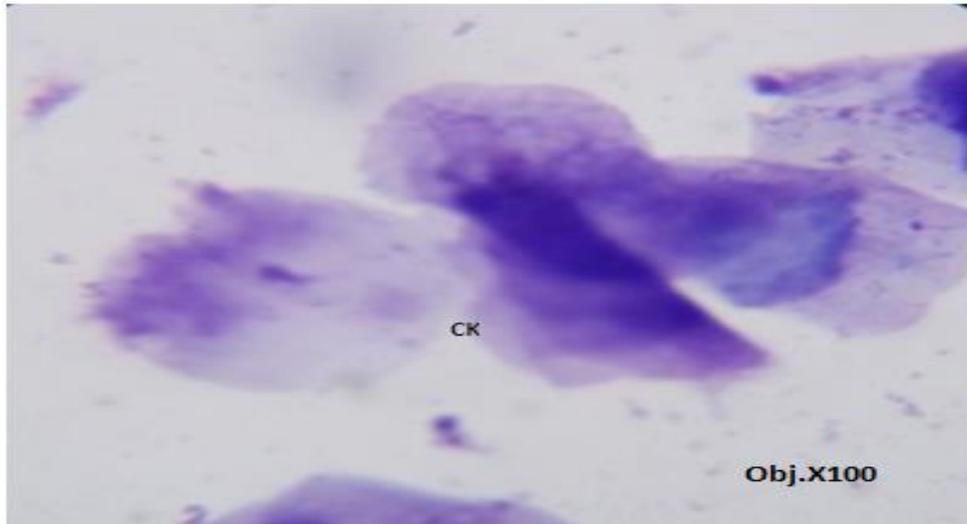


Figure 75: Vue d'un frottis vaginal d'œstrus, coloré au May-Grünwald Giemsa, au grossissement x100, fond propre, hématies absentes ou rares, cellules superficielles kératinisées majoritaires, CK : cellules superficielles kératinisées à noyau petit, \pm pycnotique (Dr Slimani khaled mabrouk).

e. Metœstrus (début)

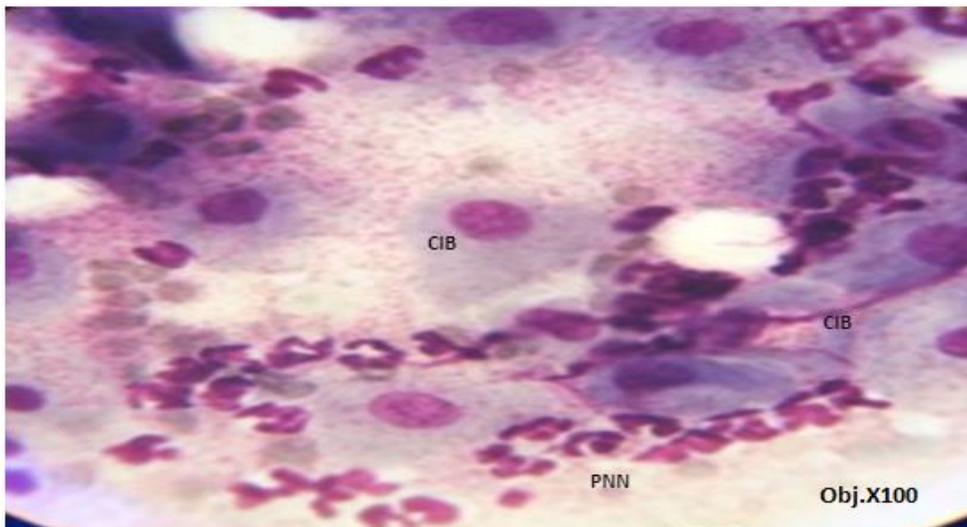


Figure 76 : Vue d'un frottis vaginal de metœstrus, coloré au May-Grünwald Giemsa, au grossissement x100, Frottis riche et basophile, fond sale, nombreux leucocytes (polynucléaires neutrophiles), mucus, cellules petites intermédiaires majoritaires. CIB : cellules intermédiaires basophiles ; PNN : polynucléaires neutrophiles (Dr Slimani khaled mabrouk).

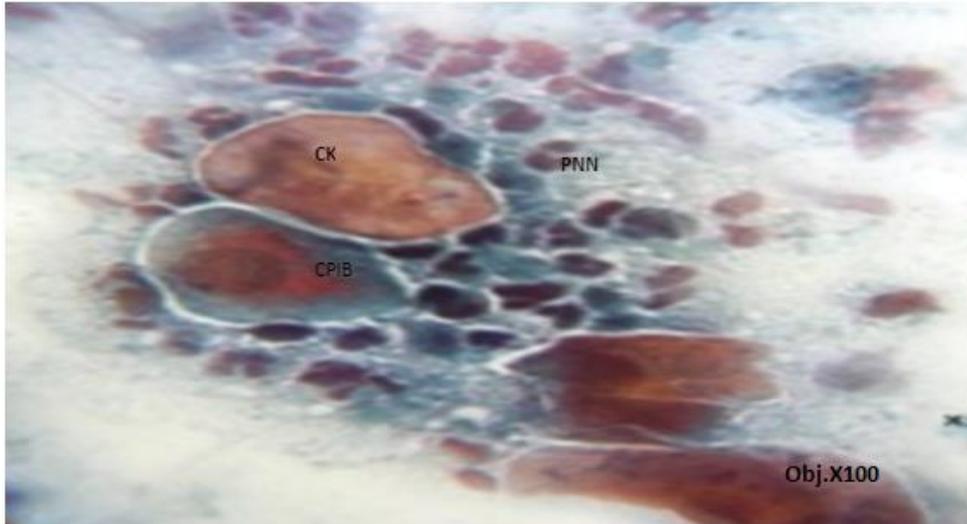


Figure 77: Vue d'un frottis vaginal de metœstrus, coloré au trichome de Harris Shorr, au grossissement x100, cellules petites intermédiaires basophile et quelques cellules kératinisées, fond sale, nombreux leucocytes (polynucléaires neutrophiles), mucus, indice éosinophilique < 20% CPIB: cellules petites intermédiaires basophiles ; PNN : polynucléaires neutrophiles, CK : cellules superficielles kératinisées (Dr Slimani khaled mabrouk).

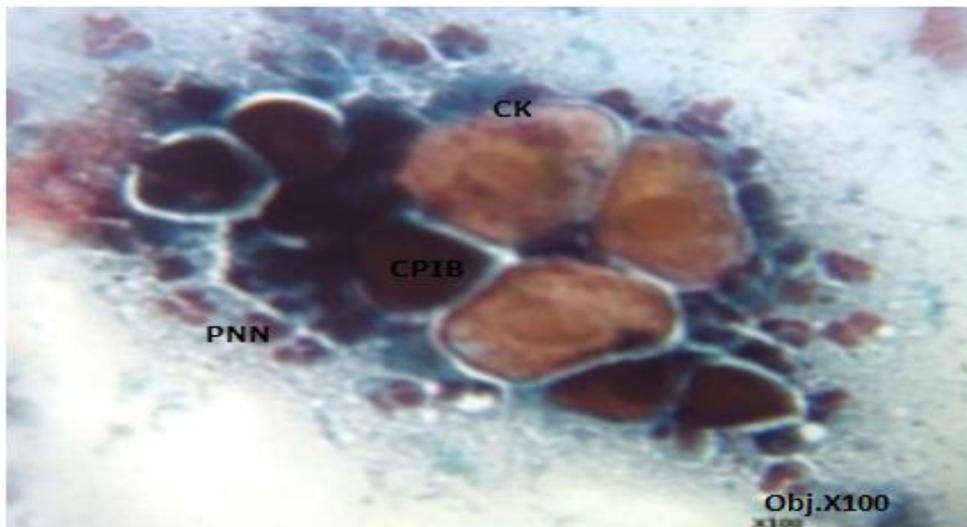


Figure 78: Vue d'un frottis vaginal de metœstrus, coloré au trichome de Harris Shorr au grossissement x100, cellules petites intermédiaires basophile majoritaire et quelques cellules kératinisées, fond sale, nombreux leucocytes (polynucléaires neutrophiles), mucus, indice éosinophilique < 20% CPIB: cellules petites intermédiaires basophiles ; PNN : polynucléaires neutrophiles, CK : cellules superficielles kératinisées (Dr Slimani khaled mabrouk).

f. Metœstrus (fin)

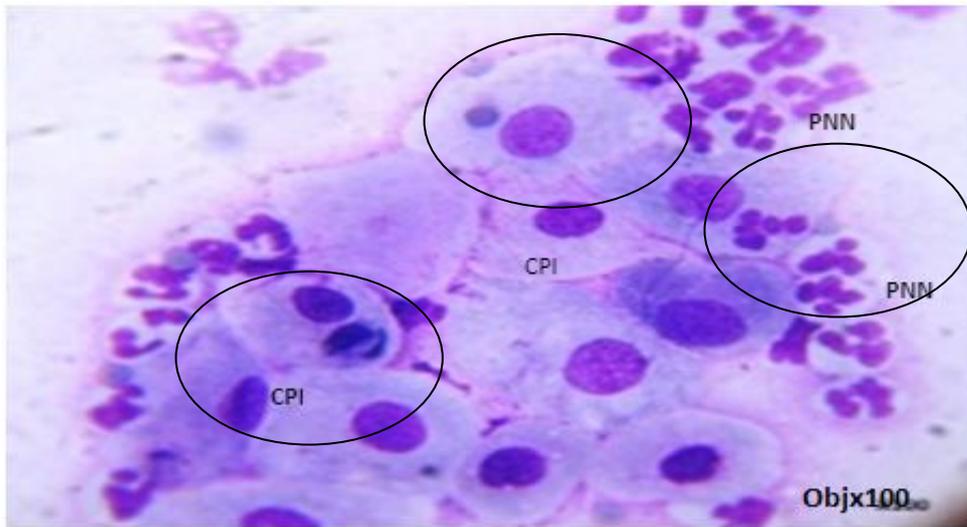


Figure 79: Vue d'un frottis vaginal de metœstrus, coloré au May-Grünwald Giemsa, au grossissement x100, cellules petites intermédiaires majoritaires et présence de cellules intermédiaires avec leucocytes superposés (cercles), fond sale, nombreux leucocytes (polynucléaires neutrophiles), mucus, indice éosinophilique < 20% CPI: cellules petites intermédiaires ; PNN : polynucléaires neutrophiles (Dr Slimani khaled mabrouk).

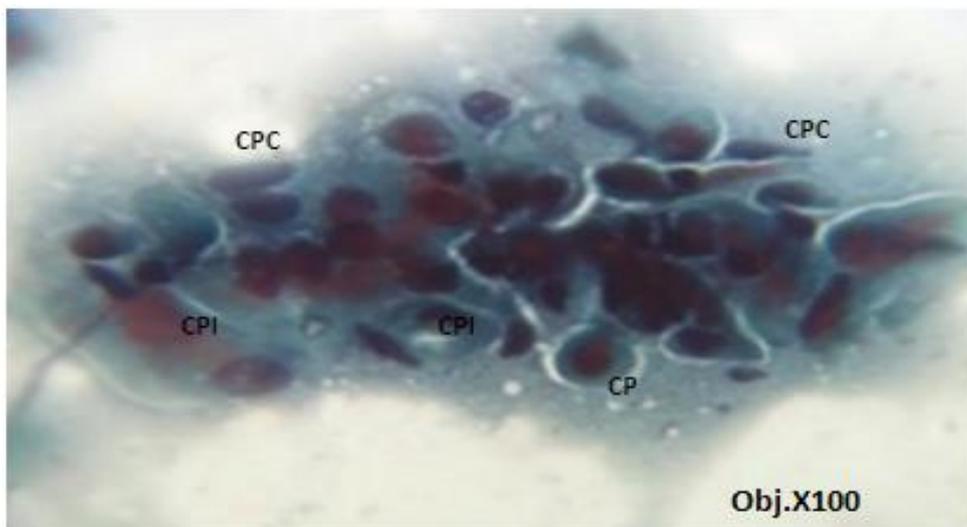


Figure 80: Vue d'un frottis vaginal de metœstrus, coloré au trichome de Harris Shorr , au grossissement x100, cellules petites intermédiaires majoritaires et présence de cellules intermédiaires basophiles avec leucocytes superposés (cercles), fond sale, nombreux leucocytes (polynucléaires neutrophiles), mucus, indice éosinophilique < 20% CPI: cellules petites intermédiaires ; CPC : cellules parabasales en colonnes , PNN : polynucléaires neutrophiles.

(Dr Slimani khaled mabrouk).

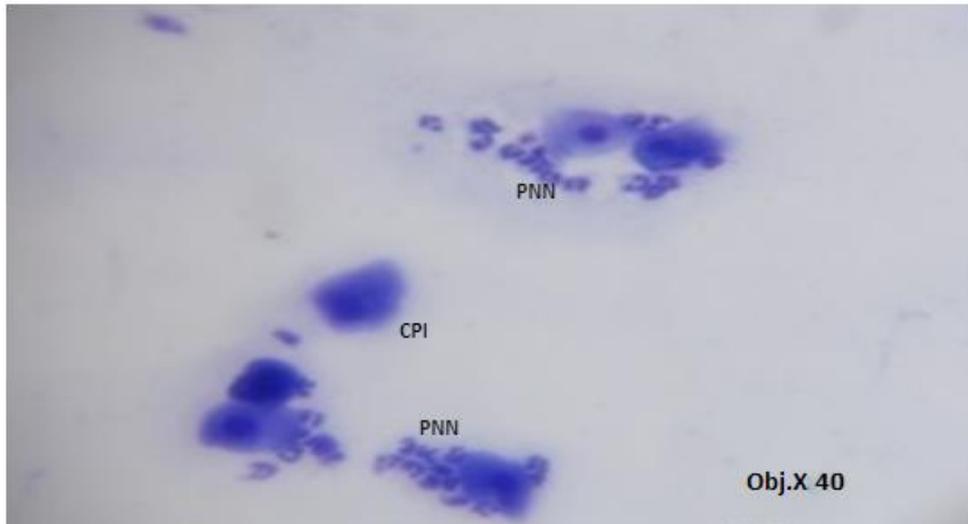


Figure 81: Vue d'un frottis vaginal de metœstrus, coloré au May-Grünwald Giemsa, au grossissement x40, cellules petites intermédiaires majoritaires, le fond devient de plus en plus propre , nombreux leucocytes (polynucléaires neutrophiles),CPI: cellules petites intermédiaires ; PNN : polynucléaires neutrophiles (Dr Slimani khaled mabrouk).

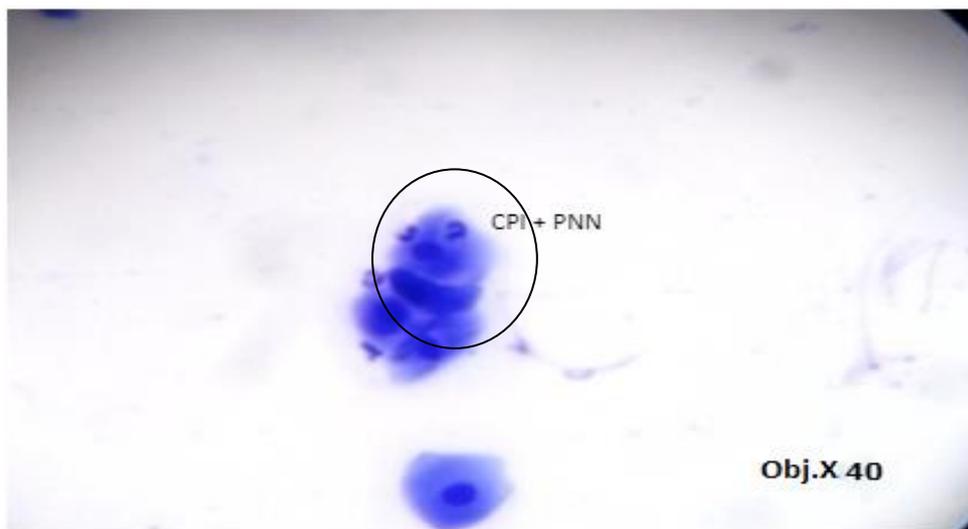


Figure 82: Vue d'un frottis vaginal de metœstrus, coloré au May-Grünwald Giemsa, au grossissement x40, cellules petites intermédiaires majoritaires et présence de cellules intermédiaires avec leucocytes superposés (cercles) le fond devient de plus en plus propre , nombreux leucocytes (polynucléaires neutrophiles),CPI: cellules petites intermédiaires ; PNN : polynucléaires neutrophiles (Dr Slimani khaled mabrouk).

g.Anœstrus

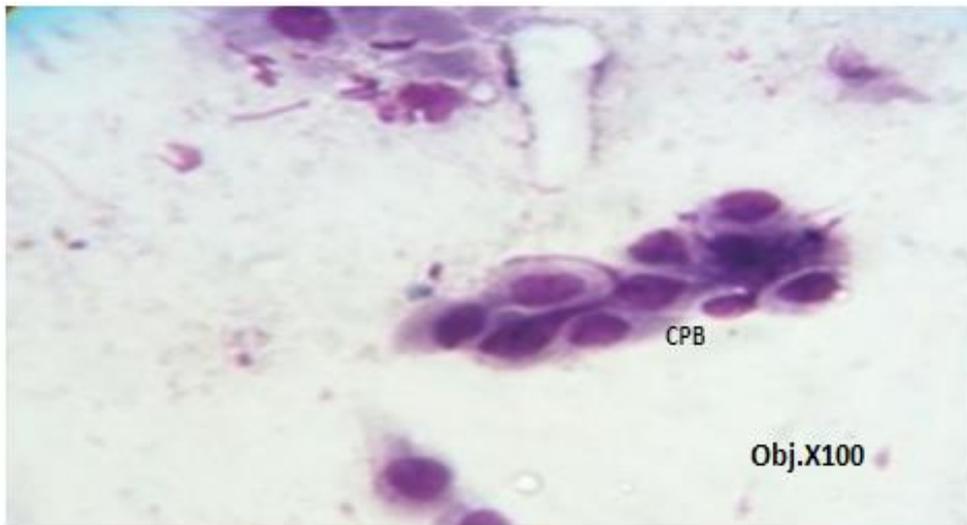


Figure 83: Vue d'un frottis vaginal d'anœstrus, coloré au May-Grünwald Giemsa, au grossissement x 100, frottis pauvre en cellules ; cellule parabasale majoritaires, le fond devient de plus en plus propre, mucus. CPB: cellules parabasales (Dr Slimani khaled mabrouk).

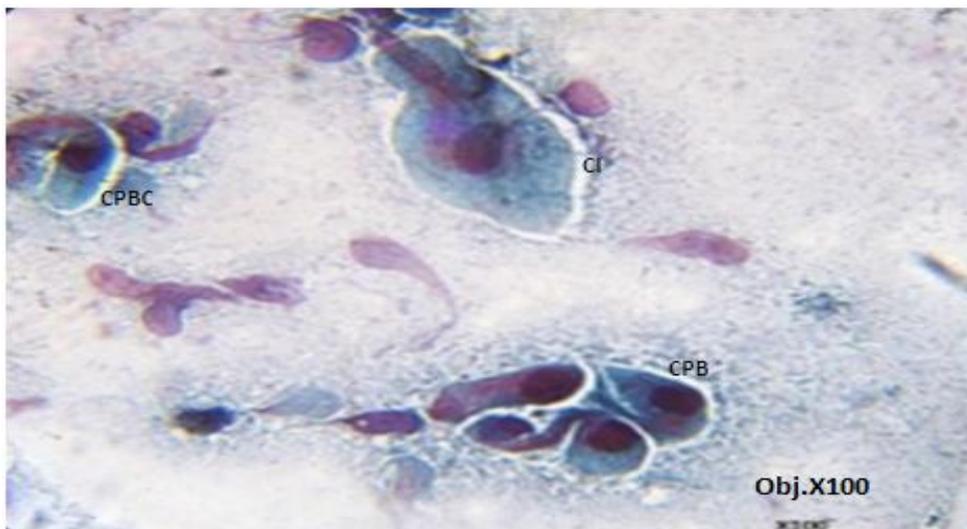


Figure 83 : Vue d'un frottis vaginal d'anœstrus, coloré au trichome de Harris Shorr, au grossissement x 100, frottis pauvre en cellules ; cellules parabasales majoritaires, mucus. CPBC: cellules parabasales en colonne ; CPB : cellules parabasale. ; CI : cellules petites intermédiaires. Indice éosinophilique <10% (Dr Slimani khaled mabrouk).

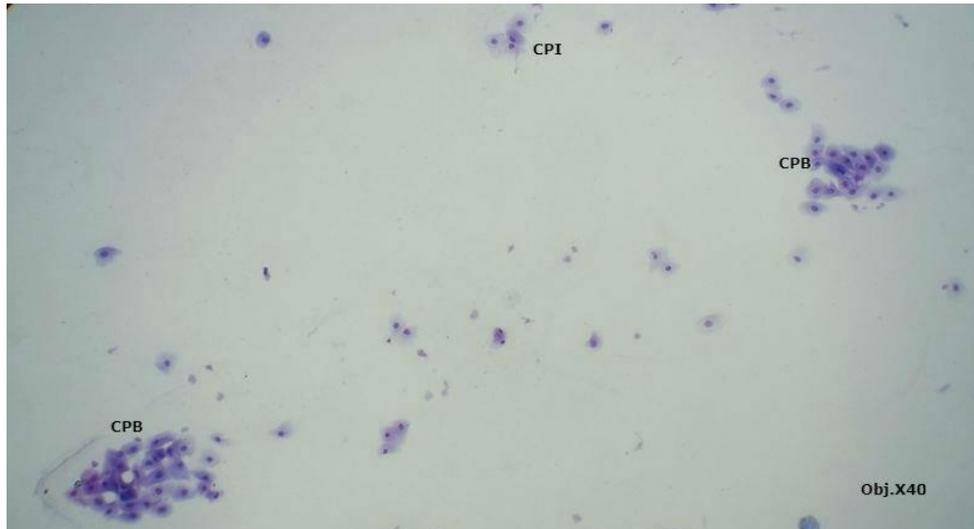


Figure 84: Vue d'un frottis vaginal d'anœstrus, coloré au May-Grünwald Giemsa, au grossissement x 40, frottis pauvre en cellules ; fond propre, cellules parabasales majoritaires, quelques cellules petites intermédiaires. CPB: cellules parabasales ; CPI : cellules petites intermédiaires (Dr Slimani khaled mabrouk).

h. Transition anœstrus –prœstrus

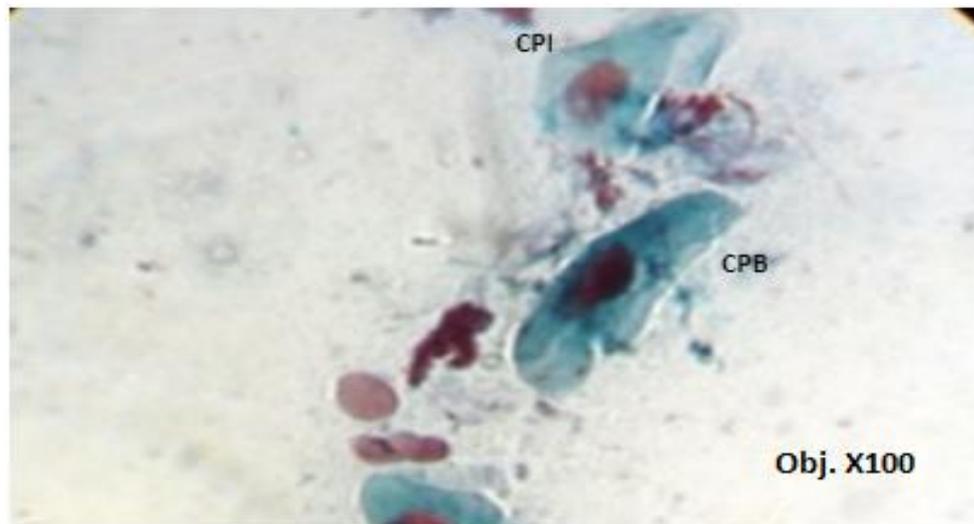


Figure 85 : Vue d'un frottis vaginal de transition d'anœstrus-prœstrus, coloré au trichome de Harris Shorr, au grossissement x 100, frottis pauvre en cellules ; présence de quelque cellules parabasales et de cellules petite intermédiaires cellules parabasales majoritaires, mucus et présence de quelques globules rouges. CPBC: cellules parabasales en colonne ; CPB : cellules parabasale. ; CPI : cellules petites intermédiaires ; Indice éosinophilique <10% (Dr Slimani khaled mabrouk).

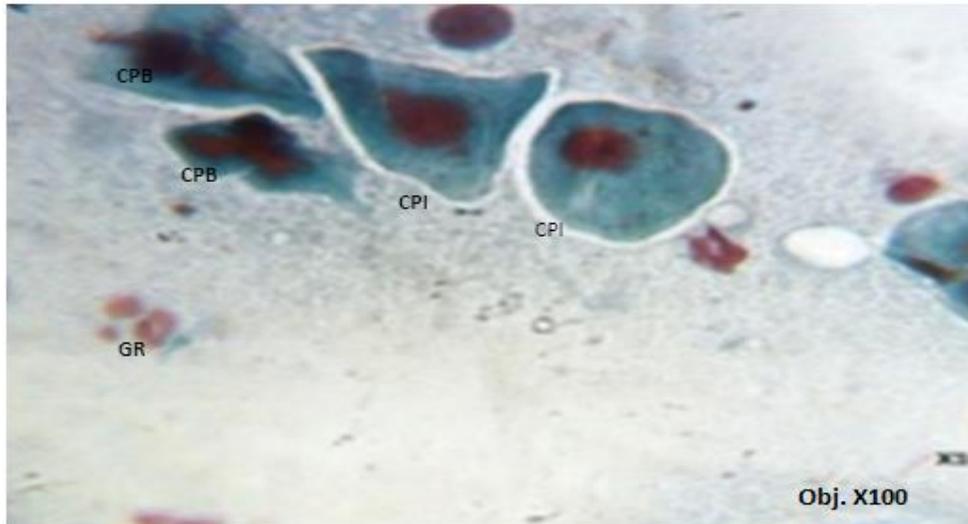


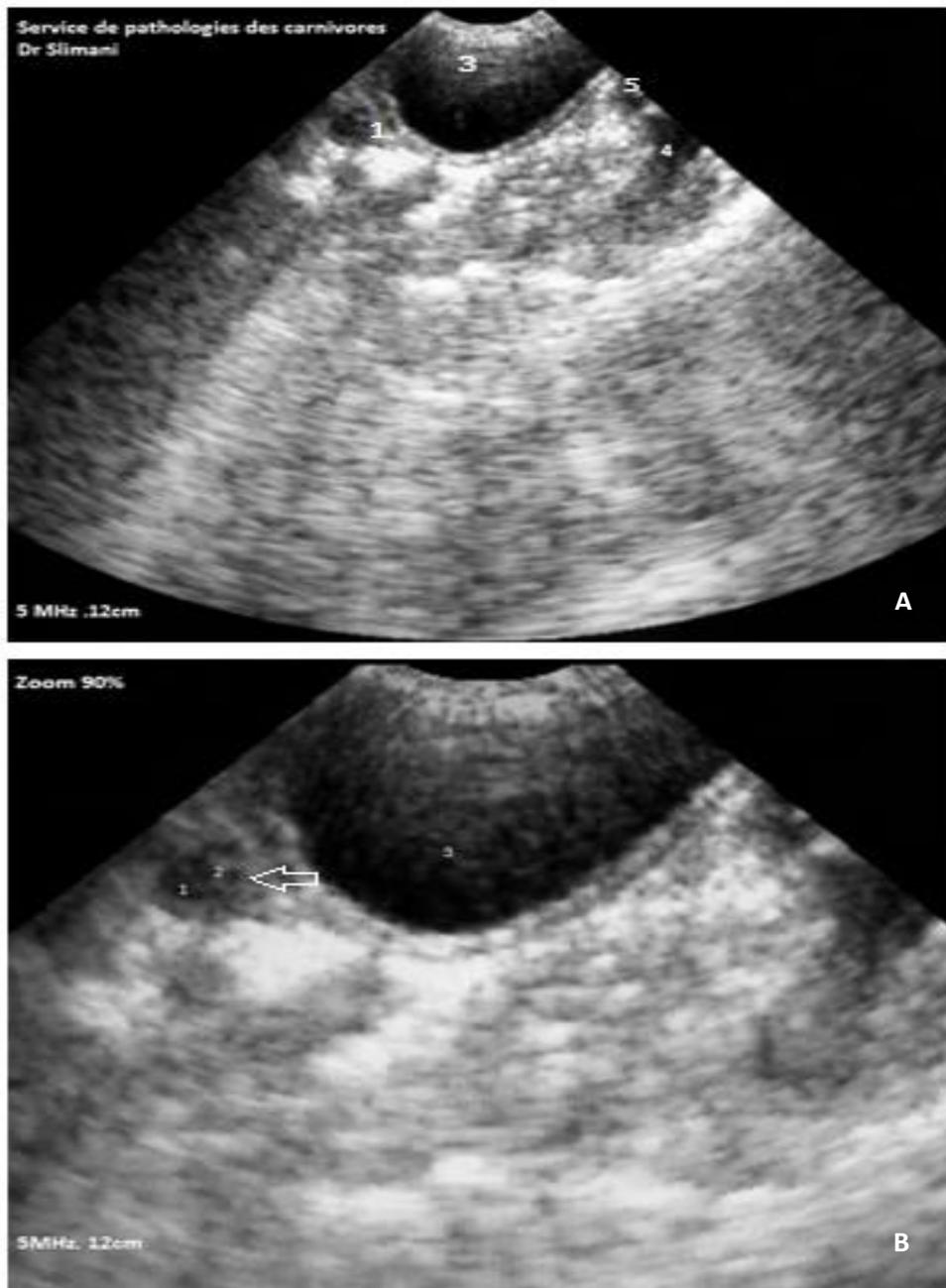
Figure 86 : Vue d'un frottis vaginal de transition d'anæstrus-præstrus, coloré au trichome de Harris Shorr, au grossissement x 100, frottis pauvre en cellules ; présence de quelque cellules parabasales et de cellules petite intermédiaires cellules parabasales majoritaires, mucus et présence de quelques globules rouges. CPBC: cellules parabasales en colonne ; CPB : cellules parabasales. ; CPI : cellules petites intermédiaires GR : globules rouges ;
Indice éosinophilique <10 (Dr Slimani khaled mabrouk).

2. Illustration du suivi échographique de la gestation : Photos échographiques réalisées durant le suivi de gestation chez 37 chiennes correspondant à la description du calendrier de gestation.



Figure 87: Vue échographique l'utérus en coupe transversale, à J14-DS, présence d'une ampoule embryonnaire (centre anéchogène) de 10 à 20 mm de diamètre (haut à gauche) à proximité de la paroi vésicale. Présence d'anses intestinales au centre échogène stroma ovarien hyperéchogène (Dr Slimani khaled mabrouk).

1 (vessie) ; 2(ampoule embryonnaire) ; 3, 4,5 (anses intestinales, muqueuse et chyle)



Figures 88, 89 : Vue échographique de l'abdomen en coupe frontale, à J16-DS, présence d'une ampoule embryonnaire (haut à gauche) plaquée contre la paroi vésicale, présence de l'embryon en forme ovulaire de 4 à 5 mm de longueur (photo B) (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A : 1 (ampoule embryonnaire) ; 3 : vessie, 4,5 : Aorte et veine cave caudale
- B: 1(liquide vitellin) ; 2 (embryon) ; 3(vessie).



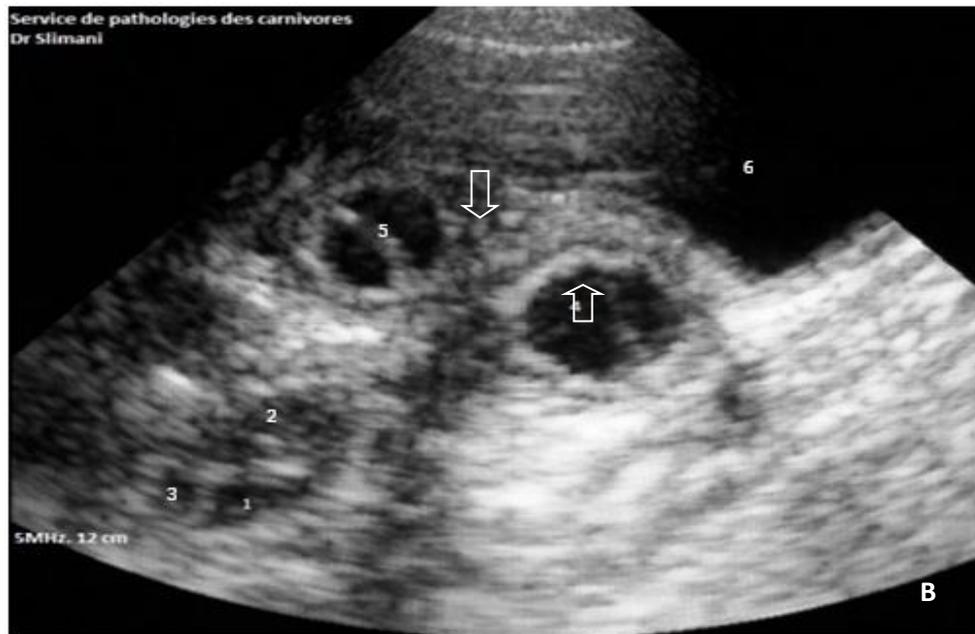
Figures 90 ,91 : Vue échographique de l'abdomen en coupe frontale, à J17-DS, présence de deux ampoules embryonnaires (haut à droite) superposées de 15 mm de diamètre. Début de formation des annexes Le chorion entoure complètement l'œuf, l'embryon (photos à droite) de 6mm de long est accolé au chorion (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A : 1(embryon) ; 2 (allantoïde en formation)
- B: 1(embryon) ; 2 (liquide vitellin) ; 3(chorion lisse) ; 4 (chorion villeux).



Figures 92,93 : Vue échographique de l'abdomen en coupe transversale, à J19-DS, présence d'une ampoule embryonnaire de 14 à 16 mm de diamètre, Embryon de forme ovale, qui se sépare du chorion, le chorion vilieux et le chorion lisse devenaient nettement différenciables (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A : ampoule en coupe transversale, 1(chorion vilieux) ; 2 (chorion lisse) 3 (embryon en forme ovale) ; 4 (allantoïde sous forme d'une ligne hyperéchogène).
- B : 1(chorion vilieux) ; 2 (chorion lisse) ; 3(vessie).



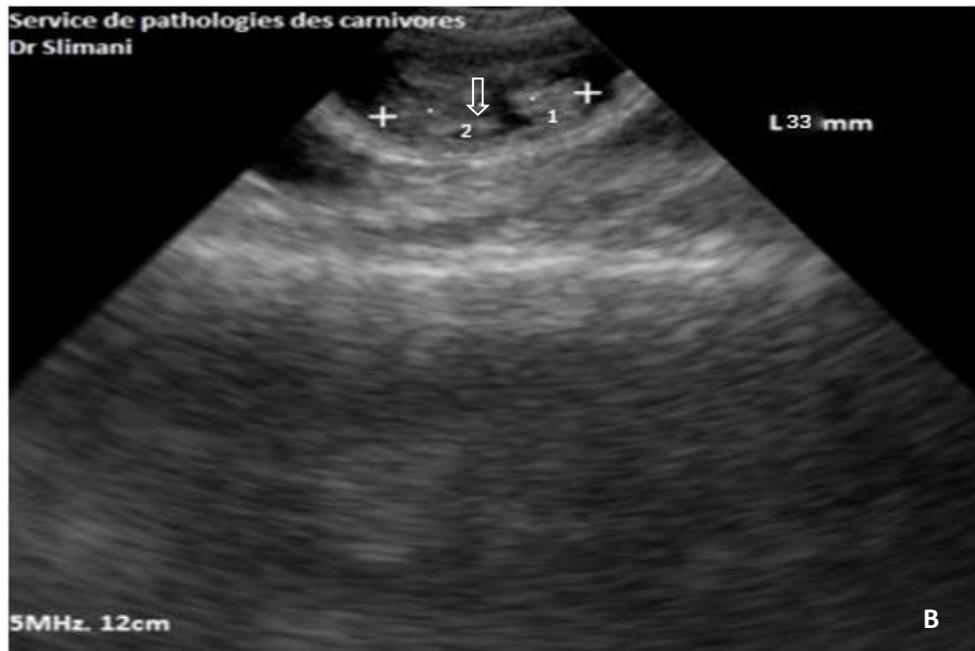
Figures 94,95: Vue échographique de l'abdomen en coupe frontale, ampoule embryonnaire de 23mm de diamètre à J22-DS, l'embryon est nettement sous la forme d'un 8, de 15 mm de long, vésicule vitelline rétractée en forme d'une ligne hyperéchogène (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A: 1(chorion villeux) ; 2(vitellus) ; 4(embryon en forme de 8).
- B : 1(embryon avec bourgeon du membre antérieur) ; 2(bourgeon du membre antérieur) ; 3(vésicule vitelline rétractée) ; 4(liquide vitellin) ; 5(vésicule vitelline rétractée en forme d'un trait hyperéchogène) ; 6(vessie).



Figures 96,97 : Vue échographique de l'abdomen en coupe frontale, ampoule embryonnaire de 22mm à 24 mm de diamètre à J24-DS, l'embryon de 12 mm de long, présente des bourgeons des membres antérieurs et postérieurs (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A : 1(embryon en coupe transversale avec 4 points hyperéchogènes).
- B : 1(tête avec hémisphères cérébraux visibles le crâne hyperéchogène sur les pariétaux en coupe longitudinale) ,2 vésicule vitelline rétractée) ; 3(cœur pas encore différencié).



Figures 98,99: vue échographique de l'abdomen en coupe frontale, ampoule embryonnaire à J25-DS, embryon de 33 mm de long, bourgeons des membres antérieurs et postérieurs bien délimités, tête volumineuse, hémisphères cérébraux visibles (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A: 1 (chorion lisse) ; 2 (tête) ; 3(cœur) ; 4(bourgeons d'un membre postérieur).
- B : 1(tête) ; (2 cœur).



Figures 100,101 : ampoule fœtale en coupe frontale et sagittale à J26-DS fœtus de 35 à 40 mm de longueur, ossification des os de la face sous forme de point hyperéchogène, début d'ossification des os des membres (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A : 1(tête) ; 2 (membre antérieur), 3 (cœur avec deux cavité)
- B : 1(membre antérieur) ; 2(tête) ; 3(membre postérieur), 4(sac vitellin).



Figure 102 : ampoule fœtale en coupe frontale à J27-DS, la vésicule vitelline est épaisse

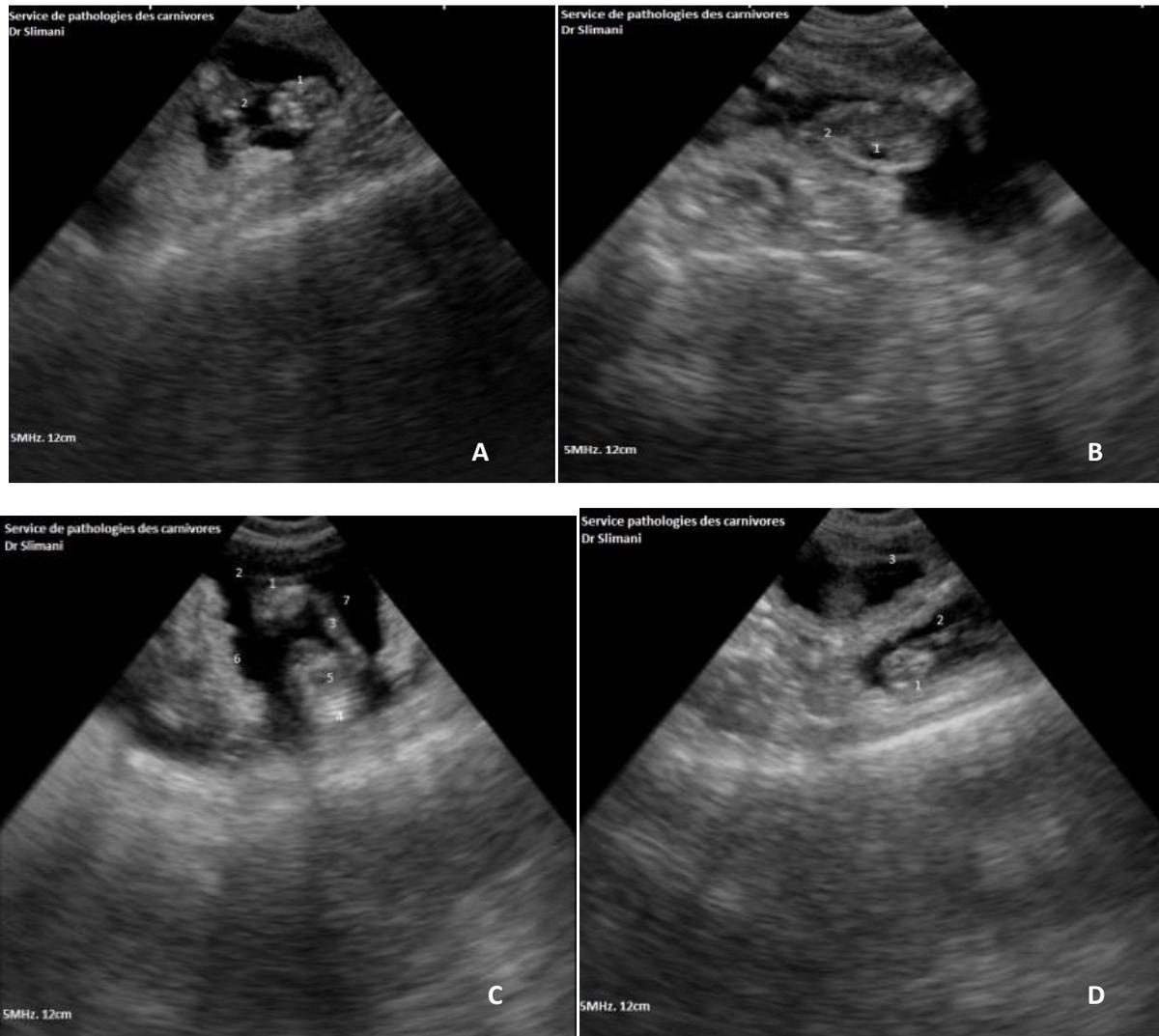
(Dr Slimani khaled mabrouk).

1(vésicule vitelline épaisse) ; 2(cœur) ; 3 (membre) antérieur ; 4(membre antérieur)



Figures 103,104 : vue d'une ampoule fœtale en coupe frontale à J29-DS, le cœur est délimité est au sein de l'aire pulmonaire ; la vésicule vitelline, chorion lisse épais ; le rachis en début d'ossification dessine une forme d'échelle ; Le diamètre de l'ampoule avoisine les 50 mm, ossification des os de la face et des os pariétaux de la tête (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A: 1(cœur) ; 2(plastron costale en début d'ossification) ,3 (rachis).
- B : 1(chorion lisse, hématome marginale) ; 2(tête) ; 3(plastron costal en ossification) ; 4(cœur) ; (vésicule vitelline très épaisse).



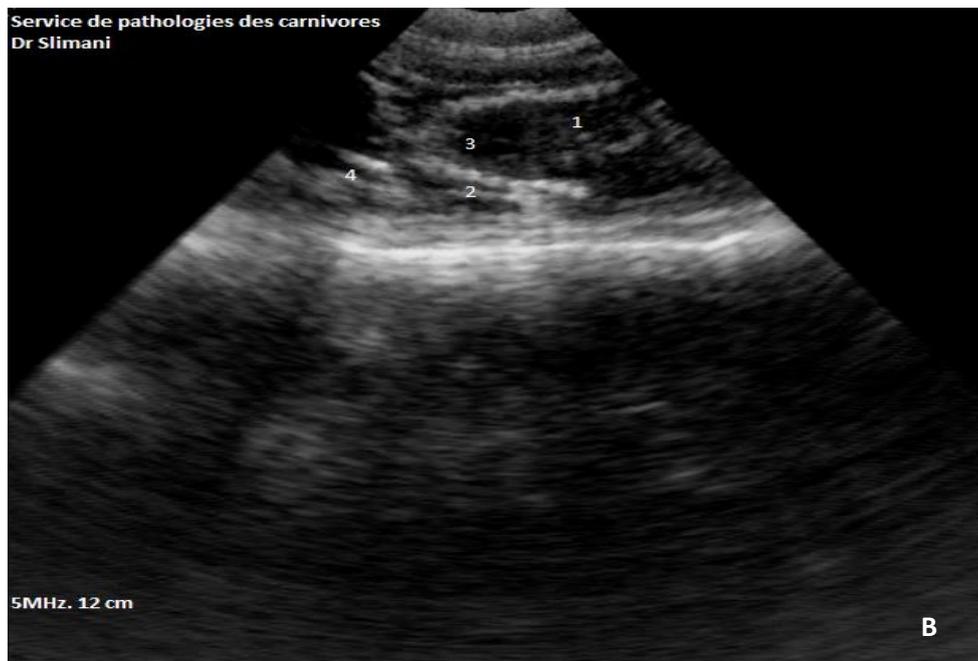
Figures 105,106, 107,108 : vue d'une ampoule fœtale en coupe frontale et sagittale à J30-DS ; L'ensemble du crane forme l'aspect d'une tête d'insecte ; L'estomac est une poche anéchogène de 3mm à 7mm de diamètre : l'ossification des os long est plus nettement visible. Annexes bien développées, membrane allantoïde visible, cote en voie d'ossification légère hyperéchogénicité (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A : 1(tête d'insecte) ; 2 (cœur)
- B : 1(estomac) ; 2(cœur)
- C : 1(tête) ; 2 (membrane allantoïde) ; 3(membre antérieure) ; 4(cotes) ; 5(cœur) ; 6 (chorion) ; 7 (allantoïde).
- D : 1(tête d'insecte) ; 2(membre antérieur) ; 3 (ampoule).



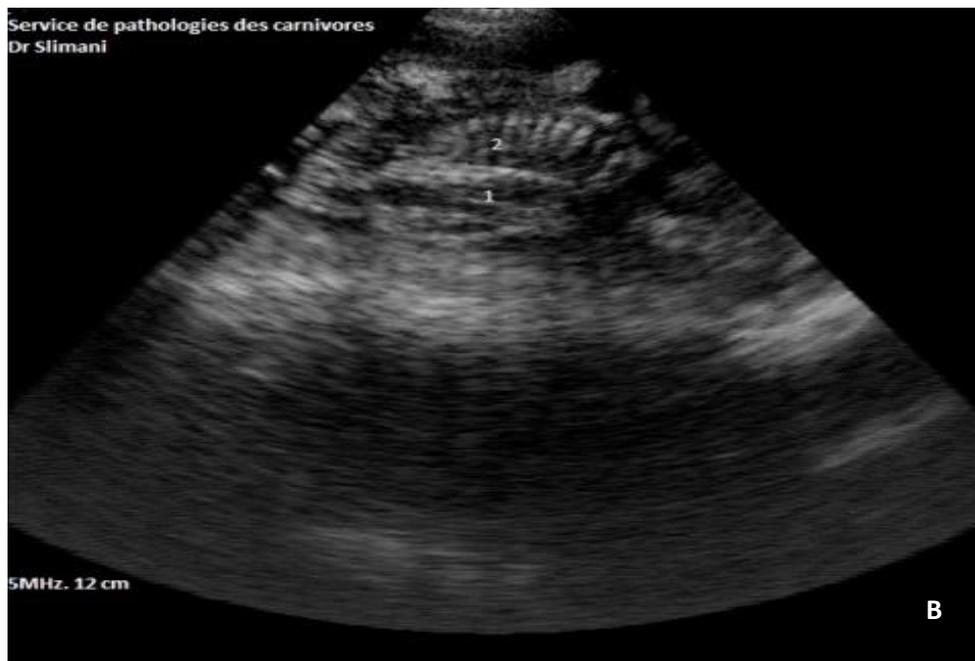
Figures 109,110 : ampoules fœtales en coupe sagittale et frontale à J 32-DS, L'ossification des zygomatiques est visible. Un aspect de la tête caractéristique d'un chiot, la vessie sous forme d'une vésicule anéchogène en région pelvienne, le rachis est visible sous forme de points hyperéchogène le long du fœtus, plastron costale ossifié (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A: 1(tête et zygomatique ossifié) ; 2(mâchoire) ; 3(membre antérieure) ; 4(rachis) ,5(cœurs) ; 6 (chorion).
- B: 1(tête) ; 2(cœur) ; 3(plastron costale) ; 4(estomac) ; 5(vessie).



Figures 111,112 : ampoules en fœtales en coupe frontale et sagittale à J35-DS, La distinction des poumons, du foie et de la vésicule biliaire était facile Les rachis étaient visibles avec 2 noyaux d'ossification par vertèbre L'ilium et les bourgeons génitaux devenaient nettement visibles cœur était divisé sur son axe longitudinale en deux cavités distinctes qui correspondaient aux ventricules (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A : 1(vésicule biliaire) ; 2(foie) ; 3(vessie) ; 4(bourgeons génitaux)
- B : 1(foie) ; 2(cotes) ,3(cœur) ; 4(scapulas).



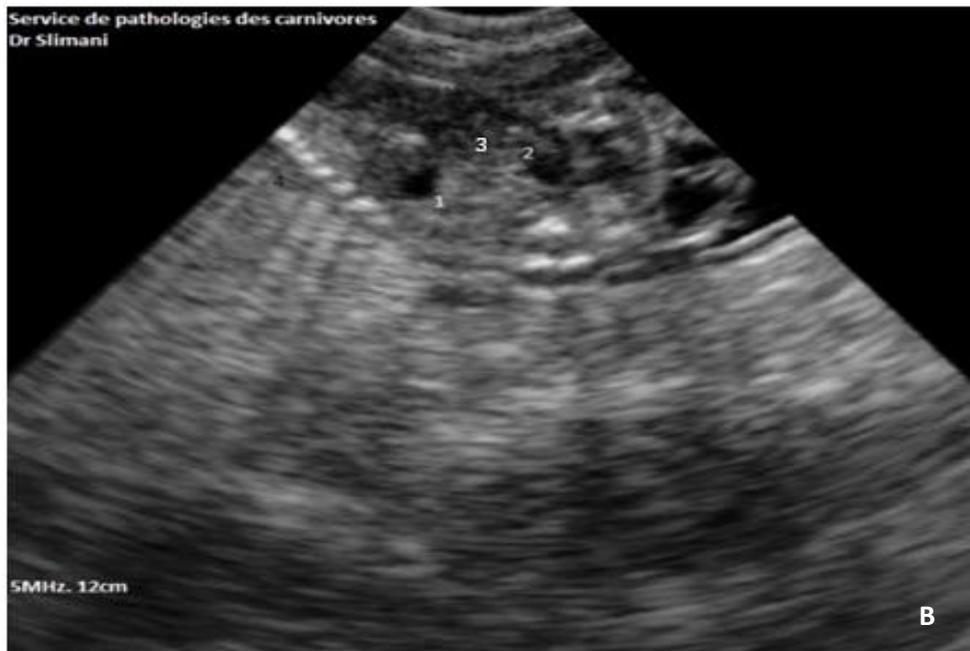
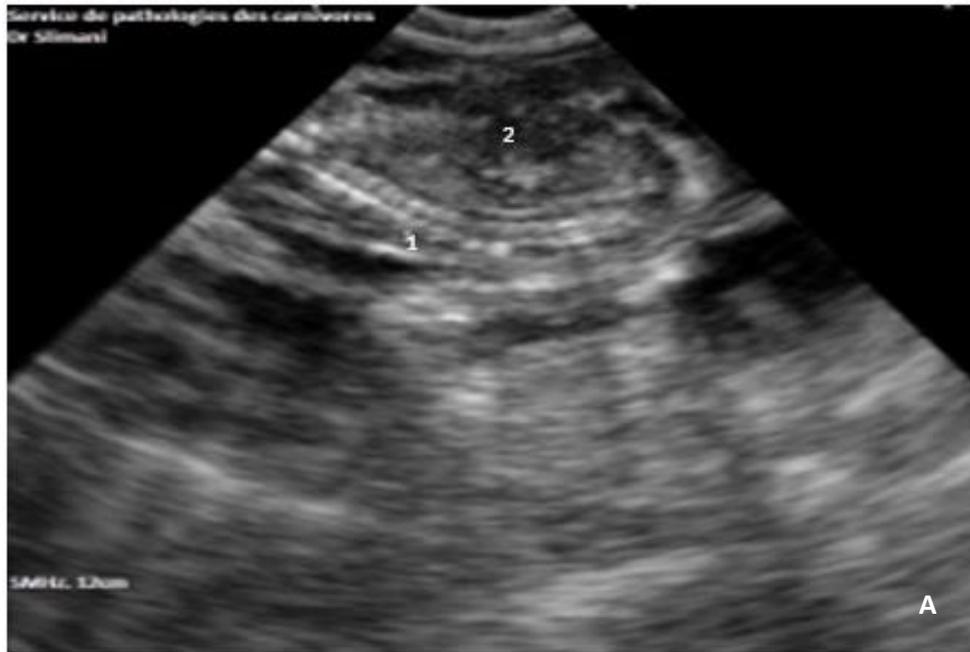
Figures 113,114 : ampoules foetale en coupe frontale et sagittale longitudinale à J36-DS, Les cotes et les sternèbres en ossification formaient des cônes d'ombre, scapulas et rachis, et os pelvien en ossification sont hyperéchogènes (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A : 1(scapulas) ; 2(rachis en deux points hyperéchogènes) ; 3(os iliaques).
- B : 1(vertèbres thoracique) ; 2(cotes et sternèbres avec cône d'ombre).



Figure 115 : coupe frontale d'une ampoule fœtale à J37-DS, la veine cave caudale et la veine ombilicale sont visible sous forme de trait hypoéchogène le long de l'abdomen (Dr Slimani khaled mabrouk).

1(vessie) ; 2(veine cave caudale) ; 3(veine ombilicale) ; 4(cœur).



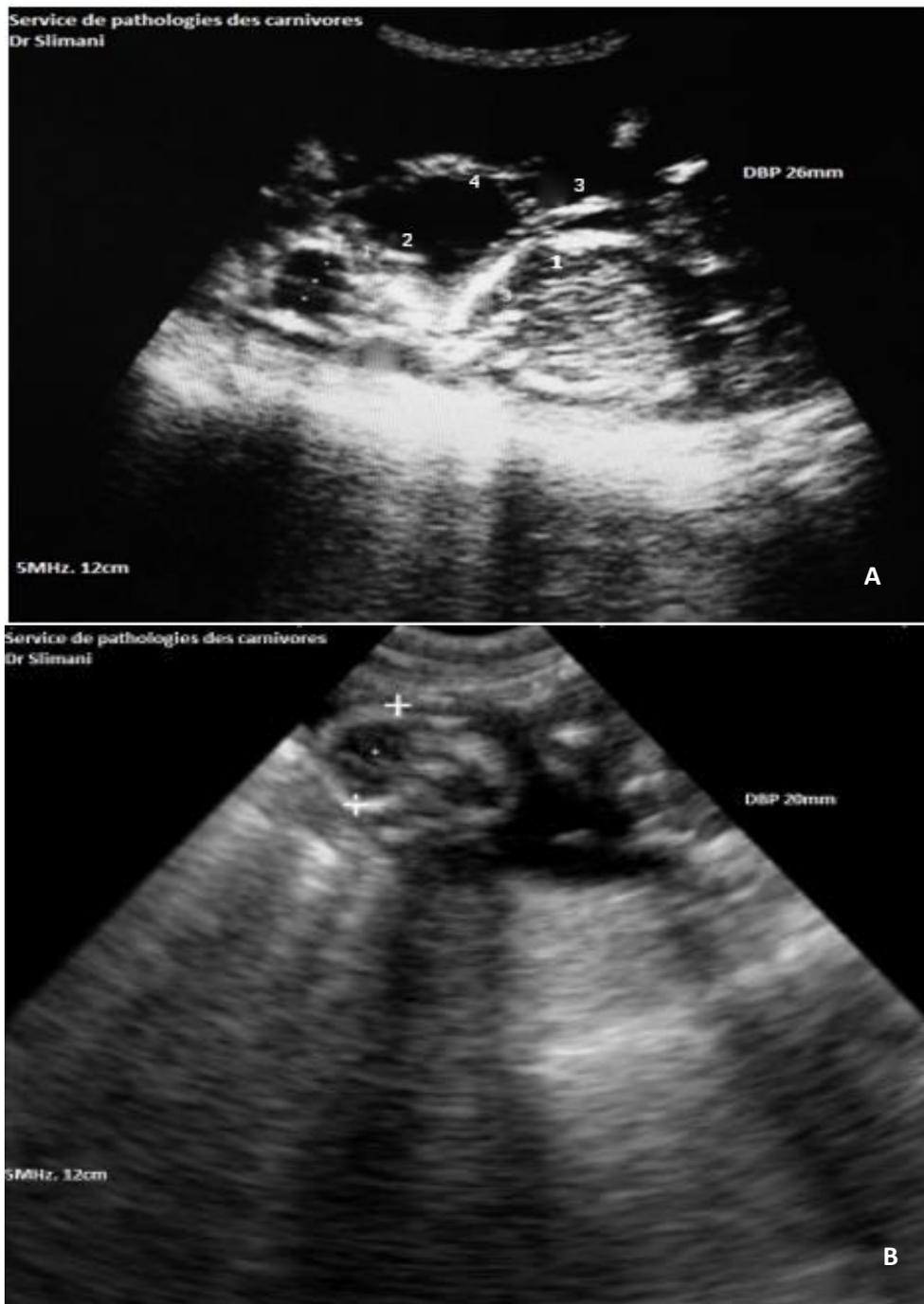
Figures 116,117 : ampoules fœtales en coupes sagittale et frontale à J38-DS ; la vésicule biliaire sous forme d'une sphère anéchogène de 3 mm à 5 mm de diamètre. Les vertèbres présentaient 3 noyaux d'ossification hyperéchogènes (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A : 1(vertèbres avec trois points hyperéchogènes) ; 2(foie).
- B : 1(vésicule biliaire) ; 2(vessie) ; 3(foie).



Figures 118,119 : ampoules fœtales en coupes frontales à J40-DS ; les cavités cardiaques étaient bien différenciées, d'autres viscères abdominaux sont bien différenciés (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A : 1(cœur avec 4cavité cardiaque hypoéchogène) ; 2(aire pulmonaire) ; 3(foie).
- B : 1(cœurs avec cavité cardiaque différencié) ; 2(estomac) ; 3(foie).



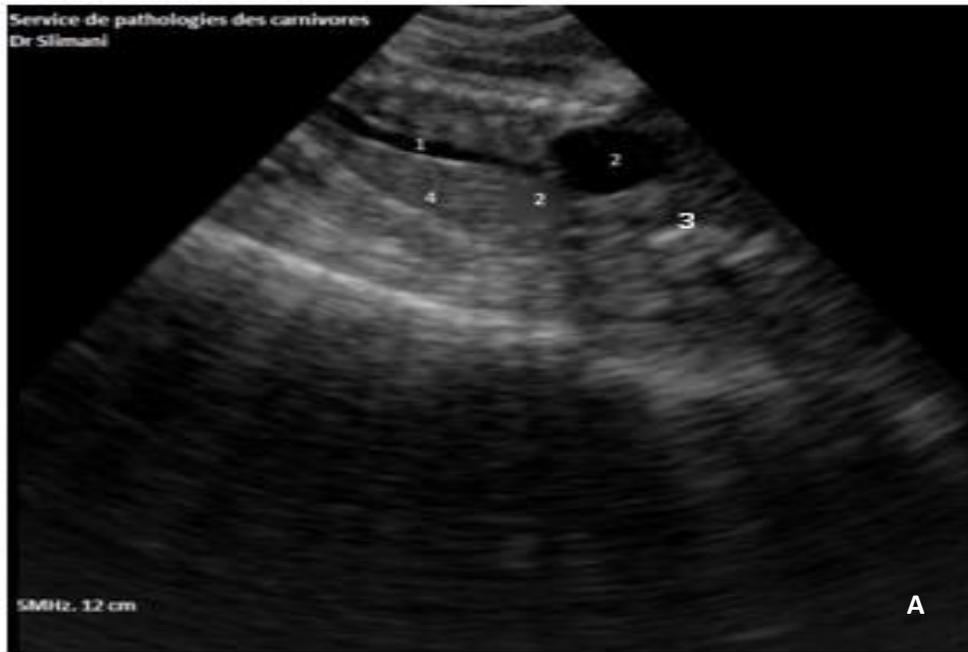
Figures 120,121 : ampoules fœtales en coupe frontales à J43-DS ; les sternèbres et les os de la mâchoire sont hyperéchogènes.les diaphyses des os longs s'évasaient, la tête montre une ossification des os de la face et de la mâchoire et un DBP avoisinant les 20mm (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A : 1(plastron costale) ; 2(os de la mâchoire) ; 3(os long) ; 4(cordon ombilical).
- B : tête avec ossification de tous les os du crâne et de la mâchoire.



Figures 122,123 : ampoules fœtales en coupes sagittales à J44-DS ; la vésicule biliaire prenait une forme ovale. Les ischions étaient sous la forme d'un trait hyperéchogène. Fœtus mesure environ de 10+/-1 cm de longueur (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A: 1(vertèbres lombaires) ; 2(ischions) ; 3 (os iliaque).
- B : 1(vésicule biliaire) ; 2(estomac).



Figures 124,125 : ampoules fœtales en coupes longitudinales et frontale à J45-DS, l'œsophage forme un long canal hypoéchogène qui communique avec l'estomac, estomac facilement détectable, la masse intestinale possède une échogénicité hétérogène, cordon ombilical visible (Dr Slimani khaled mabrouk).

- A : 1(œsophage) ; 2(estomac) ; 3(masse intestinale) ; 4(poumons).
- B : 1(masse intestinale) ; 2(cœur avec 4 cavités) ; 3(cordon ombilical) ; 4(rein).



Figures 126,127: ampoules fœtales en coupes sagittale et transversale à J50-DS, les bourgeons dentaires sous forme de petit points hyperéchogènes ordonnées et la peau sont détectables, vertèbres et os longs fortement hyperéchogènes, le fœtus mesure plus de 10 à 15 cm de long
(Dr Slimani khaled mabrouk).

- A : 1(os pariétaux du crane) ; 2(bourgeons dentaires).
- B : 1(membre postérieur) ; 2 (patte avec coussinets) ; 3(vertèbres) ; 4(peau),5(queue).



Figures 128,129 : fœtus en coupe sagittale et frontale à J53-DS, cœur bien différencié avec ventricules et atriums, appareil génitale visible et urètre sous forme d'un canal hypoéchogène, la limite entre les viscères abdominaux et poumons est bien visible, foie et masse intestinal sont volumineux (Dr Slimani khaled mabrouk).

A : 1(urètre), 2(membre postérieur) ; 3(peau) ; 4 (membres antérieurs).

B : 1(cœur) ; 2(poumons) ; 3et 4(foie et masse intestinale).

REFERENCES

- Arbeiter K, Dobretsberger M, Müller E. et al. Ein direkter Nachweis der Ovulation und Fertilisation beim Hund durch Progesteronverlaufsuntersuchungen. *J.Vet.Med.A.* 1991 ;38, p:696-701.
- Baron F. étude de la période pré-ovulatoire chez la chienne berger allemand. Thèse :Méd. Vét .Alfort.2006; p: 90.
- Blendiger K. physiology and pathology of the estrus cycles of the bitch. Proceeding of the SCIVAC congress, Pimini, Italy. 2007;[<http://www.ivis.org>].
- Boyd J.S, Renton J.P, Harvey M.J.A. et al. Problems associated with ultrasonography of the canine ovary around the time of ovulation. *J. Repro. Fer* 1993; 47, p : 101-105.
- Barone R. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Appareil uro-génital, fœtus et ses annexes. 1978; Tome III : 272-445,p:505-671.
- Bondestam S, Karkkainen M, Alitalo I, Forss M. Evaluating the accuracy of canine pregnancy diagnosis and litter size using real-time, ultrasound.1984; *Acta.Vet.Scand*: 25,p:,327-332.
- Bernard E. Diagnostic et suivi de la gestation par échographie chez la chienne : élaboration d'un document pédagogique. Thèse Méd.Vét. Lyon. 2002 ; p : 89.
- Barrau M.D, Torbit C.A, Tietz W.J. Development of the implantation chamber in the pregnant bitch. *Am.J.Anat.*1976; 143,p: 115-130.
- Badinand F, Fontbonne A. Repeatability of events during successive estrous periods within bitches: comparison between breeding results and clinical and hormonal data. *J. Reprod. Fertil; Suppl* .1993; 47, p: 548.
- Baker R, Lumsden J.H. Appareil génital. In : Atlas de Cytologie Canine et Féline. Paris: Masson. 2001.
- Bowen R.A. Techniques for preparing a canine vaginal smear. [en-ligne]. Fort Collins (USA). Colorado State University [<http://www.vivo.colostate.edu>].2000; modifié le 5 juillet 2000.
- Baba E, Hata H, Fukata T, Arakawa A. Vaginal and uterine microflora of adult dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1983; 44 (4), p: 606-609.
- Baker R, Lumsden J.H. Appareil génital. In : Atlas de Cytologie Canine et Féline. Paris : Masson. 2001; modifié le 5 juillet 2001.
- Beijerinck N.J, Dieleman S.J, Kooistra H.S et al. Low doses of bromocryptine shorten the interestrus interval in the bitch without lowering plasma prolactin concentration. *Theriogenology*.2003; 60, p: 1379-86;
- Bouchard G.F, Solorzano N, Concannon P.W, Youngquist R.S, Bierschwal C.J. Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology and Elisa for progesterone. *Theriogenology*.1991; 35, 3, p : 603-611.
- Buff S, Salesse H .Suivi de chaleurs chez une chienne. *Point Vet*.2000 ; 31,p :341-344.
- Concannon P.W. Breeding cycles of the domestic bitch. *Anim Repro Sci* .2011; 124, p: 200-210.
- Concannon P.W, England G, Verstegen J, Linde Forsberg C .Recent advances in small animal reproduction. International Veterinary Service, Ithaca, New York.2002.

- Concannon P.W. Canine pregnancy: predicting parturition and timing events of gestation. In: Recent advances in Small Animal Reproduction, International Veterinary Information Service, Ithaca, NY.2000;[<http://www.ivis.org>].
- Concannon P.W, Tsutsui T, Schille V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *J.Reprod. Fertil, Suppl.*2001; 57, p: 169-179.
- Concannon P.W, Mccann J.P, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil, Suppl.*1989; 39, p: 3-25.
- Concannon P.W, Digregorio G.B. Canine vaginal cytology. In Burke editor. Small animal reproduction and infertility. Philadelphia.1987; p: 96-111.
- Concannon P.W, Hansel W, Mc Entee K. Changes in LH, progesterone and sexual behaviour associated with preovulatory luteinisation in the bitch. *Biol. Reprod.*1975; 17, p: 604-613.
- Concannon P.W. Clinical and endocrine correlates of canine ovarian cycles and pregnancy. In Kirk editor. Current veterinary therapy small animal practice IX. Philadelphia WB Saunders. 1986; p: 1214-1224.
- Concannon P.W, Verstegen J. Pregnancy management in dogs and cats. Proceedings of the world congress WASAVA.2004; [<http://www.ivis.org>].
- Concannon P.W. Understanding and monitoring canine pregnancy. WSAVA. 2005; [<http://www.ivis.org>].
- Concannon P.W, LEIN D.H. Hormonal and clinical correlates of ovarian cycles, ovulation, pseudopregnancy and pregnancy in dogs, *Small Anim.Pract.*1989; 10, p: 1269-1282.
- 3 5 Cirit, U, Bacinoglu, S, Cangul, I. T, Kaya, H. H, Tas, M (2007). The effects of a low dose of cabergoline on induction of estrus and pregnancy rates in anestrus bitches. *Animal reproduction science*. vol. 101, n° 1–2, pp. 134-144.
- Chaffaux S, Bosse P.H. Biologie de la reproduction du chat et du chien. Encyclopédie vétérinaire, Reproduction .1997 ; 0100, p : 1-16.
- Crepel S. Le développement embryonnaire du chien : de la fécondation à la naissance. *PMCA Supp. P. Soignant.*1998 ; 33, 1, p : 25-30
- Cathenoz L, 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'école Nationale vétérinaire d'Alfort de 1990 à 1993 .Thèse Méd.Vét.1996 ;n°38.
- Cartee R.E, Rowles T. Preliminary study of the ultrasonic diagnosis of pregnancy and fetal development in the dog. *Am.J.Vet.Res;* 1984; 45, n°7, p: 1259-1265.
- Corre J, Rozenbaum M. Elaboration d'un document pédagogique de reproduction canine. Thèse Méd. Vét. Alfort.2004.
- Choquart V. suivi échographique et datation de la gestation chez la chienne à partir du pic de LH.Thèse Méd. Vét. Nantes .2002 ; n°18
- Davidson A.P, Nyland T.G., Tsuitsui T. Pregnancy diagnosis with ultrasound in the domestic cat. *Veterinary radiology.* 1986; 27,4 ,p:109-114.

- Durrant B.S, Ravida N., Spady T et al. New technologies for the study of carnivore reproduction. *Theriogenology*. 2006; p:1729-1736.
- De Gier J, Kooistra H.S, Djadjadiningrat-Laanen S.C et al. Temporal relations between plasma concentrations of LH, FSH, oestradiol 17 β , progesterone, prolactin and a melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, ovulatory and early luteal phase in the bitch *Theriogenology*. 2006; 65, p: 1346-1359.
- De Gier J, Beijerink N.J, Kooistra H.S, Okkens A.C .Physiology of the canine anoestrus and methods for manipulation of this length.*Reprod Dom Anim*.2008; 43,p:157-164.
- Dumon C .Vaginal smears in the bitch. In *Indispensable Reproduction*, (ed. PMAC).1992; pp. 47-52, 7508 Paris.
- Dumon C, Fontbonne A. Reproduction du chien et du chat. Coll. Les indispensables de l'animal de compagnie.P.M.C.A. 2009 ; p : 287.
- Dore M.A. The role of the vaginal smear in the detection of metoestrus and anoestrus in the bitch. *J. small Anim. Pract.*1978; 19, p: 561-572.
- Dettle E.E., Bertschinger H.J. et al. Luteolysis in early diestrous beagle bitches. *Theriogenology*. 1988; 29, p: 757-763.
- De Coster R, Beckers J.F, Wouters-Ballman P, Ectors F. Variations de la LH, de la FSH, du 17 β oestradiol et de la progestérone au cours du cycle oestral de la chienne. *Ann. Méd. Vét.*1979; 123, p: 177-184.
- Doucet F, Vanniménus 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.
- England G, Concannon P.W. Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations.In *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Juin 2002; [<http://www.ivis.org>].
- England G, Yeager A, Concannon P.W. Ultrasound imaging of the reproductive tract in the bitch In *Recent advances in small animal reproduction*. International Veterinary Service.2003; [www.ivis.org].
- England G, Yeager A, Concannon P.W. Ultrasound imaging of the reproductive tract of the bitch. In *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Juillet 2003; [<http://www.ivis.org>].
- England G, Allen W.E. Ultrasonography and histological appearance of the canine ovary. *Vet. Rec.*1989; 125, p: 555-556.
- England G, Yeager A.E. Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during estrus, ovulation and early pregnancy. *J. Repro. Fert.* 1993; 47, p: 107-117.
- England G, Allen W.E. Real time ultrasonic imaging of the ovary and uterus of the dog.*J.Reprod.Fert. Suppl.*2002; 39, p: 91-100.
- England G, Allen W.E, Porter D.J. Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: development of the conceptus and determination of gestational age .*J.small Anim.Pract.*1990; 31, p:324-329.

- Evans H.E, Christensen G.C. Miller's anatomy of the dog. W B Saunders company. Ed 2. 1979; p: 13-77.
- Evans H.E. Prenatal development. In: Miller's Anatomy of the dog. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders. 1993 ;p: 32-54,
- Evans J.M, Savage T;J. The collection of vaginal smears from bitches. Vet. Rec. 1970; 87, p: 598-599.
- Eilts B.E, Davidson A.P, Hosgood G. et al. Factors affecting gestation duration in the bitch. Theriogenology. 2005; 64, p: 242-251.
- England G, Allen W.E. Variability of the time of calculated LH release in 218 canine pregnancies. Vet. Rec. 1990; 125, p: 624-625.
- England G. Vaginal cytology and cervicovaginal mucus arborisation in the breeding management of bitches. J. small Anim. Pract. 1992; 33, p: 577-582.
- Eker K, Salmanoglu R. Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and corpora lutea formation in a bitch. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2006; 30, p: 589-592.
- England G. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. Theriogenology. 2006; 66, p: 1410-1418.
- England G, Concannon P.W. Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. In: Recent Advances in Small Animal Reproduction, 2000; [<http://www.ivis.org>].
- Fontbonne A, Buff S, Garnier F. Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine. Point Vét. 2000 ; 31(209), p : 395-401.
- Fontbonne A. Diaporama de cours : D1 gestation. ENVA. 2003; p: 142.
- Fontbonne A. In vivo ovulation, oocyte maturation and fertilisation in the bitch. Thèse de doctorat de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. 2008 ; p : 116.
- Fontbonne A. Les pièges des frottis vaginaux chez la chienne. Point vét ; 1996 ; 28 ,p : 19-25.
- Fontbonne A, Malandain E. Echographie ovarienne et suivi de l'œstrus chez la chienne et la chatte. WALTHAM Focus, 2006 ; 16, n°2, p: 22-29. [<http://www.ivis.org>].
- Feldman, Nelson. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: Canine and feline endocrinology and reproduction. 2 nd ed. Philadelphia: WB Saunders. 1996; p: 526-546.
- Fayrer, Hosken R. Canine theriogenology notes (female). Georgia (USA): University of Georgia. 1996; [<http://lam.vet.uga.edu>].
- Fontbonne A, Levy X, Fontaine E, Gilson C. Guide practice of canine and feline clinical reproduction. December 2008; p: 41-43.
- 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 ; p : 564-567.
- Guerin C. Détermination du moment de l'ovulation chez la chienne, implication pour la saillie ou l'insémination artificielle. Rev. Méd. Méd. 1998 ; 174, (7-8), p : 117-123.

- Guerin C, Fontbonne A. Les frottis vaginaux et le suivi du cycle oestral chez les carnivores. Intervet Ed., Angers.1997 ; p : 1-16.
- Guerin C, Petit C, Badinand F. Fécondité chez la chienne après saillie ou insémination artificielle : étude sur 202 chiennes. Point Vét. 1996 ; 28, p : 51-56.
- Goodman M. Ovulation timing: concepts and controversies.Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Clinical theriogenology. Mars 2001; 31, n°2, p: 219-235.
- Gradil C.M, Yeager A.E, Concannon P.W. Pregnancy diagnosis in the bitch.In : Kirk's Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice, Vol XIII. Philadelphia, WB Saunders. 2000; p: 918-923.
- Guyant L. Canine vaginal cytology. Vet. Tech.1988; 9, p: 513-523.
- Gobello G. Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: A review .Theriogenology . 2006 66(6-7):1560-7.
- Guerin C, Maurel MC, Launais M et al. Use an immunoenzymatic assay to detect the luteinizing hormone peak in bitches. J Reprod Fertil .Suppl 51.1997; p: 277-281
- Hewitt D, England G. Assessment of optimal mating time in the bitch. In Practice . Janvier.2000; p: 24-33.
- Hayer P, Gunzel-Apel A.R, Luerssen D. et al. Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch. J. Repro. Fert. 1993; 47, p:93-100.
- Hase M, Hori T, Kawakami E. et al. Plasma LH and Progesterone Levels before and after Ovulation and Observation of Ovarian Follicles by Ultrasonographic Diagnosis System in Dogs. J. Vet. Med. Sci.2000; 62 (3), p: 243-248.
- Holst PA, Plemister RD. Onset of diestrus in the beagle bitch: definition and significance .Am.J.Vet.Res.1974; 35, 3, p: 401-406.
- Hekerman T.W.M Okkens A.C, De Vogel J.W.A.et al. Influence of litter size and breed on variation in length of gestation in the dog. Vet Quart.1993; 15,160-161.
- Houillon C. Embryologie.Ed.Hemann.Coll Méthodes. 1968 ; p : 182.
- Holst P.A. Vaginal cytology in the bitch. In: Moorw editor. Current therapy; 1986.
- Heron J.F.Cytologie de Papanicolaou. [en-ligne]. Caen (France) : Centre Régional François Baclesse, Faculté de Médecine de Caen. 2004, (modifié le 21 mars 2000) [<http://www.oncoprof.net>].
- Hirsch D.C, Wiger N. The bacterial flora of the normal canine vagina compared with that of vaginal exudates. J. small Anim. Pract.1977; 18, p: 25-30.
- Heraud V. La prolactine : mécanisme de contrôle de sa sécrétion, rôles physiologiques et applications thérapeutiques des antiprolactiniques chez la chienne. Thèse Méd. Vét. Nantes; 1997.
- Hase M, Hori T, Kawakami E, Tsutsui T. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. Theriogenology.2000; 62, 3,p: 243-248.
- Inaba T, Matsui N, Shimizu R, Imorit. Use of echography in bitches for detection of ovulation and pregnancy.Vet.Rec.1984; 115, p: 276-277.

- Jeffcoate I.A, Lindsay F.E. Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *J Reprod Fertil Suppl.* 1989; 39, p: 277-287.
- Johnston SD, Olson P.N.S, Root Kustritz M.V. The canine estrous cycle. In: *Canine and feline theriogenology.* Philadelphia: WB Saunders.2001; p: 16-31.
- Johnston S.D .The bitch. In: *Reproduction: Small companion animals' proceedings.* Sydney: Post Graduate in Veterinary Science.8-12 août 1988; p: 69- 87.
- Kutzler M.A, Mohammed H.O, Lamb S.V Meyers-Wallen V.N. Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *.Theriogenology* .2003; 60, p: 1187-1196.
- Kutzler, M. A (2007). Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology.* Vol. 68, n° 3, pp. 354-374.
- Kutzler, M. A (2005). Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology.* Vol. 64, n° 3, pp. 766-775.
- Linde-Forsberg C, Forsberg M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fert; Suppl* .1989; 39,p: 299-310.
- Linde-Forsberg C, Forsberg M. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *J. Reprod. Fert; Suppl.*1993; 47, p: 313-323.
- Lennoz M. *Physio-pathologie du corps jaune chez la chienne.* Thèse Méd. Vét; Lyon 1975.
- Levy X, Fontbonne A. Determining the optimal time of mating in bitches: particularities *Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte.*2007; 31, p: 128-134.
- Linde-Forsberg C, Ström Holst B, Govette G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology.*1999; 52, p: 11-23.
- Ling GV, Ruby A.L. Aerobic bacterial flora of the prepuce, urethra, and vagina of normal adult dogs. *Am. J. Vet. Res;* 1978; 39(4), p: 695-698.
- Marti J A. Vaginal cytology in the bitch and queen. *Proceeding of the world congress WSAVA.*2002; [<http://www.ivis.org>].
- Marseloo N, Fontbonne A, Bassu G.et al. Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches. In *Proceeding of the 5th international Symposium on A Canine and Feline Reproduction,* Sao Paulo.4-6 août 2004; p: 75-77.
- Million C.M. *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 ; p : 125.
- Mellin T.N, Orczyk G.P, Hichens M, Behrman H.R. Serum profiles of LH, progesterone and total oestrogens during the canine oestrous cycle. *Theriogenology.*1976 ; 5, p : 175-187.
- Mialot J.P. *Examen de l'appareil génital femelle.* In : *Pathologie de la reproduction chez les carnivores domestiques.* Maisons-Alfort: éditions du point vétérinaire.1984; p: 29-44.

- Mestre J, Wanke M, Sucheyre S. Exfoliate vaginal cytology and plasma concentrations of progesterone, luteinising hormone and oestradiol-17 β during oestrus in the bitch. *J. small Anim. Pract.*1990; 31, p: 568-570.
- Nyland T.G, Mattoon J.S. *Small Animal Diagnostic Ultrasound*, 2 editions, Ed. Saunders, Philadelphia. 2002; p: 232-233.
- Neveux M. Les frottis vaginaux chez la chienne. *Point Vet.*1999; 30, p: 557-564.
- Nishiyama T, Kinugasa T, Kimura T, Watanabe G, Taya K, Tsumagari S, Takeishi M. Determination of optimal time for mating by artificial insemination with chilled semen using luteinizing hormone surge as an indicator in beagles. *J. Am. Anim. Hosp.*1999; 35, 4, p: 348-352.
- Okkens A.C, Hekerman T.W.M, De Vogel J.W.A. et al .Influence of litters size and breed on variation in length of gestation in the dog. *Vet –Quat* .1993;15, p:160-161.
- Okkens A.C, Teunissen J.M, Van Osch W. et al. Influence of litter size and breed on the duration of gestation in dogs. *J Repord; Fertil.Suppl.* 2001; 57, p: 193-197.
- Olson P.N, Husted P.W, Allen T.A, Nett T.M. Reproductive endocrinology and physiology of the bitch and queen. *Vet. Clin. North Am. [Small Anim. Pract.]*.1984; 14 (4), p: 927-946.
- Oettle E.E, Weldhagen A.A. A modified shorr's stain: a practical rapid stain for canine cytology. *J. Sth. Afr. Vet Assoc.*1982; 82, p: 267-268.
- Onclin K, Murphy B, Verstegen J.P. Comparisons of œstradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches. *Theriogenology.*2002; 57, p: 1957-1972.
- Pollet T, Viaud F. Le suivis échographique de la croissance foetal :un nouveau regard sur la gestation des animaux .L'échographie aujourd'hui et demain, congrès ENVL.3 Juin 1988.
- Pierson A, Buff S. Induction de l'œstrus chez la chienne et la chatte : quelle molécule et quelle molécule et quel protocole utiliser .Colloque AERA- maison-Alfort.8 octobre 2009.
- Phemister R.D, Holst P.A, Spano J.S, Hopwood M.L. Time of ovulation in the beagle bitch *Biol. Reprod.*1973; 8, p:74-82.
- Platt A.M, Simpson R.B. Bacterial flora of the canine vagina. *Southwest. Vet.*1974; 27, P: 76-77.
- Post K. Canine vaginal cytology during the estrous cycle. *Can. Vet. J;* 1985; 26, p: 101-104.
- Romagnoli S. Recent advances in canine female reproduction. *Proceeding of the world congress WSAVA*, 2006; [<http://www.ivis.org>].
- Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N .et al. Maturation ovocytaire, fécondation et développement embryonnaire chez la chienne. *Bull.Ac .Vét .Fr.* 2005 ; 158(2), p :167-172.
- Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N .et al. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction.* 2005;130, p : 193-201 [<http://www.reproduction-online.org>].

- Royal L, Ferney, Tainturier D. Mise au point sur les possibilités actuelles de diagnostic de la gestation chez les carnivores domestique. *Rev.Med.Vet.*1979 ; 130, 6,p : 858-890.
- Roszel J.F. Normal canine vaginal cytology. *Vet. Clin. North. Am.*1977; 7 (4), p: 667-681.
- Renton J.P, Boyd J.S. Comparison of endocrine changes and ultrasound as means of identifying ovulation. *Res Vet Sci.* 1992; 53, p:74-79.
- Silva L.D.M, Onclin K, Verstegen J.P. Assessment of ovarian changes around ovulation in bitches by ultrasonography, laparoscopy and hormonal assays. *Vet. Radio Ultras.* 1996; 37 (4), p: 313-320.
- Shille V.W, Gontarek J. The use of ultrasound for pregnancy diagnosis in the bitch.*JAVMA.*1985; 187, 10, p: 1021-1025.
- Stowater J.L, Memon M.A., Hartzband L.E. Ultrasonic features of the dog uterus and foetus. *J.Reprod. Fert., Suppl.* 1989; 39, p: 329-330.
- Schutte AP. Canine vaginal cytology –I Technique and cytological morphology. *J. small Anim. Pract.*1967; 8, p: 301-306.
- Simmons J. The vaginal smear and its practical application. *Vet. Med. [small An. Clin.;* 1970; 59, p: 369-373.
- Sokolowski J.H. The effect of ovariectomy on pregnancy maintenance in the bitch. *Lab. Anim. Sci.* 1971; 21, p: 696-699.
- Tsutsui T, Hori T, Kirihara N.et al. Relation between mating or ovulation and the duration of gestation in dogs.*Theriogenology.*2006; 66, p: 1706-1708.
- Tainturier D, Choquart V, Fieni F.et al. Le suivi de la gestation chez la chienne : imagerie médicale, déterminisme du moment de la mise bas. *Recueil de médecine vétérinaire, spécial reproduction canine .mars-avril 1998 ; 174, n°3/477-85*
- Toal R.L, Walker M.A., Henry G.A. A comparison of real-time ultrasound, palpation, and radiography in pregnancy detection and litter size determination in the bitch.,*Vet.Radiol.* 1986; 27, 4, p: 102-108.
- Tainturier D, Allain F. Maîtrise de la reproduction chez la chienne. *Bulletin du groupe d'étude en reproduction, Elevage et sélection des carnivores domestiques .mars2005.*
- Tsutsui T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs.*J. Reprod. Fertil. Suppl.*1989; 39, p: 269-275.
- Taradach C. Frottis vaginaux chez la chienne beagle. Détermination de la période d'ovulation à l'aide de l'indice éosinophile. *Revue Méd. Vét.*1980;131 (11), p : 775-782.
- Van Haaften B, Dieleman S.J, Okkens A.C.et al. Timing the mating of dogs on the basis of blood progesterone concentration. *Vet. rec.* 1989; 125, p: 524-526.
- Verstegen J, Onclin K. Estrus control in the bitch. *Proceeding of the world congress WSAVA.*2002; [<http://www.ivis.org>].
- Verstegen J, Onclin K. Régulation lutéale chez la chienne. *Reucueil de médecine vétérinaire. Spécial reproduction canine. 17-23 mars-avril.1998; vol.1, 174 n°3/4..*
- Vaughan L. Reproduction in the bitch; *Irish Vet. J.*1996; 49, p: 626-628.

- Wallace S.S, Mahaffey M.B, Miller D.M. et al. Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. *Am. J. Vet. Research.* 1992; 53, p: 209-215.
- Willams R.C, Evans H. Prenatal dental development in the dog, *canis familiaris*, chronology of tooth germ formation and calcification of deciduous teeth. *Vet, Med.C.Anay.Embrol.* 1978;7,p: 152-163.
- Wildt D.E, Chakraborty P.K, Panko W.B, Seager S.W.J. Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biol. Reprod.* 1978; 18, p: 561-570.
- Wright P.J, Parry B.W. Cytology of the canine reproductive system. *Vet. Clin. North Am. [Small Anim. Pract.]*. 1989; 19 (5), p: 851-874.
- Wright P.J. Application of vaginal cytology and plasma progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. *J. Small Anim. Pract.* 1990; 31, p: 335-340.
- Wildt D.E, Chakraborty P.K, Panko W.B, Seager S.W.J. Relationship of serum estrone, estradiol-17 β and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biol. Reprod.* 1979; 20, p: 648-658.
- Wright P.J. Practical aspects of the estimation of the time of ovulation and of insemination in the bitch. *Aus. Vet. J.* 1991; 68 (1), p: 10-13.
- Yves Piedvache, LUKY S . Santé et reproduction chez la chienne. 2006; p: 11-23.
- Yeager A.E, Concannon P.W. Serial ultrasonic appearance of postpartum uterine involution in beagle dogs. *Theriogenology.* 1986; 34, 3, p: 523-535.
- Yeager A.E, Concannon P.W. Association between the preovulatory luteinizing hormone surge and the early ultrasonographic detection of pregnancy and fetal heartbeats in beagle dogs. *Theriogenology.* 1990; 34, 4, p: 655-663.
- Zöldág, I, Fekete, S, Csáky, I, Bersényi, A (2001). Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist : a clinical trial. *theriogenology.* vol. 55, n° 8, pp. 1657-1666.

تضمنت هذه الدراسة الكشف عن رصد الشبق، الإباضة، متابعة الحمل وتطبيق بروتوكول لتحفيز الشبق على عدد إجمالي يبلغ 95 كلبة من سلالات مختلفة وتتراوح أعمارهن بين 6 أشهر و 13 عامًا، في عيادة أمراض آكلات اللحوم في معهد العلوم البيطرية في تيارت على مدار الفترة بين يناير 2011 ويناير 2016. تُستخدم ثلاث تقنيات تشخيصية لمراقبة الشبق واكتشاف الإباضة المتمثلة في فحص المبايض بالموجات فوق الصوتية وقراءة مسحات المهبل وتحديد مستويات هرمون البروجسترون في الدم. تتم مراقبة المسار السريري للحمل عن طريق الفحص بالموجات فوق الصوتية وذلك منذ آخر تزاوج الذي يمثل اليوم الذي تم اختياره معلمًا لبداية الحمل. تظهر مراقبة الشبق من اليوم الخامس من بداية فقدان الدم من الفرج وجود علاقة كرونولوجية بين مستويات البروجسترون وتطور مؤشر الحمضات وتطور قطر المبيضين. في يوم الإباضة، يتراوح قطر المبيض بين 1.69 ± 18.04 مم إلى 2.077 ± 19 مم وهو ما يقابل مؤشر الحمضات أكبر من 80% مع مستوي يفوق 23 نانومول/ل للبروجسترون في الدم. سمح استخدام البروموكريبتين عن طريق الفم عند كليات من سلالة أطلس شيبيرد بتحفيز الشبق على التوالي بعد 40 ± 8 أيام في حالة استخدامه خلال الميئوستروس المتأخر و 32 ± 10 يومًا في المتوسط في حالة استخدامه أثناء انستروس المتأخر. التشخيص المبكر بواسطة الموجات فوق الصوتية للحمل، ممكن على وجه اليقين من اليوم 15 منذ آخر تزاوج و من خلال مراقبة المراحل المتعاقبة من نمو الجنين، تم وضع تقويم الحمل وفقًا للمعايير التشريحية والمورفولوجية التي تم وصفها من يوم 13 إلى يوم 50 منذ آخر تزاوج الذي يمثل اليوم الذي تم اختياره معلمًا لبداية الحمل.

الكلمات الرئيسية: الحث؛ رصد الشبق؛ الإباضة؛ المبيض؛ الموجات فوق الصوتية؛ علم الخلايا؛ الحمل؛ آخر تزاوج.

Resumé

Cette étude comprend une détection de l'ovulation, un suivi de la gestation et l'application d'un protocole d'induction des chaleurs, sur un effectif total de 95 chiennes de différentes races et d'un âge compris entre 6 mois et 13 ans, au niveau de la clinique de pathologies des carnivores de l'institut des sciences vétérinaires de Tiarét sur une période comprise entre janvier 2011 et janvier 2016. Trois techniques de diagnostic sont utilisées pour le suivi des chaleurs et la détection de l'ovulation à savoir, l'examen échographique des ovaires, la lecture des frottis vaginaux et la détermination des taux sanguins de la progestérone. Le suivi de l'évolution clinique de la gestation est réalisé par examen échographique et ceci à partir du dernier jour de la saillie. Le suivi des chaleurs à partir du cinquième jour depuis le début des pertes vulvaires montre l'existence d'une relation chronologique entre les taux de la progestérone, la progression de l'indice éosinophilique et l'évolution du diamètre des ovaires. Au moment de l'ovulation, le diamètre de l'ovaire se situe entre $18,04 \pm 1,69$ mm à $19 \pm 2,077$ mm correspondant à un indice éosinophilique supérieur à 80 % et à un taux de progestérone supérieur à 23 nmol/L ; L'utilisation de la bromocriptine par voie orale chez des chiennes de race berger de l'atlas a permis l'induction des chaleurs respectivement après 40 ± 8 jours dans le cas de son utilisation durant le métoestrus tardif et 32 ± 10 jours en moyenne dans le cas de son utilisation durant l'anoestrus tardif. Un diagnostic précoce de la gestation est possible avec certitude à partir du 15ème jour depuis la dernière saillie et en observant les étapes successives du développement fœtal, le calendrier de la gestation est élaboré en fonction de critères anatomiques et morphologiques décrits du 13ème au 50ème depuis la dernière saillie.

Mots clés : induction, suivi des chaleurs, ovulation, ovaire, échographie, cytologie, gestation, dernière saillie.

Summary

This study includes a detection of ovulation, a follow-up of the pregnancy and the application of a protocol of induction of heat, on a total number of 95 bitches of different breeds and an age between 6 months and 13 years, at the clinic of carnivore pathology, Institute of Veterinary Sciences of Tiarét over a period between January 2011 and January 2016. Three diagnostic techniques are used for monitoring heat and detecting ovulation at namely, ultrasound examination of the ovaries, reading vaginal smears and determining blood levels of progesterone. The clinical course of gestation is monitored by ultrasound examination and this from the last day of mating. The follow-up of heat from the fifth day since the onset of vulvar losses shows the existence of a chronological relationship between the levels of progesterone, the progression of the eosinophilic index and the evolution of the diameter of the ovaries. ovulation, the diameter of the ovary is between 18.04 ± 1.69 mm to 19 ± 2.077 mm corresponding to an eosinophilic index greater than 80% and a progesterone tau greater than 23 nmol / L; L The use of bromocriptine orally in bitches of the Atlas Shepherd breed allowed the induction of heat respectively after 40 ± 8 days in the case of its use during late metoestrus and 32 ± 10 days on average in the case of its use during late anestrus. An early diagnosis of pregnancy is possible with certainty from the 15th day since the last mating and by observing the successive stages of fetal development, the pregnancy calendar is worked according to anatomical and morphological criteria described from the 13th to the 50th since the last mating.

Keywords: induction, heat monitoring, ovulation, ovary, ultrasound, cytology, pregnancy, last mating