

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE, AGROALIMENTAIRE ET DE L'ALIMENTATION NANTES
ATLANTIQUE – ONIRIS

2017

MODIFICATION DU SEXE-RATIO AVEC UNE ALIMENTATION ENRICHIE EN MINERAUX CHEZ LA CHIENNE

THESE

pour le

diplôme d'Etat de

DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement

le 20 juillet 2017

devant

la Faculté de Médecine de Nantes

par

Laura Marie Michèle Jacqueline KOUBA

Née le 04/08/1992 à Les Lilas (93)

JURY

Président : Monsieur Paul BARRIERE, Professeur à la Faculté de Nantes.

Membres : Monsieur Djemil BENCHARIF, Maître de conférences à ONIRIS.

Madame Catherine IBISCH, Maître de conférences à ONIIRIS.



ECOLE NATIONALE VETERINAIRE, AGROALIMENTAIRE ET DE L'ALIMENTATION NANTES
ATLANTIQUE – ONIRIS

2017

MODIFICATION DU SEXE-RATIO AVEC UNE ALIMENTATION ENRICHIE EN MINERAUX CHEZ LA CHIENNE

THESE

pour le

diplôme d'Etat de

DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement

le 20 juillet 2017

devant

la Faculté de Médecine de Nantes

par

Laura Marie Michèle Jacqueline KOUBA

Née le 04/08/1992 à Les Lilas (93)

JURY

Président : Monsieur Paul BARRIERE, Professeur à la Faculté de Nantes.

Membres : Monsieur Djemil BENCHARIF, Maître de conférences à ONIRIS.

Madame Catherine IBISCH, Maître de conférences à ONIIRIS.



ENSEIGNANTS-CHERCHEURS ET ENSEIGNANTS D'ONIRIS

Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique

Directrice Générale : Dominique BUZONI-GATEL

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE, PATHOLOGIE ET SCIENCES DE L'ALIMENT (BPSA)		
NUTRITION et ENDOCRINOLOGIE	Patrick NGUYEN (Pr) Lucile MARTIN (Pr)	Henri DUMON (Pr)
PHARMACOLOGIE et TOXICOLOGIE	Yassine MALLEM (MC) Martine KAMMERER (Pr) Julie DUVAL (MCC)	Hervé POULIQUEN (Pr) Jean-Claude DESFONTIS (Pr)
PHYSIOLOGIE FONCTIONNELLE, CELLULAIRE et MOLECULAIRE	Lionel MARTIGNAT (Pr) Jean-Marie BACH (Pr)	Grégoire MIGNOT (MC) Julie HERVE (MC)
HISTOLOGIE ET ANATOMIE PATHOLOGIQUE	Jérôme ABADIE (MC) Francesca FRANZOSO (MCC) Laetitia JAILLARDON (MC)	Frédérique NGUYEN (MC) Marie-Anne COLLE (Pr)
PATHOLOGIE GENERALE, MICROBIOLOGIE et IMMUNOLOGIE	François MEURENS (Pr) Jean-Louis PELLERIN (Pr)	Hervé SEBBAG (MC) Emmanuelle MOREAU (MC)
BIOCHIMIE ALIMENTAIRE INDUSTRIELLE	Laurent LE THUAUT (MC) Thierry SEROT (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Carole PROST (Pr) Florence TEXIER (MC) Mathilde MOSSER (MC) Clément CATANEO (MC)
MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE INDUSTRIELLE	Xavier DOUSSET (Pr) Bénédicte SORIN (Chef de travaux) Bernard ONNO (MC) Géraldine BOUE (MCC)	Hervé PREVOST (Pr) Emmanuel JAFFRES (MC) Nabila HADDAD (MC)
DEPARTEMENT DE SANTE DES ANIMAUX D'ELEVAGE ET SANTE PUBLIQUE (SAESP)		
HYGIENE ET QUALITE DES ALIMENTS	Michel FEDERIGHI (Pr) Bruno LE BIZEC (Pr) Catherine MAGRAS (Pr) Fanny RENOIS-MEURENS (MC)	Eric DROMIGNY (MC) Marie-France PILET (MC) Jean-Michel CAPPELIER (Pr)
MEDECINE DES ANIMAUX D'ELEVAGE	Catherine BELLOC (Pr) Isabelle BREYTON (MC) Christophe CHARTIER (Pr)	Alain DOUART (MC) Sébastien ASSIE (MC) Raphaël GUATTEO (Pr) Mily LEBLANC MARIDOR (MCC)
PARASITOLOGIE AQUACULTURE FAUNE SAUVAGE	Alain CHAUVIN (Pr) Albert AGOULON (MC)	Guillaume BLANC (MC) Ségolène CALVEZ (MC) Suzanne BASTIAN (MC)
MALADIES REGLEMENTEES, REGLEMENTATION SANITAIRE ZOONOSES	Jean-Pierre GANIERE (Pr émérite) Carole PEREZ (MC)	Nathalie RUVOEN-CLOUET (MC)
ZOOTECNIE	Aurélien MADOUASSE (MC) Xavier MALHER (Pr) François BEAUDEAU (Pr)	Christine FOURICHON (MC) Nathalie BAREILLE (Pr)
DEPARTEMENT DE SCIENCES CLINIQUES (DSC)		
ANATOMIE COMPAREE	Eric BETTI (MC)	Claire DOUART (MC) Claude GUINTARD (MC)
PATHOLOGIE CHIRURGICALE ET ANESTHÉSIOLOGIE	Olivier GAUTHIER (Pr) Béatrice LIJOUR (MC) Eric AGUADO (MC) Caroline TESSIER (MC)	Gwenola TOUZOT-JOURDE (MC) Olivier GEFFROY (Pr) Eric GOYENVALLE (MC)

DERMATOLOGIE PARASITOLOGIE DES CARNIVORES ET DES EQUIDES MYCOLOGIE ANIMAUX D'ESPECES INHABITUELLES	Patrick BOURDEAU (Pr)	Vincent BRUET (MC)
MEDECINE INTERNE, IMAGERIE MÉDICALE et LEGISLATION PROFESSIONNELLE	Dominique FANUEL (Pr) Anne COUROUCE (Pr) Catherine IBISCH (MC) Nicolas CHOUIN (MC)	Marion FUSELLIER-TESSON (MC) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Odile SENECAT (MC) Françoise ROUX (MC)
BIOTECHNOLOGIES et PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION	Francis FIENI (Pr) Jean-François BRUYAS (Pr) Daniel TAINURIER (Pr émérite)	Lamia BRIAND-AMIRAT (MC) Djemil BENCHARIF (MC)
DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCEDES ALIMENTAIRES		
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET PLOQUIN (MC) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Dominique DELLA VALLE (MC) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr) Cyril TOUBLANC (MC)	Vanessa JURY (MC) Alain LEBAIL (Pr) Catherine LOISEL (MC) Jean-Yves MONTEAU (MC) Denis PONCELET (Pr) Olivier ROUAUD (MC) Laurence POTTIER (MC)	
DEPARTEMENT DE MANAGEMENT, STATISTIQUES ET COMMUNICATION		
MATHEMATIQUES, STATISTIQUES - INFORMATIQUE	Véronique CARIOU (MC) Philippe COURCOUX (MC) El Mostafa QANNARI (Pr)	Michel SEMENOU (MC) Chantal THORIN (PCEA) Evelyne VIGNEAU (Pr)
ECONOMIE – GESTION - LEGISLATION	Pascal BARILLOT (MC) Yvan DUFEU (MC) Florence BEAUGRAND (MC)	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Sonia EL MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC) Sybille DUCHAINE (MC)
COMMUNICATION - LANGUES	Franck INSIGNARES (IE) Linda MORRIS (PCEA) David GUYLER (PCEA) contractuel Virginie Magin contractuel CARON Christophe (PLPA) Laurence FRERET (PCEA) Pascale FLEURY (PCEA)	Marc BRIDOU (PLPA) Shaun MEEHAN (PCEA) contractuel Fabiola ASENCIO (PCEA)

Pr : Professeur,

Pr A : Professeur Associé,

Pr I : Professeur Invité,

MC : Maître de Conférences,

MCC : Maître de Conférences Contractuel,

AERC : Assistant d'enseignement et de recherches,

PLPA : Professeur Lycée professionnel Agricole,

PCEA : Professeur certifié enseignement agricole

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée ainsi :

KOUBA L. (2017), Modification du Sexe-ratio avec une Alimentation Enrichie en Minéraux chez la Chienne. Thèse pour le doctorat vétérinaire. Nantes : Faculté de Médecine de Nantes, 175p.

Le défaut de citation est considéré comme du plagiat. Ce dernier est puni par la loi française et possible de sanction jusqu'à 3 ans d'emprisonnement et 300 000 euros d'amende.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Paul BARRIERE,

De la Faculté de Médecine de Nantes,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

Avec toute ma gratitude et mes hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Djemil BENCHARIF,

D'ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter d'encadrer et de corriger ce travail,

Pour m'avoir permis de travailler sur un sujet qui me tenait à cœur,

Pour sa disponibilité, son enthousiasme et sa gentillesse,

Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et le témoignage de mon sincère respect.

A Madame le Docteur Catherine IBISCH,

D'ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes,

Qui m'a fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse,

Sincères remerciements.

A Madame le Professeur Lucile MARTIN,

D'ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes,

Pour avoir accepté de co-encadrer cette thèse et l'aide qu'elle m'a apportée,

Sincères remerciements.

A mes parents. Pour votre amour inconditionnel et votre soutien inébranlable. Pour m'avoir permis de déployer mes ailes. Pour m'avoir offert tout ce dont j'avais besoin et même bien plus. Parce que vous êtes toujours là dans la tempête. A Papa, pour tous les moments qu'on a partagé tous les deux. A Maman, parce que tu es mon pote à la compote. Je vous dédie cette réussite, parce que sans vous, elle n'aurait pas été possible. Je vous aime.

A mes sœurs, qui me manquent chaque jour. A ma grande sœur Cécile, mon modèle depuis toujours et qui ne cesse d'être une source d'inspiration pour moi. Continue à illuminer le monde. A ma petite sœur Marie, pour m'avoir suivie dans bon nombre de mes plans, parfois diaboliques, souvent improbables. Aies confiance en toi et en l'avenir. Et si tu n'es pas fière de toi, moi je le serai, toujours.

A Sébastien, qui est venu compléter notre petite famille.

A Petit Microbe. Vivement que tu sois là <3.

A Mamie Yvette et Papi Jacques. Tu en avais rêvé Mamie, ce jour est arrivé mais trois années trop tard. Soyez fiers.

A Mamie Jeanne et Papi Michel. Pour les bons souvenirs.

To Sue and Colin. They say you don't get to choose your family. I say you are family to me. There are not enough words to describe how lucky I am to have you in my life.

A Jefferson. Merci d'avoir été là, encore et toujours. Cette victoire, c'est un peu la tienne aussi.

A Timothée. Parce que tu es sur une planète totalement différente de la mienne et que c'est drôlement chouette là-bas. Parce que notre amitié n'a pas de prix à mes yeux.

A Mathilde. Parce qu'on n'a jamais eu besoin de mots pour se comprendre.

« T'es comme mon frère. »

A Ying-Ying et Myriam. Pour nos fous-rires, nos coups de gueule, nos soirées « grosses »... A Ying-Ying, qui ne m'a pas quittée depuis la première année. Merci de t'être pété le genou pour aller avec ma cheville. Merci d'avoir rigolé à mes blagues ; en même temps, elles sont toujours extrêmement drôles et subtiles. Pour tous les « eh meuf, faut que je te dise un truc ». Pourvu que ça dure. A Myriam, mon acolyte de toujours en soirée. Pour toutes les fois où nous avons fait et refait le monde. Peu de personnes savent être une véritable amie comme toi. Merci pour ton soutien au fil de ces années.

A Claire. Parce que sans toi, la 5A, ça n'aurait pas été pareil. Et à bébé Grim, pour cette année qui nous attend !

Aux Chacals, Yannick, Raphaël, Adrien mon frérot baleineau et Samir. Pour tous vos délires improbables. Parce que sans vous, ça aurait été bien fade.

A Chloé. Il aura fallu partir au Pôle Nord pour te trouver. A nous la Grèce !

A Amandine. Ne change pas.

A tous mes amis véto : Kevin, Jacques, Pasta, Verratti, Caro, Antoine, Justine, Camille Dck, Léa, Stéphanie, Seb le Traître, aux Nuncha'kouilles et aux Aérofists, et à tous ceux qui ont compté... Merci pour ces cinq années.

To Sean. I guess now is the time to learn to read French. Thank you for your friendship and for those unforgettable moments. Spam Musubi forever.

Au BYNteam : Maud, Inès et Jenna. Ça y est, la vraie vie commence.

A mes amis de prépa : Marine, Simon et Claire. We made it.

A Maëlle et Justine. Même si je ne vais pas soigner de bébés cochons.

A Gildas. Qui comptera toujours pour moi, malgré la distance.

Aux Dr LAUDE, ROBIC et ZYNGFOGEL. Pour mes premiers pas en tant que vétérinaire, réussis grâce à vous.

Au Prytanée National Militaire et à ses valeurs. Noblesse oblige, Bahut aussi. A toutes les générations de Crassus. A la famille 47.

6147D, Crassus géné XXII.

To Dr OKIMOTO, Claire and Kevin. Some memories stay forever.

A José MENDEZ, mon professeur de mathématiques de seconde au PNM. Parce que vous avez été le premier à me faire croire en moi. Vous ne lirez sans doute jamais ces lignes, mais merci.

A Chantal THORIN et Concetta AMATO. Pour leur aide et leurs précieux conseils.

A Sylvie et Jean-Louis. Pour leur grande gentillesse et leur aide inestimable pendant cette thèse. Merci encore.

Et finalement, à Macha, que j'aurais voulu sauver. A Nouchka, qui me manque parfois. A Oliver et à ses caprices de petit prince. A mes acolytes, Eureka et Cookie, qui me rappellent tous les jours que ça vaut le coup. Mais surtout à toi Kaka, pour tout ce que tu représentes.

« Choisis un travail que tu aimes, et tu n’auras pas à travailler un seul jour de ta vie. »

- Confucius

Introduction.....	27
 <u>PREMIERE PARTIE : SEXE-RATIO ET INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS.....</u>	 29
 SOUS-PARTIE 1 : DEFINITION DU SEXE-RATIO ET FACTEURS L'INFLUENÇANT.....	 31
1) Définition du sexe-ratio.....	31
a) <u>Sexe-ratio primaire.....</u>	31
i) « Fragilité du mâle » et sélection maternelle.....	31
ii) Sexe-ratio et composition de l'éjaculat.....	34
b) <u>Sexe-ratio secondaire et valeurs dans diverses espèces.....</u>	34
c) <u>Sexe-ratio tertiaire.....</u>	35
 2) Intérêts et inconvénients à modifier le sexe-ratio.....	 36
a) <u>Situation actuelle en France et en Europe.....</u>	36
i) En France.....	36
ii) En Europe.....	37
b) <u>Quels sont les intérêts à modifier le sexe-ratio ?</u>	37
i) Chez l'Homme.....	37
ii) Chez les animaux.....	39
(1) Animaux de production.....	39
(2) Animaux de compagnie.....	40
c) <u>Quels sont les inconvénients à modifier le sexe-ratio ?</u>	40
 3) Facteurs maternels influençant le sexe-ratio.....	 41
a) <u>Âge de la mère.....</u>	41
b) <u>pH vaginal.....</u>	43
i) Résultats de diverses expériences.....	43
ii) Moyens de mesurer le pH vaginal.....	45
c) <u>Date du rapport sexuel ou de l'insémination par rapport à l'ovulation.....</u>	46
d) <u>Stress environnemental.....</u>	48
e) <u>Alimentation de la mère.....</u>	50
i) Restriction alimentaire.....	50
ii) Composition du régime alimentaire.....	51
iii) Apport en minéraux.....	52
f) <u>Relation entre testostérone maternelle et sexe-ratio des portées.....</u>	53
 4) Résumé.....	 54

SOUS-PARTIE 2 : ALIMENTATION MINERALE DE LA MERE ET SEXE-RATIO DE SA PORTEE.....	55
1) Premiers pas.....	55
2) Expériences chez les mammifères.....	56
a) <u>Chez les rongeurs.....</u>	56
b) <u>Chez la vache.....</u>	58
c) <u>Chez la truie.....</u>	61
d) <u>Chez l'Homme.....</u>	62
3) Par quels mécanismes l'apport minéral modifierait-il le sexe-ratio ?.....	63
4) Résumé.....	66

DEUXIEME PARTIE : ALIMENTATION DE LA CHIENNE AUTOUR DE LA FECONDATION.....

1) Evaluation de la note d'état corporel (NEC)	69
2) Evaluation des besoins nutritionnels de la chienne avant fécondation.....	69
a) <u>Comment évaluer les besoins énergétiques du chien à l'entretien ?.....</u>	70
b) <u>Ajustement du besoin énergétique d'entretien du chien à ses besoins réels.....</u>	71
c) <u>Besoins nutritionnels du chien.....</u>	72
i) Eau.....	73
ii) Protéines.....	73
iii) Fibres alimentaires.....	75
iv) Lipides.....	75
v) Glucides assimilables.....	75
vi) Calcium et phosphore.....	76
vii) Oligo-éléments et vitamines.....	76
3) Evolution des besoins alimentaires de la chienne gestante.....	77
a) <u>Risque d'une mauvaise alimentation chez la chienne gestante.....</u>	78
b) <u>Evolution des besoins alimentaires pendant le début de la gestation.....</u>	78
4) Résumé.....	79

TROISIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE : SUPPLEMENTATION CALCIQUE ET VARIATION DU PH VAGINAL..... 81

1) Matériel et méthode	83
a) <u>Animaux</u>	83
b) <u>Complémentation alimentaire</u>	84
c) <u>Déclenchement des chaleurs</u>	87
i) Interruption du metœstrus.....	87
ii) Induction de l'œstrus.....	88
d) <u>Suivi du cycle sexuel</u>	89
i) Suivi gynécologique.....	89
ii) Progestéronémie.....	90
e) <u>Suivi du pH vaginal au cours du cycle sexuel</u>	91
f) <u>Etude statistique concernant le pH vaginal au cours du cycle sexuel</u>	91
 2) Résultats	92
a) <u>Phase 1</u>	92
i) Chiennes complémentées.....	92
ii) Chiennes non complémentées.....	96
b) <u>Phase 2</u>	99
i) Chiennes complémentées.....	100
ii) Chiennes non complémentées.....	101
c) <u>Variation du pH vaginal au cours du cycle sexuel de la chienne</u>	103
d) <u>Relation entre alimentation et pH vaginal</u>	106
e) <u>Résultats de l'étude statistique</u>	109
 3) Discussion	112
a) <u>Vérification des doses de complémentations minérales</u>	112
i) Dose calcique ingérée.....	112
ii) Dose magnésique ingérée.....	113
iii) Dose de vitamine D ₃ ingérée.....	113
b) <u>Relation entre alimentation et pH vaginal</u>	113
c) <u>Variation du pH vaginal au cours du cycle sexuel de la chienne</u>	114
d) <u>Dosage de progestérone</u>	115
e) <u>Mesure de pH vaginal</u>	116
f) <u>Venue en chaleurs</u>	116
g) <u>Choix de ne pas inséminer</u>	118
h) <u>Comprimés de calcium</u>	119

i) <u>Anomalies remarquables</u>	119
4) Perspectives	120
Conclusion	123
Bibliographie	125
Annexes	135

Table des annexes

<u>Annexe 1</u> : Article L162-17 de la loi n° 94-654 du 29 juillet 1994.....	135
<u>Annexe 2</u> : Article L2131-4-1 de la loi 2004-800 du 6 août 2004.....	136
<u>Annexe 3</u> : Extrait des régimes conseillés aux femmes en fonction du sexe de l'enfant désiré (EDESSY et <i>al.</i> , 2016).....	137
<u>Annexe 4</u> : Estimation de la note l'état corporel chez le chien (d'après LAFLAMME, 1997).138	
<u>Annexe 5</u> : Composition des croquettes Royal Canin Vet Care Medium Adult Dog.....	139
<u>Annexe 6</u> : Composition des comprimés Pet-Phos Croissance Grand Chien Ca/P=2 NDV (Laboratoire Ceva).	140
<u>Annexe 7</u> : pH-mètre utilisé lors de nos expériences.....	141
<u>Annexe 8</u> : Sonde-électrode à pH de contact utilisée lors de nos expériences.	141
<u>Annexe 9</u> : Résultats de la chienne 1 pour la phase 1.....	142
<u>Annexe 10</u> : Résultats de la chienne 2 pour la phase 1.....	143
<u>Annexe 11</u> : Résultats de la chienne 3 pour la phase 1.....	144-145
<u>Annexe 12</u> : Résultats de la chienne 4 pour la phase 1.	146
<u>Annexe 13</u> : Résultats de la chienne 5 pour la phase 1.....	147-148
<u>Annexe 14</u> : Résultats de la chienne 6 pour la phase 1.....	149-150
<u>Annexe 15</u> : Résultats de la chienne 7 pour la phase 1.....	151-153
<u>Annexe 16</u> : Résultats de la chienne 1 pour la phase 2.....	154-155
<u>Annexe 17</u> : Résultats de la chienne 2 pour la phase 2.....	156-157
<u>Annexe 18</u> : Résultats de la chienne 4 pour la phase 2.....	158-159
<u>Annexe 19</u> : Résultats de la chienne 5 pour la phase 2.....	160-161
<u>Annexe 20</u> : Résultats de la chienne 6 pour la phase 2.....	162-163
<u>Annexe 21</u> : Résultats de la chienne 7 pour la phase 2.....	164-165
<u>Annexe 22</u> : Script dans R (logiciel).....	166

<u>Annexe 23</u> : Données pour le script dans R (logiciel).....	166-167
<u>Annexe 24</u> : Moyennes, écart-types et coefficients de variation des progestéronémies (en ng/mL) et pH vaginaux pour les chiennes complémentées.	168
<u>Annexe 25</u> : Moyennes, écart-types et coefficients de variation des progestéronémies (en ng/mL) et pH vaginaux pour les chiennes non complémentées.	169
<u>Annexe 26</u> : Moyennes, écart-types et coefficients de variation des progestéronémies (en ng/mL) et pH vaginaux sur les 11 cycles.	170
<u>Annexe 27</u> : Comprimé Pet-Phos Croissance Grand Chien Ca/P=2 NDV (Laboratoire Ceva)....	171
<u>Annexe 28</u> : Abstract proposé et accepté par le jury du congrès de l'ESDAR 2017.....	175

Table des illustrations

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Action du milieu sur le sexe-ratio des portées (d'après WELLS, 2000).....	33
<u>Figure 2</u> : Composition de la descendance d'un père sain avec une mère porteuse d'une maladie récessive portée par le chromosome X.....	38
<u>Figure 3</u> : Sexe-ratio des portées de femelles hamster dorées accouplées successivement ou ponctuellement. (HUCK et <i>al.</i> , 1988).....	42
<u>Figure 4</u> : Relation entre le sexe-ratio secondaire des portées et le niveau d'activité de la GPC diestérase (MITRA et CHOWDHURY, 1989).....	65
<u>Figure 5</u> : Relation en alimentation (d'après BLANCHARD et PARAGON, 2008).....	73
<u>Figure 6</u> : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 1 complémentée.....	93
<u>Figure 7</u> : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 4 complémentée.....	94
<u>Figure 8</u> : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 6 complémentée.....	95
<u>Figure 9</u> : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 2 non complémentée.....	96
<u>Figure 10</u> : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 3 non complémentée.....	97
<u>Figure 11</u> : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 5 non complémentée.....	98
<u>Figure 12</u> : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 7 non complémentée.....	99
<u>Figure 13</u> : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 7 non complémentée (suite).....	99
<u>Figure 14</u> : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 2 complémentée.....	100
<u>Figure 15</u> : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 1 non complémentée.....	101

<u>Figure 16</u> : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 4 non complémentée.....	102
<u>Figure 17</u> : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 6 non complémentée.....	103
<u>Figure 18</u> : Chute du pH vaginal au cours des œstrus de la phase 1.....	104
<u>Figure 19</u> : Chute du pH vaginal au cours des œstrus de la phase 2.....	104
<u>Figure 20</u> : Comparaison du pH vaginal au cours des œstrus de onze cycles sexuels.....	105
<u>Figure 21</u> : Moyenne et écart-types du pH vaginal des onze cycles en fonction de la progestéronémie moyenne (en ng/mL).....	105
<u>Figure 22</u> : Comparaison du pH vaginal pendant les deux cycles de la chienne 1.....	106
<u>Figure 23</u> : Comparaison du pH vaginal pendant les deux cycles de la chienne 2.....	107
<u>Figure 24</u> : Comparaison du pH vaginal pendant les deux cycles de la chienne 4.....	107
<u>Figure 25</u> : Comparaison du pH vaginal pendant les deux cycles de la chienne 6.....	108
<u>Figure 26</u> : Comparaison du pH vaginal moyen des chiennes complémentées ou non en fonction de la progestéronémie moyenne (en ng/mL).....	109
<u>Figure 27</u> : Nuage de points des pH vaginaux des chiennes en fonction de leur progestéronémie (en ng/mL).....	110
<u>Figure 28</u> : Nuage de points des pH vaginaux des chiennes pour une progestéronémie inférieure à 4ng/mL.....	110
<u>Figure 29</u> : Nuage de points des pH vaginaux des chiennes pour une progestéronémie supérieure à 4ng/mL.....	111
<u>Figure 30</u> : Modélisation pour une progestéronémie inférieure à 4ng/mL.....	111
<u>Figure 31</u> : Modélisation pour une progestéronémie supérieure à 4ng/mL.....	112

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Sexe-ratio à la naissance en fonction des espèces (d'après VACHEZ, 1978).....	34
<u>Tableau 2</u> : Sexe-ratio à la naissance chez l'Homme en fonction des pays, estimations de 2016 (d'après le site internet de la CIA).....	35

<u>Tableau 3</u> : Sexe-ratio en fonction des tranches d'âge chez l'Homme, estimations de 2016 (d'après le site internet de la CIA).....	35
<u>Tableau 4</u> : Sexe-ratio des portées nées suite à des fécondations à différents pH vaginaux (d'après WAKIM, 1972).....	44
<u>Tableau 5</u> : Sexe-ratio des portées de hamsters en fonction du pH avant la saillie (d'après PRATT, 1987).....	45
<u>Tableau 6</u> : Sexe-ratio chez le femme en fonction de la date de l'acte sexuel (d'après BENENDO, 1970).....	47
<u>Tableau 7</u> : Sexe-ratio des portées de faons en fonction du moment de la saillie (d'après VERME, 1981).....	48
<u>Tableau 8</u> : Sexe-ratio des populations de têtards en fonction du rapport $\frac{K^+}{Ca^{2+}}$ présent dans leur milieu de vie (d'après STOLKOWSKI et BELLEC, 1960, cités par DAUDIN, 1982).....	55
<u>Tableau 9</u> : Composition des deux différents régimes testés chez la souris (d'après ROCHE et LEE, 2007).....	57
<u>Tableau 10</u> : pH sanguin et sexe-ratio obtenus en fonction des régimes maternels (d'après ROCHE et LEE, 2007).....	57
<u>Tableau 11</u> : Sexe-ratio des portées de rats en fonction du régime alimentaire de la mère (d'après VAHIDI, 2007).....	57
<u>Tableau 12</u> : p-values associées à la comparaison des résultats (d'après VAHIDI, 2007).....	58
<u>Tableau 13</u> : Sexe-ratio des portées de rats en fonction du régime alimentaire de la mère (d'après OUN et <i>al.</i> , 2016).....	58
<u>Tableau 14</u> : Sexe-ratio des portées de veaux en fonction de la dominante minérale contenue dans l'alimentation des mères (résultats rassemblés par DAUDIN, 1982).....	59
<u>Tableau 15</u> : Sexe-ratio des portées en fonction du traitement (injections de vitamine D ₃ , calcium et magnésium) reçu ou non par la mère (STOLKOWSKI et LEFEVRE, 1977).....	59
<u>Tableau 16</u> : Sexe-ratio des portées en fonction du traitement reçu (injections de vitamines) ou non par la mère (STOLKOWSKI et LEFEVRE, 1977).....	60
<u>Tableau 17</u> : Conseils donnés en fonction du sexe recherché chez les veaux (STOLKOWSKI et LEFEVRE, 1977).....	60
<u>Tableau 18</u> : Composition des régimes alimentaires testés par BOLET et <i>al.</i> , 1982.....	61

<u>Tableau 19</u> : Sexe-ratio des portées de porcelets en fonction des régimes alimentaires maternels (d'après BOLET et <i>al.</i> , 1982).....	61
<u>Tableau 20</u> : Sexe des bébés en fonction des régimes suivis par leur mère (d'après EDESSY et <i>al.</i> , 2016).....	63
<u>Tableau 21</u> : Besoin énergétique d'un chien adulte en fonction de son poids optimal.....	71
<u>Tableau 22</u> : Exemple de coefficients multiplicateurs du BEE chez le chien adulte à l'entretien en bonne santé (d'après BLANCHARD et PARAGON, 2008).....	72
<u>Tableau 23</u> : Ratio Protido-Calorique minimal en fonction du poids du chien (d'après BLANCHARD et PARAGON, 2008).....	74
<u>Tableau 24</u> : Exemples de sources de protéines (d'après NRC 2006).....	74
<u>Tableau 25</u> : Exemples de sources de lipides (d'après NRC 2006).....	75
<u>Tableau 26</u> : Besoin calcique et phosphorique du chien adulte à l'entretien (d'après NRC 2006).....	76
<u>Tableau 27</u> : Recommandation d'apports journaliers en oligo-éléments en vitamines du chien adulte à l'entretien (d'après NRC 2006).....	76-77
<u>Tableau 28</u> : Calcul de la ration de croquettes (Royal Canin Vet Care Adult Medium Dog) en fonction du poids des chiennes.....	84
<u>Tableau 29</u> : Apports quotidiens en minéraux et vitamines avec l'aliment Royal Canin Vet Care Adult Medium Dog.....	85
<u>Tableau 30</u> : Apports en minéraux et vitamines contenus dans deux comprimés Pet-Phos Croissance Grand Chien Ca/P=2 NDV (Laboratoire Ceva).....	85-86
<u>Tableau 31</u> : Apport quotidien en calcium chez les chiennes lors de la phase de complémentation, selon leur poids.....	86
<u>Tableau 32</u> : Apport quotidien en magnésium chez les chiennes complémentées en fonction de leur poids.....	87
<u>Tableau 33</u> : Apport quotidien en vitamine D ₃ chez les chiennes complémentées en fonction de leur poids.....	87
<u>Tableau 34</u> : Résultats de la modélisation pour une progestéronémie inférieure à 4ng/mL...111	
<u>Tableau 35</u> : Résultats de la modélisation pour une progestéronémie supérieure à 4ng/mL.112	

Table des abréviations et des sigles

BEE	Besoin Énergétique d'Entretien
Ca	Calcium
EM	Energie métabolisable
GPC	Glycérylphosphorylcholine
J	Jour
Jpi	Nombre de jours après la pose de l'implant
K	Potassium
Mg	Magnésium
Na	Sodium
NEC	Note d'état corporel
NDV	Nom déposé vétérinaire
NRC	National Research Council
PM	Poids métabolique
PV	Poids vifs
TP	Travaux pratiques
VHF	Very high saturated fat : régime riche en acides gras saturés distribué <i>ad libitum</i>
VHF-R	Very high saturated fat-restricted : régime riche en acides gras saturés distribué de manière restreinte
VitD ₃	Vitamine D ₃

Introduction

Depuis des centaines d'années, l'Homme voudrait pouvoir choisir le sexe de son enfant à venir. Que ça soit afin d'équilibrer les sexes d'une fratrie, par choix stratégique (force de travail des garçons, absence de dot à payer) ou par préférence individuelle. Nous avons tous entendu ces croyances plus ou moins farfelues concernant le sexe du futur bébé : un garçon se conçoit entre une lune blanche et une pleine lune, l'inverse pour une fille ; la forme du ventre de la femme enceinte présage du sexe du bébé... Mais la plus connue reste celle concernant l'alimentation de la mère. Une femme qui a l'habitude de manger sucré ou qui a envie de sucré pendant sa grossesse aura une fille, alors que celles qui sont attirées par le salé auront un garçon. Ces différentes croyances continuent d'être perpétuées de nos jours, laissant entrevoir le mystère qui entoure encore la façon dont est déterminé le sexe d'un bébé.

Au-delà des attentes de l'Homme concernant sa descendance, alors que nous sommes actuellement dans une situation où l'agriculture française est chaque année un peu plus menacée, il est possible d'imaginer l'intérêt qu'il y aurait à sélectionner les sexes des petits à naître dans le domaine des productions animales. Plus besoin d'attendre la naissance du veau pour décider de son avenir, possibilité de faire naître des veaux femelles pour renouveler le troupeau... La même attente concerne les animaux de compagnie au sens large : pouvoir décider du sexe du poulain à naître, de celui des chiots de son élevage...

Tout cela a longtemps été un rêve pour l'Homme et chaque jour la science permet de nous rapprocher de sa réalisation. Mais l'Homme met souvent un point d'honneur à ce que cela reste « naturel ». Bien que souhaitant choisir le sexe de son bébé, l'Homme est souvent contre l'idée de le sélectionner aux dépens d'autres embryons pour des raisons d'éthique. C'est pourquoi influencer sur la sélection des spermatozoïdes avant fécondation en passant par l'alimentation est une idée qui prend de plus en plus d'essor. Mais pour cela, le régime alimentaire doit être commencé bien avant la conception du bébé.

L'élevage canin n'échappe pas à cette volonté de choisir le sexe de la descendance de la chienne mise à la reproduction, que cela soit pour satisfaire la demande des futurs propriétaires des chiots, ou pour pouvoir avoir plus de choix dans la portée pour sélectionner

les futurs reproducteurs. Cette thèse cherche à servir d'ébauche dans la recherche d'une méthode préconceptionnelle dans le but de sélectionner les sexes des chiots à naître, grâce à la modification de l'alimentation maternelle.

PREMIERE PARTIE : SEXE-RATIO ET INFLUENCE DE DIVERS
FACTEURS

SOUS-PARTIE 1 : SEXE-RATIO ET FACTEURS L'INFLUENCANT

1) Définition du sexe-ratio

Le sexe-ratio est un indicateur permettant de quantifier le nombre de mâles par rapport au nombre de femelles dans une population. Il existe différentes manières de l'exprimer : soit il s'agit du nombre de mâles pour cent femelles, soit il s'agit du nombre de naissances de mâles par rapport à l'ensemble des naissances (mâles et femelles confondus). C'est cette dernière définition que nous adopterons dans cette thèse : un sexe-ratio de 48% indiquera que, pour 100 naissances, 48 nouveau-nés sont de sexe masculin.

Le sexe-ratio est souvent considéré comme étant égal à 50%, puisqu'un être naît soit mâle, soit femelle. Nous verrons par la suite que la réalité est tout autre...

Il est possible de distinguer différents sexe-ratios :

- Le sexe-ratio primaire : proportion de mâles à la conception.
- Le sexe-ratio secondaire : proportion de mâles à la naissance.
- Le sexe-ratio tertiaire : proportion de mâles dans une population vieillissante.

a) Sexe-ratio primaire

Le sexe-ratio primaire est la proportion de mâles à la conception. Sa détermination est très difficile puisqu'il n'existe pas de moyen pour l'objectiver. Le sexe des embryons étant déterminé par l'ADN porté par le spermatozoïde fécondant, et en supposant qu'il existe autant de spermatozoïdes X que Y (d'après les lois de la méiose) dans un éjaculat, il serait assez intuitif de considérer que ce sexe-ratio théorique soit de 50%. Ce n'est cependant pas le cas.

i) « Fragilité du mâle » et sélection maternelle

Il a été montré que, chez les mammifères, les embryons mâles auraient un taux de survie inférieur *in utero* comparé à celui des embryons femelles (PARKES, 1926 ; McMILLEN, 1979 ; cités par CLUTTON-BROCK et IASON, 1986). Cette mortalité serait notamment accrue lors de périodes de privation alimentaire puisque la survie et la croissance des embryons mâles

nécessiteraient davantage de ressources que celles des embryons femelles (CLUTTON-BROCK et IASON, 1986). Cette mortalité embryonnaire, supérieure chez les embryons mâles, impliquerait que le sexe-ratio secondaire soit inférieur au sexe-ratio primaire. Le sexe-ratio primaire chez l'Homme a été estimé entre 52.4% et 63% dans les années 1950 à 1972 (MCMILLEN, 1979), il serait de 60% chez le porc (PARKES, 1925). Pour aller plus loin, SUNDELL (1962) est même allé jusqu'à chiffrer le sexe-ratio de portées d'embryons de trois jours et demi d'âge chez le hamster doré et trouve un sexe-ratio avant nidation de 64,3%.

Ce plus grand besoin énergétique des fœtus mâles comparé à celui des fœtus femelles a été mis en évidence par TAMIMI et *al.* (2003). Leur étude conclut que, chez la femme, celles qui attendent un petit garçon ont une consommation alimentaire 10% supérieure d'un point de vue énergétique par rapport à celles qui attendent une fille, et que donc les fœtus mâles doivent bien être plus sensibles à une restriction alimentaire. Les auteurs émettent l'hypothèse que cette consommation accrue pourrait être due à la sécrétion de testostérone, très anabolique, par le fœtus mâle.

Selon TRIVERS et WILLARD (1973), cités par WELLS (2000), la plus grande vulnérabilité des embryons et fœtus mâles (et même des nouveau-nés mâles) à leur environnement serait un moyen pour la mère de contrôler et de modifier le sexe-ratio de sa portée afin de favoriser la diffusion de ses gènes par ses descendants. WELLS (2000) résume cette théorie ainsi : chez les vertébrés, les femelles se reproduisent quasiment toutes, et les femelles en bonne santé donnent naissance à des petits forts et en bonne santé. Chez les mâles, seuls les plus forts se reproduisent beaucoup, les plus faibles se reproduisent peu, voire pas. Ainsi, une femelle avec un bon potentiel génétique et en bonne santé maximise ses chances de voir ses descendants se reproduire et donc de léguer ses gènes en donnant naissance à des mâles, qui naîtront forts grâce à leur potentiel génétique. Tandis qu'une femelle en moins bonne condition physique maximisera ses chances de voir ses gènes être transmis à leur tour par sa descendance en donnant naissance à des femelles, car même en n'ayant pas une génétique très favorable, les femelles se reproduiront plus facilement comparées aux mâles. Pour les auteurs, une femelle aurait alors tout intérêt à pouvoir agir sur le sexe-ratio de sa portée, afin de ne pas investir d'énergie dans une portée qui ne se reproduira pas dans le futur. En considérant qu'un

potentiel génétique n'est bon ou mauvais que dans un environnement donné, on arrive à ce diagramme (Figure 1) :

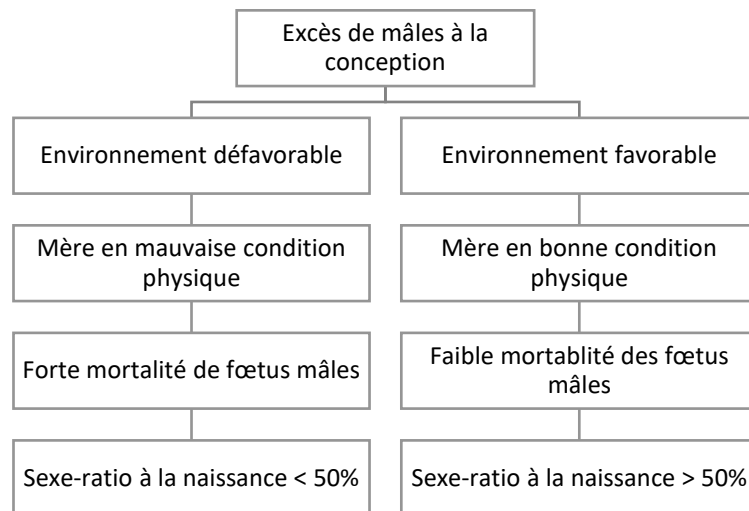


Figure 1 : Action du milieu sur le sexe-ratio des portées (d'après WELLS, 2000).

Ainsi, selon les auteurs, lorsque l'environnement n'est pas favorable à une femelle, elle aura intérêt à produire surtout des femelles. C'est ainsi que les auteurs expliquent la plus grande mortalité des embryons et fœtus mâles pendant la gestation lorsque la mère vit dans un environnement défavorable.

NICHOLS et *al.* (2014) montrent que malgré un investissement maternel supérieur pour produire un descendant mâle chez le dauphin globicéphale, il n'y avait aucune preuve que les mères puissent moduler le sexe-ratio de leur descendance en fonction de leur condition physique, de leur rang social ou des conditions du milieu.

PRAVE (1968) donne d'autres éléments pouvant expliquer ce qu'il appelle "la fragilité du mâle" : les sécrétions vaginales des mères seraient nuisibles à la migration des spermatozoïdes Y, l'environnement hormonal de la gestation serait néfaste pour les embryons/fœtus mâles, il y aurait un gène létal récessif sur le chromosome X, le haut métabolisme des fœtus mâles les rendrait vulnérables aux conditions défavorables d'un milieu...

ii) Sexe-ratio et composition de l'éjaculat

Pour expliquer le fait que le sexe-ratio primaire soit supérieur au secondaire, certains ont émis l'hypothèse que l'éjaculat contienne davantage de spermatozoïdes Y que de spermatozoïdes X (SHETTLES et VANDE WIELE, 1974), ce qui statistiquement nous donnerait davantage d'embryons mâles que d'embryons femelles. Cependant, des études sur le sperme humain (BARLOW et VOSA, 1970 ; PEARSON et BOBROW, 1970 ; SUMNER et *al.*, 1971) ont montré qu'un éjaculat était plus riche en spermatozoïdes X que Y. Cet écart de 50%-50% attendus pourrait cependant s'expliquer par la non-coloration de certains spermatozoïdes Y, la coloration étant ce qui permet à la machine de les dénombrer. Ces études font également état de spermatozoïdes YY présents à hauteur de moins de 1,5% (PEARSON ET BOBROW, 1970 ; SUMNER et *al.*, 1971) dans l'éjaculat.

Une autre étude (GRAFFELMAN et *al.*, 1999) trouve un ratio quasi-équilibré entre les spermatozoïdes X et Y dans la semence humaine (50,3% de Y) avec pourtant un sexe-ratio de nouveau-nés vivants de 51,3%. Les auteurs expliquent cette différence par l'intervention de l'environnement utérin qui influencerait la motilité et la survie des spermatozoïdes X ou Y, la survie des embryons mâles ou femelles, ou une combinaison des deux.

b) Sexe-ratio secondaire et valeurs dans diverses espèces

Le sexe-ratio secondaire est la proportion de mâles obtenue à la naissance de la portée. Bien que toujours proche des 50%, le sexe-ratio secondaire varie entre les différentes espèces animales (Tableau 1), voire même entre les hommes en fonction des continents et des pays (Tableau 2).

Espèce	Sexe-ratio
Chien	52,4-55,6%
Taureau	51-51,5%
Souris	50,7-51,2%
Homme	50,5-51,2%
Porc	50,5-51%
Cheval	49,5-49,7%
Mouton	49,2%
Poule	46,8-48,7%

Tableau 1 : Sexe-ratio à la naissance en fonction des espèces (d'après VACHEZ, 1978).

A l'échelle du monde, le sexe-ratio chez l'homme à la naissance est de 50,7% en 2016 (d'après le site internet de la CIA). Bien qu'il existe des différences entre les pays (Tableau 2), il y a toujours plus de garçons à naître que de filles.

Monde	50,7%
Chine	53,5%
Inde	52,8%
Tunisie	51,7%
Canada	51,5%
Australie	51,5%
Brésil	51,2%
France	51,2%
Ethiopie	50,7%

Tableau 2 : Sexe-ratio à la naissance chez l'Homme en fonction des pays, estimations de 2016 (d'après le site internet de la CIA).

c) Sexe-ratio tertiaire

Le sexe-ratio tertiaire représente la proportion de mâles dans une population vieillissante. A l'échelle du monde, le sexe-ratio tertiaire de l'Homme est de 44,6% (d'après le site internet de la CIA). La diminution progressive du sexe-ratio en fonction des tranches d'âge (Tableau 3) peut s'expliquer en partie par le mode de vie parfois plus extrême des hommes (accidents de la route, sports extrêmes...) par rapport à celui des femmes.

Tranche d'âge	Sexe-ratio
A la naissance	50,7%
0-14 ans	51,7%
15-24 ans	51,7%
25-54 ans	50,5%
55-64 ans	48,7%
65 ans et plus	44,6%
Population totale, tous âges confondus	50,4%

Tableau 3 : Sexe-ratio en fonction des tranches d'âge chez l'Homme, estimations de 2016 (d'après le site internet de la CIA).

En effet, KRAEMER (2000) parle de la tendance plus grande chez les adolescents que chez les adolescentes à s'adonner à la violence, à la consommation d'alcool et de drogues illicites. ANDERSON et SMITH (2003) précisent qu'en 2001 aux Etats-Unis, les accidents (tous genres confondus) sont la troisième cause de mortalité chez les hommes, alors qu'ils n'arrivent qu'en septième position chez les femmes.

DALY et WILSON (1978), cités par KRUGER et NESSE (2004), expliquent cette prise de risque supérieure chez le mâle que chez la femelle par le fait que cette dernière a souvent le choix de son compagnon. Ainsi, les mâles doivent s'affronter et c'est celui qui aura pris le plus de risques, celui qui sera le plus compétitif, qui pourra se reproduire. Ainsi, ce sont ses gènes qui seront transmis aux descendants, favorisant un comportement « à risques » chez les mâles, qui vivront globalement moins longtemps que les femelles.

Dans cette thèse, nous ne parlerons que du sexe-ratio secondaire, que nous appellerons « sexe-ratio » par souci de simplicité. Quels seraient les avantages et les inconvénients de savoir influencer ce sexe-ratio ? C'est ce que nous proposons de développer dans le paragraphe suivant.

2) Intérêts et inconvénients à modifier le sexe-ratio

a) Situation actuelle en France et en Europe

Intéressons-nous ici à la situation de l'Homme en France et en Europe.

i) En France

En France, choisir le sexe de son bébé est formellement interdit, notamment en ce qui concerne l'avortement sélectif lorsque le sexe du bébé n'est pas celui attendu. Il existe cependant une exception : le diagnostic préimplantatoire. Il consiste à analyser les gènes d'un embryon issu d'une fécondation *in vitro* à la recherche d'anomalies chromosomiques ou génétiques. Cette pratique est légalisée par la loi n° 94-654 du 29 juillet 1994 et dont les circonstances de mise en œuvre sont précisées dans la loi n° 2004-800 du 6 août 2004.

L'article L162-17 de la loi n° 94-654 du 29 juillet 1994 (Annexe 1) autorise le diagnostic préimplantatoire chez les couples ayant une forte probabilité de donner naissance à un enfant

porteur d'une maladie génétique grave. Ainsi, l'ADN des embryons est analysé avant que seuls les embryons indemnes ne soient implantés dans l'utérus maternel.

L'article L25 de la loi n° 2004-800 du 6 août 2004 rappelle l'interdiction de pratiquer le clonage humain, même à des fins thérapeutiques. L'article L2131-4-1 de la loi n° 2004-800 du 6 août 2004 (Annexe 2) rend cependant légal la conception d'un "enfant-médicament", génétiquement sélectionné pour soigner son grand frère ou sa grande sœur, atteint d'une maladie génétique grave telle que la mucoviscidose, la maladie de Huntington, l'hémophilie...

Ainsi en France, comme dans n'importe quel pays de l'Union Européenne, un couple sain n'est pas légalement autorisé à choisir le sexe de son futur enfant de façon médicale, que ce soit par sexage de la semence, par diagnostic préimplantatoire, ou plus radicalement par avortement sélectif.

ii) En Europe

Le diagnostic préimplantatoire est interdit dans certains pays, tels que l'Allemagne, l'Autriche, l'Italie, la Suisse.

D'autres pays, comme la Belgique, le Danemark, l'Espagne, les Pays-Bas et le Royaume-Uni, acceptent le diagnostic préimplantatoire, sans qu'il soit mentionné clairement quelles maladies héréditaires devraient/pourraient être recherchées lors de ce diagnostic (d'après le site internet du Sénat).

b) Quels sont les intérêts à modifier le sexe-ratio ?

i) Chez l'Homme

Des parents peuvent avoir envie de choisir le sexe de leur futur enfant pour différentes raisons. Il peut tout d'abord s'agir, comme nous venons de l'évoquer, de raisons médicales : certaines maladies, graves et héréditaires, comme l'hémophilie ou la maladie de Duchenne sont liées au chromosome X. Un couple se sachant porteur de la maladie (la mère est « porteuse de la maladie » s'il s'agit d'une maladie récessive et que l'allèle concerné est situé sur un seul de ses chromosomes X) a 25% de probabilité d'avoir un fils malade (50% des

enfants seront théoriquement de sexe masculin et 50% des garçons seront atteints de la maladie) (Figure 2).

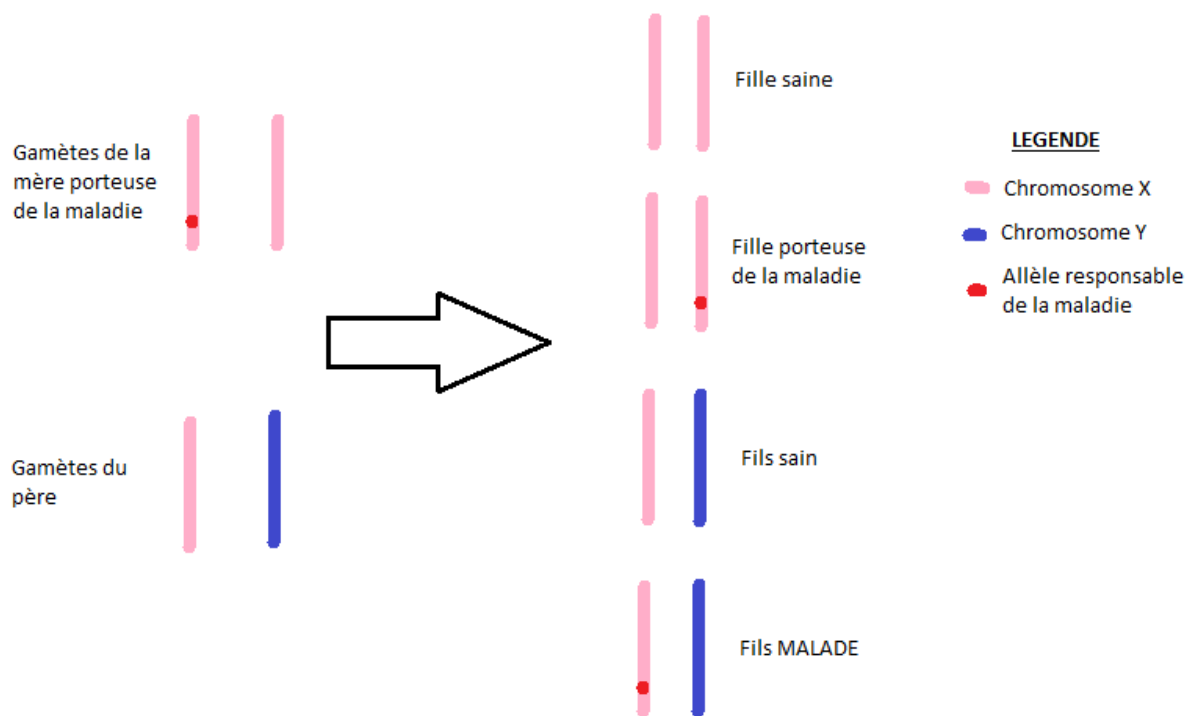


Figure 2 : Composition de la descendance d'un père sain avec une mère porteuse d'une maladie récessive portée par le chromosome X.

Dans ces conditions, il est compréhensible qu'un couple décide de n'avoir que des filles ; ces dernières seront au mieux saines pour cette maladie, et dans le pire des cas, porteuses de la maladie, sans être malades.

Mais des parents peuvent également vouloir choisir le sexe de leur bébé afin d'équilibrer leur famille. En effet, il n'est pas rare de croiser des familles dont tous les enfants sont du même sexe, et les parents espèrent que le prochain enfant soit du sexe opposé.

Il existe également, dans certains pays (Inde, Chine, pays du Moyen-Orient...), une véritable préférence pour les enfants de sexe masculin. Considérés comme étant d'une plus grande valeur que les filles, les garçons sont recherchés à tout prix et certains parents vont jusqu'à pratiquer l'avortement sélectif si le fœtus est une fille. Cette pratique, qui biaise ensuite le sexe-ratio, pose surtout de sérieux problèmes d'éthiques.

Cette thèse n'a pas pour but de discuter du côté éthique de la sélection du sexe chez l'Homme et nous ne nous intéresserons d'ailleurs ici qu'aux méthodes de sélection préconceptionnelle du sexe des embryons.

ii) Chez les animaux

(1) Animaux de production

On peut facilement imaginer l'avantage que représenterait le choix du sexe des futurs veaux, porcelets, poulets (VACHEZ, 1978)... Cependant, il faudrait que la méthode employée soit peu onéreuse pour les éleveurs, sinon elle n'a que peu d'intérêt.

Chez la vache laitière par exemple, les éleveurs recherchent en priorité des veaux femelles, afin de remplacer les mères. Les veaux mâles, eux, partent en engraissement. Il serait donc intéressant pour l'éleveur de pouvoir choisir de faire naître des veaux femelles de mères faisant partie des meilleures vaches du troupeau (veaux qui permettront de remplacer le troupeau actuel en maintenant son potentiel laitier), et de faire naître des veaux mâles chez les vaches moins bonnes laitières, veaux qui pourront de surcroît être le résultat d'un croisement « vache laitière x taureau de race bouchère », pour obtenir un meilleur rendement à la boucherie.

Chez la vache allaitante, l'éleveur pourra choisir entre faire naître des veaux mâles, qui ont une meilleure croissance que les femelles, pour la production de viande, ou bien faire naître des veaux femelles à partir de parents sélectionnés pour renouveler le troupeau.

Chez les éleveurs de poules, une sélection du sexe des poussins permettrait de s'affranchir de l'étape « sexage » qui a lieu dans les élevages et de la destruction des poussins mâles, frères des futures poules pondeuses.

En porciculture, il n'y a *a priori* pas de différence notable de rendement entre les porcs femelles ou mâles. L'intérêt de produire tel ou tel sexe résiderait donc dans la constitution du troupeau de renouvellement.

(2) Animaux de compagnie

Chez les éleveurs canins et félins, on peut facilement imaginer l'intérêt de la sélection du sexe des chiots et des chatons. Nous nous intéresserons ici tout particulièrement à la sélection des chiots, puisque c'est sur ce sujet que porte notre thèse.

Une étude menée par nos soins, en amont de notre thèse, auprès de quelques éleveurs canins nous a révélé les données suivantes :

- Les chiots femelles sont souvent plus recherchés par les futurs propriétaires.
- Les chiots femelles se vendent aussi chers, voire souvent plus chers que les chiots mâles.

Il ne nous a cependant pas été possible de mener une étude complète sur le gain financier que pourrait apporter une augmentation de production de chiots femelles car les éleveurs sont souvent réticents à nous confier les frais moyens engagés pour faire naître et grandir une portée, ainsi que le tarif auquel se vendent leurs chiots.

Cependant, si un éleveur peut diminuer le sexe-ratio de ses portées de chiots, cela lui permettra :

- de répondre plus facilement à la demande des propriétaires en leur proposant un plus grand choix de chiots femelles.
- de choisir ses futures reproductrices parmi un plus grand nombre de chiots femelles.

c) Quels sont les inconvénients à modifier le sexe-ratio ?

L'idée de modifier le sexe-ratio a inquiété certains auteurs, les poussant à se demander comment évoluerait une population où un des sexes est surreprésenté. Ils craignent que la population finisse par s'éteindre, faute de reproducteurs des deux sexes. DARWIN (1871) a tenté d'y réfléchir mais a fini par « laisser la solution au futur », ne sachant comment raisonner de façon sûre. FISHER (1930), lui, tente de prédire ce qui arrivera à une population au sexe-ratio biaisé. Selon lui, le sexe-ratio finira par se réajuster tout seul. HARDY (1997) clarifie la théorie de FISHER : dans une population où un sexe est prédominant par rapport à l'autre, les individus du sexe rare sont plus recherchés et donc plus enclins à se reproduire que les

individus de l'autre sexe. Les individus qui produisent plus d'enfants du sexe rare ont donc plus de chance d'avoir des petits-enfants. La tendance à produire le sexe rare devient donc de plus en plus courante et le sexe-ratio de la population s'équilibre. Bien sûr, cette théorie n'est valable que si l'on suppose que le patrimoine génétique des parents influe sur le sexe-ratio.

Maintenant que nous connaissons les avantages et les inconvénients de moduler les sexe-ratios dans diverses espèces, concentrons-nous sur les facteurs qui pourraient nous permettre d'intervenir sur ce sexe-ratio.

3) Facteurs maternels influençant le sexe-ratio

De nombreux facteurs sont susceptibles de faire varier le sexe-ratio des portées, et cela de façon concomitante. Nous nous intéressons davantage à l'action de facteurs maternels sur le sexe-ratio de ses portées, nous n'évoquerons pas ici les facteurs paternels, ni les techniques de médecine moderne, comme l'utilisation de semences sexées, susceptibles de modifier le sexe-ratio. Parmi les facteurs maternels susceptibles de nous intéresser, ceux présentés ici sont ceux qui nous semblent être les plus plausibles et/ou les mieux documentés.

a) Âge de la mère

En 1969, VERME montre que les mères de l'espèce cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) nées dans l'année donnent naissance à davantage de femelles (sexe-ratio moyen 30,0%) que les mères plus âgées (sexe-ratio moyen 66,7%), lorsque la portée est composée d'un unique petit. Ce résultat n'est pas retrouvé chez des portées de jumeaux, mais l'est chez des portées de triplés. Mais en 1983, VERME trouve le rapport inverse : diminution du sexe-ratio avec l'âge de la mère chez l'espèce cerf hémione (*Odocoileus hemionus*) et la taille de la portée. Il semble donc qu'on ne puisse *a priori* pas tirer de conclusion des diverses expériences de VERME.

En 1995, WAUTERS et *al.* trouvent également que les mères chevreuil (*Capreolus capreolus*) multipares produisent une plus grande proportion de faons mâles que les mères primipares (55% des faons nés d'une mère multipares sont des mâles contre 32% chez les mères primipares).

Une zone d'ombre demeure cependant : dans ces expériences, une femelle plus âgée est toujours multipare. Ainsi est-ce l'âge de la mère qui influe vraiment ou la parité de la portée ? HUCK et *al.* (1988) apportent une réponse à cette interrogation (Figure 3).

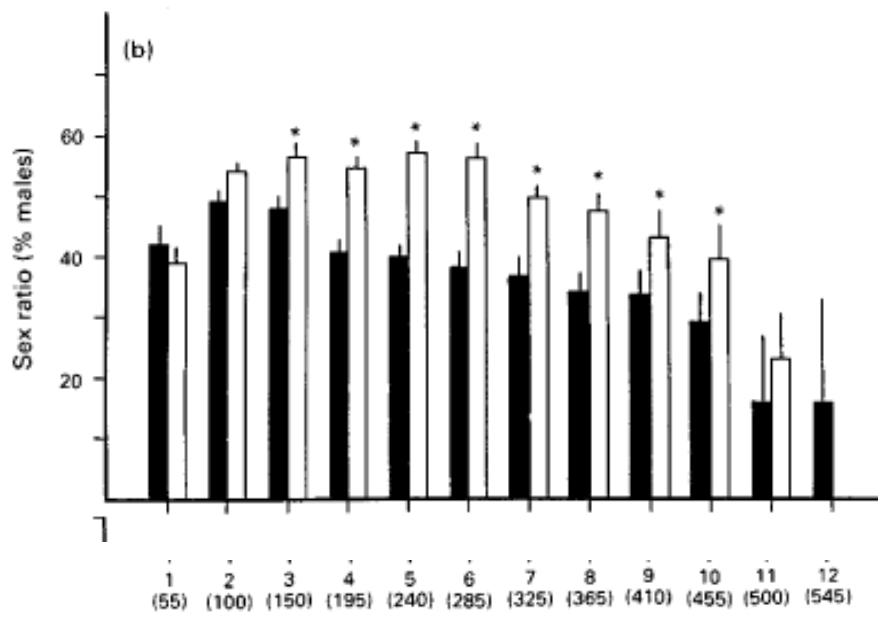


Figure 3 : Sexe-ratio des portées de femelles hamster dorées accouplées successivement ou ponctuellement. (HUCK et *al.*, 1988).

L'axe des abscisses représente le numéro de portées et entre parenthèses l'âge en jours des femelles lorsqu'elles sont accouplées pour la première fois. Les barres noires représentent le sexe-ratio des portées chez les femelles accouplées de façon répétée, les barres blanches représentent celui chez les femelles accouplées une seule fois. Les * indiquent une différence statistiquement significative entre les barres blanches et noires.

Les auteurs montrent que, chez des femelles hamster doré accouplées et gestantes jusqu'à douze cycles d'affilée, le sexe-ratio augmente bien entre la première et la deuxième portée, et se maintient jusqu'à la 3^{ème} portée puis chute au-delà de la 3^{ème} portée. La diminution du sexe-ratio, parallèlement à celle de la taille de la portée, suggère une mortalité des embryons/foetus mâles *in utero*. Ils montrent également que plus une femelle est accouplée à un âge avancé (plus de 325 jours d'âge) pour la première fois, plus le sexe-ratio de sa portée diminue. Mais à âge égal, une femelle accouplée pour la première fois produira plus de mâles qu'une femelle multipare. Pour les auteurs, les résultats de leur étude montrent qu'une augmentation de la parité de la portée exacerbe les effets néfastes liés à l'âge de la

mère. Ainsi dans la énième portée d'une femelle, on retrouvera les mêmes résultats (sexe ratio, taille de la portée...) que dans une portée d'une femelle plus âgée mais primipare. Ainsi chez ces auteurs, les conséquences de l'âge de la mère et de la parité sont les mêmes, bien que plus extrêmes en ce qui concerne la parité. A noter que les auteurs trouvent, eux, une diminution du sexe-ratio avec l'âge et la parité de la mère.

Finalement, il n'est pas possible à l'heure actuelle de conclure sur la relation entre l'âge de la mère et le sexe-ratio de ses portées.

b) pH vaginal

i) Résultats de diverses expériences

Il semblerait qu'UNTERBERGER, cité par VACHEZ en 1978, soit le premier, en 1930, à relier le pH vaginal de la mère au moment de la conception au sexe-ratio de sa portée, un pH alcalin favorisant la naissance de mâles, et un pH acide favorisant la naissance de femelles. C'est de cette observation que naît probablement la croyance populaire qu'une douche vaginale au vinaigre blanc quinze minutes avant le rapport permet de concevoir une fille, et une douche au bicarbonate de soude permet de concevoir un garçon (SHETTLES et VANDE WIEELE, 1974).

DIASIO et GLASS (1971), cités par ROHDE et *al.* (1973) et ROUX (1983), ne réussirent pas non plus à mettre en évidence une action directe du pH sur la migration des spermatozoïdes.

Selon ROHDE et *al.* (1973), les spermatozoïdes Y sont plus mobiles et rapides que les spermatozoïdes X dans le mucus vaginal autour de l'ovulation. D'après SHETTLES (1960, 1970), les spermatozoïdes Y ont une plus petite tête, de forme ronde, que les spermatozoïdes X, qui ont une tête ovale. Selon lui, les spermatozoïdes Y seraient plus « rapides » alors que les X auraient une « longévité » supérieure. Ainsi, SHETTLES (1970) remarque qu'au moment de l'ovulation, le mucus cervical est alcalin, la viscosité est faible et donc que c'est un moment favorable pour la traversée de ce mucus par les spermatozoïdes, contrairement aux restes du cycle œstral où le mucus est plus acide, où seuls les spermatozoïdes les plus « endurants » pourront le traverser. Ainsi au moment de l'ovulation, ce sont les spermatozoïdes Y, rapides

et légers, qui arriveront en premier aux ovocytes ; alors que ce sont majoritairement les spermatozoïdes X, plus résistants, qui pourront féconder les ovocytes en dehors de la courte période centrée sur l'ovulation. Ainsi, les mâles seraient conçus lorsque les conditions de fécondation seraient favorables, contrairement aux femelles. Cette théorie est soutenue par BECK *et al.* (1976).

C'est sur cela que SHETTLES (1970) basent ses recommandations : la fécondation doit avoir lieu :

- proche de l'ovulation associée à une douche vaginale au bicarbonate de soude pour avoir un garçon
- loin de l'ovulation associée à une douche vaginale au vinaigre pour avoir une fille.

En 1972, WAKIM démontre que le pH vaginal joue sur le sexe-ratio chez le lapin blanc de Nouvelle-Zélande. Le pH vaginal normal des lapines est compris entre 6,34 et 8,3. Certaines lapines reçoivent des douches vaginales alcalines afin d'augmenter leur pH vaginal, mais WAKIM se rend compte que cette douche compromet la survie des spermatozoïdes. Quarante-neuf lapines ont été inséminées, donnant naissance à 184 lapereaux. Les sexe-ratios des portées en fonction du pH vaginal au moment de la fécondation sont rassemblés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4). WAKIM confirme ainsi les résultats de SHETTLES (1970).

pH vaginal	Sexe-ratio
6,55 – 7,34	39,8%
7,35 – 7,54	53,1%
> 7,55	74,6%

Tableau 4 : Sexe-ratio des portées nées suite à des fécondations à différents pH vaginaux (d'après WAKIM, 1972).

PRATT (1987) étudie le lien entre le pH vaginal d'hamsters dorés et le sexe-ratio de leurs portées. L'auteur rapporte d'une étude précédente non publiée que le pH vaginal diminue le jour de réceptivité de la femelle (cycle œstral de 4 jours). En 1987, l'accouplement des hamsters est fait à différentes périodes en fonction du groupe (quatre groupes au total, correspondant à quatre moments d'accouplement différents, voir Tableau 5). Le pH vaginal

est mesuré juste avant accouplement. De cette étude ressort qu'il existerait une corrélation entre le pH vaginal avant accouplement et le sexe-ratio de la portée (Tableau 5).

Heure au moment de la saillie	Nombre total de femelles	pH vaginal avant saillie (moyenne +/- écart-type)	Taille de la portée (moyenne +/- écart-type)	Sexe-ratio (moyenne +/- écart-type)
15h00 (proœstrus)	36	6.90 +/- 0.02	12.3 +/- 0.5	51.4 +/- 2.4
20h00 (proœstrus)	41	6.83 +/- 0.02	12.2 +/- 0.6	55.2 +/- 2.4
01h00 (œstrus)	24	6.84 +/- 0.02	11.7 +/- 0.5	55.3 +/- 5.1
06h00 (œstrus)	46	6.75 +/- 0.02	9.4 +/- 0.4	60.0 +/- 2.5

Tableau 5 : Sexe-ratio des portées de hamsters en fonction du pH avant la saillie (d'après PRATT, 1987).

On voit ici qu'il existerait une corrélation négative significative (contrairement à ce que trouvent WAKIM, 1970, et SHETTLES, 1972) entre le pH vaginal et le sexe-ratio des portées aux deux horaires les plus extrêmes (p-value < 0,03 à 15h00, et p-value < 0.01 à 06h00). Il ne semble pas exister de corrélation aux horaires intermédiaires, les auteurs expliquent cela par le fait que le pH vaginal n'est pas le seul facteur influençant le sexe-ratio et que d'autres facteurs doivent être pris en compte à ces moments-là. Mais cette corrélation que PRATT met en évidence ne serait-elle pas plutôt liée à la date du rapport sexuel par rapport à l'ovulation ? Difficile ici de déterminer si c'est uniquement le pH vaginal qui modifie le sexe-ratio ou si la date du rapport sexuel par rapport à l'ovulation n'influe pas sur d'autres paramètres qui eux-mêmes influent sur le sexe-ratio, ou bien les deux. Par ailleurs, l'auteur n'indique pas la date de l'ovulation dans son étude.

En résumé, on peut dire que là encore aucun consensus ne se dégage de ces expériences et en fonction des auteurs, les conclusions varient du tout au tout.

ii) Moyens de mesurer le pH vaginal

Il existe dans la littérature diverses méthodes pour parvenir à mesurer le pH vaginal. En 1989, HEINZE et *al.* comparent deux moyens de mesurer le pH vaginal *in vitro* (c'est-à-dire en

mesurant des sécrétions vaginales fraîchement prélevées) : soit une bandelette qui vire de couleur en fonction du pH ou soit à une sonde-électrode (type 406 M 3, Ingold Co., Steinbach, FRG). Les auteurs recommandent d'associer les deux méthodes afin de déterminer précisément le pH vaginal. La méthode de la bandelette n'est cependant possible qu'en dehors des pertes sanguinolentes, sinon la lecture de la couleur est impossible.

D'autres auteurs, comme RIEDEWALD *et al.* (1990), mesurent le pH vaginal et cervical chez des patientes enceintes pendant des grossesses normales ou se terminant par un accouchement prématuré. Pour cela, ils mesurent le pH avec une sonde (Ingold Typ 405 KN S7) placée directement dans le vagin des patientes et mesurent le pH à 5 points différents du vagin. A chaque position, le pH est mesuré 3 fois. De leur étude se dégage que la mesure du pH vaginal permet de détecter des anomalies (infections) lors des grossesses entraînant un accouchement prématuré.

Dans une autre étude, le pH vaginal est mesuré grâce à une capsule téléométrique mesurant le pH et le transmettant à une radio-receveuse (FOX *et al.*, 1973).

Il existe donc plusieurs façons de mesurer le pH vaginal des mammifères mais il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de référence.

c) Date du rapport sexuel ou de l'insémination par rapport à l'ovulation

Cet aspect a déjà commencé à être évoqué dans le paragraphe précédent puisque le pH vaginal semble changer en fonction du moment du cycle, notamment lors de l'ovulation.

Dès 1966, KLEEGMAN publie ce qu'il a observé depuis 35 ans chez des femmes inséminées artificiellement :

- plus de bébés de sexe masculin naissent lorsque l'insémination est faite le plus proche possible de l'ovulation.
- plus de bébés filles naissent quand l'insémination a lieu 48 heures ou plus avant l'ovulation.
- ces résultats restent valables lorsque la fécondation se fait suite à un rapport sexuel et non une insémination artificielle.

En 1970, BENENDO tire les mêmes conclusions, toujours chez la femme (Tableau 6):

	Groupe A	Groupe B	Groupe C	Groupe D	Groupe E
Acte sexuel	3-5j avant ovulation	2j avant ovulation	1j avant et 2j après	Tous les jours pendant la période fertile	Après une longue séparation des partenaires et acte sexuel en dehors de la période fertile
Résultats	133 filles - 33 garçons	9 filles - 9 garçons	20 filles - 131 garçons	1 fille - 13 garçons	2 filles - 13 garçons
Sexe-ratio	19,9%	50%	86,8%	92,9%	86,7%

Tableau 6 : Sexe-ratio chez le femme en fonction de la date de l'acte sexuel (d'après BENENDO, 1970).

Ainsi selon BENENDO, un couple a plus de chances de concevoir un garçon si le rapport sexuel a lieu proche de l'ovulation, ce qui est en accord avec ce que NOORLANDER et *al.* (2010) montrent : un couple a plus de chance de concevoir une fille si le rapport sexuel a lieu 3 à 4 jours avant l'ovulation.

HARLAP (1979), quant à lui, trouve des résultats inverses chez la femme : des femmes qui conçoivent un bébé au moment de l'ovulation concevront théoriquement plus de filles que des femmes qui conçoivent quelques jours avant ou après l'ovulation. Pour GUERRERO (1975), ces phénomènes seraient dus à des variations du pH vaginal et cervical, des modifications du mucus cervical qui ont lieu autour de l'ovulation, ce qui aurait des conséquences sur la mobilité des spermatozoïdes. Pour HARLAP (1979), ils pourraient être dus à une mortalité possible de la cellule-œuf résultant de la fécondation d'un ovocyte « mature » (saillie tardive par rapport à l'ovulation) ou d'un spermatozoïde « mature » (saillie précoce par rapport à l'ovulation), mortalité différente en fonction du sexe du conceptus.

En 1981, VERME et *al.* travaillent en fonction du temps écoulé depuis le début de l'œstrus. Il remarque que chez les cerfs de Virginie (*Odocoileus virginianus*), la différence entre les sexe-ratios des deux groupes extrêmes est significative (Tableau 7) :

Saillie ... heures après début de l'œstrus	13-24	25-36	37-48	49-96	Total
Nombre de mères	15	15	21	16	67
Faons/Mère	1,87	2,07	1,90	1,69	
Faons mâles	4	12	25	21	62
Faons femelles	24	19	15	5	63
Sexe-ratio	14,3	38,7	62,5	80,8	

Tableau 7 : Sexe-ratio des portées de faons en fonction du moment de la saillie (d'après VERME, 1981).

Cette corrélation « moment de la fécondation/sexe-ratio » correspondrait à une adaptation au milieu : une femelle est saillie tard s'il y a un sous-effectif de mâles ; en donnant naissance à plus de mâles, elle permet de rétablir le nombre de mâles reproducteurs à la saison de reproduction prochaine. Il n'est pas possible ici de conclure sur le rapport entre le moment de la saillie et l'ovulation car les auteurs ne précisent pas quand l'ovulation a lieu dans le cycle des cerfs de Virginie par rapport à l'œstrus.

Le fait que la taille de la portée diminue lors d'accouplement tardif peut être expliqué par le fait qu'il faut le temps que les spermatozoïdes remontent l'utérus, se capacitent, ce qui prend trois heures d'après YANAGIMACHI (1969), et arrivent à l'ovocyte, et qu'il est possible qu'à ce moment l'ovocyte soit trop « vieux » pour être fécondé ou pour donner un œuf viable.

D'autres auteurs, comme WILCOX et *al.* (1995), n'ont pas trouvé de relation entre le moment de l'acte sexuel par rapport à l'ovulation et le sexe de l'enfant.

Ainsi, de nombreuses études ont été menées sur ce sujet, aucun consensus ne s'en dégage.

d) Stress environnemental

On constate souvent que le sexe-ratio diminue après :

- un désastre naturel : FUKUDA et *al.* (1998) montrent une diminution du sexe-ratio dans la population, neuf mois après le tremblement de terre de Kobe
- un événement majeur de pollution (MOCARELLI et *al.*, 1996)
- une crise économique (CATALANO, 2003).

Certaines études, comme celle de BRUCKNER et *al.* (2010) qui analyse le sexe-ratio de septembre 2001 aux Etats-Unis après l'événement terroriste du 11 septembre 2001, montrent qu'il s'agit bien d'une mort accrue des fœtus mâles pendant la grossesse plutôt qu'une diminution du nombre d'embryons masculins conçus. Ainsi les fœtus masculins seraient plus sensibles au stress ressenti par leur mère.

Pour aller plus loin dans cette affirmation, CHASON et *al.* (2012) montrent que des femmes donnant naissance à des filles ont une concentration salivaire élevée en cortisol (p -value = 0,0269) et basse en α -amylase (p -value = 0,029), mais seules les différences de concentration en α -amylase sont significatives.

De même, CLUTTON-BROCK et IASON (1986) rapportent que des souris stressées donnent naissance à moins de mâles que des souris non soumises à un stress environnemental.

PRATT et LISK (1989) montrent également que des femelles hamsters qui subissent un stress social (hiérarchie) produisent moins de mâles que les femelles hamsters non stressées ou des hamsters dominantes, et que leurs portées ont une taille réduite à cause d'une résorption utérine ou un avortement spontané des embryons mâles. Par ailleurs, les mâles qu'elles produisent sont plus petits.

Le stress engendré par la privation de nourriture sera abordé dans le paragraphe suivant.

Ainsi, un stress environnemental semble impacter davantage la survie des embryons et fœtus mâles que celle des femelles.

e) Alimentation de la mère

La théorie de TRIVERS et WILLARD (1973) parle des mères en « bonne condition physique » ou non. Certains auteurs se sont donc penchés sur l'influence du régime alimentaire de la mère sur le sexe-ratio de sa portée.

i) Restriction alimentaire

En 1969, VERME montre que des biches multipares donnent naissance à plus de mâles si elles ont des rations alimentaires restreintes et plus de femelles lorsqu'elles sont correctement nourries. L'inverse a été montré chez des jeunes biches primipares ; mais l'auteur n'en tire aucune conclusion du fait du faible nombre d'animaux concernés par son expérience. En 1983, VERME montre que des biches sous-nourries produisent plus de mâles que des biches bien nourries au moment de l'œstrus.

SACHDEVA et *al.* (1973) trouvent des résultats similaires chez la chèvre domestique : le sexe-ratio est augmenté chez les portées dont les mères ont manqué de nourriture, et vice-versa.

A l'inverse, en 1974, RIVERS et CRAWFORD montrent que des souris nourries avec un aliment pauvre en graisse mettent au monde des portées numériquement réduites, avec une réduction quasi-complète du nombre de mâles, et un nombre de femelles inchangé. Ils trouvent donc un sexe-ratio très bas (24.4%) chez ces femelles nourries avec un aliment pauvre en graisse, alors qu'il est de 50,5% chez le groupe-témoin. LABOV et *al.* (1986) eux montrent qu'une restriction alimentaire pendant la gestation fait passer le sexe-ratio moyen des portées de 49,6% à 40,7%.

MEIKLE et *al.* montrent en 1986 que des souris femelles nourries un jour sur deux (*ad libitum* le jour où elles sont nourries), pendant une semaine (puis accouplement à la fin de la semaine), donnent naissance à une moindre proportion de mâles que des souris nourries tous les jours (groupe témoin). Cependant si l'alimentation un jour sur deux est poursuivie une autre semaine, soit deux semaines en tout avec accouplement à la fin de ces deux semaines, les souris donnent naissance à la même proportion mâles/femelles que le groupe témoin. Les auteurs expliquent cela par l'adaptation au bout d'une semaine des souris à l'alimentation

tous les deux jours. Cependant, cette expérience ne permet pas de savoir si c'est le manque alimentaire qui modifie le sexe-ratio des portées ou le stress que cela engendre pour les mères.

En 1989, MITRA et CHOWDHURY parviennent à des conclusions similaires : des souris femelles qui subissent une période de restriction alimentaire produiront une descendance majoritairement femelle.

WILLIAMS et GLOSTER montrent, en 1992, que plus de garçons naissent dans un pays où la nourriture est abondante, comparé aux pays où la nourriture se fait rare ou qui subissent une diminution brutale de la disponibilité des aliments, qui eux voient naître plus de petites filles. De même pour WAUTERS et *al.* (1995) qui montrent que les mères chevreuil dont la masse corporelle est élevée produisent plus de mâles que les mères plus légères.

Ainsi, aucun consensus n'a été clairement exprimé mais il semble que les expériences les plus récentes montrent toute qu'une privation alimentaire entrainerait une baisse du sexe-ratio des progénitures.

ii) Composition du régime alimentaire

L'équipe de ROSENFELD et *al.* (2003) nourrit deux groupes de souris *ad libitum*, avec des régimes différents mais équivalents d'un point de vue énergétique. Ils prouvent qu'une mère mature (ayant plus de vingt semaines d'âge), nourrie avant et après fécondation avec un régime riche en acides gras insaturés, donne naissance à plus de souriceaux mâles. Au contraire, une mère nourrie *ad libitum* avant et après fécondation avec un régime pauvre en acides gras insaturés mais riche en glucides, donne naissance à plus de souriceaux femelles. Cette expérience montre que c'est la source de calories qui influe, dans un régime équilibré, sur le sexe-ratio de la portée, et que ce ne serait pas un déficit alimentaire qui diminuerait le sexe-ratio des portées puisque le régime riche en glucides était parfaitement équilibré et donné *ad libitum*.

Une autre équipe (ALEXENKO et *al.*, 2007) nourrit deux groupes de souris avec le même régime riche en acides gras insaturés (VHF : Very High saturated Fat), mais l'un des groupes

est nourri à volonté (VHF) alors que l'autre est restreint (VHF-R), ainsi qu'un groupe-témoin de souris. Le groupe VHF produit des portées dont le sexe-ratio est de 60% en moyenne, alors que le groupe VHF-R produit des portées dont le sexe-ratio est de 43%. Le groupe témoin, nourri avec un aliment qui apporte une quantité d'acides gras insaturés intermédiaire aux deux régimes, produit des portées dont le sexe-ratio est de 48%. Cette expérience montre que c'est l'excès de calories qui permet à la mère de produire plus de fils. Des souris mâles nourries avec des régimes similaires n'ont pas montré un pourcentage plus élevé de spermatozoïdes Y dans leur semence que le groupe mâle témoin, et n'ont pas produit des portées au sexe-ratio biaisé. Ce qui nous fait dire que l'effet alimentaire ne se manifeste exclusivement que chez la souris femelle.

En 2016, GHARAGOZLOU et *al.* montrent également qu'une supplémentation en huile de foie de morue chez la chienne, pendant plus d'un mois avant fécondation, augmente la proportion de chiots mâles nés.

CAMERON et *al.* prouvent, en 2008, qu'une augmentation de la glycémie au moment de la conception est associée à une production accrue de mâles.

Ainsi, un régime alimentaire riche en acides gras insaturés et/ou *ad libitum* permettrait d'augmenter le sexe-ratio dans les portées. Un régime riche en acides gras serait corrélé à un pH vaginal plus acide ainsi qu'à un taux d'œstradiol circulant significativement supérieur par rapport aux témoins (WHYTE, 2006). BECK et *al.* (1976) montrent que la mobilité des spermatozoïdes est accrue lorsqu'ils entrent en contact avec des œstrogènes, notamment les Y, naturellement plus rapides (SHETTLES, 1960), ce qui expliquerait l'augmentation du sexe-ratio lorsque la mère mange un aliment riche en acides gras.

iii) Apport en minéraux

De nombreuses expériences chez les rongeurs, la vache, et l'Homme montrent qu'il y a une influence de l'alimentation maternelle sur le sexe-ratio des descendants. Cette partie étant le pilier de cette thèse, elle sera développée en détails dans la Sous-Partie 3.

Ainsi, comme nous le montrent de nombreuses expériences, il existe bel et bien une relation entre l'alimentation de la mère et le sexe-ratio de sa portée.

f) Relation entre la testostérone maternelle et le sexe-ratio des portées

Plusieurs équipes ont travaillé sur la relation entre le taux de testostérone maternelle et le sexe-ratio des portées. SHARGAL et *al.* (2008) montrent que les femelles bouquetins nubien dominantes rejettent plus de testostérone dans leurs selles, et produisent plus de descendants mâles que les femelles dominées. HELLE et *al.* (2008) montrent que les femelles campagnol des champs qui ont une glycémie et une testostéronémie plus élevées quelques jours avant la conception produisent significativement plus de descendants mâles que femelles.

Deux autres équipes (GRANT et IRWIN, 2005, GRANT et *al.*, 2008) ont mené des travaux similaires en s'intéressant au taux de testostérone dans le liquide folliculaire de vaches. D'après elles, il y aurait une corrélation entre le taux de testostérone dans le liquide folliculaire, avant conception, et le sexe-ratio des portées de mammifères. Un taux élevé de testostérone serait corrélé avec des portées majoritairement mâles. Les auteurs évoquent la possibilité que l'ovocyte soit en fait expulsé de l'ovaire déjà adapté à recevoir un spermatozoïde X ou Y. La testostérone aurait alors une influence sur l'ovocyte avant son expulsion, de telle sorte qu'une fois expulsé, ce dernier ne puisse être fécondé que par un spermatozoïde Y. Ils émettent l'hypothèse que la période critique pourrait se trouver au moment de la formation de la zone pellucide, dont la composition pourrait être influencée par le taux de testostérone folliculaire.

Le taux de testostérone folliculaire étant variable avec la maturité du follicule, GRANT et *al.* (2008) ont vérifié que les résultats trouvés n'étaient pas juste dépendants du niveau de développement folliculaire. Pour cela, ils ont étudié les rapports œstrogène/testostérone du liquide folliculaire, ce rapport reflétant le développement du follicule. En comparant des follicules au même stade de développement, ils ont confirmé leurs résultats, à savoir qu'un taux de testostérone folliculaire élevé donnait un ovule préférentiellement fécondé par un spermatozoïde Y.

Le lien avec la théorie de TRIVERS et WILLARD (1973) serait qu'une testostéronémie maternelle élevée est souvent retrouvée chez les femelles dominantes. Ces femelles donneraient naissance à une progéniture présentant elle aussi une testostéronémie élevée, donc à des mâles dominants qui se reproduiront à l'âge adulte. Ce qui n'est pas en faveur de cette théorie est qu'en situation de stress, la testostéronémie des femelles augmente également (CHRISTIANSEN, 1998) ; ces femelles donneraient théoriquement naissances à plus de mâles, modulant ainsi la théorie de TRIVERS et WILLARD (1973). Ainsi la théorie de TRIVERS et WILLARD ne serait valable que dans les situations où l'animal est bien dans son environnement.

4) Résumé

Le sexe-ratio est une notion qui permet de quantifier la proportion d'êtres masculins dans une population donnée. Alors qu'on s'attendrait à ce qu'il soit de 50%, on se rend compte qu'il varie en fonction des espèces, des pays, d'une population donnée, et est dépendant de nombreux autres facteurs qui s'entrecroisent comme, entre-autres, l'âge de la mère, le pH vaginal au moment de la conception, l'environnement, *et cætera*, et de façon plus claire par l'alimentation maternelle. Maîtriser ces facteurs, c'est augmenter ses chances de faire naître un descendant du sexe voulu, ou bien de faire naître un maximum d'individus du sexe recherché dans une portée.

De nombreuses études mettent en avant un lien entre l'alimentation et le sexe-ratio des portées chez le rongeur, la vache, et l'Homme, mais aucune ne s'intéresse au chien, alors qu'il y aurait un véritable débouché pour une telle découverte. Parmi les pistes à suivre, il nous semble intéressant de suivre celle de l'influence des minéraux sur le sexe-ratio des portées car il peut être simple d'enrichir ou d'appauvrir une ration alimentaire en certains minéraux. C'est ce à quoi nous allons nous intéresser dans la sous-partie suivante.

SOUS-PARTIE 2 : ALIMENTATION MINERALE DE LA MERE ET SEXE-RATIO DE SA PORTEE

1) Premiers pas

Les premiers travaux sur le déterminisme ionique dans la formation du sexe dateraient de 1935-1936 avec HERBST (cités par ROUX, 1983) qui parvient à faire varier le sexe-ratio de colonies de larves du ver marin *Bonellia viridis* en modifiant la concentration en ions potassium dans l'eau de mer des bassins dans lesquels vivent les larves. Dans une seconde expérience, il remarque également qu'il obtient plus de femelles en augmentant la concentration en ions magnésium dans l'eau, et qu'au contraire, il obtient plus de mâles en la diminuant.

D'autres auteurs, comme HARTMANN et LEWINSKI (1938) ou TZONIS (1938), cités par ROUX (1983), parvinrent à des résultats similaires en travaillant sur *Ophryotroca puerilis* et *Dinophilus apatris*.

En 1958, STOLKOWSKI et BELLEC (1960) montrent qu'une variation du rapport $\frac{K^+}{Ca^{2+}}$ dans le milieu où sont élevés des têtards de *Discoglossus pictus* (OTTH) 48h après fécondation entraîne une variation dans le sexe-ratio du lot de têtards (Tableau 8).

	Rapport $\frac{K^+}{Ca^{2+}}$	Sexe-ratio
Solution hyperpotassique	$\frac{K^+}{Ca^{2+}} > 0,48$	Jusqu'à 68 % de mâles
Solution équilibrée	$\frac{K^+}{Ca^{2+}} = 0,48$	50 %
Solution hypercalcique	$0,12 < \frac{K^+}{Ca^{2+}} < 0,48$	Jusqu'à 67 % de femelles
	$0,03 < \frac{K^+}{Ca^{2+}} < 0,13$	Jusqu'à 69 % de mâles

Tableau 8 : Sexe-ratio des populations de têtards en fonction du rapport $\frac{K^+}{Ca^{2+}}$ présent dans leur milieu de vie (d'après STOLKOWSKI et BELLEC, 1960, cités par DAUDIN, 1982).

Ainsi une augmentation du rapport $\frac{K^+}{Ca^{2+}}$ (milieu hyperpotassique) augmente la proportion de mâles, une diminution de ce rapport (milieu hypercalcique) favorise les femelles. La zone de valeur du rapport $0,03 < \frac{K^+}{Ca^{2+}} < 0,13$ est expliquée par l'auteur par le fait

que la concentration en potassium des cellules passe par un maximum pour certaines valeurs du rapport $\frac{K^+}{Ca^{2+}}$.

A noter que les auteurs travaillent bien ici sur un rapport entre deux ions et non sur des concentrations propres de chaque élément. Par ailleurs, les résultats obtenus ne sont pas dus à la mortalité préférentielle d'un sexe ou de l'autre dans un milieu donné mais bien à la formation préférentielle d'un sexe dans un milieu donné, puisque les auteurs indiquent une mortalité aux alentours de 5-6% quel que soit le milieu de vie imposé.

2) Expériences chez les mammifères

Voici les principales expériences réalisées chez les mammifères concernant la modification du sexe-ratio des portées via l'alimentation minérale de la mère. Les hypothèses avancées par les auteurs permettant d'expliquer cette influence des ions sur le sexe-ratio seront développées dans le paragraphe suivant.

a) Chez les rongeurs

En 2003, CELIK et *al.* montrent chez la souris qu'un régime alimentaire riche en potassium favorise la naissance de portées majoritairement mâles (sexe-ratio de 51,5%), alors qu'un régime en calcium favorisent la naissance de femelles (sexe-ratio de 26,1%).

En 2007, ROCHE et LEE montrent, chez la souris, qu'avec une alimentation enrichie ou appauvrie en certains ions (Tableau 9), on parvient à faire varier le pH sanguin systémique. L'aliment de base (régime à base de blé, maïs et soja, mélangé à un mix de compléments minéraux nommé F8505 AIN-76A ; Bio-Serv, French Town, NJ, USA) est mélangé à 32 grammes par kilogramme de matière sèche de $NaHCO_3$ et à 14 grammes par kilogramme de matière sèche de $CaCO_3$ pour que les deux régimes soient isocalcémiques pour le régime 1, et à 21 grammes par kilogramme de matière sèche de $CaCl_2$ pour le régime 2. Mais ces variations du pH sanguin n'ont pas abouti à des sexe-ratios significativement différents (Tableau 10). Les auteurs notent cependant que la variation de pH sanguin des souris n'a en rien affecté leur fécondité, ni leur prolificité.

g/100g de matière sèche	K	Na	Cl	S	Mg	Ca	P
Régime 1	0,40	1,00	0,1	0,24	0,06	0,99	0,52
Régime 2	0,46	0,16	1,4	0,24	0,06	1,23	0,60

Tableau 9 : Composition des deux différents régimes testés chez la souris (d'après ROCHE et LEE, 2007).

	Témoin	Régime 1	Régime 2
pH sanguin	7,40	7,43	7,38
Sexe-ratio	49,7%	49,0%	51,3%

Tableau 10 : pH sanguin et sexe-ratio obtenus en fonction des régimes maternels (d'après ROCHE et LEE, 2007).

En 2007, VAHIDI et SHEIKHHA montrent qu'en fonction de la composition minérale de l'alimentation de rattes Wistar, ces dernières ont des portées au sexe-ratio biaisé. Les rations alimentaires sont enrichies au moyen d'une complémentation de l'eau de boisson, à 1% de sodium et de potassium ou 1% de calcium et magnésium. Le groupe dont la ration est enrichie en calcium (Ca) et magnésium (Mg) donne naissance à une majorité de femelles, contrairement au groupe dont la ration est enrichie en sodium (Na) et potassium (K) (**Tableau 11**). Si les différences ne sont pas significatives avec le groupe témoin qui recevait une alimentation non enrichie, elle l'est entre les groupes CaMg et NaK ($p\text{-value} = 0,007 < 0,05$) (**Tableau 12**). Les auteurs concluent donc que chez le rat, en fonction de la quantité d'ions présents dans une ration alimentaire 15 jours avant fécondation, on peut agir sur le sexe-ratio des portées à venir.

Régime	<i>Nbre de rattes gestantes</i> <i>Nbre de rattes mises à la reproduction</i>	Nombre total de petits	Sexe-ratio
NaK	$\frac{23}{24}$	164	55,5%
CaMg	$\frac{24}{24}$	163	40,5%
Témoin	$\frac{24}{24}$	147	49%

Tableau 11 : Sexe-ratio des portées de rats en fonction du régime alimentaire de la mère (d'après VAHIDI, 2007).

Comparaison	p-value	
NaK/témoin	0,25	Non significatif
CaMg/témoin	0,133	Non significatif
NaK/CaMg	0,007	Significatif

Tableau 12 : p-values associées à la comparaison des résultats (d'après VAHIDI, 2007).

En 2016, OUN et *al.* obtiennent des résultats équivalents sur le rat Sprague-Dawley avec un protocole de complémentation similaire (Tableau 13) :

Régime	<i>Nbre de rattes gestantes</i>	Nombre total de petits	Sexe-ratio
	<i>Nbre de rattes mises à la reproduction</i>		
NaK	20	169	56,8%
	20		
CaMg	20	176	39,2%
	20		
Témoin	20	182	40,54%
	20		

Tableau 13 : Sexe-ratio des portées de rats en fonction du régime alimentaire de la mère (d'après OUN et *al.*, 2016).

Ces résultats viennent moduler, voire contredire, ceux trouvés par BIRD et CONTRERAS (1986), selon lesquels plus le régime des rattes est riche en NaCl, plus le sexe-ratio diminue, et ceux trouvés par CLUZAN (1965), selon lequel des rats Wistar qui consomment pendant plusieurs mois une boisson de métabisulfite de potassium engendrent plus de femelles.

Malgré l'absence de consensus, il semblerait qu'un régime enrichi en sodium-potassium favorise la naissance de mâles, contrairement à un régime enrichi en calcium-magnésium, qui favorise la naissance de femelles, chez les rongeurs.

b) Chez la vache

D'après DAUDIN (1982) citant les résultats d'une étude rétrospective ayant eu lieu de 1965 à 1967 (STOLKOWSKI, 1967), il est possible de dégager deux grands axes chez la vache (Tableau 14) :

- Une alimentation riche en calcium favorise la naissance de femelles.
- Une alimentation riche en potassium favorise la naissance de mâles.

Cette étude repose sur une analyse rétrospective de la nature des sols, de leur pH et de l'alimentation donnée aux vaches et non sur une supplémentation minérale des vaches.

DOMINANTE MINERALE		Nombres de fermes	Sexe-ratio
Nature	Importance		
Calcique	+++	5	40,6%
	++	22	46,5%
	+	14	47,8%
Neutre	0	27	50,6%
Potassique	+	32	51,9%
	++	31	55,7%
	+++	3	58,3%

Tableau 14 : Sexe-ratio des portées de veaux en fonction de la dominante minérale contenue dans l'alimentation des mères (résultats rassemblés par DAUDIN, 1982).

En 1977, STOLKOWSKI et LEFEVRE cherchent à favoriser la production de veaux femelles par injections simultanées de vitamine D₃ (ou cholécaciférol, hormone qui induit une élévation de la calcémie), de calcium et de magnésium, moins de 21 jours avant insémination. Leurs résultats sont rassemblés dans le tableau suivant (**Tableau 15**) :

Ferme n°	Sexe-ratio chez les témoins	Sexe-ratio chez les traitées
1	54%	38%
2	56%	29%

Tableau 15 : Sexe-ratio des portées en fonction du traitement (injections de vitamine D₃, calcium et magnésium) reçu ou non par la mère (STOLKOWSKI et LEFEVRE, 1977).

Les résultats étant encourageants, les auteurs ont voulu renouveler l'expérience à plus grande échelle, en injectant uniquement des vitamines, car les injections isolées de magnésium et de calcium n'entraînèrent aucune modification sur le sexe-ratio dans une expérience non publiée. L'injection intramusculaire était composée de 10⁶ U.I. de vitamine A, 5*10⁶ U.I. de vitamine D, 50mg de vitamine E et d'un excipient émulsionnable et était réalisée dans les 21 jours avant insémination. Les résultats sont les suivants (**Tableau 16**) :

Sexe-ratio chez les traitées	Sexe-ratio témoin (moyenne sur 3 ans)
36%	55%

Tableau 16 : Sexe-ratio des portées en fonction du traitement reçu (injection de vitamines) ou non par la mère (STOLKOWSKI et LEFEVRE, 1977).

La p-value étant inférieure à 0,01, les auteurs ont conclu que le traitement à base d'une injection de vitamines était efficace pour augmenter le nombre de naissances de femelles.

De là, STOLKOWSKI et LEFEVRE (1977) donnent des conseils en fonction du sexe recherché en exploitation bovine (**Tableau 17**) :

Pour avoir plus de mâles	Animaux dans les prés ou stabulation libre	Sols riches en K ⁺	Laisser les animaux paître dans le mois qui précède la fécondation, ajouter des « blocs à lécher », éviter tout apport d'alcalino-terreux.
		Sols pauvres en K ⁺ ou riches en alcalino-terreux	Isoler les animaux dans un enclos fumé à la potasse, au fumier ou au purin, le mois qui précède la fécondation, ajouter des « blocs à lécher ».
	Animaux en stabulation	Exclure le mois avant la fécondation les compléments du commerce (riches en alcalino-terreux et diverses vitamines). Aliment recommandé : foin récoltés sur champs riches en K ⁺ , soja, betteraves, mélasse, ajouter des « blocs à lécher ». Adjonction éventuelle de KCL ou KH ₂ PO ₄ .	
Pour avoir plus de femelles	Animaux dans les prés ou stabulation libre	Sols riches en K ⁺	Retirer les animaux de ces champs et les mettre sur des terrains équilibrés, ou riches en alcalino-terreux, ou compenser par une fumure calcique.
		Sols pauvres en K ⁺ ou riches en alcalino-terreux	Exclure les « blocs à lécher ».
	Animaux en stabulation	Traitement pas injections de vitamines précédemment décrit possible. Choix d'un aliment qui n'atténue pas les effets de la vitamine D (pas de bicarbonate de sodium, ajout de MgO, exclure les concentrés du commerce).	

Tableau 17 : Conseils donnés en fonction du sexe recherché chez les veaux (STOLKOWSKI et LEFEVRE, 1977).

Il semblerait donc qu'on puisse tirer des conclusions similaires pour la vache et pour les rongeurs : c'est le calcium qui semble favoriser la naissance de femelles et le potassium la naissance de mâles.

c) Chez la truie

En 1982, LOUGNON et PICARD ont cherché à modifier le sexe-ratio des portées de truies en modifiant la composition minérale de leur aliment. Cependant, aucun résultat significatif n'est ressorti de leur étude.

La même année, BOLET et *al.* publient leurs résultats sur des expériences similaires à celles de LOUGNON et PICARD, mais déséquilibrant davantage les rations alimentaires des truies en minéraux. Ils conçoivent deux aliments : un riche en NaK, et l'autre riche en CaMg (Tableau 18) :

	Aliment riche en NaK	Aliment riche en CaMg
Première expérience (1980)	$\frac{Na+K}{Ca+Mg}=2,1$	$\frac{Na+K}{Ca+Mg}=0,7$
Deuxième expérience (1982)	$\frac{Na+K}{Ca+Mg}=3,9$	$\frac{Na+K}{Ca+Mg}=0,5$ +2000UI/kg de VitD ₃

Tableau 18 : Composition des régimes alimentaires testés par BOLET et *al.*, 1982.

Les auteurs ne précisent pas la composition d'un aliment « de base », c'est-à-dire non-enrichi en minéraux

Les truies commencent leur nouveau régime 3 mois avant le premier accouplement, et le régime est maintenu jusqu'à confirmation de la gestation. Voici les résultats qu'ils obtiennent (Tableau 19) :

	Sexe-ratio du régime riche en NaK	Sexe-ratio du régime riche en CaMg	p-value
Première expérience (1980)	55,7%	48,3%	0,05<p<0,1 Non significatif
Deuxième expérience (1982)	50%	53,5%	p>>0,05 Non significatif

Tableau 19 : Sexe-ratio des portées de porcelets en fonction des régimes alimentaires maternels (d'après BOLET et *al.*, 1982).

BOLET et ses collaborateurs n'ont donc pas réussi à établir une relation entre la complémentation minérale de la truie et le sexe-ratio de ses portées.

Il semblerait donc qu'à l'heure actuelle, personne n'a réussi à mettre en évidence un lien entre l'alimentation minérale des truies et le sexe-ratio de ses portées.

d) Chez l'Homme

En 2008, MATHEWS et *al.* analysent la composition alimentaire avant conception de femmes attendant un garçon et se rendent compte que leur régime est riche en sodium et en potassium. Mais ils ne concluent rien car contrairement à ce qu'ils attendaient, le régime des femmes attendant un garçon est également plus riche en calcium que celui des femmes attendant une fille.

En 2010, NOORLANDER et *al.* cherchent à aider des couples à concevoir une petite fille en combinant un régime alimentaire riche en calcium et pauvre en sodium (commencé au moins neuf semaines avant la fécondation) avec un rapport sexuel loin du moment de l'ovulation. Sur les 32 femmes (sur les 150 initiales) qui ont à la fois respecté strictement le régime alimentaire imposé, consistant à diminuer la natrémie et la kaliémie et à augmenter la calcémie et la magnésémie sanguines, et la date du rapport sexuel, 81% ont bel et bien donné naissance à une petite fille. L'équipe avance même que le régime alimentaire de la femme est plus important que la date du rapport fécondant, puisque 73% des femmes n'ayant suivi que le régime alimentaire imposé, sans se soucier de la date du rapport sexuel, ont donné naissance à une fille.

En 2016, EDESSY et *al.* mettent eux-aussi en avant le lien entre l'alimentation de la mère et le sexe de son enfant. Pour se faire, ils demandent à 200 femmes de suivre un régime alimentaire dépendant du sexe de l'enfant désiré : 100 femmes adoptent un régime riche en sodium et en potassium afin d'avoir un fils, et 100 femmes adoptent un régime riche en calcium et en magnésium afin d'avoir une fille. Les régimes sont détaillés dans l'Annexe 3 et un ionogramme était réalisé afin de vérifier la bonne observance de ces régimes. Les résultats de cette étude sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 20) :

	Régime « garçon » (Na & K)	Régime « fille » (Ca & Mg)	p-value
Avortement	8	12	0,04
Naissance d'un garçon	76	16	0,01
Naissance d'une fille	16	72	0,01

Tableau 20 : Sexe des bébés en fonction des régimes suivis par leur mère (d'après EDESSY et *al.*, 2016).

Ainsi, EDESSY et *al.* montrent que le régime alimentaire est susceptible d'influencer le sexe du futur enfant : un régime riche en potassium et sodium permet à 76% d'avoir un garçon, et un régime riche en calcium et en magnésium permet à 72% d'avoir une fille (résultats compatibles avec ceux de NOORLANDER et *al.*, 2010). L'étude ne précise cependant pas les sexes des avortons et n'en tient pas compte. Elle ne précise pas non plus si les pourcentages d'avortement sont ceux retrouvés dans une population qui ne suit pas de régime particulier.

Ces expériences nous montrent là un lien fort entre l'alimentation minérale de la mère et le sexe de son futur enfant. Quels seraient les mécanismes impliqués dans ce phénomène ? Bien qu'aucun ne soit certain pour l'instant, nous proposons d'évoquer quelques pistes de raisonnement dans le paragraphe suivant.

3) Par quels mécanismes l'apport minéral modifierait-il le sexe-ratio ?

NOORLANDER et *al.* (2000) émettent l'hypothèse que l'alimentation de la mère conditionne la concentration sanguine en ions et/ou en hormones, qui eux interagissent sur l'ovocyte ou sur le mucus cervical.

En 2016, EDESSY et *al.* émettent l'hypothèse qu'un régime riche en certains ions pourraient modifier les récepteurs à la surface de l'ovocyte, ce qui favoriserait l'attraction d'un type de spermatozoïde : un régime riche en potassium et en sodium et pauvre en calcium et magnésium entraînerait une attraction plus grande des spermatozoïdes Y pour l'ovocyte, qui auraient ainsi une plus grande probabilité de fertiliser l'ovocyte que les spermatozoïdes X. A

l'inverse, un régime riche en calcium et en potassium et pauvre en sodium et potassium entraînerait une attraction plus grande des spermatozoïde X pour l'ovocyte. Par ailleurs, les auteurs n'excluent pas une mortalité différentielle des embryons lors de la gestation, en fonction de leur sexe, théorie pouvant également expliquer leurs résultats obtenus mais ils n'ont cependant pas cherché à l'éclairer dans leur article.

Il est aussi possible d'évoquer un éventuel lien entre l'alimentation minérale de la mère et le pH vaginal puisque certaines expériences vues précédemment semblent indiquer que le pH vaginal pourrait influencer sur le sexe-ratio des portées (WAKIM, 1972). Une des théories émises par ROTSCHILD (1960), cité par VACHEZ (1978), serait que le pH vaginal induirait une migration sélective des spermatozoïdes. Les expériences tentées à l'époque furent décevantes, bien que dans le sens escompté.

En 1989, MITRA et CHOWDHURY tentent de relier alimentation et sexe-ratio des portées. Ils travaillent sur une enzyme, la glycérilphosphorylcholine diestérase (GPC diestérase), qui se trouve en forte concentration dans les sécrétions utérines de plusieurs mammifères, dont le rat. Leur étude consiste à mesurer l'activité de cette enzyme en fonction du régime alimentaire donné aux rattes. Trois « régimes » ont été testés :

- Un régime enrichi en calcium et magnésium ($\frac{NaK}{CaMg} = 1$ au lieu de 2,3 chez le groupe témoin).
- Un régime « normal » mais où les rattes ne sont nourries qu'un jour sur deux, pendant 7 jours.
- Un régime « normal » mais où les rattes ne sont nourries qu'un jour sur deux, pendant 21 jours.

Les auteurs se rendent compte que chez les femelles au régime enrichi en CaMg, comme chez les femelles jeûnant un jour sur deux :

- L'activité de la GPC diestérase est significativement plus basse que chez les rattes témoins.
- Le sexe-ratio des portées est significativement plus bas que chez les portées des rattes témoins.

- Mais que l'activité de la GPC diestérase est normale chez les rattees dont l'alimentation est restreinte pendant 21 jours.
- Et qu'il existe une corrélation significative entre le niveau d'activité de la GPC diestérase et le sexe-ratio des portées à la fois chez les groupes témoins et expérimentaux (celui supplémenté en CaMg, et les deux à l'alimentation restreinte) (Figure 4).

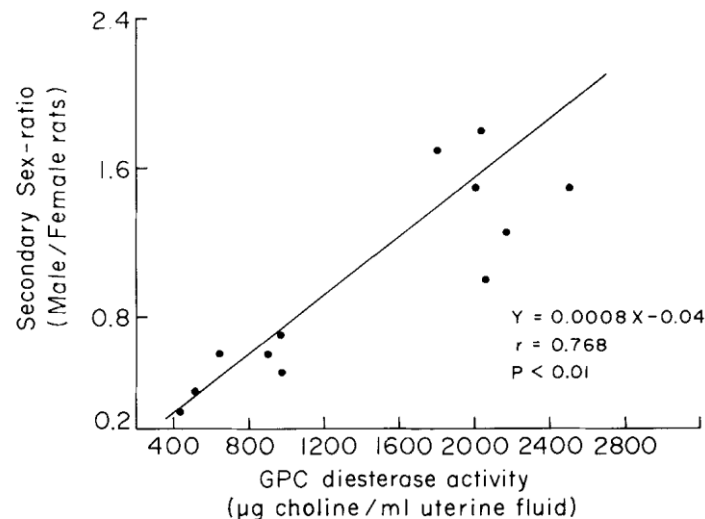


Figure 4 : Relation entre le sexe-ratio secondaire des portées et le niveau d'activité de la GPC diestérase (MITRA et CHOWDHURY, 1989).

L'absence de réduction de taille des portées dont les mères suivent un régime particulier suggèrent que le sexe-ratio n'est pas biaisé via une mortalité *in utero* sexe-dépendante, mais plutôt par une fécondation préférentielle des ovocytes par les spermatozoïdes X. De-là, les auteurs s'interrogent sur les facteurs qui influencent cette sélection préférentielle d'un type de spermatozoïde. Est-ce une modification du milieu utérin qui engendre une migration des spermatozoïdes X et Y ou est-ce une modification de l'environnement utérin qui entraîne une sélection du spermatozoïde par l'ovocyte ?

Les auteurs émettent diverses hypothèses :

- La GPC diestérase pourrait jouer un rôle dans le métabolisme du spermatozoïde puisque qu'un de ses produits (le glycérophosphate) est oxydé par le spermatozoïde, augmentant ainsi leur assimilation de dioxygène. L'enzyme est ainsi suspectée d'augmenter la mobilité des spermatozoïdes qui entrent en son contact, comme le

font l'œstrogène ou la testostérone au contact des spermatozoïdes (BECK et *al.*, 1976). Ainsi cela pourrait accroître la différence de mobilité et rapidité qu'il existe entre les spermatozoïdes Y et X (SHETTLES, 1960, BECK et *al.*, 1976). Finalement, plus l'environnement utérin serait riche en GPC diestérase, plus les spermatozoïdes Y arriveraient vite à l'ovocyte, d'où une fécondation préférentielle et un sexe-ratio supérieur à 50%.

- La GPC diestérase pourrait interagir avec les constituants à la surface de l'ovocyte et engendrer une possibilité de fécondation uniquement par un seul type de spermatozoïde.
- Les deux hypothèses pourraient également intervenir simultanément.

Bien qu'il existe des exemples indéniables de l'influence de l'apport minéral sur le sexe-ratio des portées, nous n'avons à l'heure actuelle aucune certitude sur la manière dont cela agit, nous n'avons que des hypothèses et des pistes de réflexion.

4) Résumé

Il semblerait bien que l'on puisse influencer le sexe-ratio des portées à venir en modifiant l'apport minéral apporté par l'alimentation des mères avant la conception, du moins chez certaines espèces telles que la vache, les rongeurs et l'Homme. Chez ces espèces, il se trouve qu'un régime riche en potassium et sodium favorise la conception de mâles, alors qu'un régime riche en calcium et magnésium favorise la conception de femelles.

Nous n'avons trouvé aucune expérience menée chez le chien, c'est pour cela que notre thèse s'y intéresse. Dans la partie suivante, nous allons tenter de reproduire une expérience similaire à celles faites dans les autres espèces, en faisant varier l'apport de calcium et de magnésium dans l'alimentation de chienne, mais tout d'abord nous aborderons l'alimentation de la chienne avant et au début de la gestation.

DEUXIEME PARTIE : ALIMENTATION DE LA CHIENNE
AUTOUR DE LA FECONDATION

1) Evaluation de la note d'état corporel (NEC)

Un aliment équilibré est un aliment capable de subvenir quotidiennement aux besoins nutritionnels du chien. Le maintien du poids corporel du chien résulte d'un équilibre entre les apports et les déficits énergétiques. On appelle « chien à l'entretien » un chien adulte, en bonne santé, à son poids corporel optimal et stable.

Pour déterminer le poids optimal d'un chien, on peut s'aider d'échelles établies afin de donner une note d'état corporel (NEC) ou « Body Condition Score » (BCS). Il existe différentes échelles et selon l'échelle utilisée, la note va de 1 (animal cachectique) à 5 ou 9 (animal très obèse). Ces échelles ont l'avantage d'être facilement utilisables car elles ne nécessitent qu'une observation de la silhouette du chien ainsi qu'une palpation des saillies osseuses, des côtes et des zones où la graisse a pu se déposer, permettant également de mettre en évidence une éventuellement amyotrophie. On considère que pour une note d'état corporel égale, les femelles ont plus de graisse en moyenne que les mâles (BESSON et *al.*, 2005).

Nous travaillerons ici avec l'échelle validée par LAFLAMME (1997) en 9 points, mais l'échelle en 5 points fonctionne exactement sur le même principe. Sur l'échelle en 9 points (Annexe 4), chaque point au-dessus de 5 (animal au poids optimal) représente entre 10 à 15% de poids excessif dû à de la graisse corporelle (FASCETTI et DELANEY, 2012).

L'avantage de cette notation est qu'elle permet de donner du poids aux paroles du vétérinaire et appuie ses arguments lorsque celui-ci essaie de convaincre le propriétaire du chien que ce dernier est trop maigre ou en surpoids. Cette notation permet donc au propriétaire de se rendre compte de l'état corporel de son animal, il pourra ensuite d'autant mieux apprécier l'efficacité d'un éventuel régime par exemple.

2) Evaluation des besoins nutritionnels de la chienne avant fécondation

Les besoins alimentaires de la chienne à l'entretien proviennent de diverses origines. L'objectif d'une alimentation équilibrée est de répondre à tous ces besoins alimentaires, qui varient en fonction notamment de la race du chien, de son âge et de son stade physiologique

(croissance, reproduction, animal stérilisé...), de son mode de vie ainsi que de la présence d'éventuelle(s) maladie(s).

Il existe tout d'abord des besoins d'entretien qui résultent des pertes physiologiques inévitables dues au métabolisme de base de l'animal. On estime que le métabolisme de base représente entre 55 et 70% de la dépense énergétique totale (National Research Council 2006). Il existe également des besoins de production, qui correspondent à des besoins supplémentaires qui surviennent notamment lors de la croissance du jeune chien, lors de la reproduction (gestation/lactation), ou lors du travail du chien. Les derniers besoins correspondent aux besoins de l'organisme lorsque celui-ci lutte contre le stress, comme lors d'une maladie ou lorsque le chien vit dans des conditions non favorables. Ainsi les besoins du chien vont varier en fonction de son âge et de son statut physiologique, de son environnement, de sa génétique...

Les besoins de la chienne en chaleur ne varient pas de ceux de la chienne à l'entretien, c'est pourquoi nous nous intéresserons aux besoins de la chienne à l'entretien.

a) Comment évaluer les besoins énergétiques du chien à l'entretien ?

Les besoins énergétiques du chien à l'entretien sont la quantité de calories qu'il doit consommer chaque jour pour maintenir son poids optimal. Plusieurs équations ont été proposées afin de déterminer le Besoin Énergétique d'Entretien (BEE).

La difficulté que l'on rencontre quand on veut établir une équation unique pour évaluer le besoin énergétique d'entretien est que l'on a une très grande différence de poids entre les races, et que les besoins énergétiques d'un chien de 40kg ne sont pas le double de ceux d'un chien de 20kg. Apparaît donc la notion de poids métabolique (PM) qui prend en compte le poids corporel vif (PV) et la surface corporelle du chien : $PM \text{ (en kg)} = PV^{0,75}$, (PV en kg) (BLANCHARD et PARAGON, 2008).

Ainsi on exprime le besoin énergétique d'entretien sous une équation de cette forme (voir encadré ci-dessous), où PM et PV sont exprimés en kilogrammes, et où a est un coefficient pouvant varier en fonction de paramètres explicités ci-après :

$$\text{BEE} = a \cdot \text{PM} = a \cdot \text{PV}^{0,75} \text{ (en kcal d'EM/j)}$$

Parmi les nombreuses équations proposées, aucune ne réussit parfaitement à modéliser le BEE de tous les chiens. De nombreuses études ont cherché à établir l'équation permettant de calculer le BEE de telle ou telle race. Le National Research Council dans le Nutrient Requirements of Dogs and Cats de 2006 (communément appelé NRC 2006) propose une équation qui serait valide pour un grand nombre de races, en particuliers les jeunes chiens expérimentaux vivant en chenil. Nous retiendrons ici cette équation : $\text{BEE} = 132 \cdot \text{PV}^{0,75}$ (d'après PATIL et BISBY, 2001).

De cette équation découle le tableau suivant (Tableau 21) :

Poids optimal (en kg)	BEE (en kcal d'EM/j)	Poids optimal (en kg)	BEE (en kcal d'EM/j)
1	132	45	2293
2,5	262	50	2482
5	441	55	2666
7,5	598	60	2846
10	742	65	3022
15	1006	70	3194
20	1248	75	3364
25	1476	80	3531
30	1692	85	3695
35	1899	90	3857
40	2100	100	4174

Tableau 21 : Besoin énergétique d'un chien adulte en fonction de son poids optimal.

b) Ajustement du besoin énergétique d'entretien du chien à ses besoins réels

En fonction de la race du chien, de son âge, de ses conditions de vie, de son activité physique, de son statut physiologique, et de son statut pathologique (maladie), on peut être amené à rajouter des facteurs à ces équations, afin qu'elles correspondent mieux aux besoins énergétiques de chaque chien. En effet, certaines races possèdent un métabolisme de base plus ou moins consommateur comparé à la moyenne. De même, au-delà de sept ans, le métabolisme de base du chien diminue (SPEAKMAN et *al.*, 2003). Par ailleurs, un chien castré aurait des besoins énergétiques diminués d'environ 30% (JEUSETTE et *al.*, 2004). On obtient

donc une équation de la forme ci-dessous, où k_1 serait un coefficient dépendant de la race du chien, k_2 un coefficient dépendant de son activité physique, etc (Tableau 22) :

$$BE \text{ (kcal d'EM/j)} = BEE * k_1 * k_2 * \dots$$

k_1	Races	k_2	Comportement
0,8	Races nordiques (Retriever, Terre-Neuve, Husky...)	0,7	Léthargique
0,9	Beagle, Cocker	0,8	Très calme/Sédentaire
1	Autres	0,9	Calme
1,1-1,2	Lévrier, Dogue allemand	1	Normal
		1,1	Actif
		1,2	Hyperactif

Tableau 22 : Exemple de coefficients multiplicateurs du BEE chez le chien adulte à l'entretien en bonne santé (d'après BLANCHARD et PARAGON, 2008).

c) Besoins nutritionnels du chien

Le chien doit pouvoir trouver dans son alimentation, en quantité suffisante, environ 40 nutriments essentiels. L'aliment doit répondre à l'ensemble de ses besoins en eau, énergie, protéines (il existe 20 acides aminés dont 10 sont indispensables), lipides (il existe deux acides gras essentiels, l'acide linoléique et l' α -linolénique), minéraux (calcium, phosphore, potassium, sodium, chlore, magnésium, soufre), oligo-éléments (zinc, cuivre, sélénium, fer, iode, cobalt, manganèse) et vitamines (A, groupe B, D, E, K et choline).

Pour chaque nutriment, on peut définir un apport optimal, des zones d'apport marginales, une limite inférieure (à partir de laquelle se développera une carence) et une limite supérieure (au-delà de laquelle on observera une toxicité) (Figure 5). Ces différentes zones varient en fonction de facteurs cités ci-dessus, propres au chien (âge, race, statut physiologique...), et en fonction du nutriment considéré.

Réponse de l'organisme à une dose = Effet

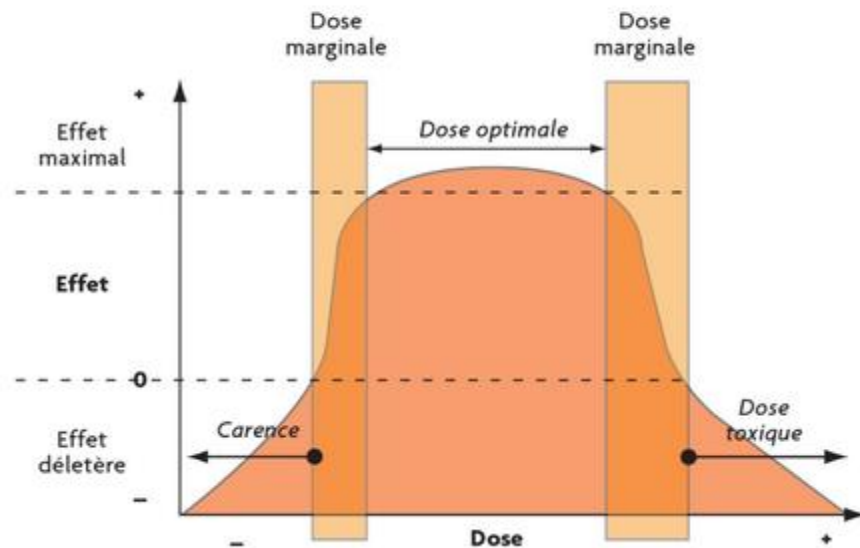


Figure 5 : Relation en alimentation (d'après BLANCHARD et PARAGON, 2008).

Des recommandations nutritionnelles sont formulées dans le National Research Council (le dernier datant de 2006), ou l'Association of American Feed Control Officials.

i) Eau

L'eau doit être laissée à disposition. Le chien doit consommer quotidiennement en moyenne 50 à 60mL/kg/jour (SCHAER, 1989), cela inclut l'eau contenue dans son alimentation.

ii) Protéines

L'apport de protéines est essentiel pour couvrir les besoins en acides aminés du chien. On peut exprimer le besoin en protéines du chien par le Ratio Protido-Calorique (RPC, exprimé en gMAT/Mcal d'EM). Ce dernier dépend avant tout du format (poids) du chien. Le Tableau 23 indique ces ratios pour un chien à l'entretien.

Format du chien	Ratio Protido-Calorique (en gMAT/Mcal EM)
Petit (<10kg)	55
Moyen (10-25kg)	60
Grand (>25kg)	65

Tableau 23 : Ratio Protido-Calorique minimal en fonction du poids du chien (d'après BLANCHARD et PARAGON, 2008).

De là nous pouvons calculer la quantité de protéines nécessaire par jour pour un chien :

$$\text{RPC souhaité} = \frac{\text{RPC minimal} \times \text{BEE}}{\text{BE}}$$

où BEE représente le besoin énergétique d'entretien, et BE le besoin énergétique réel, soit

$\text{BE} = k_1 \times k_2 \times \dots \times \text{BEE}$ en Mcal. d'où :

$$\text{RPC souhaité} = \frac{\text{RPC minimal}}{k_1 \times k_2 \times \dots}$$

Les sources de protéines sont diverses (**Tableau 24**) mais ce qui importe c'est le niveau d'apport protéique, la composition en acides aminés et surtout en acides aminés essentiels, ainsi que la température et le temps de cuisson., car ces deux derniers paramètres modifient la digestibilité et la valeur biologique.

Origine animale	Origine végétale	Autres
• Volailles • Boeuf • Porc • Poisson • Oeuf • Caséine du lait	• Gluten de maïs • Protéines de soja • Levure de bière	• Acides aminés

Tableau 24 : Exemples de sources de protéines (d'après NRC 2006).

Le besoin protéique est accru pendant la gestation et la lactation mais reste inférieur à 10 gMAT/Mcal d'EM.

iii) Fibres alimentaires

La présence de fibres alimentaires en quantité suffisante dans l'alimentation du chien assure un bon transit digestif. On recommande un apport d'au moins 5% de la matière sèche dans la ration du chien à l'entretien.

iv) Lipides

Les lipides sont bien valorisés par les carnivores et permettent d'augmenter la densité énergétique de la ration sans augmenter la quantité d'aliment à donner à l'animal. Ainsi les lipides doivent représenter environ 10 à 18%MS de la ration du chien à l'entretien (Tableau 25).

Origine animale	Origine végétale
• Suif • Saindoux • Graisse de volaille • Huile de poisson	• Huile de soja • Huile de coprah • Huile de bourrache

Tableau 25 : Exemples de sources de lipides (d'après NRC 2006).

La ration alimentaire doit également couvrir les besoins du chien en acides gras essentiels (oméga 6 : acide linoléique, oméga 3 : acide alphalinolénique, acide docosahéxaéonique (DHA) et acide eicosapentaénoïque (EPA)), souvent absent des aliments bas de gamme. Le NRC 2006 conseille un apport de 1,3g de lipides totaux par kilogramme de poids métabolique pour le chien à l'entretien, soit 1.3g/kgPM/jour, avec un apport de 0,3g/kgPM en acide linoléique, 0,012g/kgPM en acide alpha-linolénique et 0,03g/kgPM en DHA et EPA.

v) Glucides assimilables

Le reste de l'énergie apportée par la ration alimentaire est souvent d'origine glucidique (amidon principalement), car les glucides ont un faible coût. Cependant l'amidon est non indispensable pour les carnivores, il n'y a donc pas de recommandation d'apport.

Les sources de glucides sont là encore très variées : blé, maïs, farine de maïs, riz...

vi) Calcium et phosphore

La ration du chien adulte doit contenir 1gCa/Mcal d'EM et 0,75gP/Mcal d'EM, avec un $\frac{Ca}{P}$ compris entre 1 et 2 (NRC 2006). On peut également exprimer les besoins en calcium et phosphore en g/kgPM (Tableau 26) :

Statut physiologique	Calcium (g/kgPM/j)	Phosphore (g/kgPM/j)	$\frac{Ca}{P}$
Entretien	0,13	0,10	1,3

Tableau 26 : Besoin calcique et phosphorique du chien adulte à l'entretien (d'après NRC 2006).

Il n'y a pas de dose maximale pour le calcium dans le cas du chien adulte. Le NRC 2006 indique qu'il ne faut pas dépasser 4,5g/Mcal d'EM, soit 1,25gCa/kgPM/j pour les chiots de races géantes en croissance. La dose maximale du chien adulte est raisonnablement considérée comme étant supérieure à celle du chiot en croissance.

Il n'existe pas de dose maximale à ne pas dépasser pour le phosphore, les données étant insuffisantes pour conclure (NRC 2006).

vii) Oligo-éléments et vitamines

Les carences en oligo-éléments sont souvent légères. Le tableau suivant rassemble les recommandations actuelles d'apports journaliers en oligo-éléments et vitamines et les doses maximales à ne pas dépasser pour un chien adulte à l'entretien (Tableau 27) :

	Recommandations	Dose maximale
Potassium	1g/Mcal d'EM	Pas de données
Sodium	0,2g/Mcal d'EM	15g/kgMS
Magnésium	0,15g/Mcal d'EM	Pas de données
Cuivre	1,5mg/Mcal d'EM	Pas de données
Zinc	15mg/Mcal d'EM	Pas de données
Sélénium	87,5µg/Mcal d'EM	2mg/kg d'aliment (réglementaire)
Fer	7,5mg/Mcal d'EM	Pas de données
Iode	220µg/Mcal d'EM	Pas de données
Vitamine A	133 UI/kgPM/j	64 000µg/kg d'aliment
Vitamine B1	20µg/kgPM	Pas de toxicité rapportée <i>per os</i>

Vitamine B2	50-100µg/kgPM/j	Pas de données
Vitamine B3 ou PP	3,4mg/Mcal d'EM ou 200µg/kgPM/j	Pas de données
Vitamine B5	3mg/Mcal d'EM ou 0,39mg/kgPM/j	Considéré non toxique
Vitamine B6	39µg/kgPM/j ou 1,2mg/kg d'aliment	1 000mg/kg d'aliment si < 60 jours 500mg/kg d'aliment si > 60 jours
Vitamine B8	2µg/kgPM/j	Pas de toxicité rapportée
Vitamine B9	54µg/Mcal d'EM ou 7µg/kgPM/j	Pas de toxicité rapportée Au moins 1 000 fois supérieure à la dose recommandée
Vitamine B12	7µg/Mcal d'EM ou 0,92µg/kgPM/j	Pas de toxicité rapportée <i>per os</i>
Vitamine D ₃	2,75µg/Mcal d'EM ou 0,36µg/kgPM/j	1,44 – 3,6 µg/kgPM/j pendant plus de 60 jours
Vitamine E	22 UI/kg d'aliment	1 000-2 000 UI/kg d'aliment
Vitamine K	Sous forme de ménadione, 22µg/kgPM/j	>22mg/kgPM/j

Tableau 27 : Recommandation d'apports journaliers en oligo-éléments en vitamines du chien adulte à l'entretien (d'après NRC 2006).

La vitamine D₃ participe à la régulation de la calcémie, elle est hypercalcémiante. En cas d'hypervitaminose D₃, des calcifications des tissus mous et une minéralisation excessive des os peuvent avoir lieu. Elle est surtout toxique en cas de surdosage pendant une longue période (supérieure à 60 jours). Le NRC 2006 estime que la dose maximale en vitamine D₃ contenue dans une alimentation donnée pendant une longue période correspond à 4 à 10 fois les recommandations journalières, soit entre 1,44µg/kgPM/j et 3,6µg/kgPM/j.

3) Evolution des besoins alimentaires de la chienne gestante

Il n'existe pas de recommandations nutritionnelles pour les chiennes pendant leurs chaleurs. Il est conseillé de maintenir les chiennes reproductrices à une note d'état corporel comprise entre 4 et 5/9. Les besoins de la chienne gestantes sont en revanche bien décrits dans le NRC 2006.

a) Risque d'une mauvaise alimentation chez la chienne gestante

L'alimentation de la chienne gestante peut induire des altérations au niveau hormonal, inflammatoire (cytokines) et sur le placenta qui joue un rôle dans l'implantation et la différenciation embryonnaire, la croissance et le développement fœtal ainsi que la parturition (KIRK, 2001). Ainsi, une sous-alimentation, une alimentation carencée en certains nutriments, ou une suralimentation peuvent influencer de manière néfaste sur toutes les étapes de la gestation (DEBRAEKELEER et *al.*, 2010).

Pendant sa gestation, les besoins de la chienne vont progressivement augmenter afin de répondre à ses besoins d'entretien auxquels s'ajoutent ceux des fœtus en développement. Si la chienne reçoit une alimentation insuffisante pour couvrir les besoins cités, elle « sacrifiera » ses besoins d'entretien en faveur de ceux pour le développement des fœtus. Ainsi, les nutriments nécessaires à la croissance et au développement seront d'abord puisés dans le tissu graisseux, les muscles et le tissu osseux de la chienne. Si cela ne suffit toujours pas, la demande nutritionnelle sera réduite en diminuant le nombre de fœtus, voire en avortant (BOUILLLOD, 2013).

Diverses affections peuvent être la conséquence d'une mauvaise alimentation de la mère pendant la gestation, comme l'hypocalcémie ou l'hypoglycémie périnatale. De même, l'obésité en fin de gestation constitue un risque vis-à-vis des mises-bas dystociques, des mises-bas prolongées et prédispose les chiots à l'hypoglycémie et à l'hypoxie (DEBRAEKELEER et *al.*, 2010, BOUILLLOD, 2013).

b) Evolution des besoins alimentaires pendant le début de la gestation

Les besoins énergétiques de la chienne gestante n'augmentent qu'à partir du dernier tiers de sa gestation. Ses besoins énergétiques durant les cinq premières semaines de gestation sont donc les mêmes qu'à l'entretien. Il convient de faire attention à ce que la chienne maintienne son poids et sa condition corporelle durant ces semaines. Les besoins énergétiques commencent à augmenter au cours de la cinquième semaine pour atteindre un pic entre la 6^{ème} et la 8^{ème} semaine de gestation. (DEBRAEKELEER et *al.*, 2010). A ce pic, les besoins énergétiques supplémentaires correspondent à 30 à 60% des besoins énergétiques d'entretien de la chienne.

Notre thèse porte sur la sélection préconceptionnelle du sexe des chiots. Ainsi, nous ne développerons pas davantage la nutrition de la chienne gestante.

4) Résumé

Ainsi, les besoins journaliers de la chienne restent les mêmes chez la chienne en chaleurs ou en début de gestation. Maintenant que nous connaissons ces besoins et surtout les limites supérieures à ne pas dépasser, nous pouvons envisager de modifier l'apport minéral alimentaire de chiennes afin de voir s'il existe une relation entre ces apports et le sexe-ratio de leurs portées.

TROISIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE :
SUPPLEMENTATION CALCIQUE ET VARIATON DU PH
VAGINAL

Au vu de la demande des éleveurs canins dans la production de chiots femelles, il semble intéressant de chercher un moyen d'influencer le sexe-ratio des portées de chiots. Les éleveurs ne seront intéressés par les avancées scientifiques que si celles-ci sont simples à mettre en place, peu onéreuses et sans risque pour leurs chiennes. Après avoir vu que l'Homme pouvait influencer le sexe-ratio des portées en jouant sur l'alimentation de la mère dans diverses espèces, nous nous sommes demandé s'il en était de même avec le chien. Nous avons donc voulu modifier l'alimentation des chiennes avant fécondation, afin de tenter d'augmenter le nombre de chiots femelles dans les portées, c'est-à-dire a priori en augmentant la consommation en calcium des chiennes plusieurs semaines avant fécondation.

Ainsi, nous avons décidé de nous concentrer sur un paramètre que la complémentation minérale pourrait changer, à savoir le pH vaginal. Notre hypothèse de travail est qu'une complémentation minérale pourrait changer le pH vaginal de la chienne lors de la période fécondante, expliquant une fécondation préférentielle des ovocytes par un type de spermatozoïde. Ainsi, nous avons essayé de modifier le pH vaginal des chiennes en les supplémentant en calcium, magnésium, et vitamine D₃, par rapport au pH vaginal de chiennes non supplémentées.

1) Matériel et méthode

a) Animaux

Sept chiennes de race Beagle, nées entre 2010 et 2014, appartenant au service de Biotechnologie et Pathologie de la Reproduction d'ONIRIS ont participé à notre essai et ont été aléatoirement réparties dans deux groupes. Elles pèsent toutes entre 10 et 13,6kg. Chaque chienne s'est vue attribuer un numéro de 1 à 7. Les chiennes sont logées en chenil, dans des boxes individuels, et sont nourries une fois par jour, le matin, avec des croquettes Royal Canin Vet Care Adult Medium Dog (composition en Annexe 5). Elles sont vaccinées annuellement avec les valences maladie de Carré, hépatite de Rubarth, parvovirose, para-influenza, et leptospirose. Elles sont vermifugées deux fois par an avec du MILBEMAX Chien NDV (milbémycine-oxyme, praziquantel). Un traitement contre les parasites externes est fait irrégulièrement.

Les cycles sexuels des chiennes sont suivis depuis leur puberté au moyen de frottis vaginaux, réalisés toutes les semaines en période scolaire, on sait donc qu'elles présentent environ deux cycles sexuels par an.

b) Complémentation alimentaire

L'expérience a eu lieu en deux phases : chacune des sept chiennes a servi dans les deux phases afin que chaque chienne soit son propre témoin : si lors de la première expérience, une chienne n'est pas complémentée, lors de la seconde, cette même chienne sera complémentée en minéraux et vitamines, et vice-versa. La complémentation est donnée aux chiennes en même temps que leur ration de croquettes. Tous les matins et ce pendant au moins trois semaines idéalement avant les inséminations théoriques, les chiennes reçoivent deux comprimés de PET-PHOS Croissance Grand Chien Ca/P=2 NDV (Laboratoire Ceva, composition en Annexe 6). La complémentation est arrêtée à la fin du cinquième jour après la seconde insémination artificielle théorique (terme défini ci-après), puisque les spermatozoïdes survivent en moyenne jusqu'à cinq jours après insémination (PERLOFF et *al.*, 1964, DOAK et *al.*, 1967).

Les chiennes ont été nourries en calculant l'allocation énergétique selon l'équation proposée par le NRC en 1974 : $BEE=132*PV^{0,75}$ (Tableau 28). Nous n'avons pas tenu compte du coefficient $k_1=0,9$ que l'on attribue souvent aux chiens Beagle (d'après BLANCHARD et PARAGON, 2008), car ce sont des chiennes vivant en chenil extérieur, et il leur faut de l'énergie supplémentaire en hiver pour résister au froid.

Poids de la chienne (en kg)	Besoin à l'entretien = $132*(PV)^{0,75}$ (en kcal d'EM)	Ration de croquettes correspondant aux besoins d'entretien (en g)
10	742,29	189,80
11	797,29	203,86
12	851,06	217,61
13	903,71	231,07

Tableau 28 : Calcul de la ration de croquettes (Royal Canin Vet Care Adult Medium Dog) en fonction du poids des chiennes.

Par souci de simplicité, nous avons choisi de nourrir toutes les chiennes avec une portion de 210g de croquettes. Cette ration correspond également à ce que les chiennes consommaient quotidiennement avant le début de notre expérience. Ainsi après avoir établi la ration journalière des chiennes, nous avons pu calculer les apports minéraux et vitaminiques que recevront les chiennes par leur alimentation (Tableau 29).

	Apport par ration journalière		Apport par ration journalière
Calcium (g)	2,31	Acide folique (mg)	1,89
Cuivre (mg)	2,94	Vitamine A (UI)	6090
Iode (mg)	1,13	Vitamine B1 (mg)	0,88
Fer (mg)	42	Vitamine B2 (mg)	0,80
Manganèse (mg)	16,38	Vitamine B3 (mg)	3,17
Zinc (mg)	47,25	Vitamine B5 (mg)	7,25
Phosphore (g)	1,68	Vitamine B6 (mg)	5,57
Magnésium (g)	0,17	Vitamine C (mg)	42
Biotine (mg)	0,58	Vitamine D3	210 UI = 5,25 µg
Choline (mg)	420	Vitamine E (mg)	126

Tableau 29 : Apports quotidiens en minéraux et vitamines avec l'aliment Royal Canin Vet Care Adult Medium Dog.

Lors de la phase de supplémentation en calcium, deux comprimés Pet-Phos Croissance Grand Chien Ca/P=2 NDV (Laboratoire Ceva) sont ajoutés quotidiennement à la ration alimentaire. Cela représente un apport supplémentaire en calcium de 2,48g par jour, les chiennes supplémentées ingèrent donc un total de 4,79 g de calcium par jour (Tableau 30).

	Apport par les 2 comprimés		Apport par les 2 comprimés
Calcium (g)	2,48	Vitamine D3	336 UI = 8,4 µg
Magnésium (g)	0,0224	Vitamine E (UI)	20
Phosphore	1,216	Biotine (mg)	0,16
Vitamine A (UI)	3200	Acide folique (mg)	0,128
Vitamine B1 (mg)	2,4	Choline (mg)	9,6
Vitamine B2 (mg)	2,4	Fer (mg)	3,2
Vitamine B3 (mg)	24	Iode (mg)	0,4
Vitamine B5 (mg)	16	Cobalt (mg)	0,8

Vitamine B6 (mg)	0,32	Cuivre (mg)	0,8
Vitamine B12 (µg)	0,48	Manganèse (mg)	0,288
Vitamine C (mg)	32	Zinc (mg)	0,32

Tableau 30 : Apports en minéraux et vitamines contenus dans deux comprimés Pet-Phos
Croissance Grand Chien Ca/P=2 NDV (Laboratoire Ceva).

Les valeurs calculées du tableau suivant regroupent les apports quotidiens reçus par les chiennes complémentées avec les deux comprimés Pet-Phos (**Tableau 31**). Précisons que le NRC 2006 recommande un apport calcique journalier de 130mgCa/kgPM/j (PM : poids métabolique).

Poids de la chienne (en kg)	Apport de Ca pour 210g de croquettes/j (en g)	Apport de Ca par les 2 comprimés (en g)	Apport de Ca total (en g/kg PM/j)	X*besoins calciques NRC
10	2,31	2,480	0,852	6,6
11			0,793	6,1
12			0,743	5,7
13			0,700	5,4
13,6			0,676	5,2

Tableau 31 : Apport quotidien en calcium chez les chiennes lors de la phase de complémentation, selon leur poids.

Ainsi, pour les chiennes complémentées et qui mangent la ration de 210g de Royal Canin Vet Care Adult Medium Dog, l'apport total en calcium représente environ 6,6 fois les recommandations du NRC 2006.

Les mêmes calculs peuvent être faits avec le magnésium et la vitamine D3 (**Tableaux 32 et 33**). Le NRC 2006 recommande un apport journalier de 10mg/kgPM en magnésium et 0,36µg/kgPM en vitamine D3.

Poids de la chienne (en kg)	Apport de Mg par la ration/j (en g)	Apport de Mg par les 2 comprimés (en g)	Apport de Mg total (en g/kg PM/j)	X*besoins Mg NRC
10	0,17	0,022	0,034	1,7
11	0,17	0,022	0,032	1,6
12	0,17	0,022	0,030	1,5
13	0,17	0,022	0,028	1,4
13,6	0,17	0,022	0,027	1,4

Tableau 32 : Apport quotidien en magnésium chez les chiennes complémentées en fonction de leur poids.

Poids de la chienne (en kg)	Apport de Vit D3 par la ration/j (en µg)	Apport de Vit D3 par les 2 comprimés (en µg)	Apport de Vit D3 total (en µg/kg PM/j)	X*besoins NRC
10	5,25	8,4	2,427	6,7
11	5,25	8,4	2,260	6,3
12	5,25	8,4	2,117	5,9
13	5,25	8,4	1,994	5,5
13,6	5,25	8,4	1,927	5,4

Tableau 33 : Apport quotidien en vitamine D₃ chez les chiennes complémentées en fonction de leur poids.

c) Déclenchement des chaleurs

Il n'était pas prévu au départ de déclencher les chaleurs des chiennes mais celles-ci ne venant pas au moment opportun pour la réalisation des mesures, il a été décidé de déclencher les chiennes qui mettaient trop de temps à revenir en œstrus.

i) Interruption du metœstrus

Pour lyser le corps jaune et interrompre le metœstrus des chiennes, nous avons utilisé le protocole mis au point par GALODE (2014) dans sa thèse de doctorat vétérinaire. Le protocole est de réaliser, chez des chiennes à au moins deux mois de leur précédent œstrus, des injections de cloprosténol, un analogue des PGF_{2α}, tous les deux jours à la dose de

2,5µg/kg en sous-cutané jusqu'à ce que la progestéronémie descende en dessous des 1ng/mL pendant deux mesures consécutives à 48 heures d'intervalle.

Pour ce faire, nous utilisons la spécialité dénommée ESTRUMATE NDV (cloprosténol) dosée à 0,25mg/mL. Afin d'obtenir des volumes injectables raisonnables, nous diluons la spécialité au dixième (1mL d'ESTRUMATE NDV pour 9mL de NaCl 0,9%) et obtenons une solution à 25µg/mL. Ainsi, nos injections se font à raison de 0,1mL/kg tous les deux jours. Régulièrement, la progestéronémie des chiennes est contrôlée. Lorsque la progestéronémie passe sous le seuil des 1ng/mL deux fois d'affilée, le metœstrus est considéré comme achevé et les injections de cloprosténol sont arrêtées.

ii) Induction de l'œstrus

Lorsque les chiennes sont en anœstrus, il est possible de faire démarrer un nouveau cycle sexuel en utilisant un implant d'acétate de desloréline (SUPRELORIN 4,7 mg NDV), un analogue de synthèse de la GnRH, qui est laissé en place 14 jours, puis retiré. L'implant est posé le jour où la progestéronémie est inférieure à 1ng/mL pour la deuxième fois consécutive, à 48 heures d'intervalle (GALODE, 2014).

La pose de l'implant est facile à réaliser et quasiment indolore. Le dispositif est constitué d'un trocart et d'un injecteur réutilisable. L'implant doit être positionné en sous-cutané, à un endroit où il sera facilement palpé (pour vérifier sa présence) et où il pourra facilement être retiré 14 jours après sa pose. Le site d'implantation est la face interne de la cuisse, droite ou gauche indifféremment (GALODE, 2014). Un aide maintient la chienne sur le dos. Après avoir réalisé une désinfection soignée du lieu d'injection (à l'aide d'une solution de polyvidone iodée (VETEDINE solution NDV) et d'une compresse), le trocart est enfoncé sur toute sa longueur dans un repli cutané préalablement formé. Au fur et à mesure que l'on enfonce le piston de l'injecteur, on sent l'implant sortir. Il suffit alors de le pincer au travers de la peau afin de le maintenir pendant que l'on retire le trocart. L'opérateur pourra vérifier qu'il n'a pas trop bougé pendant cette manipulation par palpation transcutanée. La brèche cutanée créée par le trocart (environ un demi centimètre de diamètre) est ensuite désinfectée à l'aide d'une solution de polyvidone iodée (VETEDINE solution NDV) et d'une compresse.

Le retrait de l'implant se fait 14 jours après sa pose. Pour se faire, l'aide maintient la chienne dans la même position que pour la pose, c'est-à-dire sur le dos. L'opérateur repère l'implant en le palpant à travers la peau et le pince pour l'immobiliser. Après une aseptie locale, une incision de quelques millimètres est réalisée à l'aide d'une lame de scalpel. L'opérateur exerce ensuite une pression par taxis externe sur l'implant pour le faire sortir. Il se peut qu'une coque fibreuse se soit formée autour de ce dernier, il suffit alors de l'inciser. Parfois, l'implant peut se rompre en plusieurs morceaux au moment où l'opérateur tente de le faire sortir. Il faut que l'opérateur s'assure de retirer l'intégralité des morceaux. L'incision est ensuite désinfectée à l'aide d'une solution de polyvidone iodée (VETEDINE solution NDV) et d'une compresse. L'ovulation survient généralement quelques jours avant ou après le retrait de l'implant.

d) Suivi du cycle sexuel

i) Suivi gynécologique

Tous les deux à quatre jours à partir du début des phases d'expérimentation, un suivi gynécologique est réalisé. Il comprend, en fonction du moment dans le cycle, une évaluation clinique de l'aspect de la vulve et un frottis vaginal.

L'aspect de la vulve est évalué selon différents critères : turgescence, éventuelles pertes vulvaires, et s'il y a lieu, caractérisation macroscopique de ces pertes. Ces paramètres, assez subjectifs, ont fait l'objet de notes lorsqu'ils étaient évidents, mais n'ont pas été rigoureusement observés et répertoriés.

Les frottis vaginaux sont réalisés au moyen d'écouvillons dont l'extrémité recouverte de coton est humidifiée avec du sérum physiologique. L'écouvillon est inséré au niveau de la commissure dorsale de la vulve, l'opérateur tenant l'extrémité de la vulve entre ses doigts et appliquant une tension vers le bas pour faciliter l'insertion de l'écouvillon. Il est ensuite inséré verticalement dans le vestibule du vagin sur quelques centimètres, en longeant la paroi caudale, puis basculé horizontalement. Il est en tout inséré sur environ dix à quinze centimètres. L'opérateur le tourne ensuite plusieurs fois sur lui-même avant de le retirer du vagin. L'extrémité de l'écouvillon est ensuite roulée sur une lame de microscope afin de former trois stries. Le frottis est ensuite coloré au RAL 555®, qui est une variante rapide de la

coloration de May-Grünwald Giemsa et lu au microscope, afin d'en évaluer sa propreté, sa densité cellulaire, la répartition des cellules et la nature des cellules présentes.

ii) Progestéronémie

Tous les deux à quatre jours, des prises de sang sont réalisées afin de mesurer et de suivre la progestéronémie au cours du cycle sexuel. Ces échantillons ne sont cependant pas systématiquement analysés, cela dépend du stade sexuel dans lequel se trouve la chienne. Les échantillons non dosés sont conservés au congélateur à -25°C. Les prises de sang sont réalisées le plus souvent le matin, à la veine céphalique, droite ou gauche indifféremment, à l'aide d'une aiguille bleue de 0,6mm de diamètre et de seringues de 2,5mL. Le sang est ensuite placé dans un tube à héparine de contenance 1,3 mL. Ces derniers sont ensuite centrifugés, dans l'heure suivante, dans une centrifugeuse HETTICH Universal 320 à 3500 tours/minute pendant 5 minutes. 200µL de plasma sont ensuite immédiatement placés dans un puit d'une cartouche VIDAS Progesterone REF.30409. Il arrive parfois que la progestéronémie ne puisse pas être immédiatement dosée. Dans ce cas, le plasma est placé dans un tube sec et congelé à -25°C. Il sera décongelé à température ambiante juste avant le dosage. La cartouche VIDAS est lue et analysée par l'automate Minividas® de Biomérieux afin de déterminer la progestéronémie de la chienne. Le principe du dosage associe la méthode immunoenzymatique par compétition à une détection finale en fluorescence. Des anticorps de souris anti-progestérone canine sont fixés au fond du puit de la cartouche VIDAS. La progestérone contenue dans l'échantillon se fixe alors aux anticorps. Après lavage, un dérivé de la progestérone, qui en réagissant donnera une coloration fluorescente, est ajouté. La fluorescence finale de l'échantillon est mesurée et est donc inversement proportionnelle à la quantité de progestérone contenue dans l'échantillon. L'automate est capable de mesurer des progestéronémies comprises entre 0,25ng/mL et 80ng/mL. Au-delà de cette valeur maximale, une dilution sera nécessaire pour déterminer la progestéronémie.

Nous avons appelé « jour d'insémination théorique » le jour où une première insémination aurait dû être réalisée si nous avions voulu mettre les chiennes à la reproduction. Cette première insémination aurait été suivie par une seconde 48 heures plus tard. Ces deux jours théoriques particuliers sont notés IA1 et IA2 dans notre thèse. IA1 correspond au jour

où la progestéronémie est aux alentours de 10 ng/mL, moment où la première insémination est habituellement réalisée au service de Reproduction d'ONIRIS.

e) Suivi du pH vaginal au cours du cycle sexuel

Une mesure du pH vaginal des chiennes est réalisée en moyenne deux fois par semaine en dehors de la période sexuelle et tous les un à trois jours pendant la période sexuelle. Pour cela, un pH-mètre (EUTECH pH5+ ECPH502PLUSK, [Annexe 7](#)) muni d'une sonde-électrode à pH de contact (SI Analytics ScienceLine, [Annexe 8](#)), de 1,2 centimètres de diamètre, est étalonné au moyen de deux solutions de pH connus (pH = 4 et pH= 7) avant chaque série de mesures. La sonde à pH est ensuite rincée à l'eau déminéralisée. Un aide maintient la chienne debout sur une table, pendant que l'opérateur place un vaginoscope court à l'entrée du vagin de la chienne. L'ouverture du vaginoscope laisse suffisamment de place pour y glisser la sonde à pH. Le vaginoscope est ensuite retiré pendant que la sonde à pH est introduite délicatement dans le vagin au moyen de rotations et de poussées. La lecture de la valeur du pH se fait lorsque la sonde est placée dans la position requise (un repère blanc sur la sonde permet à l'opérateur de vérifier la position de la sonde dans le vagin). Il faut que celle-ci soit appliquée contre la paroi gauche du vagin. L'opérateur attend que la valeur du pH se stabilise avant de relever la mesure.

La sonde est nettoyée, désinfectée et rincée au moyen de compresses, d'alcool et d'eau distillée entre les mesures des pH vaginaux de chaque chienne.

f) Etude statistique concernant le pH vaginal au cours du cycle sexuel

Afin d'analyser les valeurs de pH vaginal obtenues au cours du cycle sexuel de la chienne, un modèle à effets mixtes a été utilisé. Il s'agit d'un modèle hiérarchique dans lequel le premier niveau modélise la réponse individuelle et le deuxième niveau modélise le comportement des paramètres pour l'ensemble de la population. Par exemple, pour notre étude de la relation entre la progestéronémie et le pH vaginal, le modèle s'écrit :

Niveau individuel : $pH_{ij} = \alpha_i + \beta_i * Progest\acute{e}rone_j + \varepsilon_{ij}$

Niveau de la population : $\begin{cases} \alpha_i = \alpha + a_i \\ \beta_i = \beta + b_i \end{cases}$

Où i est l'indice des individus ($1 \leq i \leq 11$)

et ε_{ij} sont identiquement et indépendamment distribués selon une loi normale $N(0 ; \sigma^2)$.

Les coefficients α et β sont les effets fixes (estimations ponctuelles pour l'ensemble de la population), a_i et b_i sont les effets aléatoires, ils doivent aussi être distribués selon une loi normale. La normalité des résidus et des effets aléatoires a été vérifiée et validée pour chaque modèle au moyen de graphiques préconisés par les auteurs des modèles à effets mixtes (PINHEIRO et BATES, 2000).

2) Résultats

Les résultats complets et détaillés des frottis vaginaux, dosages de progestéronémie et mesures de pH sont présentés en annexe (Annexes 9 à 21). Sont présentées ci-dessous les courbes de pH vaginal et de progestéronémie au cours du temps pour chaque chienne. Les stades des cycles indiqués sur les graphes sont des constats faits ces jours-là et ne correspondent pas forcément au premier jour de chaque stade œstral.

a) Phase 1

Dans cette première phase, les chiennes 1, 4 et 6 sont complémentées alors que les chiennes 2, 3, 5 et 7 ne le sont pas. La complémentation est arrêtée à la fin du 5^{ème} jour après la seconde insémination artificielle théorique.

i) Chiennes complémentées

La complémentation de la chienne 1 a démarré à J0 et s'est terminée à J21. Elle entre en proœstrus dès J3 et l'œstrus est constaté à J9. Le début de metoœstrus a lieu à J22. Les inséminations artificielles auraient dû avoir lieu à J14 et J16. La chienne 1 n'a donc reçu que 14 jours de compléments avant insémination, contrairement aux trois semaines prévues. La fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes aurait théoriquement pu être possible jusqu'à J21 (Annexe 9 et Figure 6). A savoir que le Service de Reproduction d'Oniris ne

considère lui que la fécondation des ovocytes n'est possible que 48-72 heures après l'ovulation, soit 48-72 heures après que la progestéronémie ait dépassé 8-10ng/mL.

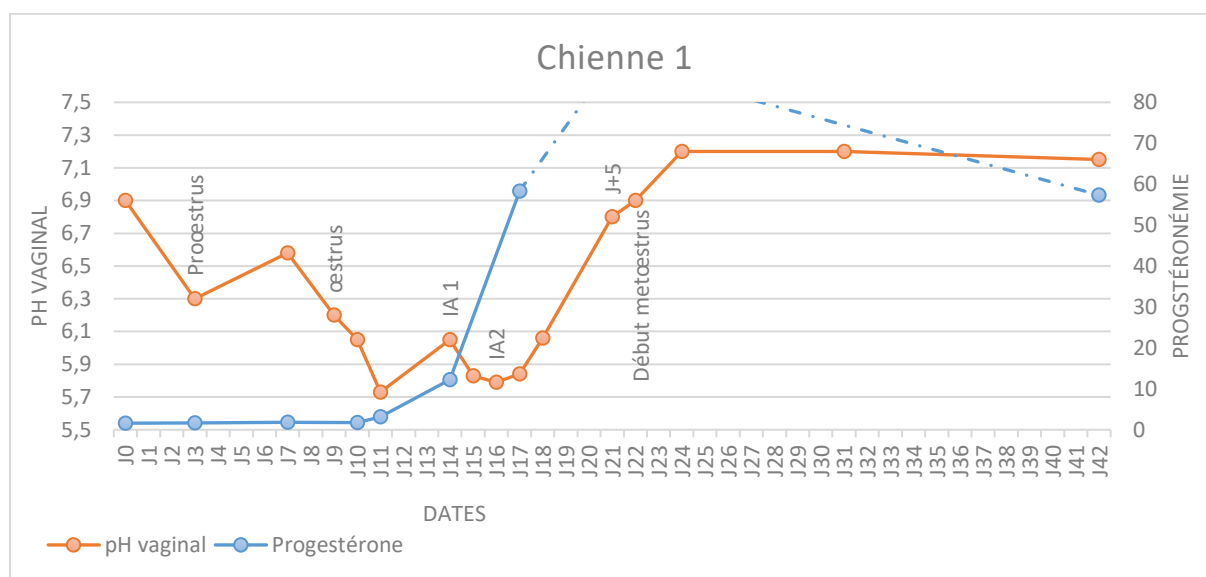


Figure 6 : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 1 complémentée.

La complémentation de la chienne 4 a démarré à J0 et s'est terminée à J30 (Jpi21). Un implant de desloréline est posé à J9 (Jpi0, où Jpi signifie « Jour de pose de l'implant ») et retiré à J23 (Jpi14). Aucun frottis n'a montré de phase de proœstrus et il n'y a jamais eu de pertes vulvaires sanguinolentes non plus. L'œstrus est cependant constaté à J14 (Jpi5). Le début de métœstrus a lieu à J28 (Jpi19). Les inséminations artificielles auraient dû avoir lieu à J22 (Jpi13) et J24 (Jpi15) ou J23 (Jpi14) et J25 (Jpi16). La fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes aurait théoriquement pu se faire jusqu'à J29 (Jpi20) ou J30 (Jpi21), selon la date de la dernière insémination (Annexe 12 et Figure 7). A savoir que le Service de Reproduction d'Oniris ne considère lui que la fécondation des ovocytes n'est possible que 48-72 heures après l'ovulation, soit 48-72 heures après que la progestéronémie ait dépassé 8-10ng/mL. La chienne 4 a été utilisée à notre insu pour un TP sondage urinaire à J16 (Jpi7).

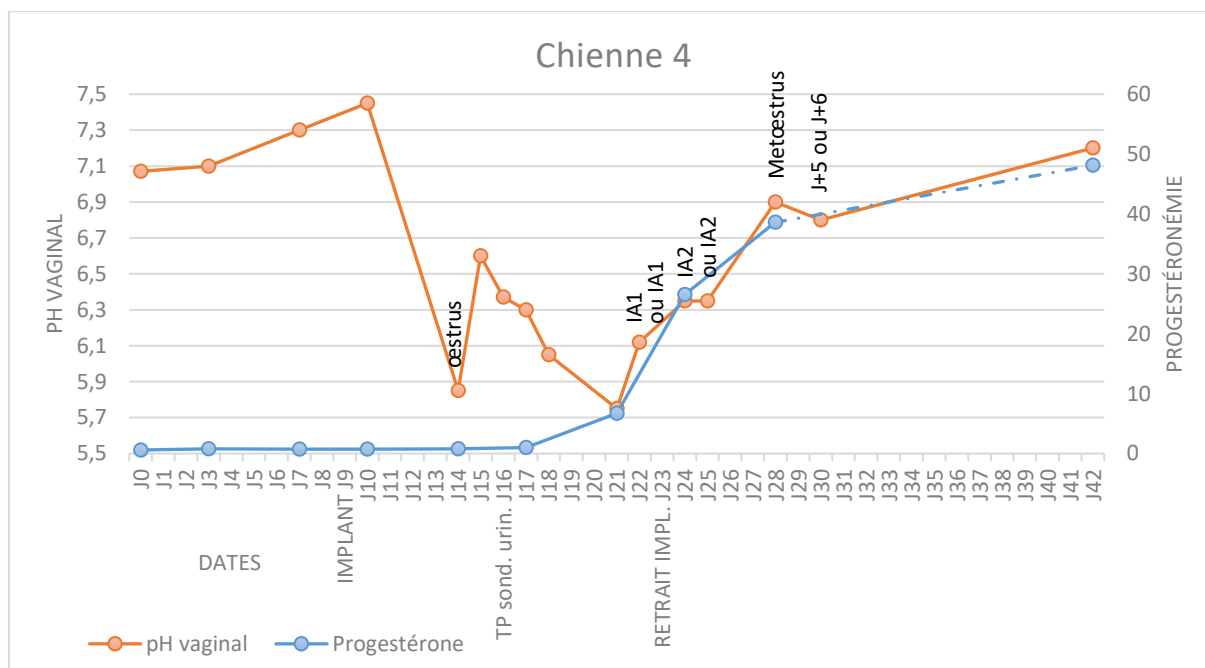


Figure 7 : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 4 complémentée.

La complémentation de la chienne 6 a démarré à J0 et s'est terminée à J30 (Jpi21). Un implant de desloréline est posé à J9 (Jpi0) et retiré à J23 (Jpi14). Le proœstrus débute à J9 (Jpi0) et l'œstrus est constaté à J21 (Jpi12). Le metœstrus est constaté à J42 (Jpi33). Les inséminations artificielles auraient dû avoir lieu à J22 (Jpi13) et J24 (Jpi15) ou J23 (Jpi14) et J25 (Jpi16). La fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes aurait théoriquement pu être possible jusqu'à J29 (Jpi20) ou J30 (Jpi21), selon la date de la dernière insémination (Annexe 14 et Figure 8). A savoir que le Service de Reproduction d'Oniris ne considère lui que la fécondation des ovocytes n'est possible que 48-72 heures après l'ovulation, soit 48-72 heures après que la progestéronémie ait dépassé 8-10ng/mL. La chienne 6 a été utilisée à notre insu pour un entraînement à l'endoscopie intra-utérine à J16 (Jpi7) et un TP sondage urinaire ce même jour, ce qui a entraîné des saignements vaginaux.

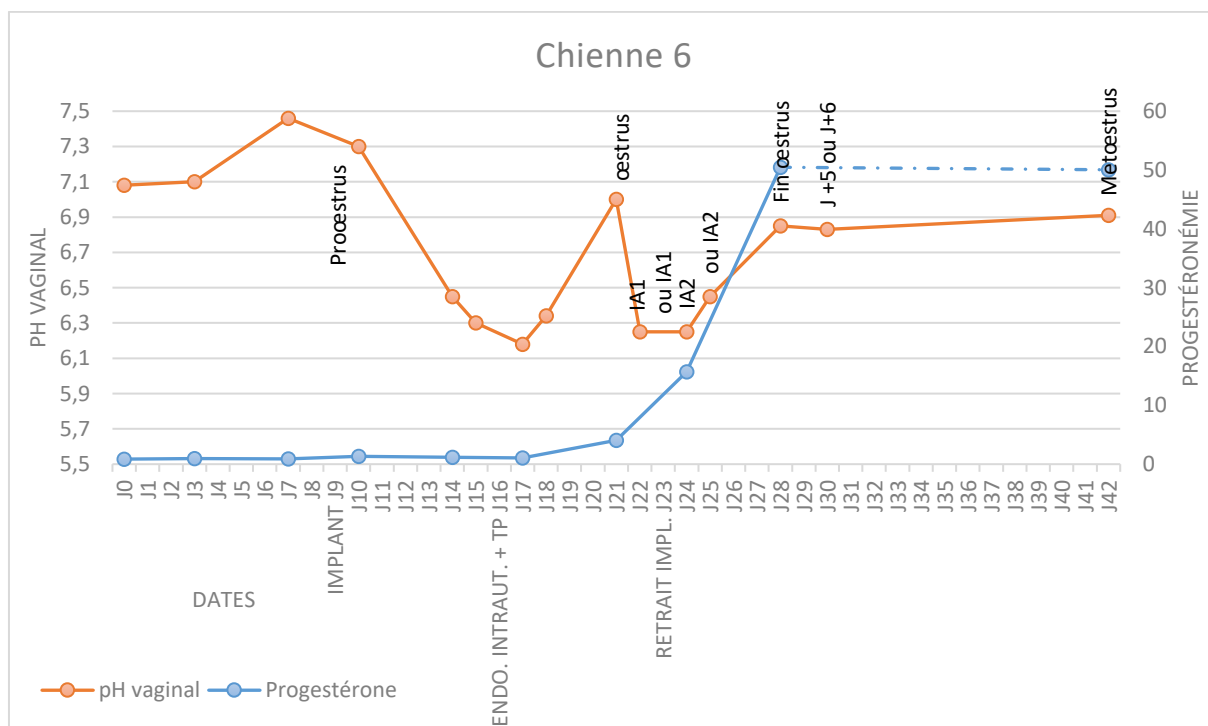


Figure 8 : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 6 complémentée.

ii) Chiennes non complémentées

Chez la chienne 2, un implant de desloréline est posé à J9 (Jpi0) et retiré à J23 (Jpi14). Le proœstrus est constaté à J14 (Jpi5) et l'œstrus à J21 (Jpi12). Le début de metœstrus autour de J28. Les inséminations artificielles auraient dû avoir lieu à J22 (Jpi13) et J24 (Jpi15) ou J23 (Jpi14) et J25 (Jpi16). La fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes aurait théoriquement pu être possible jusqu'à J29 (Jpi20) ou J30 (Jpi21), selon la date de la dernière insémination (Annexe 10 et Figure 9). A savoir que le Service de Reproduction d'Oniris ne considère lui que la fécondation des ovocytes n'est possible que 48-72 heures après l'ovulation, soit 48-72 heures après que la progestéronémie ait dépassé 8-10ng/mL.

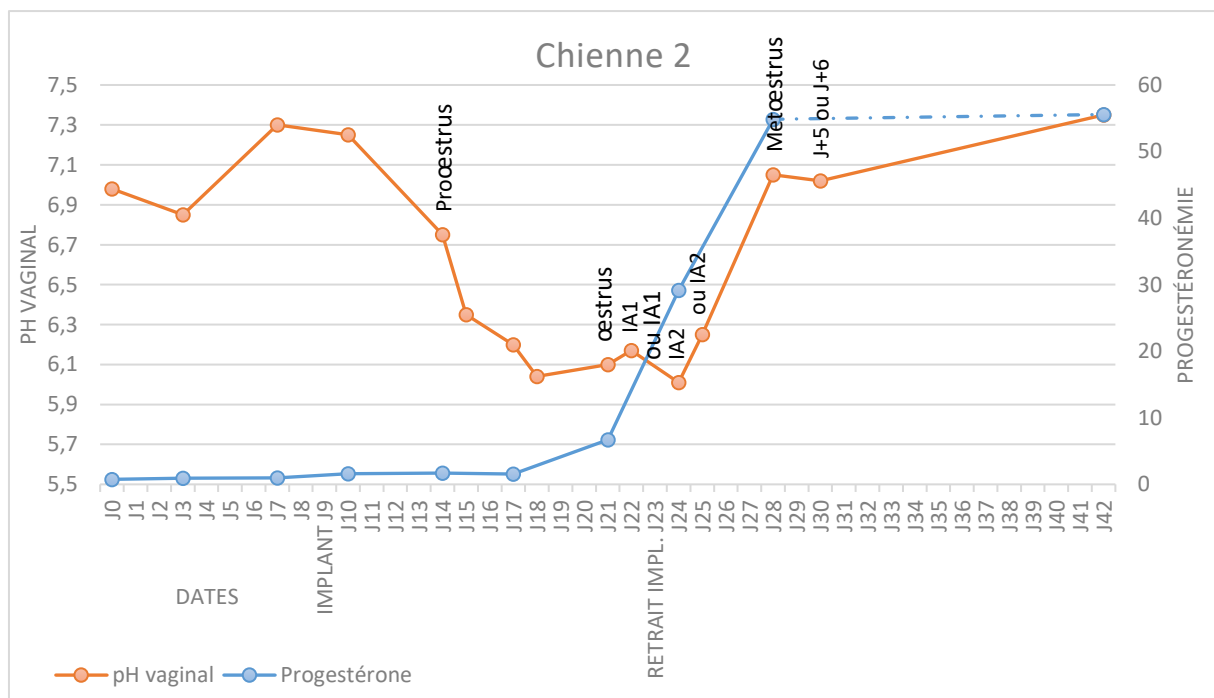


Figure 9 : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 2 non complémentée.

Chez la chienne 3, un implant de desloréline est posé à J39 (Jpi0) et retiré à J53 (Jpi14). La fin du proœstrus est constatée à J45 (Jpi6) et l'œstrus à J49 (Jpi10). Les inséminations artificielles auraient dû avoir lieu à J52 (Jpi13) et J54. (Jpi15) La fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes aurait théoriquement pu être possible jusqu'à J59 (Jpi20) (Annexe 11 et Figure 10). A savoir que le Service de Reproduction d'Oniris ne considère lui que la fécondation des ovocytes n'est possible que 48-72 heures après l'ovulation, soit 48-72 heures après que la

progestéronémie ait dépassé 8-10ng/mL. La chienne 3 a été utilisée à notre insu pour un TP sondage urinaire à J16.

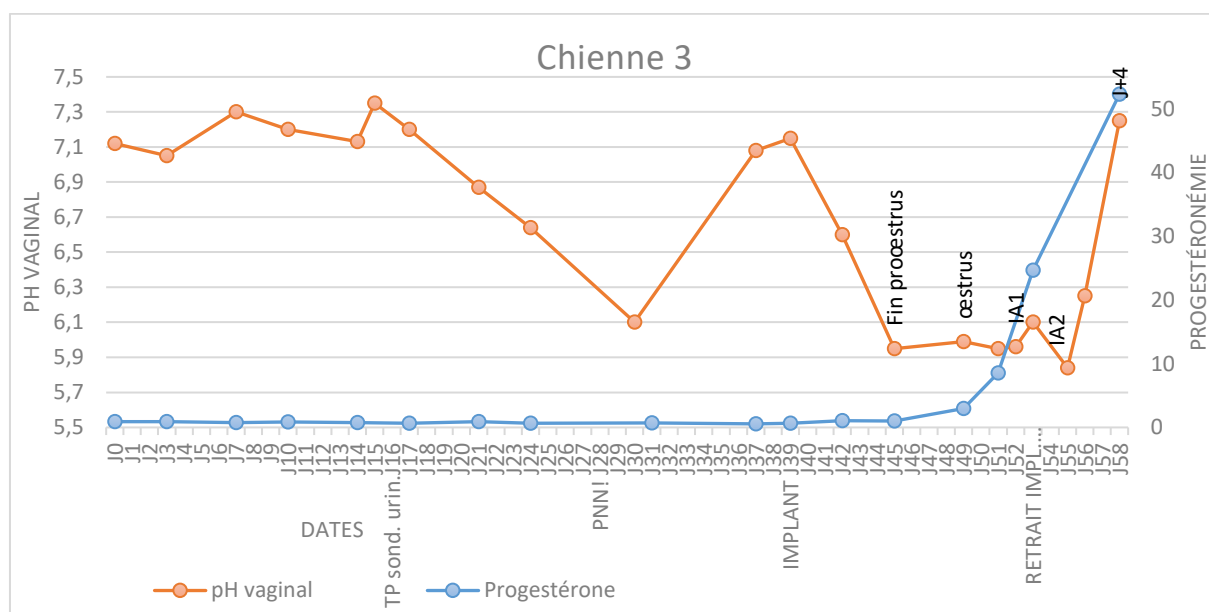


Figure 10 : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 3 non complémentée.

Neuf injections de cloprosténol ont été nécessaires afin de terminer le metœstrus de la chienne 5. Un implant de desloréline est posé à J39 (Jpi0) et retiré à J53 (Jpi14). La fin du proœstrus est constatée à J45 (Jpi6) et l'œstrus à J49 (Jpi10). Les inséminations artificielles auraient dû avoir lieu à J52 (Jpi13) et J54 (Jpi15). La fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes aurait théoriquement pu être possible jusqu'à J59 (Jpi20) (Annexe 13 et Figure 11). A savoir que le Service de Reproduction d'Oniris ne considère lui que la fécondation des ovocytes n'est possible que 48-72 heures après l'ovulation, soit 48-72 heures après que la progestéronémie ait dépassé 8-10ng/mL.

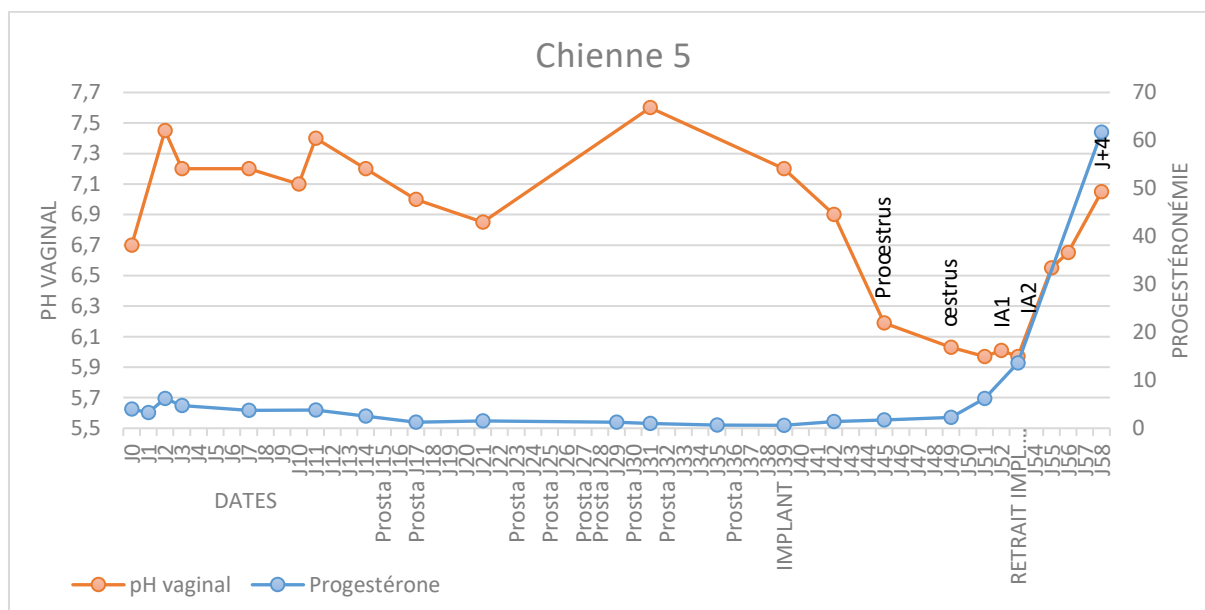


Figure 11 : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 5 non complémentée.

Dix-huit injections de cloprosténol ont été nécessaires afin de stopper le metœstrus de la chienne 7. Un implant de desloréline est posé à J59 (Jpi0) et retiré à J73 (Jpi14). La fin du proœstrus est constatée à J65 (Jpi6) et l'œstrus à J70 (Jpi11). Les inséminations artificielles auraient dû avoir lieu à J71 (Jpi12) et J73 (Jpi14) ou J72 (Jpi13) et J74 (Jpi15). La fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes aurait théoriquement pu être possible jusqu'à J78 (Jpi19) ou J79 (Jpi20), selon la date de la dernière insémination (Annexe 15 et Figures 12 et 13). A savoir que le Service de Reproduction d'Oniris ne considère lui que la fécondation des ovocytes n'est possible que 48-72 heures après l'ovulation, soit 48-72 heures après que la progestéronémie ait dépassé 8-10ng/mL.

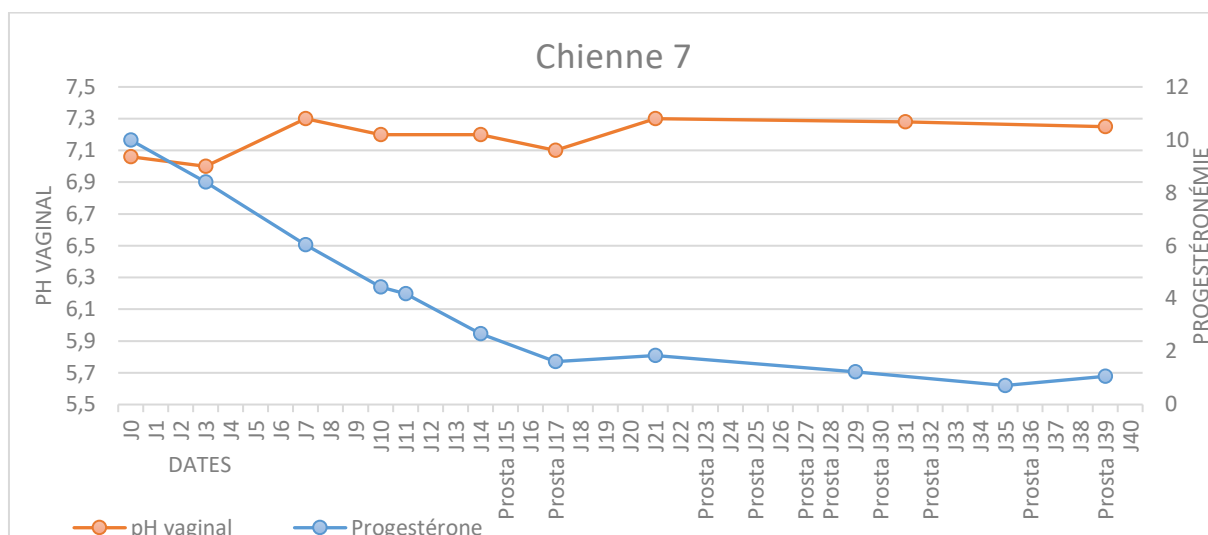


Figure 12 : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 7 non complémentée.

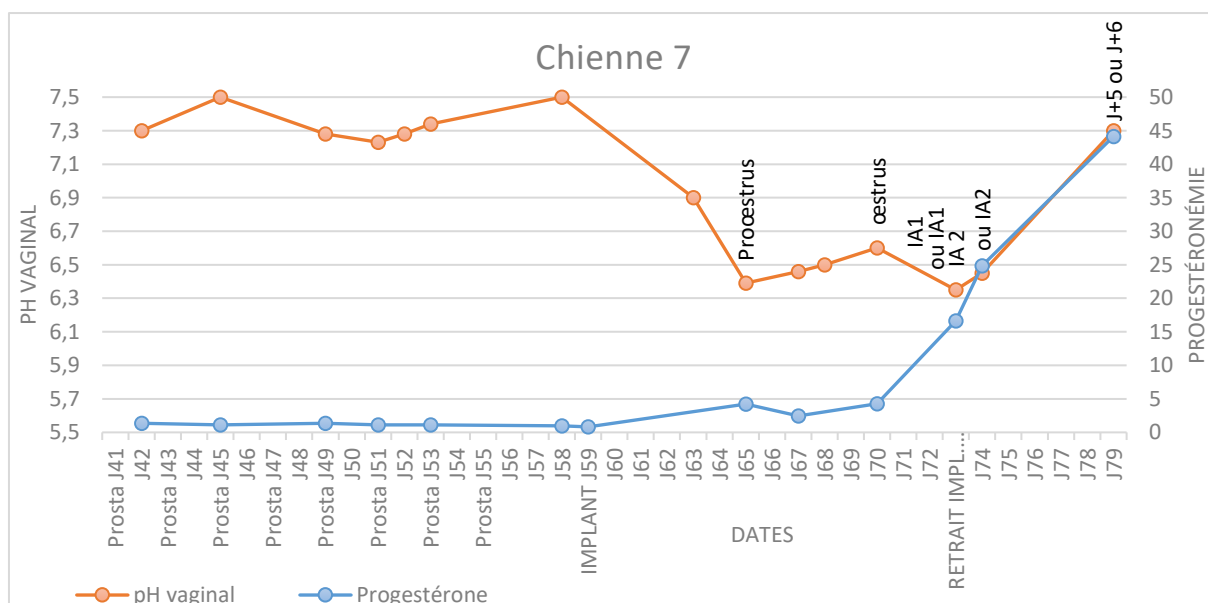


Figure 13 : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 7 non complémentée (suite).

b) Phase 2

Dans cette seconde phase, les chiennes 2, 3, 5 et 7 sont complémentées alors que les chiennes 1, 4 et 6 ne le sont pas. Comme lors de la phase 1, la complémentation est arrêtée à la fin du 5^{ème} jour après la seconde insémination artificielle théorique.

i) Chiennes complémentées

La complémentation de la chienne 2 a démarré à J0 et s'est terminée à J38 (Jpi22). Trois injections de cloprosténol (prostaglandines) ont été nécessaires pour mettre fin au metœstrus (J9, J11 et J14). Un implant de desloréline est posé à J16 (Jpi0) et retiré à J30 (Jpi14). A J22, Le frottis (Jpi6) a montré un état de proœstrus. L'œstrus est cependant constaté à J14 (Jpi5). Les inséminations artificielles auraient dû avoir lieu à J31 (Jpi15) et J33 (Jpi17). La fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes aurait théoriquement pu possible jusqu'à J38 (Jpi22) (Annexe 17 et Figure 14). A savoir que le Service de Reproduction d'Oniris ne considère lui que la fécondation des ovocytes n'est possible que 48-72 heures après l'ovulation, soit 48-72 heures après que la progestéronémie ait dépassé 8-10ng/mL.

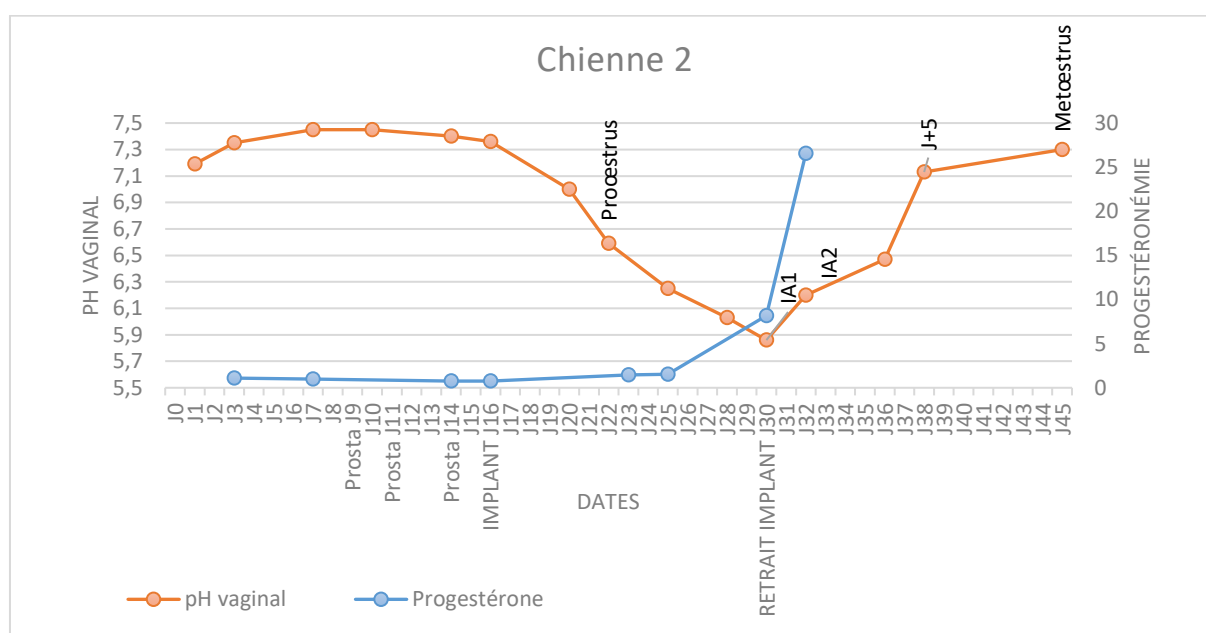


Figure 14 : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 2 complémentée.

La chienne 3 avait commencé à être complémentée également mais a été exclue du protocole très rapidement car une sténose vaginale empêchait le passage de la sonde-électrode.

Les chiennes 5 et 7 (Annexes 19 et 21) ont également été complémentées, mais après deux à deux mois et demi de complémentation et entre vingt-cinq et trente injections de

prostaglandines, et n'étant toujours pas parvenu à mettre un terme à leur metœstrus, il a été décidé d'arrêter le suivi.

ii) Chiennes non complémentées

Chez la chienne 1, trois injections de cloprosténol (prostaglandines) ont été nécessaires pour mettre fin au metœstrus, à J9, J11 et J14. Un implant de desloréline a été posé à J16 (Jpi0) et retiré à J30 (Jpi14). Le proœstrus a été constaté à J22 (Jpi6). Le début du metœstrus a été constaté autour de J36 (Jpi20). Les inséminations artificielles auraient dû avoir lieu à J31 (Jpi15) et J33 (Jpi17). La fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes aurait théoriquement pu être possible jusqu'à J38 (Jpi22) (Annexe 16 et Figure 15). A savoir que le Service de Reproduction d'Oniris ne considère lui que la fécondation des ovocytes n'est possible que 48-72 heures après l'ovulation, soit 48-72 heures après que la progestéronémie ait dépassé 8-10ng/mL.

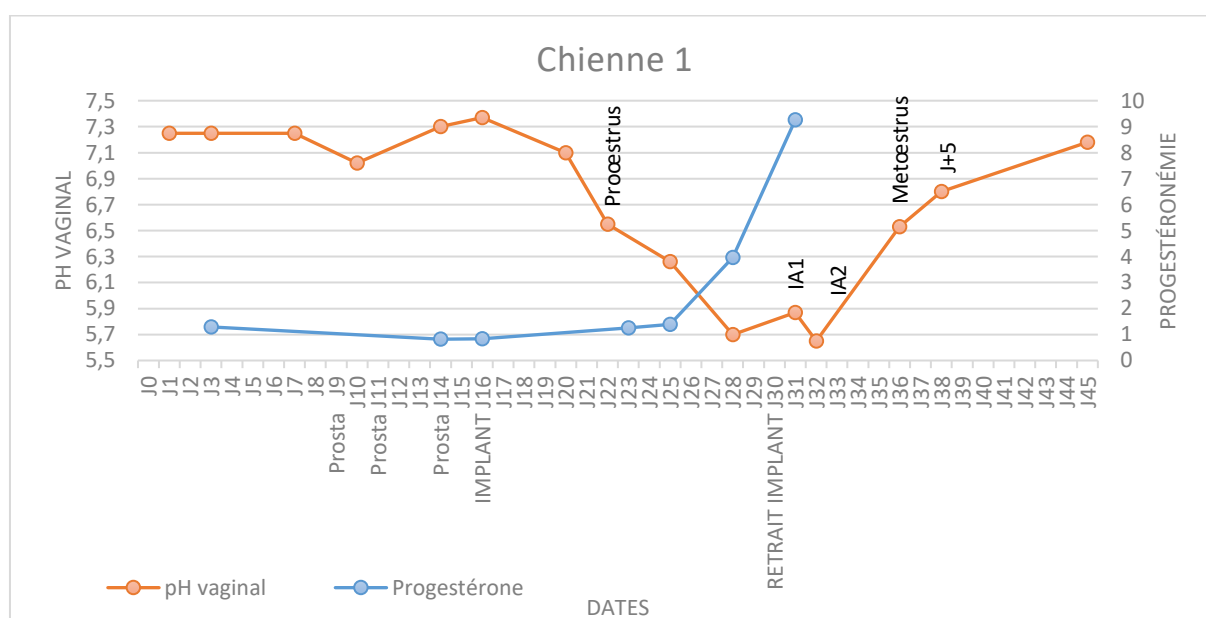


Figure 15 : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 1 non complémentée.

Chez la chienne 4, trois injections de prostaglandines ont été nécessaires pour mettre fin au metœstrus, à J9, J11 et J14. Un implant de desloréline a été posé à J16 (Jpi0) et retiré à J30 (Jpi14). Le proœstrus a été constaté à J22 (Jpi6) et le metœstrus à J45 (Jpi29). Les inséminations artificielles auraient dû avoir lieu à J31 (Jpi15) et J33 (Jpi17). La fécondation des

ovocytes par les spermatozoïdes aurait théoriquement pu être possible jusqu'à J38 (Jpi22) (Annexe 18 et Figure 16). A savoir que le Service de Reproduction d'Oniris ne considère lui que la fécondation des ovocytes n'est possible que 48-72 heures après l'ovulation, soit 48-72 heures après que la progestéronémie ait dépassé 8-10ng/mL.

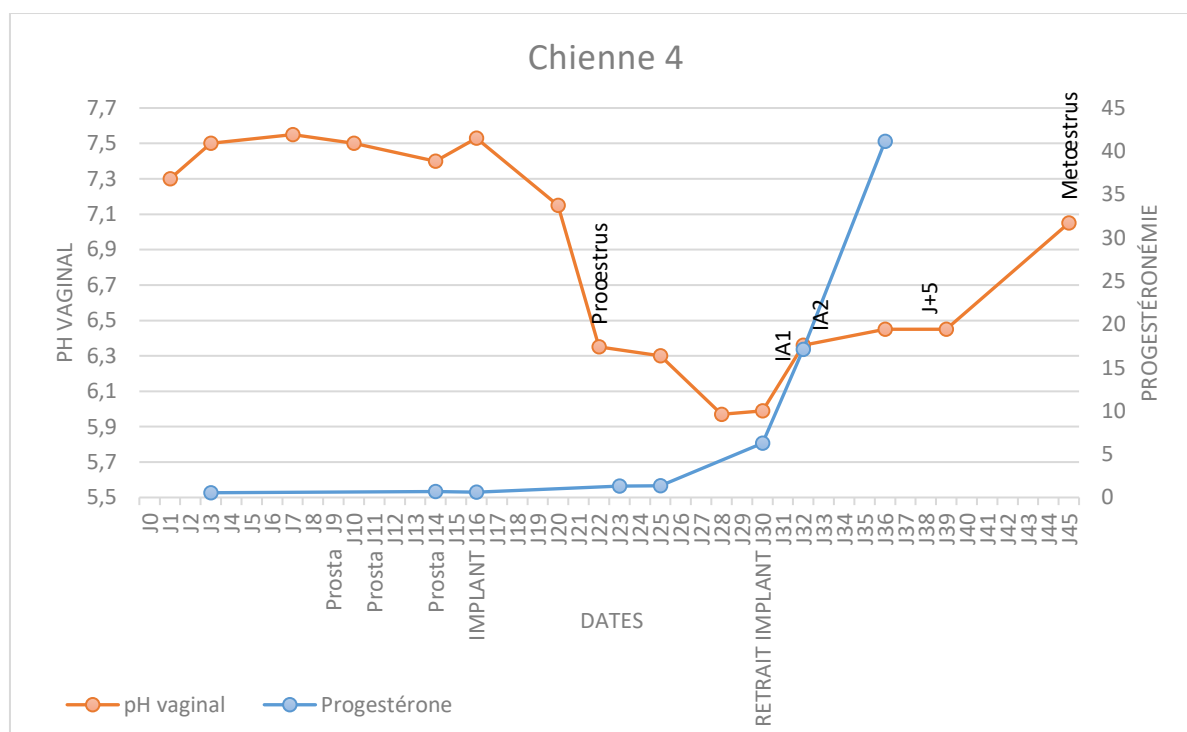


Figure 16 : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 4 non complémentée.

Chez la chienne 6, et comme pour les deux chiennes précédentes, trois injections de prostaglandines ont été nécessaires pour mettre fin au mœstrus, à J9, J11 et J14. Un implant de desloréline a été posé à J16 (Jpi0) et retiré à J30 (Jpi14). Le proœstrus a été constaté à J22 (Jpi6), l'œstrus à J36 (Jpi20) et le mœstrus à J45 (Jpi29). Les inséminations artificielles auraient dû avoir lieu à J33 (Jpi17) et J35 (Jpi19) ou J34 (Jpi18) et J36 (Jpi20). La fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes aurait théoriquement pu être possible jusqu'à J40 ou J41 (Jpi24 ou Jpi25) (Annexe 20 et Figure 17). A savoir que le Service de Reproduction d'Oniris ne considère lui que la fécondation des ovocytes n'est possible que 48-72 heures après l'ovulation, soit 48-72 heures après que la progestéronémie ait dépassé 8-10ng/mL.

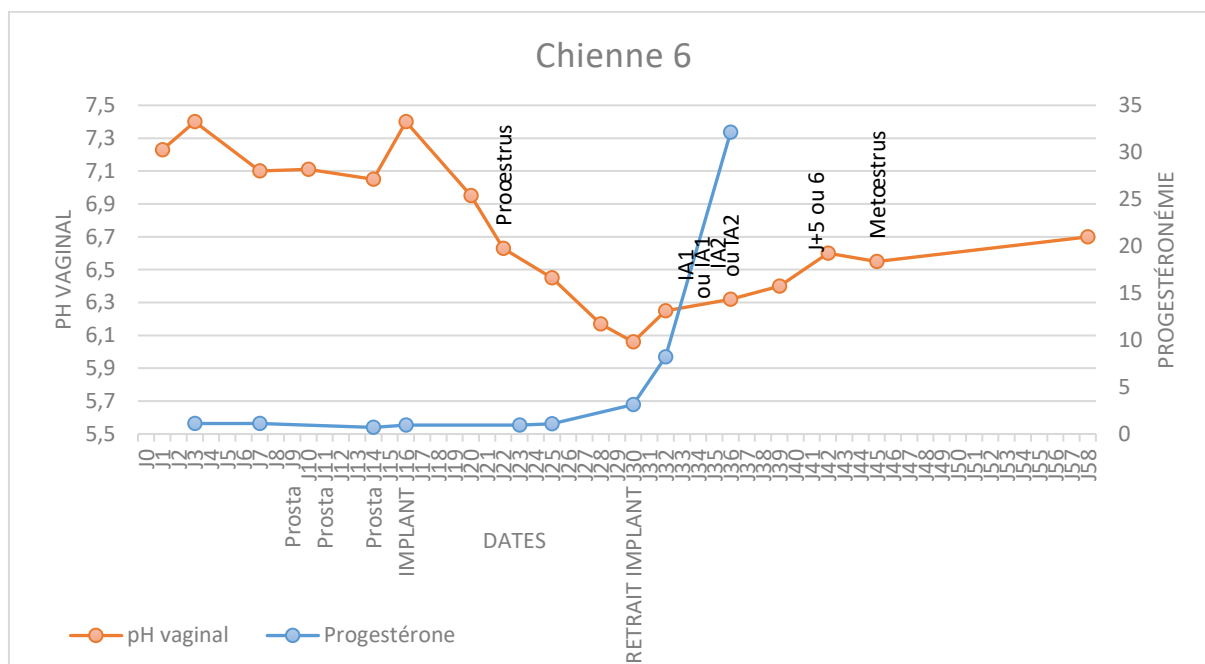


Figure 17 : pH vaginal et progestéronémie (en ng/mL) au cours du temps chez la chienne 6 non complémentée.

c) Variation du pH vaginal au cours du cycle sexuel de la chienne

Si l'on ne tient pas compte du régime alimentaire des chiennes, nous avons obtenus 11 cycles pendant lesquels nous connaissons l'évolution du pH vaginal.

On remarque qu'entre la première insémination artificielle et la seconde, le pH vaginal peut soit augmenter, soit diminuer, soit rester stable.

Il est possible de comparer les sept cycles de la phase 1 et les quatre cycles de la phase 2 sur un même graphique. Pour tracer ces graphiques, on a superposé les courbes de telle sorte que les progestéronémies des points de même abscisse soient similaires (Figures 18 et 19).

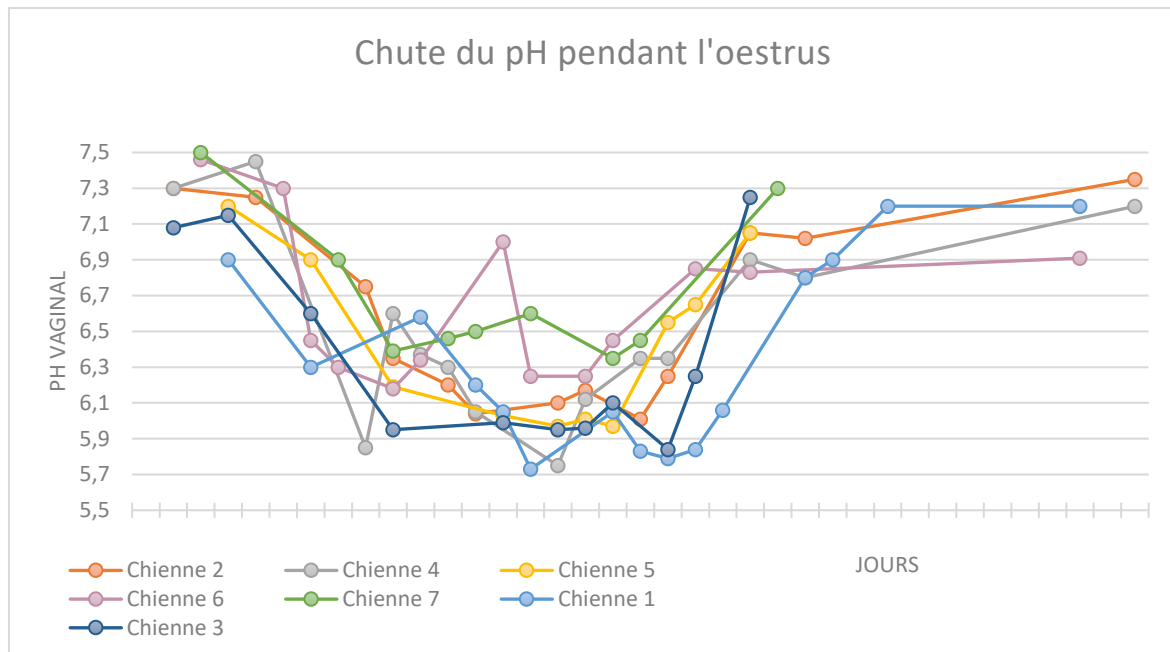


Figure 18 : Chute du pH vaginal au cours des œstrus de la phase 1.

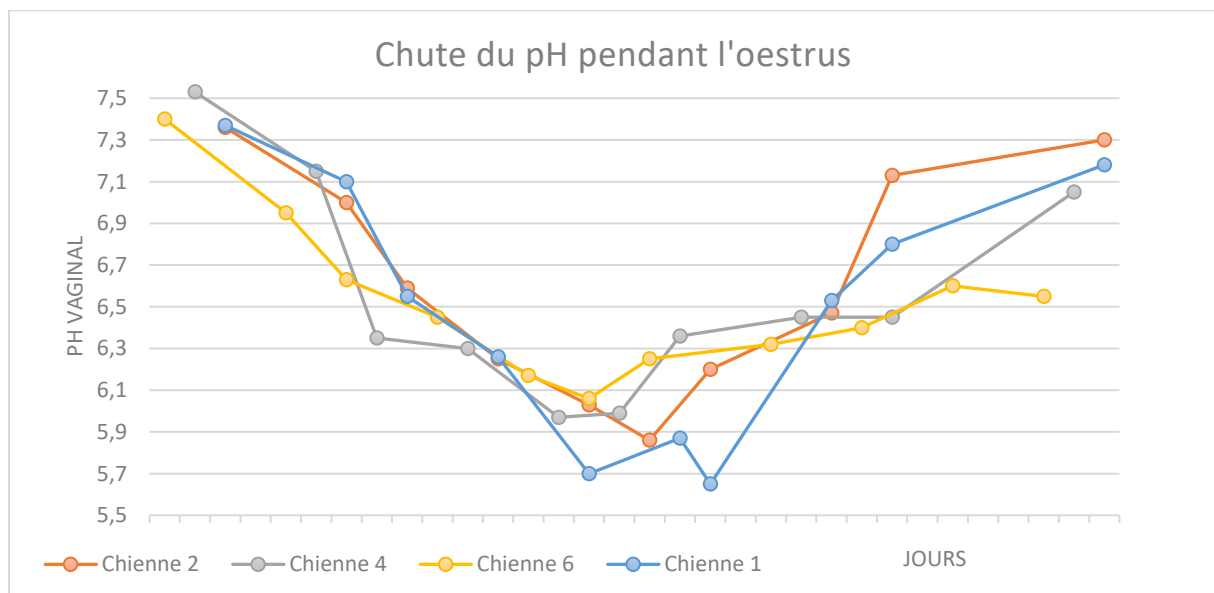


Figure 19 : Chute du pH vaginal au cours des œstrus de la phase 2.

Si on combine les Figures 18 et 19, on obtient un graphique nous permettant de comparer simultanément le pH vaginal de onze cycles (Figure 20). On voit ainsi que pendant leur cycle sexuel, les chiennes ont toutes subi une chute puis une remontée de leur pH vaginal. Puisque les onze courbes sont placées de telle sorte que tous les points d'une même abscisse aient une valeur de progestéronémie proche, on peut donc conclure qu'il y a une baisse qui

semble significative du pH vaginal chez la chienne pendant le proœstrus et l'œstrus, et que ce pH remonte à la fin de la période fertile.

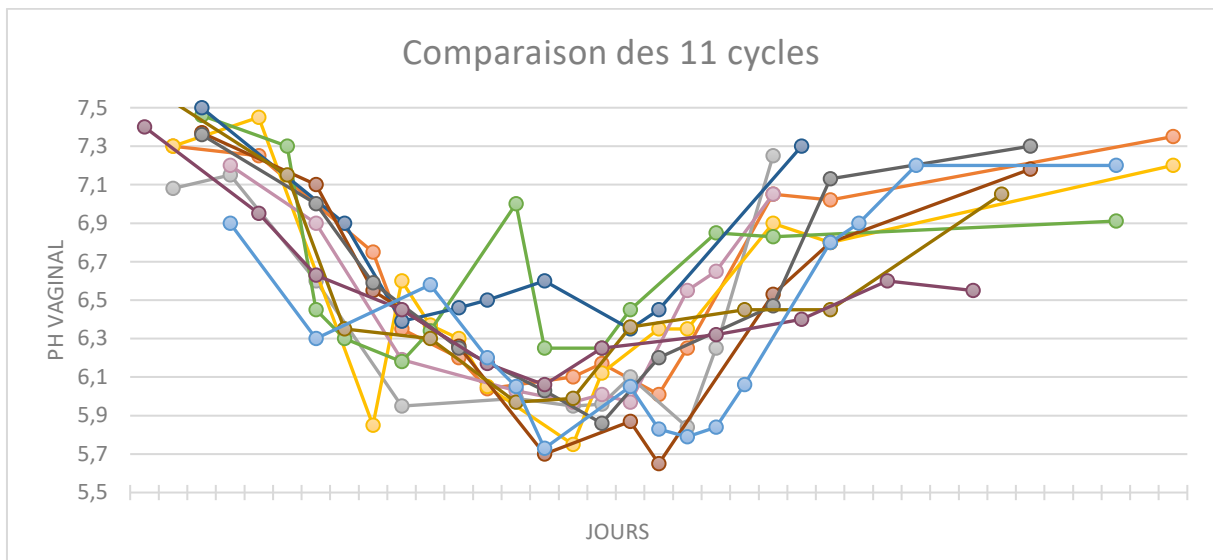


Figure 20 : Comparaison du pH vaginal au cours des œstrus de onze cycles sexuels.

Il est possible d'extrapoler nos résultats obtenus afin d'obtenir une courbe moyenne du pH vaginal au cours du cycle sexuel de la chienne. ([Figure 21](#) et [Annexe 26](#)).

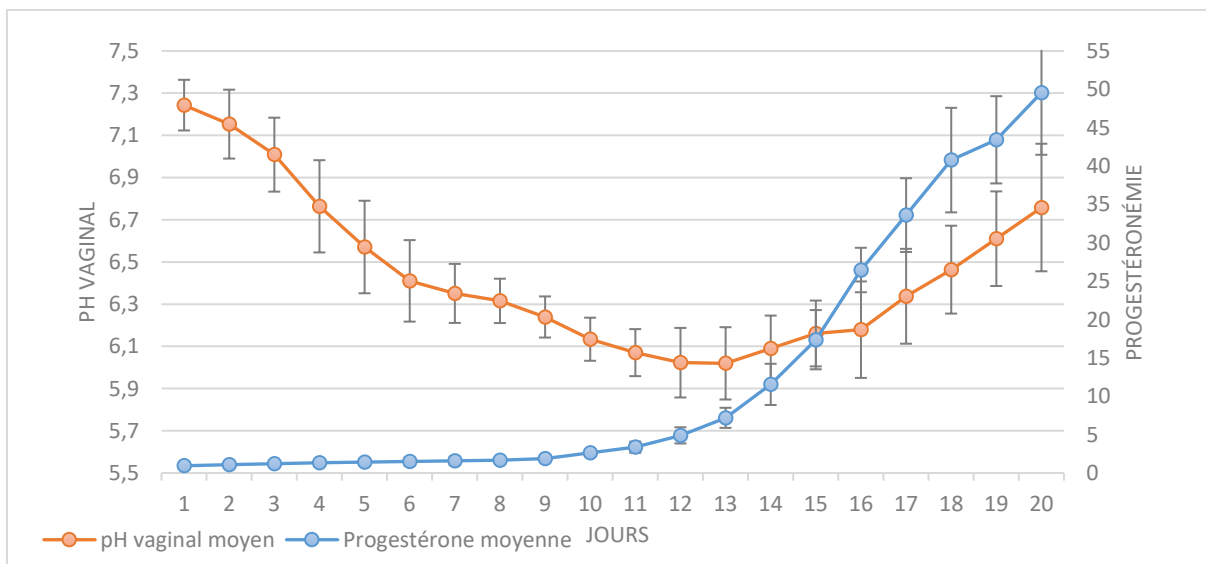


Figure 21 : Moyenne et écart-types du pH vaginal des onze cycles en fonction de la progestéronémie moyenne (en ng/mL).

Sur ce graphe, on constate que les écart-types et les coefficients de variation sont faibles, notamment pendant le proœstrus/œstrus ce qui signifie que les valeurs des onze cycles sont peu dispersées autour de la moyenne. On a donc bien une diminution qui semble significative du pH vaginal lors de cette période du cycle sexuel de la chienne, avec ensuite une remontée du pH qui ne se fait pas à la même vitesse selon les chiennes (ce que l'on voit grâce aux écart-types et coefficients de variation qui augmentent).

d) Relation entre alimentation et pH vaginal

Bien qu'il n'y ait eu au final que trois chiennes dont nous connaissons la variation de pH vaginal lorsqu'elles sont ou non complémentées (quatre chiennes si on accepte la chienne 1 qui n'a reçu que quatorze jours de complémentation avant la première insémination théorique), il est possible de tirer des ébauches de résultats sur l'effet de la complémentation calcique et magnésique sur le pH vaginal de la chienne.

Un graphique rassemblant les courbes des variations du pH vaginal pendant les deux cycles (complémenté ou non) d'une même chienne peut être tracé (Figures 22 à 25). Comme précédemment, deux points de même abscisse correspondent au pH vaginal de la chienne dont les progestéronémies sont similaires. La période où la fécondation des ovocytes est possible est représentée par un cercle en pointillés rouges.

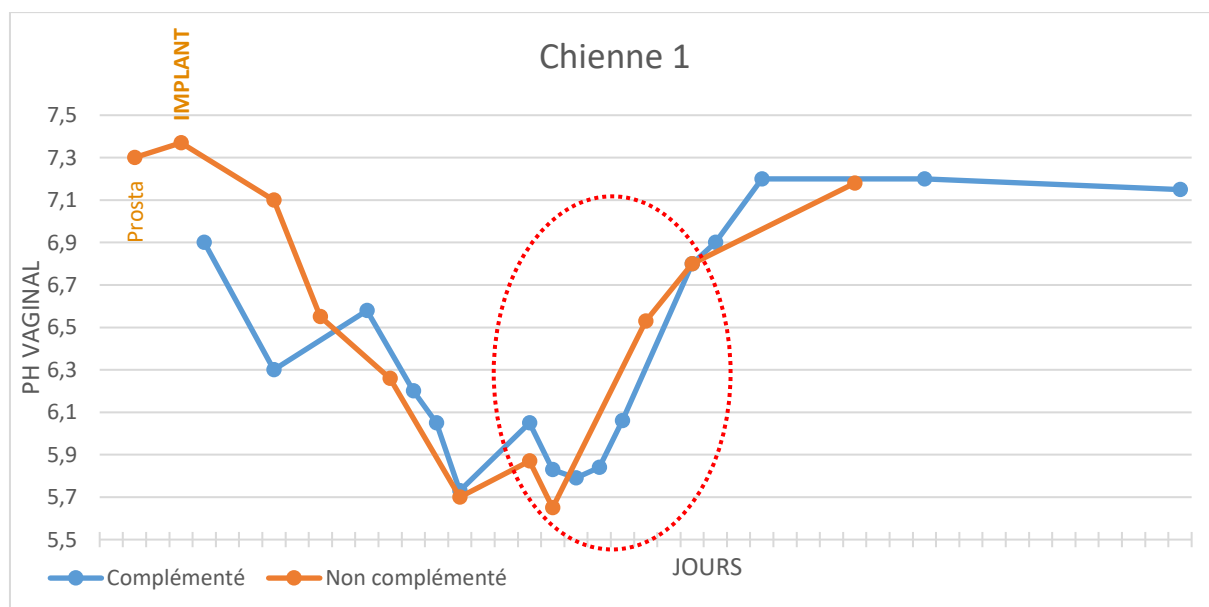


Figure 22 : Comparaison du pH vaginal pendant les deux cycles de la chienne 1.

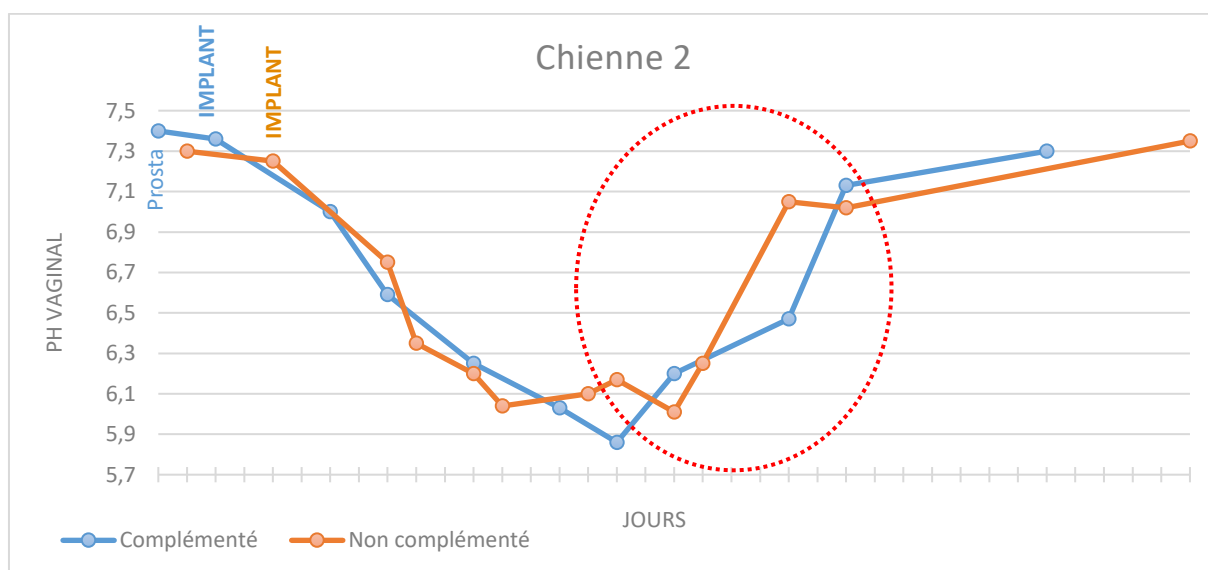


Figure 23 : Comparaison du pH vaginal pendant les deux cycles de la chienne 2.

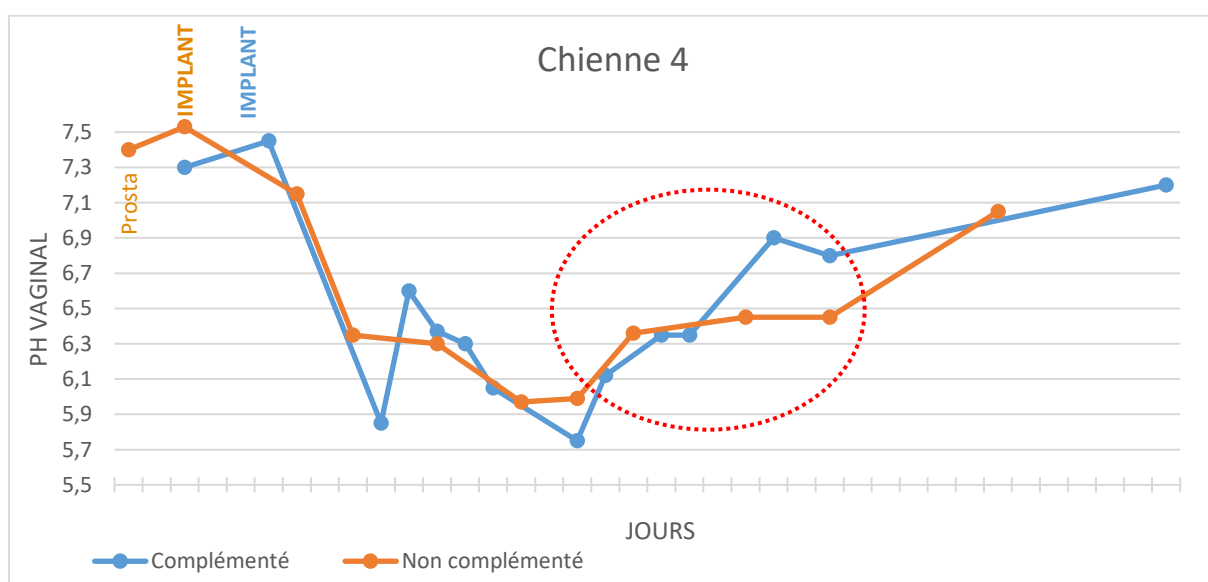


Figure 24 : Comparaison du pH vaginal pendant les deux cycles de la chienne 4.

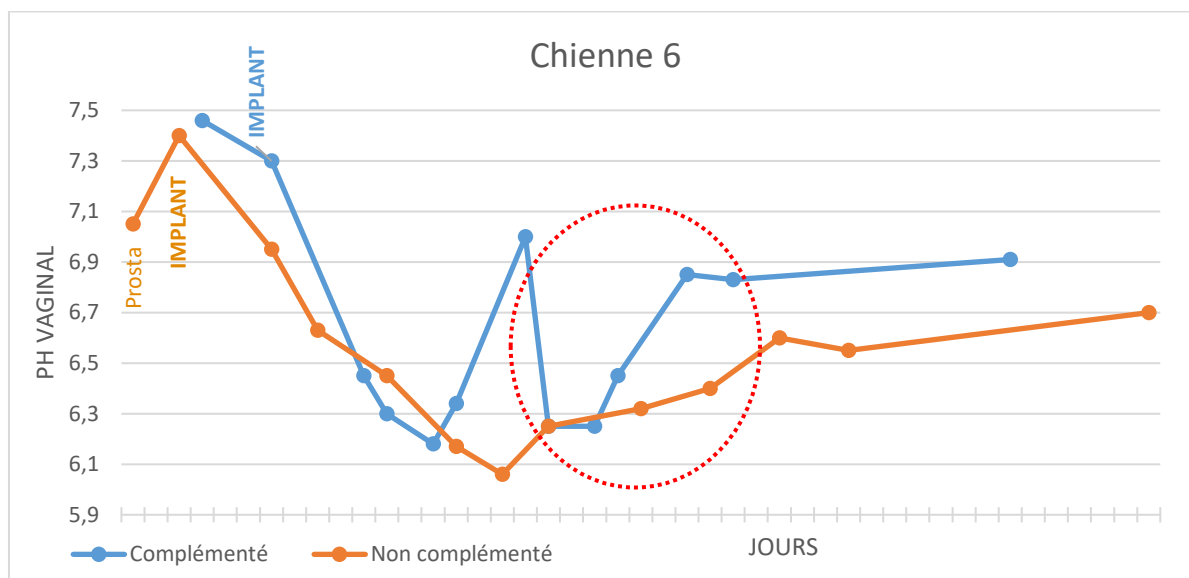


Figure 25 : Comparaison du pH vaginal pendant les deux cycles de la chienne 6.

Nous voyons en effet sur ces figures qu'à chaque fois les deux courbes sont assez similaires. Il n'y a que la chienne 6 dont le pH vaginal remonte plus vite quand elle est complémentée comparé à quand elle ne l'est pas. Globalement, la complémentation ne semble pas changer de façon majeure le pH vaginal de la chienne pendant son cycle sexuel.

On peut également chercher à établir la courbe des pH vaginaux moyens pour les chiennes complémentées ou non pas afin de voir si elles diffèrent beaucoup (Figure 26 et Annexes 25 et 26).

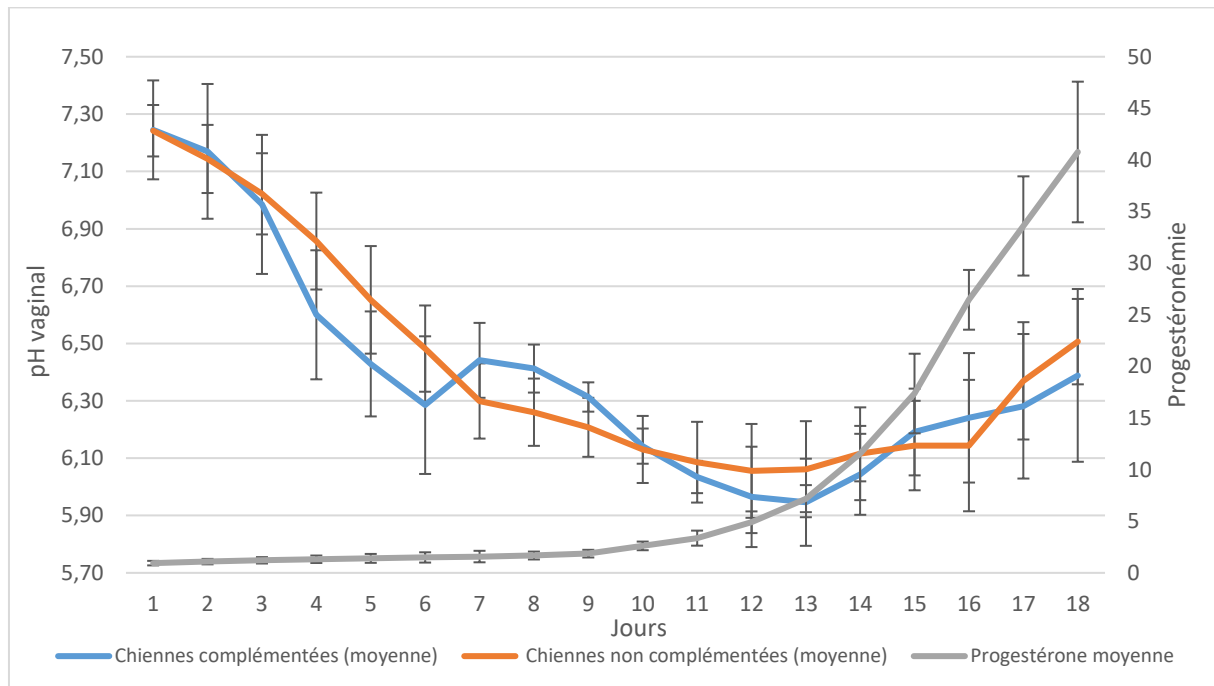


Figure 26 : Comparaison du pH vaginal moyen des chiennes complémentées ou non en fonction de la progestéronémie moyenne (en ng/mL).

Les barres d'écart-type se recoupent à chaque mesure, il ne semble donc pas y avoir de différence significative entre les pH vaginaux des chiennes complémentées et ceux de celles qui ne le sont pas. En revanche, le pH vaginal des chiennes non complémentées semble plus stable que celui des chiennes complémentées.

e) Résultats de l'étude statistique

On trace d'abord le nuage de points des pH vaginaux des chiennes en fonction de leur progestéronémie (Figure 27).

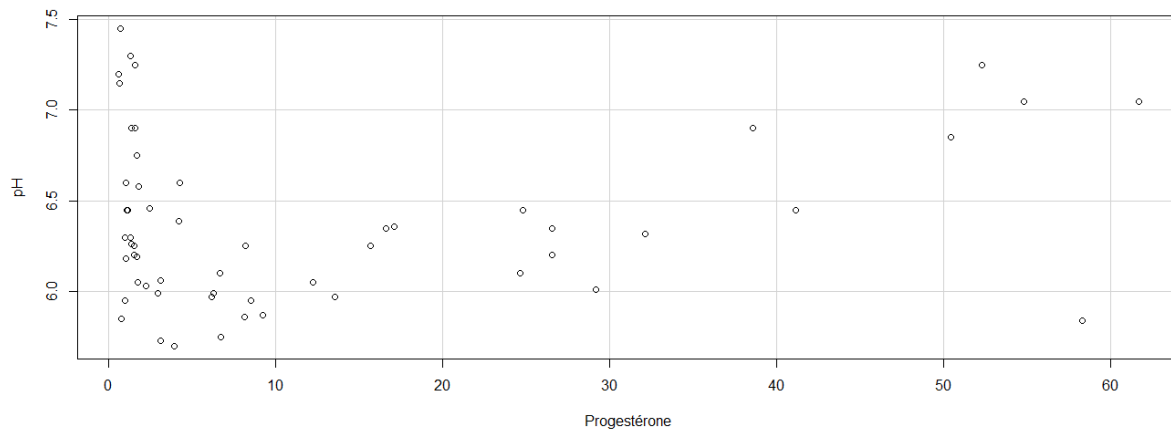


Figure 27 : Nuage de points des pH vaginaux des chiennes en fonction de leur progestéronémie (en ng/mL).

On remarque que les points semblent s'aligner sur deux droites distinctes : une de pente négative lorsque la progestéronémie est inférieure à 4ng/mL (**Figure 28**) et une de pente positive lorsqu'elle est supérieure à 4ng/mL (**Figure 29**).

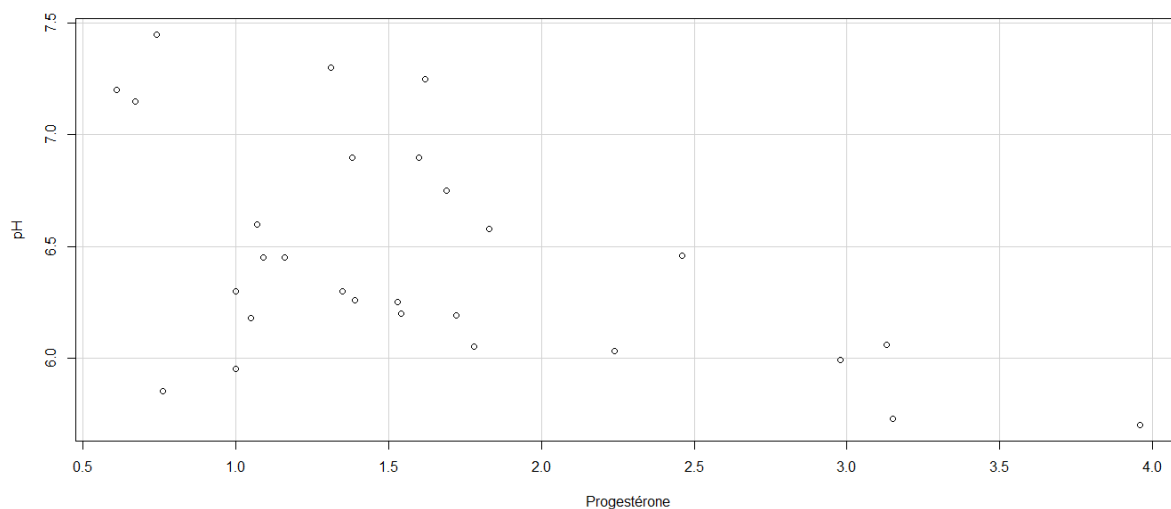


Figure 28 : Nuage de points des pH vaginaux des chiennes pour une progestéronémie inférieure à 4ng/mL.

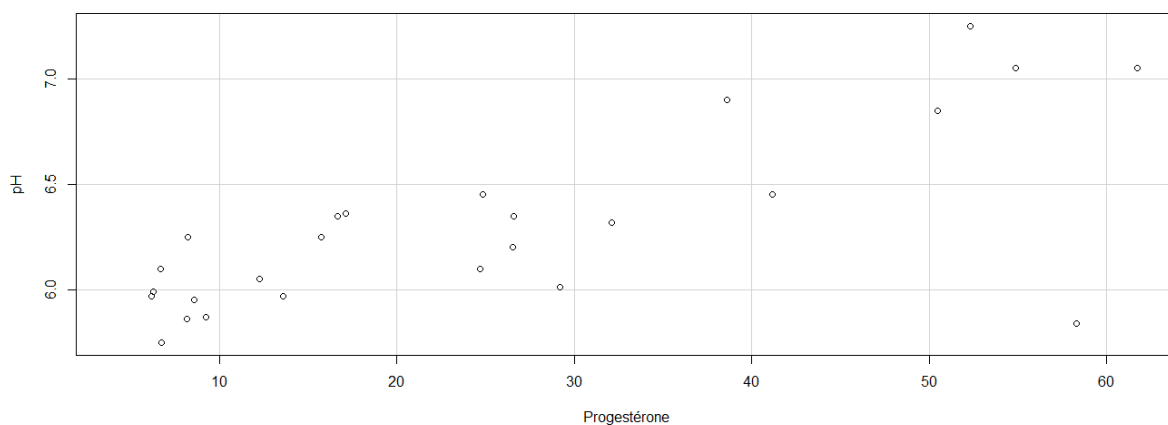


Figure 29 : Nuage de points des pH vaginaux des chiennes pour une progestéronémie supérieure à 4ng/mL.

On cherche donc à tracer ces deux droites grâce à un modèle linéaire à effets mixtes (script et tableau de données en [Annexes 22 et 23](#)), et on obtient les résultats suivants ([Figures 30 et 31](#) et [Tableaux 34 et 35](#)) :

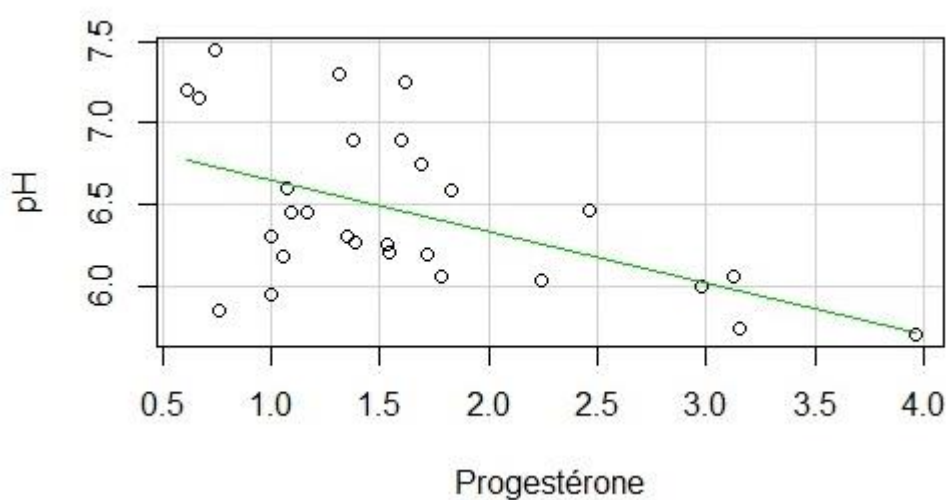


Figure 30 : Modélisation pour une progestéronémie inférieure à 4ng/mL.

	Valeur	Ecart-type	p-value
Ordonnée à l'origine	6,964	0,181	0,000
Pente	-0,317	0,099	0,006

Tableau 34 : Résultats de la modélisation pour une progestéronémie inférieure à 4ng/mL.

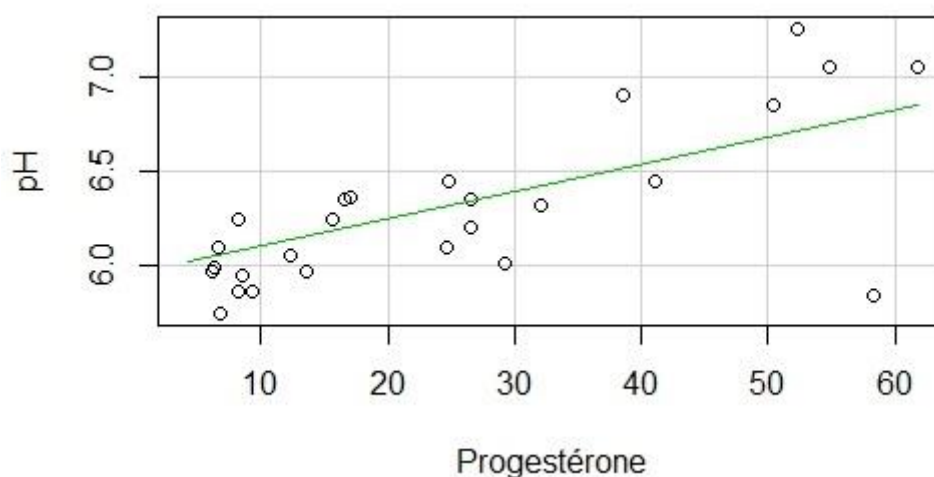


Figure 31 : Modélisation pour une progestéronémie supérieure à 4ng/mL.

	Valeur	Ecart-type	p-value
Ordonnée à l'origine	5,943	0,100	0,000
Pente	0,015	0,003	$3,10^{-4}$

Tableau 35 : Résultats de la modélisation pour une progestéronémie supérieure à 4ng/mL.

Les p-values sont largement inférieures à 0,05 ce qui prouve que nos modélisations sont valides. On peut ainsi conclure à une chute brutale (pente de -0,317) et significative du pH vaginal lorsque la progestéronémie est inférieure à 4ng/mL et une remontée progressive (pente de 0,017) lorsqu'elle est supérieure à 4ng/mL. Ainsi nos impressions sont confirmées et le pH vaginal chute bien significativement lors du proœstrus et du début d'œstrus et remonte ensuite plus lentement à la fin de la période fertile.

3) Discussion

a) Vérification des doses de complémentations minérales

i) Dose calcique ingérée

Dans notre expérience, nous sommes allés jusqu'à 0,85gCa/kgPM/j, ce qui est inférieur à la dose maximale recommandée. Aucun effet secondaire, tel que de la constipation, n'a été observé au cours de nos expériences.

ii) Dose magnésique ingérée

Il n'existe pas de dose maximale magnésique chez le chien, donc il n'y a pas d'apport connu à ne pas dépasser.

iii) Dose de vitamine D₃ ingérée

Ici, une attention particulière a été portée afin de ne pas dépasser de façon excessive les soixante jours au maximum de complémentation puisque celle-ci se situait entre 1,9 et 2,4 µg/kgPM/j. Ces soixante jours ont été dépassés pour deux chiennes (les chiennes 5 et 7) lors de la phase 2. La vitamine D₃ intervenant dans la régulation de la calcémie, une prise de sang a été réalisée afin de contrôler la calcémie après 72 jours de complémentation pour la chienne 5 et 61 jours pour la chienne 7, et les calcémies des deux chiennes se sont révélées dans les normes. L'expérience a cependant été arrêtée pour ces deux chiennes ce jour-là.

b) Relation entre alimentation et pH vaginal

Pour des raisons économiques, nous n'avons pas pu reformuler la composition de croquettes, en abaissant la concentration en sodium et en potassium et en augmentant celle en calcium et magnésium, et les faire fabriquer. C'est ce qui avait été fait dans les nombreuses expériences dans d'autres espèces. Il a donc été choisi de rajouter un complément alimentaire en plus de la ration quotidienne de croquettes, qui à défaut de réduire l'apport en potassium et sodium, augmente celui de calcium et de magnésium. Ainsi nous n'avons apporté qu'un supplément minéral sans pouvoir appauvrir la ration en certains autres ions. Cela peut constituer une explication au fait que nous n'avons pas mis en évidence de différence de pH vaginal au cours du cycle sexuel en fonction de la complémentation ou non de la chienne. Peut-être qu'avec une ration complémentée en calcium et magnésium mais appauvrie en sodium et potassium, les pH vaginaux n'auraient pas été similaires.

Par ailleurs, il faut tenir compte du fait que nous n'avons pas pu nous appuyer sur la bibliographie pour déterminer la quantité de complément à donner aux chiennes. Il est donc possible que la dose quotidienne de complément que les chiennes recevaient était en fait insuffisante pour modifier le pH vaginal.

Une autre hypothèse serait que l'alimentation n'agit pas sur le pH vaginal mais sur un autre paramètre, indépendant du pH vaginal, qui influe sur la sélection préférentielle des spermatozoïdes.

On remarque cependant que le pH vaginal des chiennes complémentées semble moins stable que celui des chiennes non complémentées. Cela pourrait éventuellement participer à une sélection différentielle des spermatozoïdes chez les chiennes complémentées.

c) Variation du pH vaginal au cours du cycle sexuel de la chienne

La Figure 21 est à considérer avec quelques précautions car au vu du nombre de mesures de pH vaginal et de progestérone, nous avons calculé les valeurs des points entre deux mesures. Cependant, l'intérêt de cette courbe est de mettre en avant cette chute du pH vaginal que l'on retrouve dans chacun des onze cycles qui débute quelques jours avant l'augmentation de la progestéronémie, confirmée par notre étude statistique (Figures 30 et 31), puis sa remontée plus lente.

Dans la Figure 21, le point à pH = 7 à J21 chez la chienne 6 en phase 1 semble aberrant et n'a donc pas été pris en compte lors des calculs. Il est possible de trouver une explication à cette mesure aberrante, cela sera développé dans le paragraphe i) Anomalies remarquables.

Cette chute du pH vaginal pendant le proœstrus et l'œstrus semble très intéressante car elle n'a jamais été décrite aussi précisément chez la chienne. Cette chute de pH vaginal a été notée également chez la femelle hamster doré par PRATT (1987) mais les résultats n'ont jamais été publiés.

Son étude pourrait par exemple permettre de mettre en place une nouvelle méthode de détection de l'ovulation ou de suivi du cycle sexuel.

On remarque également que le pH vaginal commence à ré-augmenter lorsque la progestéronémie est autour de 10ng/mL, soit au moment de la première insémination artificielle pour sept des quatorze chiennes (Figures 6 à 17). Cette observation pourrait éventuellement constituer un moyen de détection du moment où il faut inséminer la chienne.

d) Dosage de progestérone

Les dosages de progestérone plasmatique ont été réalisés à l'aide de l'automate Minividas® de Biomérieux. Cet appareil est initialement conçu pour mesurer la progestéronémie à partir de prélèvements humains. Cependant les progestérones humaine et canine ont la même structure, le même poids moléculaire, *et cætera*, ce sont les mêmes molécules. Par ailleurs, BRUGGER et *al.* montrent en 2011 que l'utilisation de l'automate Minividas® de Biomérieux pour la détermination de la progestéronémie à partir de sang périphérique est fiable. L'utilisation de cet automate dans le cadre de cette thèse semble donc tout à fait acceptable.

Les prises de sang sont réalisées sur des tubes héparinés, d'une contenance de 1,3mL. Les échantillons sont pour la grande majorité centrifugés aussi rapidement que possible et analysés dans les deux heures après leur prélèvement. Dans le cas contraire, ils sont centrifugés dans les deux heures après leur prélèvement et le plasma est congelé à -25°C. VOLKMANN (2006) montre que la concentration en progestérone contenue dans un échantillon de sang prélevé sur tube hépariné n'était pas modifiée au bout de cinq heures. Le fabricant précise que les échantillons peuvent être conservés 48 heures maximum à 2-8°C, ou congelé à -25±6°C. Selon lui, une étude (non citée par le fabricant) réalisée sur des échantillons congelés pendant deux mois a montré que cela n'avait aucun impact sur la qualité des résultats. Les échantillons dans cette thèse ont tous été analysés moins de deux mois après leur congélation. Le fabricant conseille également de ne pas utiliser d'échantillons hémolysés, lipémiques ou ictériques, même s'il n'a pas été observé d'influence significative. Cette recommandation n'a pas été prise en compte.

Il faut également prendre en compte l'heure de prélèvement, car il a été montré que la progestéronémie subit de grandes variations tout au long de la journée (LINDE-FORSBERG et *al.*, 2008). De là découlent des remarques :

- Cela peut expliquer les valeurs parfois surprenantes qu'on obtenait pour certaines chiennes dont la progestérone semblait osciller au lieu de décroître, suite aux injections de prostaglandines.
- Il faut en tenir compte dans l'analyse des résultats.

Pour pallier à ces variations, les prises de sang étaient quasiment toutes réalisées le matin vers 10h, sinon elles étaient faites le midi, et quelques rares prises de sang ont été faites dans l'après-midi. Ainsi, on peut supposer que nos progestéronémies soient globalement comparables entre elles d'un jour sur l'autre.

e) Mesure de pH vaginal

Il a été difficile de trouver un moyen fiable de mesurer le pH. Les premiers essais ont été réalisés en mai et juin 2016 et ont pris plusieurs semaines pour pouvoir mettre en place un protocole fiable et répétable. Nous ne pouvions utiliser du papier pH, dont la couleur varie en fonction du pH, puisque les pertes sanguinolentes qui ont lieu pendant le proœstrus masque la couleur du papier. Les essais avec une sonde à pH habituelle n'ont pas non plus été fructueux puisque l'électrode ne fonctionne qu'en étant immergée dans un liquide et là elle n'était pas suffisamment en contact avec les sécrétions vaginales. Nous avons donc investi dans une sonde à pH qui fonctionne par contact. Les premiers essais nous ont montré que, bien que le pH varie en fonction de l'endroit et de la position de la sonde, la mesure du pH est répétable si la sonde est toujours placée au même endroit. C'est ainsi que nous avons décidé de toujours mesurer au moins deux fois consécutives le pH sur la paroi gauche du vagin, à environ 7,5 centimètres de la vulve (distance marquée par un trait blanc présent sur la sonde). Par ailleurs, les mesures ont été très majoritairement réalisées par le même opérateur, ce qui permet d'être sûr que le pH est toujours mesuré au même endroit.

L'utilisation ou non d'un vaginoscope pour placer la sonde dans le vagin de la chienne ne change en rien, selon nous, la valeur mesurée par le pHmètre puisque le vaginoscope est très court (5cm), dépourvu de toute trace de désinfectant, et est retiré dès que la sonde à pH est placée dans le vagin. Par ailleurs, deux semaines après le début des expériences, l'emploi du vaginoscope n'était plus nécessaire à la mise en place de la sonde à pH dans le vagin. La manœuvre étant indolore pour les chiennes, il est rapidement devenu possible de la réaliser seule, sans aide pour tenir la chienne.

f) Venue en chaleurs

Il n'était pas initialement prévu que le cycle sexuel des chiennes soit déclenché par la pose d'un implant de desloréline. Ce choix a été fait de sorte que l'œstrus des chiennes arrive

à un moment où des mesures répétées du pH vaginal étaient possibles. La première contrainte était qu'il fallait être à plus de deux mois de l'œstrus précédent. La seconde était de lyser le corps jaune chez les chiennes qui étaient encore en metœstrus grâce à des injections répétées de prostaglandines, ce qui a pris beaucoup de temps pour certaines chiennes (et beaucoup d'injections, 18 pour la chienne 7 lors de la première phase), et ce qui n'a pas été réussi chez les chiennes 5 et 7 lors de la seconde phase, malgré de très nombreuses injections (20 pour la chienne 5 et 26 pour la chienne 7, différentes explications sont proposées ci-après).

Les injections de prostaglandines ont été faites toutes les 48-72h. Le protocole diffère légèrement de celui de GALODE (2014). Cela peut expliquer que l'on ait dû faire de nombreuses injections à la chienne 7 lors de la première phase pour obtenir une progestéronémie inférieure à 1ng/mL sur deux dosages consécutifs, ou que l'on n'ait pas réussi à terminer le metœstrus chez les chiennes 5 et 7 lors de la seconde phase.

Ainsi, certaines chiennes sont venues en chaleurs seules lors de la première phase, alors que d'autres ont été déclenchées par la pose d'un implant de desloréline. Cela constitue le premier biais de notre étude. Par ailleurs, les chiennes n'ont pas été en œstrus au même moment, ce qui peut éventuellement constituer un autre biais, puisque le climat n'était pas le même en septembre ou en novembre, et qu'on ne sait pas dans quelle mesure le climat peut affecter l'environnement vaginal, même si a priori on suppose que la composition du milieu vaginal reste la même quelle que soit la saison.

Lors de la seconde phase, les chiennes 5 et 7 n'ont pas pu être implantées car la condition « deux dosages de progestérone inférieurs à 1ng/mL à 48 heures d'intervalle » n'a jamais été atteinte. Les injections de prostaglandines avaient pourtant été démarrées après au moins deux mois de metœstrus. Une première explication pour la chienne 5 serait qu'elle aurait pu être implantée à un moment mais que les injections avaient été continuées afin de synchroniser son implantation avec celle de la chienne 7, et peut être s'est-elle « habituée » aux prostaglandines, résultant en une baisse de la réponse aux injections et à une légère augmentation de sa progestéronémie, la rendant supérieure à 1ng/mL. Pour la chienne 7, lors de la première phase, il avait déjà fallu 18 injections de prostaglandines, ce qui est beaucoup comparé au nombre d'injections que GALODE (2014) avait dû faire. Lors de la seconde phase,

après deux mois de metœstrus, la chienne 7 restait la chienne la plus maigre du groupe (note d'état corporel de 4/9). Peut-être que cela peut expliquer le délai rencontré pour mettre fin au metœstrus.

Une autre explication concernant l'impossibilité de mettre fin au metœstrus de la chienne 7 est que cinq jours après l'arrêt des prostaglandines, un pyomètre a été diagnostiqué. Celui-ci n'était pas clinique avant l'arrêt des injections car la chienne recevait des injections de prostaglandines qui favorisaient la vidange de l'utérus. Mais il devait déjà être présent en sous-jacent, ce qui explique peut-être l'échec à mettre fin au metœstrus de la chienne 7.

g) Choix de ne pas inséminer

Il aurait été intéressant d'inséminer les chiennes afin de vérifier notre théorie selon laquelle une complémentation calcique diminue le sexe-ratio des portées. Mais pour cela, il aurait fallu inséminer 2x7 chiennes et

- Soit diagnostiquer les sexes de chaque fœtus à 35 jours de gestation, avec une marge d'erreur non quantifiable (PRUGNARD et *al.*, 2016) puis les faire avorter à un stade de gestation avancé.
- Soit les laisser mener à terme leur gestation puis euthanasier les chiots nouveau-nés, ce qui nous pose un problème éthique.
- Soit les laisser mener à terme leur gestation et replacer la cinquantaine de chiots.

Il a donc été décidé, pour pallier à ce problème, de compléter des chiennes d'éleveurs canins, afin de n'avoir à sacrifier aucun chiot. Les démarches pour contacter les propriétaires ont été entreprises. En septembre 2016, quatre éleveurs avaient accepté de nous confier l'alimentation d'au moins deux chiennes de leur élevage. Cependant, la réalisation de la première phase de notre thèse consistant à mesurer les pH vaginaux s'est révélée dense en travail et en investissement, et il est rapidement apparu qu'il serait impossible de réaliser cette seconde phase de complémentation de chiennes d'éleveurs pour cette thèse. Cette étape fera, espérons-le, l'objet d'une future thèse vétérinaire.

h) Comprimés de calcium

Lors de la rédaction de notre protocole, il nous a fallu choisir un complément alimentaire calcique suffisamment riche et facile à donner. Notre choix s'est portée vers les comprimés Pet-Phos Croissance Grand Chien Ca/P=2 NDV du laboratoire Ceva. Ces comprimés étaient trop grands (4,5 cm de long pour 1 cm de large, Annexe 27) pour être donnés ainsi, ils étaient donc coupés en petits morceaux avant d'être mélangés aux croquettes des chiennes. Le souci était que lorsque les chiennes mangeaient moins, comme lors du proœstrus et de l'œstrus, soit les chiennes triaient leur gamelle et ne mangeaient que leurs croquettes, soit elles ne touchaient pas du tout à leur gamelle. Il était impossible de mettre les comprimés directement au fond de la gueule des chiennes à cause de leur taille, ni une fois coupés, à cause de la quantité à faire avaler. Ainsi, lors des chaleurs de certaines chiennes, la prise de leur complément calcique a été retardée ; au lieu d'être ingéré en même temps que le reste de la gamelle en quelques minutes vers 9h du matin, la gamelle était progressivement ingérée au cours de la journée. Mais finalement, cela n'a concerné que la chienne 6 et dans une moindre mesure, les chiennes 1 et 2, lors de la première phase.

Un autre biais à signaler est que toutes les chiennes n'ont pas reçu la même durée de complémentation, certaines ont reçu le complément pendant moins de 3 semaines (la chienne 1 lors de la première phase expérimentale), d'autres pendant plus longtemps. Lors de la première phase, la chienne 1 est venue en chaleurs beaucoup plus rapidement que prévu : elle n'a reçu que 14 jours de complémentation avant sa première insémination théorique, alors que le protocole voulait que les chiennes soient complémentées au moins 3 semaines avant l'IA1. Il se pourrait que 14 jours ne soient pas suffisants pour percevoir une modification du pH vaginal induit par la complémentation.

i) Anomalies remarquables

Certaines chiennes ont été utilisées à notre insu pour des TP de sondage urinaire (chiennes 3 et 6 lors de la phase 1) ou pour une endoscopie vaginale le même jour (chienne 6 phase 1). Nous suspectons que ces manipulations soient à l'origine de la remontée de pH vaginal observée deux jours après les manipulations pour la chienne 6, surtout que ces dernières lui avaient occasionné quelques saignements d'origine vaginale, le sang étant à un pH de 7,2-7,3. Concernant la chienne 3, douze jours après le sondage urinaire, des

polynucléaires neutrophiles sont observés au frottis vaginal. Nous ne pouvons pas être certains du lien entre ces deux événements mais on ne peut pas non plus exclure tout lien entre les deux. Toujours est-il que le pH vaginal de la chienne 3 a très nettement chuté entre le TP sondage urinaire et la mise en évidence des polynucléaires neutrophiles pour finalement remonter à des valeurs attendues une dizaine de jours plus tard, où aucun polynucléaire n'était ensuite retrouvé à la cytologie.

4) Perspectives

Notre expérience a porté sur un petit groupe de chiennes, à une dose de complémentation arbitraire. Il serait intéressant de la recommencer avec un cheptel plus grands (une cinquantaine de chiennes) ou bien d'augmenter la dose de compléments donnés pour voir si l'on peut dégager des résultats plus significatifs.

Puisque la finalité de cette thèse était de modifier le sexe-ratio, elle devait initialement comporter deux expériences menées parallèlement : la première consistait à compléter des chiennes en calcium et en magnésium et à mesurer leur pH vaginal durant leur cycle sexuel afin d'essayer de dégager une différence du pH vaginal autour de la conception en fonction du régime maternel, expliquant des possibles modifications du sexe-ratio des portées. La seconde, quant à elle, devait consister à compléter des chiennes d'éleveurs avec les mêmes compléments alimentaires afin de confirmer cette modification du sexe-ratio en faveur de portées avec un sexe-ratio inférieur à 50% (il y aurait donc plus de chiots femelles que mâles à naître). Bien que quatre éleveurs aient accepté de faire participer au moins deux de leurs chiennes, cette seconde expérience n'a pas été menée, la première étant déjà très chronophage. Nous espérons que cette seconde expérience sera l'objet d'une prochaine thèse.

Les résultats que nous avons trouvés sont très encourageants. Premièrement, notre méthode pour mesurer le pH vaginal semble tout à fait adéquate pour la tâche : à la fois indolore et répétable, la mesure du pH vaginal se fait aisément. Deuxièmement, notre mise en évidence d'une chute du pH vaginal au début de la période fertile puis sa remontée à la fin de cette dernière nous permet d'imaginer la mise en place d'une nouvelle méthode afin de

suivre le cycle sexuel de la chienne. Par ailleurs, plus de la moitié de chiennes de notre étude expérimentale ont montré une remonté du pH vaginal lorsque la progestéronémie est aux alentours de 10ng/mL, soit au moment opportun pour la première insémination artificielle. La détection de cette augmentation du pH pendant la période fertile pourrait également constituer une nouvelle méthode indolore et rapide pour détecter le jour où devrait se faire l'insémination.

Cette thèse n'est qu'une ébauche du travail à faire dans le domaine de la sélection préconceptionnelle du sexe chez la chienne. De nombreux autres paramètres que le pH vaginal pourraient être suivis afin de peut-être comprendre un jour la façon dont l'alimentation maternelle peut influencer sur le sexe des descendants.

Conclusion

Depuis toujours, l'Homme cherche à percer les mystères entourant la détermination du sexe de l'enfant à naître, que ce soit pour des raisons de préférence personnelle pour un sexe ou pour des raisons culturelles. Avec l'avancée de la science, on sait également désormais que certaines maladies héréditaires sont liées au sexe, et alors choisir le sexe de son futur enfant revient à faire naître un enfant en bonne santé.

Devant les difficultés financières auxquelles les éleveurs doivent faire face, la sélection du sexe des progénitures de leur bétail serait un moyen de prévoir leur avenir et de maximiser leur rendement.

Il existe de nombreux moyens pour parvenir à faire naître un enfant du sexe désiré, mais bon nombre sont aujourd'hui interdits par la loi. Un des moyens ne nécessitant ni manipulation d'ADN, ni avortement sélectif, est la sélection préconceptionnelle du sexe de l'enfant en passant par un régime alimentaire maternel contrôlé, plusieurs mois avant la conception de l'enfant.

Partant de l'observation qu'en fonction des apports en minéraux que contenait l'alimentation maternelle chez la Femme, la vache, la ratte et autres mammifères, le sexe-ratio pouvait être modifié, nous avons cherché à vérifier que cela s'appliquait également à la chienne. En effet, il n'est pas rare de voir les éleveurs canins préférer faire naître des chiots femelles que des chiots mâles (plus grande demande des futurs adoptants, prix de vente plus élevé, plus grand choix de futures reproductrices...).

Ainsi, nous avons complémenté des chiennes en calcium, magnésium et vitamine D₃, et mesuré leur pH vaginal au cours du cycle sexuel. Si nous n'avons, dans cette thèse, pas réussi à mettre en évidence une différence significative entre le pH vaginal des chiennes complémentées et celui des chiennes qui ne l'étaient pas, nous avons cependant mis en avant une chute rapide et marquée du pH vaginal à partir du proœstrus puis un retour plus lent au pH vaginal initial, commençant aux alentours du jour où la première insémination artificielle devrait être réalisée, quel que soit le régime alimentaire. Cette observation ouvre de nouvelles

perspectives dans le domaine de la reproduction de la chienne, et plus précisément dans le suivi du cycle sexuel, et sera l'objet d'un poster lors du congrès ESDAR 2017 (European Society for Domestic Animal Reproduction ou Société Européenne pour la Reproduction des Animaux de Compagnie, Annexe 28).

Le pH vaginal n'est qu'un des facteurs sur lequel l'alimentation maternelle pourrait jouer. Cette thèse conduit à de nouveaux sujets de thèses, voire de recherche, dans le but de comprendre le lien entre l'alimentation de la chienne et le sexe-ratio de ses portées, et de peut-être réussir un jour à formuler un aliment maternel en fonction du sexe-ratio voulu dans les portées.

Bibliographie

ALEXENKO A. P, MAO J, ELLERSIECK M. R, DAVIS A. M, WHYTE J. J, ROSENFELD C. S, ROBERTS R. M. (2007), The Contrasting Effects of Ad Libitum and Restricted Feeding of a Diet Very High in Saturated Fats on Sex Ratio and Metabolic Hormones in Mice. *Biology of Reproduction* ; 77(4) : 599-604.

ANDERSON R. N, SMITH B. L. (2003), Deaths: Leading Causes for 2001. *National Vital Statistics Reports* ; 52(9) : 1-86.

BARLOW P, VOSA C. G. (1970), The Y Chromosome in Human Spermatozoa. *Nature* ; 226 : 961-962.

BECK. J, HERSCHEL S, HUNGERSHÖFER R, SCWINGER E. (1976), The Effect of Steroid Hormones on Motility and Selective Migration of X- and Y-bearing Human Spermatozoa. *Fertility and Sterility* ; 27(4) : 407-412.

BENENDO F. (1970), The Problem of Sex Determination in the light of our Own Investigations. *Endokrynologia Polska* ; 21(3) : 265-273.

BESSON C, VERWAERDE P, BRET-BENNIS L, PRIYMENKO N. (2005), L'évaluation clinique de l'état nutritionnel chez les carnivores domestiques. *Revue Méd Vét.* ; 156(5) : 269-274.

BIRD E, CONTRERAS R. J. (1986), Maternal Dietary Sodium Chloride Levels Affect the Sex Ratio in Rat Litters. *Physiology & Behavior* ; 86 : 307-310.

BLANCHARD G, PARAGON B-M. (2008), L'alimentation des chiens. *Paris : France Agricole* ; p.206.

BOLET G, GUEGUEN L, DANDO P, OLLIVIER L. (1982), Influence de l'Alimentation Minérale de la Truie sur le Taux de Masculinité à la Naissance. *Reproduction Nutrition Développement* ; 22(6) : 1073-1081.

BOUILLLOD C. (2013), Elaboration Pratique d'un Support Pédagogique et de Fiches Techniques Pour la Gestion de la Gestation chez le Chienne. Th. Méd. Vét : Lyon : Université Claude Bernard, 156p.

BRUCKNER TA, CATALANO R, AHERN J (2010), Male Fetal Loss in the U.S. Following the Terrorist Attacks of September 11, 2001. *BMC Public Health* ; 10 : 273p.

BRUGGER N, OTZDORFF C, WALTER B, HOFFMANN B, BRAUN J (2011), Quantitative Determination of Progesterone (P4) in Canine Blood Serum Using an Enzyme-linked Fluorescence Assay. *Repro. Dom. Anim.* ; 46 : 870-873.

CAMERON E. Z, LEMONS P. R, BATEMAN P. W, BENNETT N. C (2008), Experimental Alteration of Litter Sex Ratios in a Mammal. *Proc. R. Soc. B* ; 275(1632) : 323-327.

CATALANO R. A. (2003), Sex Ratios in the Two Germanies: a Test of the Economic Stress Hypothesis. *Hum. Reprod.* ; 18(9) : 1972-1975.

CHASON R. J, McLAIN A. C, SUNDARAM R, CHEN Z, SEGARS J. H, PYPER C, BUCK LOUIS G. M. (2012), Preconception Stress and the Secondary Sex Ratio: a Prospective Cohort Study. *Fertility and Sterility* ; 98(4) : 937-941.

CHRISTIANSEN K. (1998), Behavioral Correlates of Testosterone. *In* : NIESCHLAG E, BEHRE H. M, Testosterone. *Springer* : 107-142.

CLUTTON-BROCK T. H, ALBON S. D, GUINNESS F. E. (1981), Parental Investment in Male and Female Offspring in Polygynous Mammals. *Nature* ; 289 : 487-489.

CLUTTON-BROCK T. H, IASON G. R (1986), Sex Ratio Variation in Mammals. *The Quarterly Review of Biology* ; 61(3) : 339-374.

CLUZAN R, CAUSERET J, HUGOT D (1965), Le Métabisulfite de Potassium, Etude de Toxicité à Long Terme sur le Rat. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* ; 5(2) : 267-281.

DAUDIN J. (1982), Contribution à l'Etude de la Déviation du Sex-ratio Une Expérimentation sur un Cheptel Bovin à Dominance Charollaise (Allier). Th. Méd. Vét. Lyon : Université Claude Bernard, 77p.

DARWIN C. (1871), The Descent of Man. *D. Appleton and Compagny*, 447p.

DEBRAEKELEER J, GROSS K. L, ZICKER S. C. (2010), Feeding Reproducing Dogs. *In* : HAND M. S, THATCHER C. D, REMILLARD R. L, ROUDEBUSH P, NOVOTNY B. J, Small Animal Clinical Nutrition 5th Edition. *Mark Moris Institute* ; chapter 15 : 281-292.

DIASIO R. B, GLASS R. H (1971), Effects of pH on the Migration of X and Y Sperm. *Fertility and Sterility* ; 22(5) : 303-305.

DOAK R. L, HALL A, DALL H. E. (1967), Longevity of Spermatozoa in the Reproductive Tract of the Bitch. *J. Reprod. Fertil.* ; 13 : 51-58.

- EDESSY M, EL RASHEDY M. I, EL BATAL K, AHMED S, BADAWEY M, OUN A. E, BENDARY A. (2016), Pre-conceptional Maternal Diet and Fetal Sex Pre-selection. *Int. J. Curr. Res. Med. Sci.* ; 2(12) : 8-13.
- FASCETTI A. J, DELANEY S. J. (2012), Applied Veterinary Clinical Nutrition. *Chichester, Wiley-Blackwell* ; p.399.
- FISHER R. A. (1958), The Genetical Theory of Natural Selection. *Oxford University Press*, 1930, republié par *Dovers Publications* ; 291p.
- FOX C. A, MELDRUM S. J, WATSON B. W (1973), Continuous Measurement by Radio-Telemetry of Vaginal pH during Human Coitus. *J. Reprod. Fert.* ; 33 : 69-75.
- FUKUDA M, FUKUDA K, SHIMIZU T, MOLLER H. (1998), Decline in Sex Ratio at Birth after Kobe Earthquake. *Hum. Reprod.* ; 13 : 2321-2322.
- GALODE M (2014), Essai d'Induction des Chaleurs avec un Implant de Desloréline chez la Chienne en Mœœstrus après Interruption du Cycle au Cloprosténol. Th. Méd. Vét. Nantes : Faculté de Médecine de Nantes, 214p.
- GHARAGOZLOU F, YOUSSEFI R, AKBARINEJAD V. (2016), Effects of Diets Supplemented by Fish Oil on Sex Ratio of Pups in Bitch. *Veterinary Research Forum* ; 7(2) : 105-110.
- GRAFFELMAN J, FUGGER E. F, KEYVANFAR K, SCHULMAN J. D (1999), Human Live Birth and Sperm-sex Ratios Compared. *Human Reproduction* ; 14(11) : 2917-2919.
- GRANT V. J, IRWIN R. J. (2005), Follicular Fluid Steroid Levels and Subsequent Sex of Bovine Embryos. *Journal of Experimental Zoology* ; 303A(12) : 1120-1125.
- GRANT V. J, IRWIN R. J, STANDLEY N. T, SHELLING A. N, CHAMLEY L. W. (2008), Sex of Bovine EMmryos May Be Related to Mother's Preovulatory Follicular Testosterone. *Biology of Reproduction* ; 78(5) : 812-815.
- GUERRERO R. (1975), Type and Time of Insemination within the Menstrual Cycle and the Human Sex Ratio at Birth. *Studies in Family Planning* ; 6(10) : 367-371.
- HARDY I. C. W. (1997), Possible Factors Influencing Vertebrate Sex Ratios: an Introductory Overview. *Applied Animal Behavior Science* ; 51(3-4) : 217-241.
- HARLAP S. (1979), Gender of Infants Conceived on Different Days of the Menstrual Cycle. *The New England Journal of Medicine* ; 300(26) : 1445-1448

HARTMANN M, LEWINSKI G (1938), Untersuchungen über die Geschlechtsbestimmungen und Geschlechtsumwandlung von *Ophryotroca puerilis*. II. Versuche über die Wirkung von Kalium, Magnesium und Kupfer. *Zool. Jahrb.* ; 58 : 551-574.

HEINZE T, RIEDEWALD S, SALING E. (1989), Determination of Vaginal pH y pH Indicator Strip and by pH Micro Electrode. *J. Perinat. Med.* ; 17 : 477-479.

HELLE S, LAAKSONEN T, ADAMSSON A, PARANKO J, HUITI O. (2008), Female Field Voles with High Testosterone and Glucose Levels Produce Male-biased Litters. *Animal Behavior* ; 75(3) : 1031-1039.

HERBST C. (1935), Untersuchungen zur Bestimmung des Geschlechts. II. Die abhängigkeit des Geschlechts von Kaliumgehalt des umgebenden Mediums bei *Bonellia viridis*. *Roux Archiv. F. Entwicklung Mech.* ; 132.

HUCK U. W, PRATT N. C, LABOV J. B, LISK R. D. (1988), Effects of Age and Parity on Litter Size and Offspring Sex Ratio in Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Reprod. Fert.* ; 83 : 209-214.

JEUSETTE I, DETILLEUX J, CUVELIER C, ISTASSE L, DIEZ M. (2004), *Ad libitum* Feeding Following Ovariectomy in Female Beagle Dogs: Effect on Maintenance Energy Requirement and on Blood Metabolites. *J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutri.* ; 88 : 117-121.

KIRK C. A. (2001), New Concepts in Pediatric Nutrition. *Veterinary Clinics of North America : Small Animal Practice* ; 31 : 369-392.

KLEEGMAN S. J. (1966), Can Sex be Predetermined by the Physician?. *In* : INGELMAN-SUNDBERG A, WESTIN B. (Eds.), *Fifth World Congress of Fertility and Sterility*, Stockholm, Sweden ; 109 : 109p.

KRAEMER S. (2000), The Fragile Male. *BMJ* ; 321(7276) : 1609-1612.

KRUGER D. J, NESSE R. M. (2004), Sexual Selection and the Male:Female Mortality Ratio. *Human Nature* ; 2 : 66-85.

LABOV J. B, HUCK U. W, VASWANI P, LISK R. D. (1986), Sex Ratio Manipulation and Decreased Growth of Male Offspring of Undernourished Golden Hamster. *Behav. Ecol. Sociobiol.* ; 18(4) : 241-249.

LAFLAMME D. P. (1997), Development and Validation of a Body Condition Score System for Dogs. *Canine Practice* ; 22 : 10-15.

LINDE-FORSBERG C, STRÖM HOLST B, FORSBERG M. (2008), Daily Progesterone Fluctuations During the Estrus Cycle in the Bitch. *6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, ISCFR*, Vienne, Autriche ; pp.2-3.

LOUGNON J, PICARD M. (1962), A Propos du Sex-ratio chez le Porc. *Journées Rech. Porcine en France* ; 14 : 65-74.

MATHEWS F, JOHNSON P. J, NEIL A. (2008), You Are What Your Mother Eats: Evidence for Maternal Preconception Diet Influencing Foetal Sex in Humans. *Proc. R. Soc. B.* ; 275(1643) : 1661-1668.

McMILLEN M. M. (1979), Differential Mortality by Sex in Fetal and Neonatal Deaths. *Science* ; 204(4388) : 89-91.

MEIKLE D. B, DRICKAMER L. C. (1986), Food Availability and Secondary Sex Ratio Variation in Wild and Laboratory House Mice (*Mus musculus*). *J. Reprod. Fert.* ; 78 : 587-591.

MITRA J, CHOWDHURY M. (1989), Glycerylphosphorylcholine Diesterase Activity of Uterine Fluid in Conditions Inducing Secondary Sex Ratio Change in the Rat. *Gamete Research* ; 23 : 415-420.

MOCARELLI P, BRAMBILLA P, GERTHOUX P. M, PATTERSON D. G JR, NEEDHAM L. L. (1996), Change in Sex Ratio with Exposure to Dioxin. *The Lancet* ; 348(9024) : 409p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES (2006), Nutrient Requirement of Dogs and Cats. *The National Academies Press*, Washington D.C ; p.398.

NICHOLS H. J, FULLARD K, AMOS W. (2014), Costly Sons Do Not Lead to Adaptive Sex Ratio Adjustment in Pilot Whales, *Globicephala melas*. *Animal Behavior* ; 88 : 203-209.

NOORLANDER A. M, GERAEDTS J. P. M, MELISSEN J. B. M. (2010), Female Gender Pre-selection by Maternal Diet in Combination with Timing of Sexual Intercourse – a Prospective Study. *Reproductive Biomedicine Online* ; 21(6) : 794-802.

OUN A. E, BAKRY S, SOLTAN S, TAHA A, KADRY E. (2016), Preconceptional Minerals Administration Skewed Sex Ratio in Rat Offspring. *Research in Obstetrics and Gynecology* ; 4(1) : 11-15.

PARKES A. S. (1925), Studies on the Sex-ratio and Related Phenomena. (7) The Foetal Sex-ratio in the Pig. *The Journal of Agricultural Science* ; 15(3) ; 284-299.

PARKES A. S. (1926), The Mammalian Sex-Ratio. *In* : Cambridge Philosophical Society, *Biological Reviews* ; 2(1) : 1-51.

PATIL A. R, BISBY T. M. (2001), Comparison of Maintenance Energy Requirement of Client-owned Dogs and Kennel Dogs. *Purina Nutrition Forum* ; 23(9A) : 85.

PEARSON P. L, BOBROW M. (1970), Fluorescent Staining of the Y Chromosome in Meiotic Stages of the Human Male. *J. Reprod. Fert.* ; 22 : 177-179.

PERLOFF W. H, STEINBERGER M. D. (1964), *In Vivo* Survival of Spermatozoa in Cervical Mucus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* ; 88(4) : 439-442.

PINHEIRO J. C, BATES M. D. (2000), Mixed-Effects Models in S and Splus. *Springer – Verlag New York Inc.* ; 421p.

PRATT N. C, HUCK U. W, LISK R. D. (1987), Offspring Sex Ratio in Hamsters Is Correlated with Vaginal pH at Certain Times of Mating. *Behavioral and Neural Biology* ; 48(2) : 310-316.

PRATT N. C, LISK R. D. (1989), Effects of Social Stress During Early Pregnancy on Litter Size and Sex Ratio in the Golden Hamster. *J. Reprod. Fert.* ; 87 : 763-769.

PRAVE M. (1968), La Proportion Naturelle des Sexes chez les Animaux (Sex-ratio) : Les Tentatives de Modification. Th. Méd. Vét. Lyon : Université Claude Bernard, 75p.

PRUGNARD C, AMIRAT-BRIAND L, CHEREL Y, BABARIT C, GUINTARD C, BETTI E, TAINURIER D, BENCHARIF D. (2016), Early Sex Determination in the Canine Foetus by Ultrasound and PCR. *Animal Reproduction Science* ; 165 : 56-68.

RIEDEWALD S, KREUTZMANN I-M, HEINZE T, SALING E. (1990), Vaginal and Cervical pH in Normal Pregnancy and Pregnancy Complicated by Preterm Labor. *J. Perinat. Med.* ; 181-186.

RIVERS J. P. W, CRAWFORD M. A. (1974), Maternal Nutrition and the Sex Ratio at Birth. *Nature* ; 252(5481) : 297-298

ROCHE J. R, LEE J. M. (2007), Altering Systemic Acid-Base Balance Through Nutrition Failed to Change Secondary Sex Ratio. *Reproduction, Fertility and Development* ; 19 : 887-890.

ROHDE W, PORSTMANN T, DÖRNER G. (1973), Migration of Y-bearing Human Spermatozoa in Cervical Mucus. *J. Reprod. Fert* ; 33 : 167-169.

ROSENFELD C. S, GRIMM K. M, LIVINGSTON K. A, BROKMAN A. M, LAMBERSON W. E, ROBERTS R. M. (2003), Striking Variation in the Sex Ratio of Pups Born to Mice According to Whether Maternal Diet is High in Fat or Carbohydrate. *The National Academy of Sciences* ; 100(8) : 4628-4632.

ROUX S. (1983), Influence de l'Equilibre Minéral de la Ration sur le Sex-ratio de la Souris une Etude Expérimentale. Th. Méd. Vét. Lyon : Université Claude Bernard, 144p.

SACHDEVA K. K, SENGAR O. P. S, SINGH S. N, LINDAHL I. L. (1973), Studies on Goats: I. Effect of Plane of Nutrition on the Reproductive Performance of Does. *J. agric. Sci., Camb* ; 80(3) : 375-379.

SCHAER M. (1989), General Principles of Fluid Therapy in Small Animal Medicine. *Veterinary Clinics of North America: Small animal Practice* ; 19(2) : 203-213.

SHARGAL D, SHORE L, ROTERI N, TERKEL A, ZOROVSKY Y, SHEMESH M, STEINBERGER Y. (2008), Fecal Testosterone is Elevated in High Ranking Female Ibexes (*Capra nubiana*) and Associated with Increased Aggression and a Preponderance of Male Offspring. *Theriogenology* ; 69(6) : 673-680.

SHETTLES L. B. (1960), Nuclear Morphology of Human Spermatozoa. *Nature* ; 4725 : 648-649.

SHETTLES L. B, VANDE WIELE L. (1974), Can Parents Choose the Sex of Their Baby ?. *Birth and the Family Journal* ; 1(2) : 3-5.

SHETTLES L. B. (1970), Factors Influencing Sex Ratios. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* ; 8(5) : 643-647.

SPEAKMAN J. R, VAN ACKER A, HARPER E. J (2003), Age-related Changes in the Metabolism and Body Composition of Three Dog Breeds and Their Relationship to Life Expectancy. *Aging cell* ; 2 : 265-275.

STOLKOWSKI J, BELLEC A. (1960), Influence du Rapport $\frac{K+}{Ca^{2+}}$ du Milieu sur la Distribution des Sexes chez les Têtards de *Discoglossus pictus* (Otth), Elevés en Solution de Ringer. *C. R. Ac. SC., Paris* ; 251(16) : 1669-1971.

STOLKOWSKI J. (1967), Influence Possible de la Nutrition Minérale sur la Répartition des Sexes chez la Vache : une Enquête Rétrospective. *C. R. Ac. SC., Paris* ; 265 : 1059-1062.

STOLKOWSKI J, LEFEVRE M. (1977), Essais de Contrôle du Sexe chez les Bovins, sous l'Influence de la Nutrition Minérale. *Rec. Méd. Vét.* ; 153(1) : 33-40.

SUMNER A. T, ROBINSON J. A, EVANS, H. J (1971), Distinguishing between X, Y and YY-bearing Human Spermatozoa by Fluorescence and DNA Content. *Nature New Biology* ; 229 : 231-233.

SUNDELL G. (1962) The Sex Ratio Before Uterine Implantation in the Golden Hamster. *Development* ; 10(1) : 58-63.

TAMIMI R. M, LAGIOU P, MUCCI L. A, HSIEH C-C, ADAMI H-O, TRICHOPOULOS D (2003), Average Energy Intake Among Pregnant Women Carrying a Boy Compared with a Girl. *BMJ* ; 326 : 1245-1246.

TRIVERS R. L, WILLARD D. E. (1973), Natural Selection of Parental Ability to Vary the Sex Ratio of Offspring. *Science, New Series* ; 179(4068) : 90-92.

TZONIS K. (1938), Beeinflussung der Geschlechtsverhältnisse bei *Dinophilus apatris* (Korsch) durch Aussenbedingungen. *Zool. Jahrb.* ; 58 : 539-550.

VACHEZ B (1978), Déterminisme du Sexe et Sexe Ratio. Th. Méd. Vét. Lyon : Université Claude Bernard, 79p.

VAHIHI A. R, SHEIKHHA M. H. (2007), Comparing the Effects of Sodium and Potassium Diet with Calcium and Magnesium Diet on Sex Ratio of Rats' Offspring. *Pakistan Journal of Nutrition* ; 6(1) : 44-48.

VERME L. J. (1969), Reproductive Patterns of White-Tailed Deer Related to Nutritional Plane. *The Journal of Wildlife Management* ; 33(4) : 881-887.

VERME L. J, OZOGA J. J. (1981), Sex Ratio of White-Tailed Deer and the Estrus Cycle. *The Journal of Wildlife Management* ; 45(3) : 710-715.

VERME L. J. (1983), Sex Ratio Variation in *Odocoileus*: A Critical Review. *The Journal of Wildlife Management* ; 47(3) : 573-582.

VOLKMANN D. H. (2006), The Effects of Storage Time and Temperature and Anticoagulant on Laboratory Measurements of Canine Blood Progesterone Concentrations. *Theriogenology* ; 66 : 1583-1586.

WAKIM P. E. (1972), Determining the Sex of Baby Rabbits by Ascertaining the pH of the Vagina of the Mother before Mating. *Journal of the American Osteopathic Association* ; 72(2) : 173-174.

WAUTERS L. A, DE CROMBRUGGHE S. A, NOUR N, MATTHYSEN E. (1995), Do Female Roe Deer in Good Condition Produce More Sons Than Daughters. *Behav. Ecol. Sociobiol.* ; 37 : 189-193.

WELLS J. C. K. (2000), Natural Selection and Sex Differences in Morbidity and Mortality in Early Life. *J. theor. Biol.* ; 202(1) : 65-76.

WHYTE J. J, ALEXENKO A. P, DAVIS A. M, ELLERSIECK M. R, FOUNTAIN E. D, ROSENFELD C. S. (2006), Maternal Diet Composition Alters Serum Steroid and Free Fatty Acid Concentrations and Vaginal pH mice. *J. Endocrinol.* ; 192 : 75-81.

WILCOX A. J, WEINBERG C. R, BAIRD D. D. (1995), Timing of Sexual Intercourse in Relation to Ovulation. *The New England Journal of Medicine* ; 333(23) : 1517-1521.

WILLIAMS R. J, GLOSTER S. P. (1992), Human Sex Ratio As It Relates to Caloric Availability. *Social Biology* ; 39 : 285-291.

YANAGIMACHI R. (1969), *In Vitro* Capacitation of Hamster Spermatozoa by Follicular Fluid. *J. Reprod. Fert.* ; 18 : 275-286.

SITES INTERNET

CIA, The World Factbook [en ligne]. Disponible sur : <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/> (Consulté pour la dernière fois en juin 2017).

Sénat, Octobre 2008. Etude de législation comparée n°188 – octobre 2008 – Le diagnostic préimplantatoire [en ligne]. Disponible sur <https://www.senat.fr/lc/lc188/lc1880.html>. (Consulté pour la dernière fois en juin 2017).

Annexes

Annexe 1 : Article L162-17 de la loi n° 94-654 du 29 juillet 1994.

*“Le diagnostic [*préimplantatoire*] biologique effectué à partir de cellules prélevées sur l'embryon in vitro n'est autorisé qu'à titre exceptionnel dans les conditions suivantes :*

- Un médecin exerçant son activité dans un centre de diagnostic prénatal pluridisciplinaire tel que défini par l'article L. 162-16 doit attester que le couple, du fait de sa situation familiale, a une forte probabilité de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic.*
- Le diagnostic ne peut être effectué que lorsque a été préalablement et précisément identifiée, chez l'un des parents, l'anomalie ou les anomalies responsables d'une telle maladie.*
- Les deux membres du couple expriment par écrit leur consentement à la réalisation du diagnostic.*
- Le diagnostic ne peut avoir d'autre objet que de rechercher cette affection ainsi que les moyens de la prévenir et de la traiter.*
- Il ne peut être réalisé que dans un établissement spécifiquement autorisé à cet effet après avis de la Commission nationale de médecine et de biologie de la reproduction et du diagnostic prénatal et dans des conditions définies par décret en Conseil d'Etat.”*

Annexe 2 : Article L2131-4-1 de la loi 2004-800 du 6 août 2004.

Après l'article L. 2131-4 [du code de la santé publique], il est inséré un article L. 2131-4-1 ainsi rédigé :

« Art. L. 2131-4-1. - Par dérogation aux dispositions prévues par le cinquième alinéa de l'article L. 2131-4, le diagnostic biologique effectué à partir de cellules prélevées sur l'embryon in vitro peut également être autorisé, à titre expérimental, lorsque les conditions suivantes sont réunies :

« - le couple a donné naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique entraînant la mort dès les premières années de la vie et reconnue comme incurable au moment du diagnostic ;

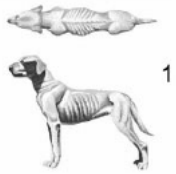
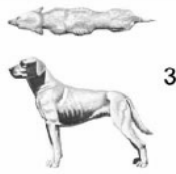
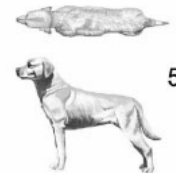
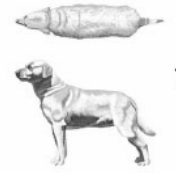
« - le pronostic vital de cet enfant peut être amélioré, de façon décisive, par l'application sur celui-ci d'une thérapeutique ne portant pas atteinte à l'intégrité du corps de l'enfant né du transfert de l'embryon in utero, conformément à l'article 16-3 du code civil ;

« - le diagnostic mentionné au premier alinéa a pour seuls objets de rechercher la maladie génétique ainsi que les moyens de la prévenir et de la traiter, d'une part, et de permettre l'application de la thérapeutique mentionnée au troisième alinéa, d'autre part.

« Les deux membres du couple expriment par écrit leur consentement à la réalisation du diagnostic. »

Régime riche en Potassium (K)	Céréales « cornflakes », bretzels, sucre, gelée, popcorn, margarine, confiture. Fruits : banane, abricot, raisin, pastèque, fruits secs. Jus : orange, poire, cerise. Légumes : petits pois, maïs, flageolets, pomme de terre, patate douce, tomate. Poulet sans la peau, surtout le blanc de poulet. Lentilles, haricots blancs. Pain blanc. Viande, poisson. Soupes, café.
Régime riche en Sodium (Na)	Sel.
Régime riche en Calcium (Ca)	Lait et produits laitiers Pain fait de farine blanche mais sans sel ni levure. Amandes, graines de tournesol. Saumon, sardines, huîtres. Légumes, surtout laitue, persil, coriandre, carotte, ail, épinards, pois chiches. Beurre sans sel. Tous les fruits sauf : banane, cerise, abricot, tomates cuites. Miel, café, poisson.
Régime riche en Magnésium (Mg)	Pain complet Amandes, cacahuètes, beurre de cacahuète sans sel. Soja, pomme de terre en petite quantité. Produits laitiers.

Annexe 3 : Extrait des régimes conseillés aux femmes en fonction du sexe de l'enfant désiré (EDESSY et *al.*, 2016).

Note	Palpation du squelette	Répartition du tissu adipeux, observation de la silhouette	Illustrations
1 (Émacié)	Côtes, vertèbres, bassin, et saillies osseuses visibles à distance	Pas de graisse discernable. fonte musculaire extrême	 1
2 (Très maigre)	Côtes, vertèbres et bassin bien visibles, autres saillies osseuses éventuellement visibles	Absence de graisse palpable, perte minimale de muscle	
3 (Maigre)	Côtes facilement palpables, voire visibles, apophyses épineuses des vertèbres lombaires visibles, os du bassin proéminents.	Pas de tissu adipeux sous cutané recouvrant les côtes.	 3
4 (Fin)	Côtes facilement palpables	Graisse de couverture minimale	
5 (Optimal)	Côtes palpables	Pas d'excès de graisse sous-cutanées recouvrant les côtes	 5
6 (Surcharge)	Côtes palpables	Léger excès de graisse recouvrant les côtes	
7 (Gros)	Côtes difficiles à palper	Graisse déposée sur les côtes, les lombes, la base de la queue	 7
8 (Obèse)	Côtes palpables en exerçant une forte pression	Fort dépôt de graisse sur les côtes, les lombes, la base de la queue	
9 (Très obèse)	Côtes non palpables	Dépôt majeur de graisse sur le thorax, rachis, base de la queue, encolure, membres, face...	 9

Annexe 4 : Estimation de la note l'état corporel chez le chien (d'après LAFLAMME, 1997).

TABLE D'ANALYSE	Quantités	Manganèse (mg/kg)	78,0
Cendres brutes (%)	6,4	Zinc (mg/kg)	225,0
Cellulose brute (%)	1,4	VITAMINES	Quantités
Fibres alimentaires (%)	6,7	Biotine/Vitamine B8 (mg/kg)	2,75
Matière grasse (%)	16,0	Choline (mg/kg)	2 000,0
Acide linoléique (%)	3,39	Acide folique/Vitamine B9	9,0
Energie métabolisable (calculée selon NRC85) (kcal/kg)	3694,5	Vitamine A (UI/kg)	29 000,0
Energie métabolisable (mesurée) (kcal/kg)	3911,0	Thiamine/Vitamine B1 (mg/kg)	4,2
Humidité (%)	9,5	Riboflavine/Vitamine B2 (mg/kg)	3,8
Extrait non azoté (%)	43,7	Niacine/Vitamine B3 (mg/kg)	15,1
Oméga 6 (%)	3,49	Acide pantothénique/Vitamine B5 (mg/kg)	34,5
Protéine brute (%)	23,0	Pyridoxine/Vitamine B6 (mg/kg)	36,5
Amidon (%)	38,4	Vitamine C (mg/kg)	200,0
MINERAUX	Quantités	Vitamine D3 (UI/kg)	1 000,0
Calcium (%)	1,1	Vitamine E (mg/kg)	600,0
Phosphore (%)	0,8	NUTRIMENTS	Quantités
Magnésium (%)	0,08	Arginine (%)	1,43
Sodium (%)	0,2	L-lysine (%)	1,05
Cuivre (mg/kg)	14,0	Lutéine (mg/kg)	5,0
Iode (mg/kg)	5,4	Méthionine Cystine (%)	1,17
Fer (mg/kg)	200,0	Taurine (mg/kg)	2 000,0

Annexe 5 : Composition des croquettes Royal Canin Vet Care Medium Adult Dog.

Composition (résumé)	Phosphate bicalcique, levures et produits similaires, carbonate de calcium, protéines animales transformées (foie de porc), acides gras (palmitique et stéarique), oxyde de magnésium, lécithines brutes	
Composition détaillée	Additifs par kg	Gallate de propyle : 37 mg Buthydroxyanisole (BHA) : 113 mg Butylhydroxytoluène (BHT) : 16 mg Vitamine A : 200 000 U.I. Vitamine D3 : 21 000 U.I. Vitamine E : 1 250 U.I. Vitamine B1 : 150 mg Vitamine B2 : 150 mg Pantothénate de calcium : 1000 mg Vitamine B6 : 20 mg Vitamine B12 : 30 µg Vitamine C : 2000 mg Biotine (vitamine H) : 10 mg Vitamine PP : 1500 mg Acide folique : 8 mg Choline HCl : 600 mg Fer (s.f. de sulfate monohydraté) : 200 mg Iode (s.f. de calcium) : 25 mg Cobalt (s.f. de carbonate basique monohydraté) : 50 mg Cuivre (s.f. de sulfate pentahydraté) : 50 mg Manganèse (s.f. d'oxyde) : 18 mg Zinc (s.f. de sulfate monohydraté) : 20 mg L-Arginine : 400 mg Lysine HCl : 400 mg
	Teneurs en constituants analytiques	Humidité 5 %, Protéines brutes 21 %, Matières grasses brutes 3 %, Cendres brutes 46 %, Calcium 15,5 %, Phosphore 7,6 %, Magnésium 0,14 %

Annexe 6 : Composition des comprimés Pet-Phos Croissance Grand Chien Ca/P=2 NDV (Laboratoire Ceva).



Annexe 7 : pH-mètre utilisé lors de nos expériences.



Annexe 8 : Sonde-électrode à pH de contact utilisée lors de nos expériences.

Date	J	Frottis vaginal	Stade du cycle	Progestéronémie	pH vaginal	Autres
12/09/2016	0	Sale, pauvre en cellules, quelques hématies (trauma de la sonde ?)	Anœstrus	1,6	6,9	Début de la complémentation
15/09/2016	3	Sale, riche en cellules parabasales et intermédiaires, nombreuses hématies	Proœstrus	1,7	6,3	Mucus vaginal hémorragique, vulve congestionnée
19/09/2016	7		Proœstrus	1,83	6,58	
21/09/2016	9		Œstrus		6,2	Boude sa gamelle
22/09/2016	10			1,78	6,05	Boude sa gamelle
23/09/2016	11			3,15	5,73	Boude sa gamelle
26/09/2016	14	Propre, nombreuses cellules superficielles en placards	Œstrus	12,26	6,05	IA1
27/09/2016	15				5,83	
28/09/2016	16		Œstrus		5,79	IA2
29/09/2016	17	Nombreuses cellules superficielles et intermédiaires		58,32	5,84	
30/09/2016	18				6,06	
03/10/2016	21	Réapparition de cellules parabasales, absence de polynucléaires		>80	6,8	J+5, arrêt de la complémentation
04/10/2016	22	Présence de polynucléaires	Metœstrus		6,9	
06/10/2016	24				7,2	
13/10/2016	31				7,2	
24/10/2016	42			57,35	7,15	
16/11/2016	65			35,94		

Annexe 9 : Résultats de la chienne 1 pour la phase 1.

Date	J	Jpi	Frottis vaginal	Stade du cycle	Progesté -ronémie	pH vaginal	Autres
12/09/2016	0		Sale, pauvre en cellules	Anœstrus	0,75	6,98	
15/09/2016	3		Sale, cellules parabasales en faible nombre, PNN dégénérés	Anœstrus	0,92	6,85	
19/09/2016	7				0,95	7,3	
21/09/2016	9	0					Pose de l'implant
22/09/2016	10	1			1,62	7,25	
26/09/2016	14	5	Cellules parabasales et intermédiaires en assez grand nombre, présence de quelques placards	Proœstrus	1,69	6,75	
27/09/2016	15	6				6,35	
29/09/2016	17	8	Présence d'hématies, beaucoup de cellules intermédiaires et parabasales, peu de placards	Proœstrus	1,54	6,2	
30/09/2016	18	9				6,04	
03/10/2016	21	12	Beaucoup de cellules intermédiaires et superficielles, quelques placards	Œstrus	6,7	6,1	
04/10/2016	22	13				6,17	IA1
05/10/2016	23	14					Ou IA1, retrait de l'implant
06/10/2016	24	15		Œstrus	29,17	6,01	IA2
07/10/2016	25	16				6,25	Ou IA2
10/10/2016	28	19		Metœstrus	54,85	7,05	
12/10/2016	30	21				7,02	J+5 ou 6
24/10/2016	42	33	Peu de cellules parabasales	Metœstrus	55,57	7,35	
16/11/2016	65	56			25,01		

Annexe 10 : Résultats de la chienne 2 pour la phase 1. Jpi : Nombre de jours après la pose de l'implant.

Date	J	Jpi	Frottis vaginal	Stade du cycle	Progesté -ronémie	pH vaginal	Autres
12/09/2016	0		Cellules parabasales en nombre moyen, pas de placards	Anœstrus ?	0,91	7,12	
15/09/2016	3		Sale, cellules parabasales en nombre moyen		0,9	7,05	
19/09/2016	7				0,76	7,3	
21/09/2016	9		Beaucoup de cellules parabasales en placards	Proœstrus ?			
22/09/2016	10				0,88	7,2	
26/09/2016	14		Cellules parabasales en nombre moyen		0,76	7,13	
27/09/2016	15					7,35	
29/09/2016	17		Peu de cellules parabasales, quelques placards	Fin d'anœstrus ?	0,67	7,2	
03/10/2016	21		Riche en cellules parabasales et intermédiaires, nombreux placards de cellules intermédiaires	Proœstrus	0,92	6,87	
06/10/2016	24			Proœstrus	0,65	6,64	
10/10/2016	28		Présence de polynucléaires neutrophiles				Vaginite ?
12/10/2016	30					6,1	
13/10/2016	31				0,69		
19/10/2016	37				0,56	7,08	
21/10/2016	39	0			0,67	7,15	Pose de l'implant
24/10/2016	42	3	Cellules parabasales et intermédiaires en assez grand nombre		1,07	6,6	
27/10/2016	45	6	Sale et très acidophile, beaucoup de cellules intermédiaires et superficielles, grand nombre de placards	Fin de proœstrus	1	5,95	

31/10/2016	49	10	Propre, grand nombre de cellules intermédiaires, quelques cellules superficielles, quelques placards, absence d'hématies		2,98	5,99	
02/11/2016	51	12			8,56	5,95	
03/11/2016	52	13				5,96	IA1
04/11/2016	53	14			24,68	6,1	Retrait de l'implant
15/11/2016	54	15					IA2
06/11/2016	55	16				5,84	
07/11/2016	56	17				6,25	
09/11/2016	58	19			52,29	7,25	

Annexe 11 : Résultats de la chienne 3 pour la phase 1. Jpi : Nombre de jours après la pose de l'implant.

Date	J	Jpi	Frottis vaginal	Stade du cycle	Progesté -ronémie	pH vaginal	Autres
12/09/2016	0		Sale, pauvre en cellules, quelques hématies (trauma de la sonde ?)	Anœstrus	0,59	7,07	Début de la complémentation
15/09/2016	3		Sale, pauvre en cellules parabasales	Anœstrus	0,76	7,1	
19/09/2016	7				0,74	7,3	
21/09/2016	9	0					Pose de l'implant
22/09/2016	10	1			0,74	7,45	
26/09/2016	14	5	Beaucoup de cellules intermédiaires, quelques cellules superficielles, présence de placards	Œstrus	0,76	5,85	
27/09/2016	15	6				6,6	
28/09/2016	16	7				6,37	TP sondage urinaire
29/09/2016	17	8	Grand nombre de cellules superficielles, quelques cellules intermédiaires	Œstrus	1	6,3	
30/09/2016	18	9				6,05	
03/10/2016	21	12		Œstrus	6,72	5,75	
04/10/2016	22	13				6,12	IA1
05/10/2016	23	14					Ou IA1 et retrait implant
06/10/2016	24	15		Œstrus	26,57	6,35	IA2
07/10/2016	25	16				6,35	Ou IA2
10/10/2016	28	19		Début metœstrus	38,61	6,9	
12/10/2016	30	21				6,8	Fin de la complémentation
24/10/2016	42	33	Quantité moyenne de cellules parabasales, pas de polynucléaires	Metœstrus	48,13	7,2	

Annexe 12 : Résultats de la chienne 4 pour la phase 1. Jpi : Nombre de jours après la pose de l'implant.

Date	J	Jpi	Frottis vaginal	Stade du cycle	Progesté -ronémie	pH vaginal	Autres
12/09/2016	0		Cellules intermédiaires et superficielles en faible nombre		4,01	6,7	Conjonctivite œil gauche, lactation de pseudogestation
13/09/2016	1				3,28		
14/09/2016	2				6,19	7,45	
15/09/2016	3		Sale, moyennement riche en cellules parabasales	Anœstrus	4,76	7,2	Œil va mieux
19/09/2016	7			Anœstrus	3,7	7,2	Œil beau, toujours du lait
22/09/2016	10			Anœstrus		7,1	
23/09/2016	11				3,76	7,4	
26/09/2016	14				2,52	7,2	
27/09/2016	15						Injection de cloprosténol
29/09/2016	17		Sale, pauvre en cellules	Anœstrus	1,24	7	Injection de cloprosténol
03/10/2016	21		Pauvre en cellules	Anœstrus	1,55	6,85	
05/10/2016	23						Injection de cloprosténol
07/10/2016	25						Injection de cloprosténol
09/10/2016	27						Injection de cloprosténol
10/10/2016	28			Anœstrus			Injection de cloprosténol
11/10/2016	29				1,23		
12/10/2016	30						Injection de cloprosténol
13/10/2016	31				1,02	7,6	
14/10/2016	32						Injection de cloprosténol
17/10/2016	35				0,64		
18/10/2016	36						Injection de cloprosténol

21/10/2016	39	0			0,61	7,2	Pose de l'implant
24/10/2016	42	3	Pauvre en cellules parabasales	Anœstrus	1,38	6,9	
27/10/2016	45	6	Sale, cellules parabasales et intermédiaires en grand nombre, quelques placards	Proœstrus	1,72	6,19	
31/10/2016	49	10	Propre, nombreuses cellules intermédiaires et quelques superficielles, nombreux placards, absence d'hématie	Œstrus	2,24	6,03	
02/11/2016	51	12			6,18	5,97	
03/11/2016	52	13				6,01	IA1
04/11/2016	53	14			13,58	5,97	Retrait de l'implant
06/11/2016	55	16				6,55	IA2
07/11/2016	56	17				6,65	
09/11/2016	58	19			61,74	7,05	J+4

Annexe 13 : Résultats de la chienne 5 pour la phase 1. Jpi : Nombre de jours après la pose de l'implant.

Date	J	Jpi	Frottis vaginal	Stade du cycle	Progesté -ronémie	pH vaginal	Autres
12/09/2016	0		Assez riche en cellules		0,86	7,08	
15/09/2016	3		Propre, placards de cellules parabasales, riche en cellules, pas d'hématies	Fin anœstrus	0,95	7,1	
19/09/2016	7				0,91	7,46	
21/09/2016	9	0	Propre, placards de cellules parabasales, riche en cellules	Proœstrus			Pose de l'implant
22/09/2016	10	1			1,31	7,3	
26/09/2016	14	5	Beaucoup de cellules parabasales, quelques intermédiaires, présence de placards	Proœstrus	1,16	6,45	
27/09/2016	15	6				6,3	
28/09/2016	16	7					Prise pour TD sondage urinaire + endoscopie
29/09/2016	17	8	Cellules parabasales et intermédiaires	Proœstrus	1,05	6,18	
30/09/2016	18	9				6,34	
03/10/2016	21	12	Beaucoup de cellules intermédiaires et superficielles, quelques placards	Œstrus	4,03	7	Boude sa gamelle
04/10/2016	22	13				6,25	IA1
05/10/2016	23	14					Ou IA1 et retrait de l'implant
06/10/2016	24	15		Œstrus	15,71	6,25	IA2, boude sa gamelle
07/10/2016	25	16				6,45	Ou IA2
10/10/2016	28	19		Fin d'œstrus	50,47	6,85	

12/10/2016	30	21				6,83	J+5, Arrêt de la complémentation
24/10/2016	42	33	Présence de polynucléaires neutrophiles, beaucoup de cellules parabasales en placards	Metœstrus	50,04	6,91	

Annexe 14 : Résultats de la chienne 6 pour la phase 1. Jpi : Nombre de jours après la pose de l'implant.

Date	J	Jpi	Frottis vaginal	Stade du cycle	Progesté -ronémie	pH vaginal	Autres
12/09/2016	0		Sale, pauvre en cellules, présence de quelques polynucléaires neutrophiles	Metœstrus	9,99	7,06	
15/09/2016	3		Pauvre en cellules (parabasales et intermédiaires), présence de quelques polynucléaires neutrophiles	Metœstrus	8,41	7	
19/09/2016	7				6,04	7,3	
22/09/2016	10				4,44	7,2	
23/09/2016	11				4,19		
26/09/2016	14				2,67	7,2	
27/09/2016	15						Injection de cloprosténol
29/09/2016	17			Anœstrus	1,62	7,1	Injection de cloprosténol
03/10/2016	21		Sale, pauvre en cellules	Anœstrus	1,85	7,3	
05/10/2016	23						Injection de cloprosténol
07/10/2016	25						Injection de cloprosténol
09/10/2016	27						Injection de cloprosténol
10/10/2016	28			Anœstrus			Injection de cloprosténol
11/10/2016	29				1,23		
12/10/2016	30						Injection de cloprosténol
13/10/2016	31					7,28	
14/10/2016	32						Injection de cloprosténol
17/10/2016	35				0,72		
18/10/2016	36						Injection de cloprosténol
21/10/2016	39				1,07	7,25	Injection de cloprosténol

23/10/2016	41						Injection de cloprosténol
24/10/2016	42		Très peu de cellules parabasales	Anœstrus	1,37	7,3	
25/10/2016	43						Injection de cloprosténol
27/10/2016	45		Très peu de cellules parabasales	Anœstrus	1,13	7,5	Injection de cloprosténol
29/10/2016	47						Injection de cloprosténol
31/10/2016	49		Sale, peu de cellules parabasales	Anœstrus	1,36	7,28	Injection de cloprosténol
02/11/2016	51				1,11	7,23	Injection de cloprosténol
03/11/2016	52					7,28	
04/11/2016	53				1,11	7,34	Injection de cloprosténol
06/11/2016	55						Injection de cloprosténol
09/11/2016	58				0,98	7,5	
10/11/2016	59	0			0,82		Pose de l'implant
14/11/2016	63	4				6,9	
16/11/2016	65	6	Sale, cellules intermédiaires en quantité moyenne, en placards, quelques cellules parabasales	Proœstrus	4,23	6,39	
18/11/2016	67	8			2,46	6,46	
19/11/2016	68	9				6,5	
21/11/2016	70	11	Beaucoup de cellules intermédiaires et superficielles, peu de placards	Œstrus	4,29	6,6	
22/11/2106	71	12					IA1
23/11/2016	72	13					Ou IA1
24/11/2016	73	14			16,64	6,35	IA2 et retrait de l'implant
25/11/2016	74	15			24,84	6,45	Ou IA2

28/11/2016	77	18	Grand nombre de cellules superficielles, peu de placards, nombreux bacilles et coques sans polynucléaires neutrophiles				
30/11/2016	79	20			44,14	7,3	J+5 ou 6

Annexe 15 : Résultats de la chienne 7 pour la phase 1. Jpi : Nombre de jours après la pose de l'implant.

Date	J	Jpi	Frottis vaginal	Stade du cycle	Progesté-ronémie	pH vaginal	Autres
09/01/2017	0		Sale, cellules parabasales en faible à moyenne quantité, débris en faible quantité	Anœstrus			
10/01/2017	1					7,25	
12/01/2017	3		Sale, cellules parabasales en faible à moyenne quantité, débris en faible quantité	Anœstrus	1,29	7,25	
16/01/2017	7		Sale, cellules parabasales en moyenne quantité, absence de placards	Anœstrus		7,25	Ecouvillon rosé
18/01/2017	9						Injection de cloprosténol
20/01/2017	11						Injection de cloprosténol
23/01/2017	14		Cellules parabasales en faible quantité, cellules intermédiaires en quantité modérée	Fin d'anœstrus, début de proœstrus	0,82	7,3	Injection de cloprosténol
25/01/2017	16	0			0,84	7,37	Pose de l'implant
29/01/2017	20	4				7,1	
31/01/2017	22	6		Proœstrus		6,55	
01/02/2017	23	7			1,26		
03/02/2017	25	9			1,39	6,26	
06/02/2017	28	12			3,96	5,7	
08/02/2017	30	14					Retrait de l'implant
09/02/2017	31	15			9,26	5,87	IA1
10/02/2017	32	16				5,65	

11/02/2017	33	17					IA2
14/02/2017	36	20	Sale, polynucléaires neutrophiles en très grand nombre, cellules parabasales en grand nombre formant de grands placards	Metœstrus		6,53	
16/02/2017	38	22				6,8	J+5
23/02/2017	45	29	Sale, quelques placards de cellules parabasales, grande quantité de cellules parabasales, faible nombre de polynucléaires neutrophiles	Metœstrus		7,18	

Annexe 16 : Résultats de la chienne 1 pour la phase 2. Jpi : Nombre de jours après la pose de l'implant.

Date	J	Jpi	Frottis vaginal	Stade du cycle	Progestéronémie	pH vaginal	Autres
09/01/2017	0		Sale, cellules parabasales en faible à moyenne quantité, débris en faible quantité	Anœstrus			Début complémentation
10/01/2017	1					7,19	
12/01/2017	3		Sale, cellules parabasales en faible quantité	Anœstrus	1,1	7,35	
16/01/2017	7		Sale, cellules parabasales en quantité moyenne, absence de placards	Anœstrus	0,99	7,45	
18/01/2017	9						Injection de cloprosténol
19/01/2017	10					7,45	
20/01/2017	11						Injection de cloprosténol
23/01/2017	14			Anœstrus	0,76	7,4	Injection de cloprosténol
25/01/2017	16	0			0,76	7,36	Pose de l'implant
29/01/2017	20	4				7	
31/01/2017	22	6		Proœstrus		6,59	
01/02/2017	23	7			1,44		
03/02/2017	25	9			1,53	6,25	
06/02/2017	28	12				6,03	
08/02/2017	30	14			8,18	5,86	Retrait de l'implant
09/02/2017	31	15					IA1
10/02/2017	32	16			26,55	6,2	
11/02/2017	33	17					IA2
14/02/2017	36	20				6,47	
16/02/2017	38	22				7,13	J+5, arrêt de la complémentation

23/02/2017	45	29	Sale, quelques placards de cellules parabasales, grande quantité de cellules parabasales, faible nombre de polynucléaires neutrophiles	Metœstrus		7,3	
------------	----	----	---	-----------	--	-----	--

Annexe 17 : Résultats de la chienne 2 pour la phase 2. Jpi : Nombre de jours après la pose de l'implant.

Date	J	Jpi	Frottis vaginal	Stade du cycle	Progesté-ronémie	pH vaginal	Autres
09/01/2017	0		Sale, cellules parabasales en faible quantité, débris présents	Anœstrus			
10/01/2017	1					7,3	
12/01/2017	3		Sale, cellules parabasales en faible quantité, débris présents	Anœstrus	0,55	7,5	
16/01/2017	7		Sale, cellules parabasales en faible quantité, débris présents	Anœstrus		7,55	
18/01/2017	9						Injection de cloprosténol
19/01/2017	10					7,5	
20/01/2017	11						Injection de cloprosténol
23/01/2017	14		Sale, cellules parabasales en quantité moyenne	Fin d'anœstrus	0,67	7,4	Injection de cloprosténol, blessure entre les coussinets
25/01/2017	16	0			0,6	7,53	Pose de l'implant
29/01/2017	20	4				7,15	
31/01/2017	22	6		Proœstrus		6,35	
01/02/2017	23	7			1,3		
03/02/2017	25	9			1,35	6,3	
06/02/2017	28	12				5,97	
08/02/2017	30	14			6,29	5,99	Retrait de l'implant
09/02/2017	31	15					IA1
10/02/2017	32	16			17,11	6,36	
11/02/2017	33	17					IA2

14/02/2017	36	20	Propre, cellules intermédiaires et superficielles en grand nombre, nombreux placards	Œstrus	41,14	6,45	
16/02/2017	38	22					J+5
17/02/2017	39	23				6,45	
23/02/2017	45	29	Sale, cellules parabasales en grand nombre, quelques petits placards, quelques polynucléaires neutrophiles	Metœstrus		7,05	

Annexe 18 : Résultats de la chienne 4 pour la phase 2. Jpi : Nombre de jours après la pose de l'implant.

Date	J	Jpi	Frottis vaginal	Stade du cycle	Progesté-ronémie	pH vaginal	Autres
09/01/2017	0						Début complémentation
10/01/2017	1					7,27	
12/01/2017	3				4,42	7,2	
16/01/2017	7					7,21	
18/01/2017	9						Injection de cloprosténol
19/01/2017	10					7,24	
20/01/2017	11					7,3	Injection de cloprosténol
23/01/2017	14				1,32	7,37	Injection de cloprosténol
25/01/2017	16					7,2	Injection de cloprosténol
29/01/2017	20						Injection de cloprosténol
31/01/2017	22						Injection de cloprosténol
03/02/2017	25				0,92	7,2	Injection de cloprosténol
06/02/2017	28						Injection de cloprosténol
08/02/2017	30						Injection de cloprosténol
10/02/2017	32						Injection de cloprosténol
13/02/2017	35						Injection de cloprosténol
14/02/2017	36			Anœstrus ?	0,75	7,17	
15/02/2017	37						Injection de cloprosténol
17/02/2017	39						Injection de cloprosténol
20/02/2017	42				1,33		Injection de cloprosténol
22/02/2017	44						Injection de cloprosténol
23/02/2017	45				1,69		
24/02/2017	46						Injection de cloprosténol

27/02/2017	49						Injection de cloprosténol
01/03/2017	51				1,39		Injection de cloprosténol
03/03/2017	53						Injection de cloprosténol
06/03/2017	56						Injection de cloprosténol
08/03/2017	58				1,26		Injection de cloprosténol
10/03/2017	60						Injection de cloprosténol
13/03/2017	63						Injection de cloprosténol
15/03/2017	65						Injection de cloprosténol
18/03/2017	68						Injection de cloprosténol
20/03/2017	70						Injection de cloprosténol

Annexe 19 : Résultats de la chienne 5 pour la phase 2. Jpi : Nombre de jours après la pose de l'implant.

Date	J	Jpi	Frottis vaginal	Stade du cycle	Progesté-ronémie	pH vaginal	Autres
09/01/2017	0		Sale, cellules parabasales en grand nombre	Fin d'anœstrus, début de proœstrus			
10/01/2017	1					7,23	
12/01/2017	3		Sale, nombreux placards de cellules parabasales	Début de proœstrus	1,12	7,4	
16/01/2017	7		Sale, cellules parabasales en quantité moyenne, quelques placards de cellules parabasales	Début de proœstrus	1,13	7,1	
18/01/2017	9						Injection de cloprosténol
19/01/2017	10		Sale, cellules parabasales en quantité moyenne, quelques placards de cellules parabasales	Début de proœstrus		7,11	
20/01/2017	11						Injection de cloprosténol
23/01/2017	14				0,7	7,05	Injection de cloprosténol
25/01/2017	16	0			0,94	7,4	Pose de l'implant
29/01/2017	20	4				6,95	
31/01/2017	22	6		Proœstrus		6,63	
01/02/2017	23	7			0,95		
03/02/2017	25	9			1,09	6,45	
06/02/2017	28	12				6,17	
08/02/2017	30	14			3,13	6,06	Retrait de l'implant

10/02/2017	32	16			8,21	6,25	
11/02/2017	33	17					IA1
12/02/2017	34	18					Ou IA1
13/02/2017	35	19					IA2
14/02/2017	36	20	Propre, cellules parabasales et intermédiaires en grand nombre, nombreux placards de cellules	Œstrus	32,13	6,32	Ou IA2
17/02/2017	39	23				6,4	
19/02/2017	41	25					J+5 ou 6
20/02/2017	42	26				6,6	
23/02/2017	45	29	Sale, présence de quelques polynucléaires neutrophiles, cellules parabasales en grand nombre, présence de quelques petits placards de cellules parabasales	Metœstrus		6,55	
08/03/2017	58	42				6,7	

Annexe 20 : Résultats de la chienne 6 pour la phase 2. Jpi : Nombre de jours après la pose de l'implant.

Date	J	Jpi	Frottis vaginal	Stade du cycle	Progesté-ronémie	pH vaginal	Autres
09/01/2017	0						Début de la complémentation
10/01/2017	1					7,25	
12/01/2017	3				15,07	7	
16/01/2017	7					7,2	
19/01/2017	10					7,1	
20/01/2017	11						Début de la complémentation
23/01/2017	14				7,73	7,27	
25/01/2017	16					7,23	
03/02/2017	25				3,99	7,15	Injection de cloprosténol
06/02/2017	28						Injection de cloprosténol
08/02/2017	30						Injection de cloprosténol
10/02/2017	32						Injection de cloprosténol
13/02/2017	35						Injection de cloprosténol
14/02/2017	36			Anœstrus	1,02	7,3	
15/02/2017	37						Injection de cloprosténol
17/02/2017	39						Injection de cloprosténol
20/02/2017	42				2,56		Injection de cloprosténol
22/02/2017	44						Injection de cloprosténol
23/02/2017	45				0,88		
24/03/2017	46						Injection de cloprosténol
27/02/017	49						Injection de cloprosténol

01/03/2017	51				1,67		Injection de cloprosténol
03/03/2017	53						Injection de cloprosténol
06/03/2017	56						Injection de cloprosténol
08/03/2017	58				1,51		Injection de cloprosténol
10/03/2017	60						Injection de cloprosténol
13/03/2017	63						Injection de cloprosténol
15/03/2017	65						Injection de cloprosténol
18/03/2017	68						Injection de cloprosténol
20/03/2017	70						Injection de cloprosténol

Annexe 21 : Résultats de la chienne 7 pour la phase 2. Jpi : Nombre de jours après la pose de l'implant.

Annexe 22 : Script dans R (logiciel).

```
library(nlme,pos=4)

pHoestrusI<-pHoestrus[pHoestrus[,5]=="Part1",]

scatterplot(pH~Progestérone, reg.line=FALSE, smooth=FALSE, spread=FALSE,
boxplots=FALSE, span=0.5, ellipse=FALSE, levels=c(.5, .9), data=pHoestrusI)

Modele1<-lme(pH~Progestérone,pHoestrusI,random=~1|Nom.de.la.chienne)
summary(Modele1)
qqnorm(Modele1)

pHoestrusII<-pHoestrus[pHoestrus[,5]=="Part2",]

scatterplot(pH~Progestérone, reg.line=FALSE, smooth=FALSE, spread=FALSE,
boxplots=FALSE, span=0.5, ellipse=FALSE, levels=c(.5, .9), data=pHoestrusII)

Modele2<-lme(pH~Progestérone,pHoestrusII,random=~1|Nom.de.la.chienne)
summary(Modele2)
qqnorm(Modele2)
```

Annexe 23 : Données pour le script dans R (logiciel). c : complémentée, nc : non complémentée. Part1 : progestéronémie < 4 ng/mL, Part2 : progestéronémie > 4 ng/mL.

Nom de la chienne	Temps	Progestérone	pH	Partie du graphique
Chienne 1c	1	1,6	6,9	Part1
Chienne 1c	8	1,83	6,58	Part1
Chienne 1c	11	1,78	6,05	Part1
Chienne 1c	12	3,15	5,73	Part1
Chienne 1c	15	12,26	6,05	Part2
Chienne 1c	18	58,32	5,84	Part2
Chienne 2nc	2	1,62	7,25	Part1
Chienne 2nc	6	1,69	6,75	Part1
Chienne 2nc	9	1,54	6,2	Part1
Chienne 2nc	13	6,7	6,1	Part2
Chienne 2nc	16	29,17	6,01	Part2
Chienne 2nc	20	54,85	7,05	Part2
Chienne 3nc	1	0,67	7,15	Part1
Chienne 3nc	4	1,07	6,6	Part1
Chienne 3nc	7	1	5,95	Part1
Chienne 3nc	11	2,98	5,99	Part1
Chienne 3nc	13	8,56	5,95	Part2
Chienne 3nc	15	24,68	6,1	Part2
Chienne 3nc	20	52,29	7,25	Part2

Chienne 4c	2	0,74	7,45	Part1
Chienne 4c	6	0,76	5,85	Part1
Chienne 4c	9	1	6,3	Part1
Chienne 4c	13	6,72	5,75	Part2
Chienne 4c	16	26,57	6,35	Part2
Chienne 4c	20	38,61	6,9	Part2
Chienne 5nc	1	0,61	7,2	Part1
Chienne 5nc	4	1,38	6,9	Part1
Chienne 5nc	7	1,72	6,19	Part1
Chienne 5nc	11	2,24	6,03	Part1
Chienne 5nc	13	6,18	5,97	Part2
Chienne 5nc	15	13,58	5,97	Part2
Chienne 5nc	20	61,74	7,05	Part2
Chienne 6c	3	1,31	7,3	Part1
Chienne 6c	4	1,16	6,45	Part1
Chienne 6c	7	1,05	6,18	Part1
Chienne 6c	14	15,71	6,25	Part2
Chienne 6c	18	50,47	6,85	Part2
Chienne 7nc	7	4,23	6,39	Part2
Chienne 7nc	9	2,46	6,46	Part1
Chienne 7nc	12	4,29	6,6	Part2
Chienne 7nc	15	16,64	6,35	Part2
Chienne 7nc	16	24,84	6,45	Part2
Chienne 1nc	9	1,39	6,26	Part1
Chienne 1nc	12	3,96	5,7	Part1
Chienne 1nc	15	9,26	5,87	Part2
Chienne 2c	9	1,53	6,25	Part1
Chienne 2c	14	8,18	5,86	Part2
Chienne 2c	16	26,55	6,2	Part2
Chienne 4nc	8	1,35	6,3	Part1
Chienne 4nc	13	6,29	5,99	Part2
Chienne 4nc	15	17,11	6,36	Part2
Chienne 4nc	19	41,14	6,45	Part2
Chienne 6nc	7	1,09	6,45	Part1
Chienne 6nc	12	3,13	6,06	Part1
Chienne 6nc	14	8,21	6,25	Part2
Chienne 6nc	18	32,13	6,32	Part2

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
Prog. moyenne	1,06	1,13	1,19	1,19	1,21	1,24	1,28	1,51	1,72	2,59
pH vaginal moyen	7,25	7,17	6,99	6,60	6,43	6,29	6,44	6,41	6,31	6,14
Prog. écart-type	0,270	0,279	0,295	0,255	0,275	0,315	0,337	0,305	0,456	0,480
pH vaginal écart-type	0,173	0,235	0,243	0,225	0,183	0,240	0,131	0,084	0,051	0,061
Prog. coeff. de variation	0,255	0,248	0,247	0,215	0,227	0,255	0,263	0,202	0,265	0,185
pH vaginal coeff. de variation	0,024	0,033	0,035	0,034	0,028	0,038	0,020	0,013	0,008	0,010
	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18		
Prog. moyenne	3,47	5,47	7,89	11,61	18,49	28,46	38,11	47,14		
pH vaginal moyen	6,03	5,97	5,95	6,04	6,19	6,24	6,28	6,39		
Prog. écart-type	0,843	1,251	1,961	2,911	3,682	2,317	5,679	9,678		
pH vaginal écart-type	0,056	0,175	0,152	0,141	0,151	0,226	0,252	0,301		
Prog. coeff. de variation	0,243	0,229	0,248	0,251	0,199	0,081	0,149	0,205		
pH vaginal coeff. de variation	0,009	0,029	0,026	0,023	0,024	0,036	0,040	0,047		

Annexe 24 : Moyennes, écart-types et coefficients de variation des progestéronémies (en ng/mL) et pH vaginaux pour les chiennes complémentées.

Prog. : progestérone. Coeff. de variation : coefficient de variation.

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
Prog. moyenne	0,88	1,07	1,23	1,39	1,51	1,64	1,75	1,78	1,94	2,63
pH vaginal moyen	7,24	7,14	7,02	6,86	6,65	6,48	6,30	6,26	6,21	6,13
Prog. écart-type	0,174	0,249	0,323	0,398	0,497	0,590	0,708	0,468	0,284	0,385
pH vaginal écart-type	0,090	0,119	0,142	0,169	0,188	0,150	0,131	0,117	0,103	0,117
Prog. coeff. de variation	0,199	0,233	0,262	0,285	0,328	0,359	0,404	0,263	0,146	0,147
pH vaginal coeff. de variation	0,012	0,017	0,020	0,025	0,028	0,023	0,021	0,019	0,017	0,019
	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18		
Prog. moyenne	3,31	4,58	6,79	11,52	16,73	25,12	31,36	37,59		
pH vaginal moyen	6,09	6,06	6,06	6,12	6,14	6,14	6,37	6,51		
Prog. écart-type	0,625	0,782	0,967	2,562	3,791	3,045	3,364	4,318		
pH vaginal écart-type	0,141	0,164	0,168	0,162	0,156	0,229	0,205	0,149		
Prog. coeff. de variation	0,189	0,171	0,142	0,222	0,227	0,121	0,107	0,115		
pH vaginal coeff. de variation	0,023	0,027	0,028	0,026	0,025	0,037	0,032	0,023		

Annexe 25 : Moyennes, écart-types et coefficients de variation des progestéronémies (en ng/mL) et pH vaginaux pour les chiennes non complémentées.

Prog. : progestérone. Coeff. de variation : coefficient de variation.

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
Prog. moyenne	0,94	1,09	1,22	1,32	1,40	1,50	1,58	1,68	1,86	2,61
pH vaginal moyen	7,24	7,15	7,01	6,76	6,57	6,41	6,35	6,32	6,24	6,13
Prog. écart-type	0,220	0,265	0,309	0,360	0,431	0,498	0,557	0,382	0,371	0,418
pH vaginal écart-type	0,120	0,163	0,175	0,219	0,219	0,193	0,140	0,105	0,097	0,102
Prog. coeff. de variation	0,233	0,243	0,254	0,273	0,307	0,333	0,352	0,227	0,199	0,160
pH vaginal coeff. de variation	0,017	0,023	0,025	0,032	0,033	0,030	0,022	0,017	0,016	0,017
	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20
Prog. moyenne	3,37	4,91	7,19	11,55	17,37	26,45	33,61	40,77	43,42	49,55
pH vaginal moyen	6,07	6,02	6,02	6,09	6,16	6,18	6,34	6,46	6,61	6,76
Prog. écart-type	0,728	1,052	1,311	2,686	3,857	2,895	4,806	6,812	5,684	8,087
pH vaginal écart-type	0,111	0,165	0,171	0,157	0,156	0,228	0,225	0,208	0,224	0,302
Prog. coeff. de variation	0,216	0,214	0,182	0,232	0,222	0,109	0,143	0,167	0,131	0,163
pH vaginal coeff. de variation	0,018	0,027	0,028	0,026	0,025	0,037	0,035	0,032	0,034	0,045

Annexe 26 : Moyennes, écart-types et coefficients de variation des progestéronémies (en ng/mL) et pH vaginaux sur les 11 cycles.

Prog. : progestérone. Coeff. de variation : coefficient de variation.



Annexe 27 : Comprimé Pet-Phos Croissance Grand Chien Ca/P=2 NDV (Laboratoire Ceva).

**Abstract du poster présenté lors du congrès de
l'ESDAR les 24-26 août 2017**

Preliminary results: Vaginal pH variations during oestrus cycle of the bitch.

L. Kouba¹, L. Martin², S. Michaud³, L. Amirat-Briand³ and D. Bencharif³

¹*Oniris : The National Veterinary, Food agriculture, and food hygiene school of Loire Atlantique, BP,*

²*Nutrition and Endocrinology Unit, ONIRIS: The National Veterinary, Food agriculture, and food hygiene school of Loire Atlantique, ³Laboratory of Biotechnology and Pathology of Reproduction, ONIRIS: The National Veterinary, Food agriculture, and food hygiene school of Loire Atlantique*

An optimal uterine environment is important for a successful fertilization after an insemination. The spermatozoa mobility can be affected by the vaginal pH, which can compromise the fertilization and hence pregnancy. The objective of this study was to follow the vaginal pH of the bitch during the estrus cycle. In total, 11 estrus cycles of 7 Beagle bitches, aged between 3 and 7 years old, were studied. The estrus was triggered using a Deslorelin acetate implant (SUPRELORIN® 4,7mg), implanted subcutaneously during anestrus – after termination of the metestrus using repeated subcutaneous injections (between 3 and 26) of a PGF2α analog (Cloprostenol, ESTRUMATE®) at the dose of 2,5µg/kg. The implant was removed 14 days after its implantation [1,2]. The estrus cycles were checked with vaginal smears and dosage of plasmatic progesterone with the Minividas® machine (Biomérieux). Vaginal pH was measured against the vaginal left wall, always at the same spot, using a surface pH electrode (SI analytics ScienceLine L39). The vaginal pH during anestrus is over 7 but drops sharply during proestrus, reaching pH values around 6. The vaginal pH remains low during ovulation and a few days (4 to 6) after (eg: pH=6,02±0,16 when progesterone=7,19±1,31). Then it starts to increase progressively again, to reach similar pH values as those obtained during the anestrus (eg: pH=6,61±0,22 when progesterone=43,42±5,68), highlighting the end of the fertile period. Conclusively, a sharp drop of the vaginal pH is observed during the proestrus and estrus of the bitch. Monitoring the vaginal pH could be a new method to follow the estrus cycle.

Vu : L'enseignant Rapporteur

De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes
Atlantique Oniris

Ojeunil Bencharif
Ojeunil Bencharif
Ojeunil BENCHARIF
Membre des Conférences

Vu : La Directrice Générale

De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Nantes Atlantique Oniris

D. BUZONI-GATHEMOS
P/D Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire
et de l'Alimentation Nantes Atlantique

Najoua BARRIERE
Najoua BARRIERE
Service des Formations Vétérinaires
Responsable Administrative

Nantes, le 27/06/17

Vu :

Le Président de la Thèse

Professeur

P. BARRIERE
P. BARRIERE

WS - -
WS - -

Vu :

Le Doyen de la Faculté de
Médecine de Nantes

Professeur Pascale JOLLIET

Vu et permis d'imprimer

NOM : *KOUBA*
Prénom : *LAURA*
KOUBA
LAURA

MODIFICATION DU SEXE-RATIO AVEC UNE ALIMENTATION ENRICHIE EN MINÉRAUX CHEZ LA CHIENNE.

RESUME

Les éleveurs canins ont souvent des préférences concernant le sexe des chiots à naître. Partant d'une croyance populaire selon laquelle l'alimentation de la femme peut conditionner le sexe de son futur enfant, nous avons cherché à la vérifier chez la chienne. Le pH vaginal est l'un des facteurs sur lequel l'alimentation pourrait agir, modifiant ainsi l'environnement vaginal induisant une fécondation préférentielle de l'ovocyte par un type de spermatozoïde (X ou Y). Nous avons nourri sept chiennes Beagle avec un complément alimentaire contenant notamment du calcium, du magnésium et de la vitamine D₃, et mesuré leur pH vaginal au cours de leur cycle œstral. Ces pH sont ensuite comparés à ceux obtenus lors de cycles œstraux pendant lesquels les chiennes ne sont pas complémentées. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les pH vaginaux des chiennes complémentées et ceux de celles qui ne l'étaient pas. En revanche, nous avons mis en évidence une chute marquée du pH vaginal lors du proœstrus. Ce dernier remonte ensuite progressivement à partir de l'ovulation, jusqu'à atteindre des valeurs similaires à celles obtenues avant le proœstrus. Cela n'a jamais été décrit auparavant chez la chienne. Une telle découverte ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de la reproduction canine, notamment dans le suivi du cycle sexuel de la chienne.

MOTS CLES : Sex-ratio, Alimentation, Chienne, Chien, pH, Calcium, Magnésium, Complément alimentaire, Minéraux du régime, Cycle œstral, Nutrition, Reproduction, Animaux mâles, Animaux femelles.

JURY Président : Monsieur le Professeur Paul BARRIERE, Professeur à la Faculté de Nantes

Rapporteur : Monsieur Djemil BENCHARIF, Maître de conférences à ONIRIS

Assesseur : Madame Catherine IBISCH, Maître de conférences à ONIRIS

ADRESSE DE L'AUTEUR

NOM DE L'IMPRMEUR

61 rue de la grange au loup
44300 Nantes

Faculté de Nantes