

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة ابن خلدون تيارت

UNIVERSITE IBN KHALDOUN TIARET

معهد علوم البيطرة

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

قسم الصحة الحيوانية

DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur vétérinaire

Présenté par : BENTRIA NACEUR

Insémination artificielle chez la chienne

Jury :

Président : DERRAR Sofiane

Encadrant (e) : SAIM Mohamed Said

Examineur : HAMDI Mohamed

Grade:

MCA

MCA

MCB

Année universitaire :2021/2022



Dédicaces

C'est avec profonde gratitude et sincères mots,

Que je dédie ce modeste travail de fin d'étude à mes chers parents ; qui ont sacrifié leur vie pour ma réussite et me ont éclairé le chemin par leurs conseils judicieux.

A mon très cher père Ahmed, le héros de ma vie, source d'amour, d'affection, de générosité et de sacrifices. Tu étais

toujours là près de moi pour me soutenir, m'encourager et me guider avec tes précieux conseils. Que ce travail soit le témoignage des sacrifices que vous n'avez cessé de déployer pour mon éducation et mon instruction. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et l'admiration que je porte au grand homme que vous êtes. Puisse Dieu le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A ma très chère mère Badra, source de ma vie, d'amour et de tendresse qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Vous m'avez toujours aidé par vos conseils et vos sacrifices. Puisse

Dieu le tout puissant

t'accorder meilleure santé et longue vie.

J'espère qu'un jour,

Je pourrai leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi que dieu leur prête bonheur et longue vie.

Je dédie aussi ce travail,

A mes frères Anas et Mohamed, que Dieu vous garde, je vous souhaite tout le bonheur que vous méritez. A ma sœur : Ikram pour sa patience, soutien et ses sentiments d'amour aux moments

*les plus difficiles. Je vous souhaite plein de succès, de joie et de
bonheur : Que Dieu vous garde et illumine ton chemin.*

*A mes ami(e)s ; Mostafa, Abdelillah, Abdelkader, Tarek,
Ilyes aux doux moments partagés de complicité et de
bonne humeur. Merci pour les*

très bons moments qu'on avait partagé ensemble. Je vous aime toutes.

A tous ceux et celles qui me sont chers.

Remerciements

Après avoir rendu grâce à Dieu le tout puissant et les miséricordieux, je tiens également à exprimer mes vifs respects et mes forts remerciements à mon promoteur: Dr SAIM Mohamed Said et Dr AYAD Mohamed Amine, pour leurs accueils, leurs assistances et leurs sens de former et d'informer.

Je tiens à remercier Monsieur le président du jury Dr Derrar Sofiane pour sa grande disponibilité.

Mes profonds remerciements pour le Dr HAMDI Mohamed membre de jury quia accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie Dr. SLIMANI Khaled pour son accueil et pour ses efforts et son assistance et sa grande disponibilité

Je remercie aussi toute l'équipe pédagogique de la faculté des sciences vétérinaires de Tiaret (ISVT) et l'équipe du clinique des carnivores et spécialement pour Dr.Besseghir pour les efforts fournis et les conditions de travail afin de mieux réussir dans cette tâche.

Finalement, je remercie tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

المخلص

يعد موضوع الإنجاب من أكثر الأسباب شيوعاً للاستشارات في الطب البيطري.

يرتكز الهدف من هذا العمل على تطوير تقنية التلقيح الاصطناعي داخل المهبل في الأنابيب.

تنقسم دراستي إلى قسمين ؛ يهدف الجزء النظري إلى تقديم تذكيرات تشريحية وفسولوجية للتكاثر ، ثم التطرق لتقنيات مراقبة فترة الشبق في أنثى الكلب وطرق تحصيل السائل المنوي للذكر وكذلك الفحوصات التي يجب أن تخضع لها الحيوانات المنوية لتقدير هذه الصفات و أخيراً التلقيح الاصطناعي.

في الجزء التجريبي ، تم الكشف بشكل خاص عن متابعة الشبق عند عدة إناث لتحديد اللحظة المناسبة لتلقيح أنثى الكلب ، وتقنية جمع وفحص السائل المنوي وفعل التلقيح.

الكلمات الدالة:

أكلة اللحم، التلقيح الاصطناعي، مراقبة الشبق، السائل المنوي، الحيوانات المنوية، تحصيل السائل المنوي،

Résumé

Le thème de la reproduction est l'un des motifs de consultations les plus fréquentes en médecine vétérinaire.

L'objectif de mon travail de master complémentaire s'attache à développer la technique d'insémination artificielle intra-vaginale chez l'espèce canine.

Mon étude s'articule sur deux parties ; une partie bibliographique visant à présenter des rappels anatomiques ainsi que physiologiques de la reproduction, puis j'ai abordé les techniques de suivi des chaleurs chez la chienne et les méthodes de récolte de la semence du mâle ainsi les examens que le sperme doit subir pour apprécier ces qualités et en fin l'insémination artificielle.

Dans la partie expérimentale, j'ai exposé plus particulièrement un suivi de chaleurs de plusieurs femelles pour déterminer le moment favorable pour inséminer la chienne, la technique de récolte et d'examen de la semence (spermogramme) et l'acte d'insémination lui-même.

Mots clés :

Carnivore, insémination artificielle, suivi des chaleurs, sperme, récolte.

Abstract

The subject of reproduction is one of the most frequent reasons for consultations in veterinary medicine.

The objective of my complementary master's work focuses on developing the technique of intravaginal artificial insemination in canines.

My study is divided into two parts; a bibliographical part aims to present anatomical and physiological reminders of reproduction, then I approached the techniques of monitoring heat in the female dog and the methods of harvesting the semen of the male as well as the examinations that the sperm must undergo to appreciate these qualities and finally artificial insemination.

In the experimental part, I exposed more particularly a follow-up of heats of several females to determine the favorable moment to inseminate the female dog, the technique of collection and examination of the semen (spermogram) and the technique of insemination.

Keywords :

Carnivores, artificial insemination, heat monitoring, sperm, harvest.

Dédicaces

Remerciements

ملخص

Résumé

Abstract

Table des matières

Liste des figures, tableaux

Liste des abréviations

Introduction :	1
A. Anatomie de l'appareil génitale de la chienne :	2
1. Les ovaires.....	2
2. L'oviducte :.....	2
3. L'utérus :.....	2
5. Le vagin :	2
5. La vulve :.....	2
6. Les mamelles :.....	2
B. Physiologie sexuelle de la chienne	3
1. La puberté	3
2. Cycle sexuel de la chienne.....	3
a) Pro-œstrus.....	4
b) Œstrus.....	4
c) Métœstrus et diœstrus	4
d) Anœstrus	5
3. Endocrinologie du cycle sexuel	5
a) GnRH.....	5
b) FSH.....	5
c) LH.....	5
d) Les œstrogènes	6
e) La progestérone	6
f) Notion de rétrocontrôle	6

4.	Durée de gestation	7
a)	Durée de gestation selon l'évènement pris comme point de départ	7
b)	Facteurs de variation de la durée de gestation	8
II.	PARTIE 2 : L'insémination artificielle chez la chienne	10
A.	Indications de l'insémination artificielle	10
1.	Trouble comportemental	10
a)	Différence hiérarchique entre le mâle et la lice	10
b)	Manque de libido chez le mâle	11
c)	Phénomène de préférence sexuelle	11
d)	Défaut de socialisation	11
e)	Traumatisme lors des saillies précédentes	11
f)	Cas particulier : le syndrome de féminisation	11
2.	Manque d'expérience de la part d'un ou des deux reproducteurs	12
3.	Affection ostéo-articulaire	12
a)	Douleur ostéo-articulaire	12
b)	Fracture de l'os pénien chez le mâle	12
4.	Disproportion morphologique entre mâle et femelle	13
5.	Malformation congénitale du vagin et de la vulve	13
6.	Raisons sanitaires	13
a)	Exemple de l'herpès virose	13
b)	Exemple des mycoplasmoses	14
7.	Eloignement géographique	14
B.	Réglementation de l'insémination artificielle	14
C.	Le suivi de chaleurs : détermination du moment idéal pour inséminer	15
1.	La cytologie vaginale	15
a)	Réalisation d'une cytologie vaginale	15
b)	Interprétation du frottis vaginal	16
(1)	Frottis de pro-œstrus	16
(2)	Frottis d'œstrus	17
(3)	Frottis de métœstrus	17
(4)	Frottis d'anœstrus	17

2.	Le dosage de progestérone	17
a)	Prélèvement de l'échantillon	18
b)	Méthodes de dosages	18
c)	Interprétation de la progestéronémie	18
D.	Choix de la semence	18
1.	Type de semence.....	18
a)	Semence fraîche	19
b)	Semence réfrigérée	19
c)	Semence congelée.....	20
E.	Techniques d'insémination artificielle	20
1.	Insémination intra-vaginale	20
a)	Matériel nécessaire à l'insémination intra-vaginale.....	20
b)	Technique d'insémination intra-vaginale.....	21
2.	Insémination intra-utérine	22
a)	Insémination intra-utérine transcervicale	22
(1)	Insémination transcervicale par endoscopie	22
(2)	Insémination transcervicale par méthode scandinave ou norvégienne.....	23
b)	Insémination intra-utérine chirurgicale	24
(1)	Insémination intra-utérine par laparotomie	24
(2)	Insémination intra-utérine par laparoscopie	25
3.	Insémination intra-tubaire	25
IV.	Partie expérimental : Insémination artificielle.....	26
A.	Objectifs :.....	26
1.	Matériels et méthodes :.....	26
a)	Lieu :.....	26
b)	Animaux :.....	26
2.	Matériel :.....	26
3.	Pour le suivi des chaleurs :.....	26
a)	Pour la récolte de sperme :.....	26
b)	Pour le spermogramme :.....	27
c)	Pour l'insémination artificielle :	27

4.	Examens gynécologiques :	28
a)	Les frottis vaginaux :	29
(1)	Réalisation :	29
(a)	Prélèvement :	29
(b)	Étalement et fixation :	29
(c)	Coloration :	29
(d)	Lectures des lames :	29
5.	Récolte de sperme :	30
a)	La récolte manuelle du sperme :	30
b)	Le spermogramme :	31
(1)	Les étapes du spermogramme	31
(2)	La mobilité :	31
(3)	La numération :	32
(4)	Test de vitalité :	32
(5)	Résultat et discussion :	33
(a)	Suivi des chaleurs :	33
(i)	Suivi des chaleurs par les observations cliniques :	33
(ii)	Suivi des chaleurs par les examens complémentaires (la cytologie vaginale) : 34	
(a)	Réalisation des frottis vaginaux :	34
(i)	Le prélèvement :	34
(ii)	L'étalement et la fixation :	34
(iii)	La coloration :	35
6.	Récolte manuelle :	37
a)	Spermogramme :	37
(1)	Examen macroscopique :	37
(2)	Examen microscopique :	37
(a)	La mobilité :	37
(b)	La concentration :	38
(c)	Test de vitalité :	38
7.	Les techniques d'inséminations artificielles intra-vaginales:	39
a)	En absence de la sonde OSIRIS (ballonnet gonflable) :	39

b) Le choix du moment de l'insémination :.....	41
Conclusion.....	42
Références	

Liste des figures:

	Titre des figures	Page
Figure 1 :	L'appareil génital de la chienne	3
Figure 2 :	Variations hormonales au cours du cycle sexuel de la chienne	7
Figure 3 :	Matériel nécessaire à l'insémination intra-utérine par méthode norvégienne	23
Figure 4 :	Matériel en place pour l'insémination intra-utérine par méthode norvégienne	24
Figure 5 :	Matériel utilisé pour la récolte de sperme	27
Figure 6 :	Les différents matériels utilisés dans l'insémination artificielle	28
Figure 7 :	Ecoulements vaginaux et examen de la vulve	33
Figure 8 :	Ecouvillon de proestrus	34
Figure 9 :	Etalement et fixation de frottis	34
Figure 10 :	Coloration de RAL 555	35
Figure 11 :	Proestrus	36
Figure 12 :	Les différentes fractions (urétrale, spermatique et prostatique)	37
Figure 13 :	Appréciation de la mobilité	38
Figure 14 :	Lubrification et intromission de la sonde	39
Figure 15 :	Injection de la 1ère fraction urétrale puis la fraction spermatique	40
Figure 16 :	Injection de la fraction prostatique et 2ml d'air et le retrait de la sonde.	40
Figure 17 :	Le massage clitoridien pendant 10 minutes	41

Liste des tableaux:

Liste des tableaux

	Titre des tableaux	Page
Tableau I :	Caractéristiques des différents types de sonde à ballonnet utilisées pour l'insémination intra-vaginale canine	21

Liste des abréviations:

TRIS : Tri-hydroxy-méthyl-amino méthane

PeniG : Peniciline G

LH : Hormone lutéinisante

FSH : Follicle Stimulating Hormone

GnRH : Gonadotro phin releasing hormone

CERREC : Centre d'Etude et de Recherche en Reproduction et Elevage des Carnivores

LOF : Livre des Origines Français

FCI : Fédération Cynologique Internationale

ELISA : Enzyme-Linked Immuno Assay

Introduction

L'insémination artificielle a été découverte au XVIIIème siècle notamment avec la première insémination chez le chien pratiquée par l'Abbé Spallanzani en 1780 et ayant conduit à la naissance de trois chiots suite à l'insémination d'une chienne avec de la semence fraîche. Au XIX et XXIème siècle, des essais ont été réalisés dans le but d'améliorer la collecte et la conservation de la semence dans l'espèce canine mais les réelles avancées dans ce domaine ont eu lieu dans les années cinquante grâce au développement de l'insémination artificielle dans l'espèce bovine. La première portée obtenue par Seager à partir de semence congelée est née en 1969 aux Etats-Unis. Au cours des vingt dernières années, plusieurs travaux ont visé à améliorer le taux de réussite grâce à une meilleure conservation de la semence par congélation, une meilleure connaissance du cycle œstral de la chienne et à de meilleures techniques d'insémination, mais surtout par la confirmation de son intérêt zootechnique.

Compte tenu des particularités du cycle de la chienne, comportant des périodes d'œstrus tous les 6 à 7 mois, tout échec lors de la mise à la reproduction implique une perte de temps pour l'éleveur. L'insémination artificielle peut être un outil précieux dans la gestion et l'optimisation de la reproduction en élevage canin.

En France, le chien de race est en popularité grandissante. En dépit des problématiques économiques actuelles, le nombre d'inscriptions au LOF augmente chaque année : en 2018, le nombre d'inscriptions était de 234 073, soit près de 20% de plus qu'il y a 10 ans (42,43). Le marché du chien de race est donc en plein essor.

Afin de satisfaire la demande, les éleveurs canins doivent augmenter leurs performances. Le recours à un suivi de chaleurs et à une insémination artificielle permet d'obtenir de meilleurs résultats en termes de fertilité et de prolificité, de remédier à des problèmes d'infertilité, d'améliorer le potentiel génétique des chiens de race. Ainsi, l'insémination artificielle canine s'est considérablement développée ces dernières années, notamment dans des centres d'inséminations comme le CERREC. A titre d'exemple, le CERREC réalisait seulement une soixantaine d'inséminations par an avant 2000, a atteint la centaine d'inséminations en 2007 et a procédé à plus de 150 inséminations en 2017 (42).

Les vétérinaires, principaux collaborateurs des éleveurs, sont donc eux aussi constamment soucieux d'améliorer leurs compétences et la qualité des services qu'ils proposent. Au CERREC, les pratiques ont considérablement évolué au fil des années. Régulièrement, des études de performances sont entreprises afin de poser un regard critique sur les méthodes employées (42,43).

L'objectif de cette thèse sera donc de faire une insémination artificielle au méthode intra-vaginale. ces dernières années et d'étudier quels facteurs peuvent avoir une influence positive ou négative sur cette technique.

CHAPITRE I : Rappels anatomique et physiologique de l'appareil génital de la chienne

A. Anatomie de l'appareil génitale de la chienne :

L'appareil génital femelle comprend la vulve, les organes internes et les mamelles. Les organes internes sont les ovaires, les trompes utérines, l'utérus et le vagin.

1. Les ovaires : sont situés en arrière des reins, les deux gonades sont entourées par une bourse ovarienne et graisseuse, les ovaires interviennent dans la production ovocytaire au cours d'un processus appelée ovogénèse. Outre cette fonction primordiale, l'ovaire favorise la synthèse des œstrogènes et de la progestérone. Ses hormones jouent un rôle dans les modifications physiques et comportementales liées au cycle sexuel, le maintien de la gestation et le déclenchement de la mise bas (3).

2. L'oviducte : autrement dite les trompes utérines, entourent complètement l'ovaire. Elles recueillent les ovocytes libérés par les ovaires au moment de l'ovulation, lieu de la fécondation (3).

3. L'utérus : de la chienne a une forme en Y le pied correspond au corps de l'utérus alors que les branches représentent les cornes dans lesquelles se développent les fœtus. L'utérus communique avec le vagin par le col de l'utérus.

4. Le vagin : situé en arrière de l'utérus, accueille avec le vestibule le pénis du mâle lors de l'accouplement (3).

5. La vulve : est l'orifice terminal de l'appareil génital femelle, composée de deux lèvres verticales. Cette dernière comporte un bulbe vestibulaire érectile qui bloque le pénis et prolonge l'acte copulatoire au moment de la saillie (3).

6. Les mamelles : jouent un rôle dans la fonction de la reproduction, elles sont au nombre de cinq (5) paires : deux paires thoracique, deux paires abdominales et une paires inguinale (3).

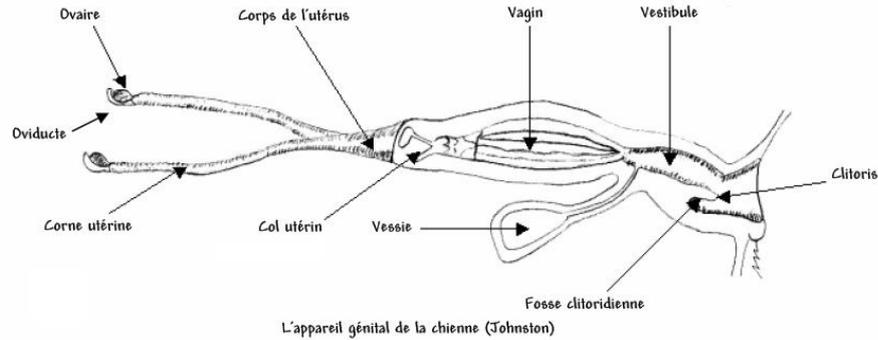


Figure 01 : L'appareil génital de la chienne (5)

B. Physiologie sexuelle de la chienne

1. La puberté

La puberté chez la chienne est définie comme l'âge d'apparition des premières chaleurs. L'âge de la puberté dépend de la taille à l'âge adulte et varie généralement entre 4 et 18 mois (4). Chez les petites races, la puberté survient plutôt avant l'âge de 9 mois alors que les chiennes de races grandes à géantes peuvent présenter leurs premières chaleurs à plus de 15 mois (4,5).

On parlera d'impubérisme si une chienne n'a pas présenté ses premières chaleurs à 2 ans, mais cela est rare (les premières chaleurs passant facilement inaperçues chez certaines chiennes) (4).

2. Cycle sexuel de la chienne

La chienne est mono-œstrienne non saisonnière : il n'y a qu'une période d'ovulation spontanée par cycle de reproduction, et ces cycles sont généralement indépendants de la saison.

Il est courant de dire que la chienne présente deux cycles par an. En effet, l'intervalle entre deux épisodes de chaleurs, dénommé intervalle interœstrus, dure 7 mois en moyenne. En réalité, il existe une variabilité raciale et individuelle importante. Par exemple, certaines races primitives comme le Dogue du Tibet et le Basenji ont conservé une activité saisonnière : elles ont un seul cycle par an en hiver. Inversement, le Berger allemand présente un intervalle interœstrus plus court que la moyenne (6). Le cycle sexuel de la chienne est découpé en 4 étapes : pro-œstrus, œstrus, métœstrus et anœstrus. Le pro-œstrus et l'œstrus correspondent à la période des chaleurs. Durant ces phases a lieu la maturation des follicules ovariens puis l'ovulation.

Le métœstrus est la phase de mise en place et de fonctionnement du corps jaune.

Enfin, l'anœstrus est une période de repos sexuel.

a) Pro-œstrus

Le pro-œstrus débute par l'apparition d'un écoulement séro-hémorragique à la vulve de la chienne. Cette période est également caractérisée un œdème vulvaire et une attirance des mâles. Toutefois, la chienne n'est pas encore réceptive au mâle et peut même présenter de l'agressivité à son égard.

D'autres modifications comportementales sont également caractéristiques du pro-œstrus : la chienne est généralement plus excitée et a tendance à perdre l'appétit (7).

Le pro-œstrus dure 9 jours en moyenne, mais sa durée est très variable : de 2 à 15 jours (7).

Au fil des jours, les écoulements vulvaires passent de séro-hémorragiques à séreux et sont de moins en moins abondants. La chienne est de plus en plus réceptive au mâle.

b) Œstrus

La phase suivante, l'œstrus, est caractérisée par l'acceptation du mâle, en plus de tous les signes précédents. A l'approche du mâle, la chienne présente une attitude caractéristique (lordose, déviation de la queue sur le côté).

L'œstrus dure en moyenne 10 jours et sa durée peut varier de 3 à 12 jours (7).

L'ovulation se produit généralement dans les 5 premiers jours de l'œstrus, bien que plus de 70% des chiennes ovulent dans les 3 premiers jours de l'œstrus (7). L'ovulation chez la chienne correspond à la libération d'un oocyte primaire, non fécondable. Celui-ci doit compléter sa méiose dans l'oviducte. Cette maturation dure 36 à 48h (soit environ 2 jours). Ensuite, l'ovocyte mature reste fécondable pendant 2 jours, parfois un peu plus (8).

c) Métœstrus et diœstrus

Théoriquement, on distingue le métœstrus (mise en place du corps jaune) et le diœstrus (période d'activité du corps jaune). En réalité, ces 2 phases sont le plus souvent regroupées, soit sous le terme de métœstrus, soit sous le terme de diœstrus. Par la suite, nous parlerons donc de métœstrus au sens large.

La chienne est en métœstrus lorsqu'elle n'accepte plus le mâle. De plus, l'œdème et les écoulements vulvaires disparaissent rapidement dès les premiers jours du métœstrus.

Chez la chienne, une activité lutéale est toujours présente, que la chienne soit gestante ou non. Chez la chienne non gestante, le corps jaune reste fonctionnel pendant 55 à 90 jours, et en moyenne 65 jours (7). Dans le cas où la chienne est gestante, le fonctionnement du corps jaune est interrompu au moment de la mise-bas.

d) Anœstrus

Il s'agit d'une période de repos sexuel et d'inactivité ovarienne. La durée de cette étape est extrêmement variable : de 40 à 270 jours. Cela explique la variabilité de l'intervalle interœstrus entre les chiennes.

Cette phase est importante car elle conditionne le bon déroulement du cycle suivant. En effet, c'est pendant l'anœstrus qu'a lieu l'involution utérine après la mise-bas. Sachant que l'involution utérine dure 135 jours, on considère donc que la durée minimale normale de l'anœstrus est également de 135 jours, soit 4,5 mois (6).

3. Endocrinologie du cycle sexuel

Les hormones qui interviennent dans le cycle sexuel sont sécrétées à 3 niveaux : hypothalamique (GnRH), hypophysaire (FSH et LH) et gonadique (œstrogènes et progestérone).

a) GnRH

La GnRH est une hormone sécrétée de manière pulsatile par l'hypothalamus. La GnRH stimule la libération des gonadotrophines hypophysaires FSH et LH.

La sécrétion de GnRH est elle-même influencée par des sollicitations nerveuses et hormonales. Par exemple des stimuli sensitifs tels que la vue, l'ouïe, l'odorat, sont capables de stimuler sa sécrétion (8).

L'augmentation de la fréquence des pulses de libération de la GnRH marque le passage de l'anœstrus au pro-œstrus, en stimulant indirectement la croissance folliculaire par l'intermédiaire de la FSH.

b) FSH

La FSH est une hormone sécrétée par l'hypophyse antérieure en réponse à une stimulation par la GnRH.

La FSH induit la croissance et la maturation des follicules ovariens au cours du pro-œstrus (9).

c) LH

La LH est également une hormone hypophysaire sécrétée lors de la stimulation de l'hypophyse par la GnRH.

La LH agit en synergie avec la FSH sur la croissance des follicules ovariens.

De plus, le pic de sécrétion de LH en fin de pro-œstrus est à l'origine de la lutéinisation préovulatoire des follicules (sécrétion de progestérone par les cellules folliculaires) puis de l'ovulation 30 à 48 heures plus tard (9).

d) Les œstrogènes

Les œstrogènes (et en particulier le 17- β -œstradiol) sont sécrétés par les cellules de la thèque interne des follicules ovariens en croissance. Ils sont responsables des modifications physiques et comportementales caractéristiques des chaleurs.

Au cours du pro-œstrus, la concentration plasmatique d'œstradiol augmente progressivement jusqu'à la fin du pro-œstrus, où elle atteint un pic 1 à 2 jours avant le pic de sécrétion de LH (10). Enfin, celle-ci chute rapidement en parallèle de l'élévation de la progestéronémie.

e) La progestérone

La progestérone est sécrétée par les follicules ovariens en période pré-ovulatoire, puis par le corps jaune après l'ovulation.

Elle est responsable de la dentellisation de la muqueuse utérine, la préparant ainsi à la nidation. De plus, elle inhibe la motricité utérine et maintient le col fermé pendant la gestation (8).

La progestéronémie, d'abord basale à une concentration inférieure à 1 ng/ml, atteint une concentration de 2 à 3 ng/ml (6 à 9 nmol/L environ) au moment du pic de LH (10,11).

A l'ovulation, ce taux se situe à des valeurs de 4 à 10 ng/ml selon les laboratoires (10,11).

Pendant le métœstrus, le corps jaune sécrète de la progestérone en quantité importante, que la chienne soit gestante ou non. Puis le corps jaune régresse et la progestéronémie diminue en parallèle. Si la chienne n'est pas gestante, la décroissance est progressive, alors que chez la chienne gestante, une chute brutale de la progestéronémie se produit 2 jours avant la mise bas (8).

f) Notion de rétrocontrôle

L'activité hypothalamo-hypophysaire est finement régulée par les hormones hypophysaires et les stéroïdes sexuels. On parle donc de rétrocontrôle.

Un rétrocontrôle négatif est exercé par les hormones hypophysaires FSH et LH sur la sécrétion de GnRH. Il s'agit d'un rétrocontrôle « court » (8).

Les hormones ovariennes exercent quant à elles un rétrocontrôle « long » sur la sécrétion de GnRH :

- les œstrogènes en forte concentration en fin de pro-œstrus exercent un rétrocontrôle positif sur la sécrétion de GnRH, ce qui induit une sécrétion plus importante de FSH et LH, à l'origine du pic pré-ovulatoire de LH ;

- la progestérone en forte concentration exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GnRH, FSH et LH (8).

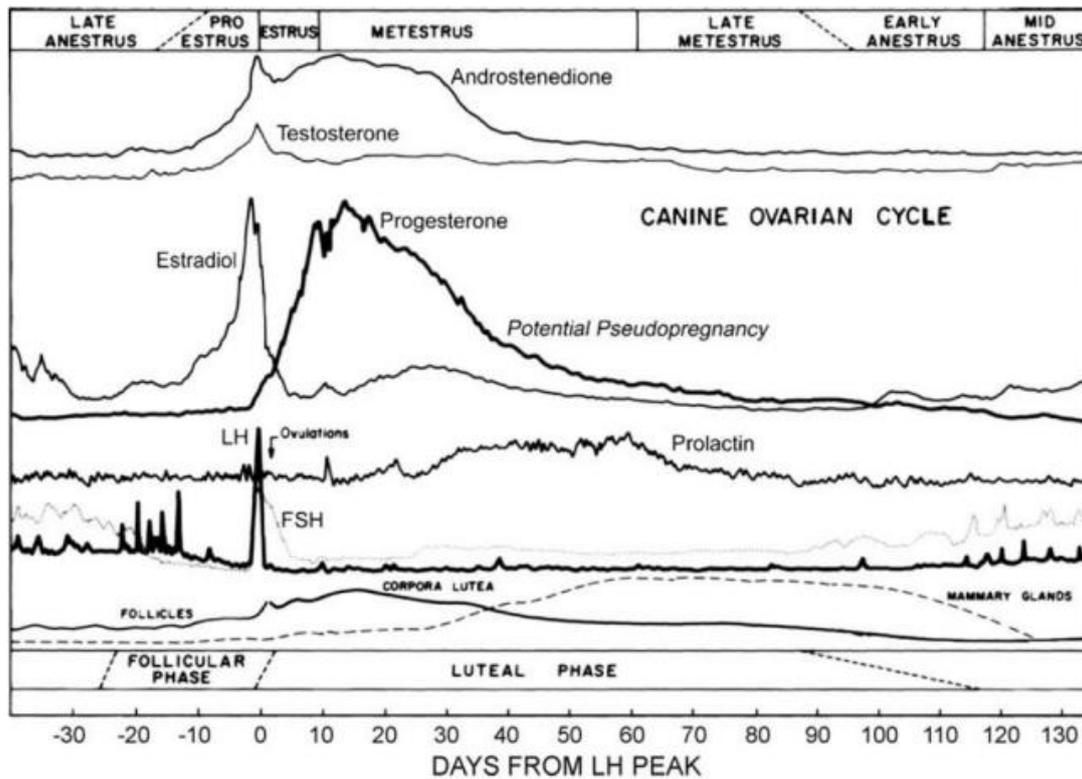


Figure 2 : Variations hormonales au cours du cycle sexuel de la chienne (5)

4. Durée de gestation

a) Durée de gestation selon l'évènement pris comme point de départ

La durée de gestation est extrêmement variable selon l'évènement défini comme point de départ de la gestation.

Si le premier accouplement est considéré comme point de départ, la durée de gestation varie entre 57 et 72 jours (13). Cette différence s'explique notamment par :

- la longue période de réceptivité de la femelle (jusqu'à 12 jours d'œstrus) ;
- la viabilité prolongée des spermatozoïdes dans les voies génitales de la femelle : au maximum 9 jours (13) ;

- la maturation de 2 jours obligatoire de l'ovocyte après l'ovulation. Pendant cette période, la fécondation est impossible.

Ainsi, une chienne saillie le premier jour de l'œstrus peut sans problème être fécondée 7 jours plus tard (en supposant que l'ovulation ait lieu 5 jours après le début de l'œstrus, et en ajoutant la durée de 2 jours de maturation de l'ovocyte).

En pratique, c'est le pic de LH ou l'ovulation (2 jours après le pic de LH) qui sont considérés comme point de départ de la gestation car l'intervalle entre le pic de LH pré ovulatoire /l'ovulation et la mise bas est beaucoup moins variable :

- d'après une étude sur 54 chiennes Beagle, la durée entre le pic de LH et la mise bas était de 64 à 66 jours, avec une moyenne de 65,1 jours (13);

- d'après une autre étude sur 1146 chiennes de toutes races, cette durée était de 65 +/- 1,9 jours (14) ;

- dans une étude de 2011 sur 162 gestations, la durée moyenne de gestation en prenant pour point de départ l'ovulation (définie comme le jour où la progestéronémie atteignait une valeur de 6 ng/ml) était de 63,1 +/- 2,1 jours, et 77,8% des chiennes mettaient bas entre 61 et 65 jours post ovulation (15).

La durée de gestation de la chienne en prenant pour point de départ l'ovulation est donc généralement comprise entre 61 et 65 jours.

Un autre évènement peut également être considéré comme point de départ de la gestation : le premier jour de métœstrus. La durée de gestation est alors de 57 jours en moyenne.

Récemment, une étude sur 24 chiennes a montré que prendre le premier jour de métœstrus comme point de départ permettait de prédire la date de mise-bas avec plus de précision qu'avec le pic de LH ou l'ovulation (16).

b) Facteurs de variation de la durée de gestation

En dehors de tout phénomène pathologique, la durée de gestation peut varier en fonction de nombreux paramètres intrinsèques et extrinsèques :

- le nombre de chiots : il a été montré que la durée de gestation était inversement corrélée à la taille de la portée. Il n'est donc pas rare d'observer de plus longues durées de gestation au-delà de 65 jours lors de chiot unique par exemple, sans que cela ne soit forcément pathologique (15) ;

- le poids de la chienne : la durée de gestation est plus longue chez les grandes races que chez les petites races (15) ;

- la méthode de dosage de la progestérone, le calibrage de l'appareil et la valeur définie comme correspondant au seuil ovulatoire. Ainsi, chaque centre de reproduction est familier avec ses méthodes et les durées de gestation sont généralement bien connues. Au CERREC, il est communément admis que la durée de gestation est de 61 à 63 jours après l'ovulation.

II. CHAPITRE 2 : L'insémination artificielle chez la chienne

Cette seconde partie sera consacrée à l'insémination artificielle chez la chienne.

Dans un premier temps, nous développerons les principales indications de l'insémination artificielle chez la chienne, suivies de quelques points de réglementation.

Puis, nous présenterons des notions beaucoup plus pratiques autour de l'insémination artificielle, en suivant un ordre chronologique ; nous détaillerons d'abord les différents moyens de réaliser un suivi de chaleurs, dont l'objectif est de déterminer le moment optimal pour réaliser une insémination. Puis, nous nous intéresserons au choix de la semence et à l'évaluation de sa qualité. Enfin, nous décrirons les différentes techniques d'insémination artificielle ainsi que les résultats que l'on peut obtenir à partir de données issues de la littérature.

A. Indications de l'insémination artificielle

D'après le règlement international d'élevage de la FCI, pour des raisons éthiques, le recours à l'insémination artificielle n'est à envisager que si la saillie naturelle a déjà été réalisée auparavant (17).

Il est possible de pratiquer exceptionnellement l'insémination artificielle en première intention si cela est justifié à des fins d'amélioration de la santé ou du pool génétique de la race, ou pour le bien-être de la chienne (17). Ces critères justifient la réalisation d'inséminations artificielles en élevage notamment.

Il existe de nombreuses causes d'échec de la saillie naturelle, qui peuvent concerner le mâle et/ou la liche.

1. Trouble comportemental

Il s'agit ici de tout refus de la saillie, de la part de la liche ou du mâle, qui ne soit pas dû à un problème médical.

a) Différence hiérarchique entre le mâle et la liche

Si la liche est de nature très dominante par rapport au mâle, la saillie peut être compromise. En effet, la femelle peut se dérober ou même manifester de l'agressivité à l'approche du mâle.

Dans le même sens, un mâle plutôt soumis n'osera pas toujours aller à l'encontre de la femelle.

b) Manque de libido chez le mâle

Certaines races sont réputées pour avoir peu ou pas de libido, comme le Basset hound, le West Highland white terrier et le Golden Retriever (18).

c) Phénomène de préférence sexuelle

Même dans des conditions à priori idéales pour la saillie naturelle, en dehors de tout problème hiérarchique, une chienne peut totalement refuser un mâle et en accepter un autre, et inversement pour le chien: c'est le phénomène de préférence sexuelle (18).

d) Défaut de socialisation

Il existe une période sensible durant laquelle le jeune chiot est plus facilement influencé par ce qui l'entoure. Les expériences vécues pendant cette période auront des conséquences sur le tempérament de l'animal pendant toute sa vie. Chez le chiot, cette période commence à 3 semaines et se termine à 12 semaines. Durant cette période, le chiot s'identifie à sa propre espèce, et apprend à interagir avec des individus de son espèce ou d'une espèce différente. Ainsi, une période de socialisation mal gérée avec trop peu de contacts sociaux peut conduire à des troubles du comportement sexuel (18).

e) Traumatisme lors des saillies précédentes

Un traumatisme physique ou psychologique lors d'une saillie peut induire un blocage à l'occasion de saillies ultérieures.

f) Cas particulier : le syndrome de féminisation

Chez le chien mâle, il s'agit d'un syndrome paranéoplasique consécutif à la sécrétion excessive d'œstrogènes par une tumeur testiculaire (sertolinome) ou plus rarement surrénalienne (4).

La modification du comportement constitue un motif de consultation fréquent pour les propriétaires. Les symptômes classiquement retrouvés sont :

- dermatologiques : alopecie non prurigineuse bilatérale, intéressant le plus souvent la sphère génitale et périnéale ainsi que le ventre, et épargnant la tête et les extrémités.

Parfois, on retrouve uniquement une dermatose au niveau du fourreau, caractérisée par de l'érythème et de l'hyperpigmentation ;

- morphologiques : ptose du fourreau, gynécomastie et diminution de la masse musculaire ;

- comportementaux : baisse de la libido, comportement de femelle (chien qui attire les autres mâles et qui urine comme une femelle) (4).

Face à ce type de symptômes, il convient de palper les testicules à la recherche d'une asymétrie ou d'une cryptorchidie. En cas de cryptorchidie, le risque d'apparition de sertolinome est élevé surtout si le testicule ectopique est en position abdominale (4). Le traitement consiste en une castration chirurgicale, afin de retirer la tumeur. De plus, il n'est pas raisonnable de faire reproduire un chien cryptorchide en raison du risque de transmission de cette anomalie à la descendance (4).

2. Manque d'expérience de la part d'un ou des deux reproducteurs

Une saillie entre deux reproducteurs expérimentés se fera en général plus rapidement que s'il s'agit d'une première expérience pour les reproducteurs. La saillie possède une part d'apprentissage, c'est pourquoi il vaut mieux que l'un des deux reproducteurs soit expérimenté pour que la saillie ait plus de chance de bien se dérouler (18).

3. Affection ostéo-articulaire

Toute affection débilante et/ou douloureuse peut être à l'origine d'un échec de la saillie. Selon la nature de cette affection, il sera possible ou non d'envisager une insémination artificielle.

a) Douleur ostéo-articulaire

Que cela concerne le mâle ou la femelle, l'existence d'une douleur ostéo-articulaire limite physiquement les possibilités de saillie.

Si c'est la femelle qui est atteinte, il sera peut-être judicieux de l'écartier au moins temporairement de la reproduction car la prise de poids engendrée par la gestation peut être source de souffrance et d'aggravation de l'affection présentée.

Dans le cas d'une affection ostéo-articulaire touchant le mâle, on peut tout à fait envisager une insémination artificielle selon la nature de l'affection douloureuse.

b) Fracture de l'os pénien chez le mâle

La fracture de l'os pénien est rare. Elle est due le plus souvent à un traumatisme, moins fréquemment à une tumeur (4).

Les symptômes sont variables : la fracture de l'os pénien peut rester asymptomatique mais dans les cas plus graves, les fragments osseux ou le cal peuvent provoquer une obstruction de l'urètre pénien et secondairement une insuffisance rénale post-rénale. La douleur occasionnée lors de l'érection est responsable d'une diminution de la libido (4).

La réparation chirurgicale est délicate : la cicatrisation se fait par seconde intention (4).

4. Disproportion morphologique entre mâle et femelle

Chez certaines races, le mâle peut être physiologiquement de poids beaucoup plus important que la femelle. Il peut également y avoir un problème d'obésité du mâle. On procèdera alors à une insémination artificielle dans le but d'épargner à la femelle une éventuelle douleur lors du chevauchement.

5. Malformation congénitale du vagin et de la vulve

Chez la chienne, un certain nombre d'anomalies congénitales peuvent être à l'origine d'un échec de la saillie : Vulve étroite, vulve barrée, bride vaginale, septum vaginal, etc.

Le colley et le berger picard présentent fréquemment une vulve barrée. Il s'agit d'un recouvrement partiel ou total de la vulve par le repli périnéal (4).

La bride vaginale est due à une formation anormale de l'hymen ou à une déchirure prénatale anormale de celui-ci.

Le septum vaginal correspond à une grande bride. Si la bride peut éventuellement se rompre pendant la saillie, ce n'est généralement pas possible dans le cas d'un septum.

Les malformations du vagin et de la vulve peuvent être responsables d'infertilité et de dystocie mais aussi de vaginites et de cystites récidivantes.

6. Raisons sanitaires

Il est préférable de procéder à une insémination artificielle si l'un des reproducteurs est porteur d'une maladie contagieuse ou sexuellement transmissible (dermatose parasitaire, herpès virose, mycoplasme, etc.).

a) Exemple de l'herpès virose

L'herpès virose canine est due à un herpès virus et est principalement responsable d'infertilité, d'avortements et de mortinatalité. La transmission est oro-sinusale, vénérienne et transplacentaire (4).

Chez l'adulte, des signes respiratoires ou des lésions de l'appareil génital (vésicules et ulcères) peuvent également survenir. Chez le chiot nouveau-né, la maladie se traduit par un syndrome fébrile et des troubles digestifs, apparaissant le plus souvent avant l'âge d'une semaine. Le chiot peut ensuite développer des troubles neurologiques et des troubles de l'hémostase (pétéchies). La mort est fréquente en quelques jours (4).

Le diagnostic chez la chienne passe par la réalisation d'une sérologie ou d'une PCR sur écouvillon vaginal.

Il n'existe pas de traitement spécifique. Par contre, une prophylaxie médicale est possible en vaccinant la mère. Le protocole classique est de 2 injections à 1 mois d'intervalle dont une 10 à 14 jours avant la mise bas (4).

b) Exemple des mycoplasmoses

Les mycoplasmoses sont des maladies dues à des bactéries du genre *Mycoplasma*.

Les mycoplasmes sont des bactéries commensales de la sphère génitale de la chienne, mais au-delà d'une certaine quantité, ils deviennent pathogènes et sont responsables de vaginites, d'infertilité, d'avortements et de mortinatalité. Chez le chien, ils peuvent entraîner des balanoposthites, des urétrites ou également de l'infertilité (4).

Le diagnostic est réalisé par bactériologie sur écouvillon vaginal ou prélèvement de semence. L'implication des mycoplasmes dans un trouble de la reproduction est établie au-delà d'une concentration de 10⁶ UFC/ml, douteuse entre 10⁴ et 10⁶ UFC/ml et exclue en dessous de 10⁴ UFC/ml (5).

Le traitement fait appel à des antibiotiques de la famille des macrolides (josamycine), des tétracyclines (doxycycline) ou des fluoroquinolones (4).

7. Eloignement géographique

En élevage canin, les deux reproducteurs choisis pour la portée sont souvent éloignés l'un de l'autre. Dans ce cas, il est plus simple et plus rapide d'envoyer la semence réfrigérée ou congelée pour une insémination artificielle.

B. Réglementation de l'insémination artificielle

Une insémination artificielle est un acte vétérinaire, mais peut, sous certaines conditions, être réalisée par l'éleveur (celui-ci est autorisé à réaliser une insémination intra-vaginale en semence fraîche).

Tout vétérinaire, s'il souhaite pratiquer une activité de reproduction dans sa clientèle, est habilité à réaliser une insémination artificielle en semence fraîche. Par contre, la réalisation d'une insémination en semence réfrigérée ou congelée est réservée aux vétérinaires agréés, c'est-à-dire ayant suivi une formation spécifique dans une école vétérinaire. Dans le cas contraire, la portée issue de l'insémination peut ne pas être admissible au LOF (19).

D'après le règlement international d'élevage de la FCI, pour toute insémination artificielle, le vétérinaire qui prélève la semence doit rédiger un document attestant de l'identité du mâle dont la semence a été récoltée et l'envoyer au service tenant le livre des origines (17).

De plus, le vétérinaire inséminateur doit lui aussi rédiger une attestation d'insémination artificielle pour le service tenant le livre des origines, en précisant l'identification de la lice et du mâle (17)

C. Le suivi de chaleurs : détermination du moment idéal pour inséminer

Le suivi de chaleurs a pour objectif de déterminer avec précision la date d'ovulation et par conséquent d'inséminer au moment optimal de fertilité de la chienne.

La période fertile de la chienne est courte : l'ovocyte mature n'est fécondable que pendant 2 jours. Le suivi de chaleurs est donc particulièrement recommandé dans cette espèce, que l'on souhaite procéder à une saillie naturelle ou à une insémination artificielle.

En plus d'augmenter les chances de gestation, la détermination de la date d'ovulation permet d'avoir une meilleure estimation de la date de mise bas. Cela prend toute son importance lorsqu'une dystocie est prévisible (race prédisposée, chiot unique, antécédents de dystocie).

Il existe différentes techniques permettant d'effectuer un suivi de chaleurs chez la chienne.

Nous détaillerons essentiellement la cytologie vaginale et le suivi de la progestéronémie, qui sont les méthodes les plus communément utilisées car elles sont simples à mettre en œuvre, rapides et fiables lorsqu'elles sont associées.

1. La cytologie vaginale

Au cours des chaleurs, l'augmentation du taux sanguin d'œstrogènes est à l'origine d'un épaissement de l'épithélium vaginal. Le nombre de couches cellulaires augmente, et les cellules les plus superficielles subissent une kératinisation et une dégénérescence. De ce fait, différents types cellulaires se mettent en place (11). Le type de cellules visualisées et leur proportion permet alors d'indiquer au clinicien si la chienne est en pro-œstrus, en œstrus, en métœstrus ou en anœstrus.

La cytologie vaginale est un examen simple de première intention, qui doit être couplé à un autre examen complémentaire comme le dosage de progestérone si l'on veut connaître avec précision la date d'ovulation de la chienne (11).

En pratique, le premier frottis vaginal est généralement réalisé 5 à 6 jours après le début des pertes sanguines (11).

a) Réalisation d'une cytologie vaginale

Un écouvillon stérile est introduit verticalement dans le vagin, de façon à éviter la fosse clitoridienne, puis horizontalement afin de se rapprocher le plus possible du col utérin. Un

mouvement de rotation de l'écouvillon contre la muqueuse vaginale permet de récolter les cellules épithéliales.

L'écouvillon est ensuite roulé 2 à 3 fois sur une lame dans le sens de la longueur, de manière à réaliser des étalements parallèles. La lame est ensuite séchée puis colorée.

Il existe différentes colorations possibles : Coloration RAL 555, coloration de May-Grünwald Giemsa ou coloration de Harris Shorr. La coloration de Harris Shorr est plus longue à effectuer mais est intéressante dans l'interprétation des frottis vaginaux car elle permet de distinguer les cellules acidophiles (rouges) des cellules basophiles (bleues).

b) Interprétation du frottis vaginal

Lors de la lecture du frottis vaginal, on peut observer différents types de cellules : des cellules épithéliales vaginales, des hématies, des PNN et des bactéries.

Les cellules épithéliales peuvent être de 3 types en fonction de leur degré de différenciation :

- les cellules parabasales sont les plus petites cellules épithéliales vaginales. Elles sont bien rondes, basophiles et possèdent un gros noyau central ;

- les cellules intermédiaires sont de plus grande taille par rapport aux cellules parabasales. Leur rapport nucléocytoplasmique est plus faible mais reste élevé. Leur contour est plutôt régulier ;

- les cellules superficielles sont des cellules très kératinisées et très déshydratées. Leur cytoplasme est acidophile et de grande taille, et le rapport nucléocytoplasmique est très faible. Ce sont des cellules aux contours très irréguliers et anguleux ce qui constitue un critère majeur de reconnaissance. Ces cellules peuvent également être pliées sur elles-mêmes.

(1) Frottis de pro-œstrus

Lorsque la chienne est en pro-œstrus, les 3 types de cellules épithéliales vaginales peuvent être retrouvés sur le frottis, avec une proportion faible de cellules superficielles. On observe des hématies en quantité importante surtout en début de pro-œstrus.

On ne doit normalement pas observer de PNN. Leur présence témoigne soit d'une infection, soit d'un frottis de métœstrus. Dans les deux cas, c'est la présentation clinique de la chienne qui permettra au clinicien de s'orienter.

Au cours d'un suivi de chaleurs, la visualisation d'un frottis de pro-œstrus indique que la chienne n'est pas prête à ovuler. Un nouveau frottis est à réaliser 3 à 5 jours plus tard (14).

(2) Frottis d'œstrus

On parle de frottis d'œstrus lorsque l'on observe plus de 50 % de cellules superficielles. On peut retrouver les 3 types de cellules épithéliales en début d'œstrus, mais un frottis de fin d'œstrus montrera quasiment 100 % de cellules superficielles. On visualisera classiquement de nombreuses cellules superficielles en amas, comme le montre la figure 4.

La présence d'hématies est possible, mais en quantité moins importante que lors du proœstrus. La visualisation de PNN à ce stade doit faire penser à un frottis de métœstrus, signifiant qu'il est trop tard pour inséminer.

(3) Frottis de métœstrus

A la cytologie vaginale, le passage d'œstrus à métœstrus est caractérisé par l'apparition de PNN. Dans les premiers jours de métœstrus, on retrouvera classiquement les 3 types de cellules épithéliales (parabasales, intermédiaires et superficielles) ainsi que des PNN, comme cela est représenté sur la figure 5.

Au cours du métœstrus, la proportion de cellules superficielles chute en quelques jours jusqu'à ce que l'on ne retrouve que des cellules parabasales.

La visualisation d'un frottis de métœstrus signifie qu'il est trop tard pour inséminer la chienne.

Il est donc important de toujours réaliser une cytologie vaginale avant d'inséminer pour être certain que la chienne est toujours dans la période fertile.

(4) Frottis d'anœstrus

Sur un frottis d'anœstrus, on retrouve uniquement des cellules parabasales en très faible quantité.

2. Le dosage de progestérone

Chez la chienne, la cinétique suivie par la progestéronémie en période péri-ovulatoire est relativement stable. La progestéronémie, d'abord basale, augmente lentement autour du pic de LH. Puis il s'en suit une augmentation rapide et importante autour de l'ovulation (20).

De plus, les valeurs de la progestéronémie sont très bien corrélées au pic de LH et à l'ovulation, ce qui en fait une technique de choix pour la réalisation d'un suivi de chaleurs.

La cytologie vaginale et le dosage de progestérone sont fréquemment associés lors d'un suivi de chaleurs. Pour des raisons pratiques et financières, on ne réalisera généralement un dosage de la progestéronémie qu'à partir de la visualisation d'un frottis évocateur d'œstrus ou de fin de pro-œstrus (20).

a) Prélèvement de l'échantillon

Un prélèvement de sang sur tube hépariné est réalisé. Il est ensuite immédiatement centrifugé, et le plasma est récolté dans un tube sec. Si l'échantillon n'est pas analysé immédiatement, il peut être conservé réfrigéré ou congelé (10).

b) Méthodes de dosages

Le dosage de la progestérone peut être effectué grâce à des méthodes quantitatives ou semiquantitatives.

Les dosages quantitatifs font appel à des techniques d'immuno-analyse comme la radioimmunologie ou la chimioluminescence.

Les dosages semi-quantitatifs de type ELISA, sont plus facilement accessibles mais sont moins précis (11).

Une étude sur la comparaison des valeurs de la progestéronémie péri-ovulatoire obtenues à l'aide de trois méthodes (radio-immunologie, chimioluminescence, ELISA) chez 33 chiennes a montré des valeurs significativement différentes entre ces trois méthodes (21).

Deux valeurs de progestéronémie obtenues avec la même technique de dosage peuvent également être différentes d'un appareil à un autre, en fonction de la calibration de ces appareils (20).

Il convient donc d'utiliser systématiquement la même méthode et la même machine afin de limiter au maximum les erreurs d'interprétation.

c) Interprétation de la progestéronémie

D'une valeur initialement inférieure à 1 ng/ml en anœstrus et en début de pro-œstrus, la progestéronémie commence à augmenter à partir du pic de LH, soit environ 2 à 3 jours avant l'ovulation (5).

On considère que le pic de LH a eu lieu lorsque la progestéronémie est supérieure à 2 ng/ml (5). Le suivi de chaleurs se doit donc d'être plus rapproché lorsque l'on obtient cette valeur.

Le jour de l'ovulation est déterminé par une valeur de progestéronémie comprise entre 4 et 10 ng/ml selon les laboratoires (5,10,11)

D. Choix de la semence

1. Type de semence

Trois types de semence sont utilisés en insémination artificielle chez le chien : fraîche, réfrigérée et congelée.

a) Semence fraîche

Une semence fraîche est une semence qui vient d'être récoltée, qui n'a pas subi de modifications thermiques et qui n'a reçu aucun additif. Le prélèvement du mâle est directement suivi de l'insémination de la femelle.

La réfrigération et la congélation de la semence entraînent systématiquement une altération de celle-ci ; l'insémination en semence fraîche est donc à privilégier afin de maximiser les chances de gestation. Cependant, elle nécessite la présence du mâle au moment où l'insémination est décidée, ce qui n'est pas toujours réalisable en pratique.

b) Semence réfrigérée

Une semence réfrigérée est une semence à laquelle a été rajouté un dilueur, permettant sa conservation plusieurs jours à +4°C : 2 à 5 jours en pratique, et jusqu'à 11 jours pour une semence d'excellente qualité au moment du prélèvement et dans des conditions optimales de conservation (28).

L'avantage de l'utilisation de semence réfrigérée est de permettre la reproduction d'un chien et d'une chienne éloignés géographiquement, à un coût abordable et avec moins d'altérations que si l'on utilisait de la semence congelée.

Peu de matériel est nécessaire pour réfrigérer de la semence : une centrifugeuse pour récupérer la fraction spermatique, un réfrigérateur pouvant refroidir à +4°C, un dilueur réfrigéré, des tubes, et une bouteille thermos pour le transport éventuel (4).

Concernant le dilueur, il peut être préparé soi-même ou acheté dans le commerce. Il possède 4 grands rôles :

- tampon : afin de limiter les variations de pH et d'osmolalité de la semence. Les tampons classiquement utilisés sont le tris (hydroxyméthyl)aminométhane, l'hydroxyde de potassium, le citrate de sodium ;

- nutritif : les sources d'énergie utilisables sont le fructose, le dextrose, le lactose et le glucose ;

- protecteur vis-à-vis des basses températures : le jaune d'œuf est utilisé lors de préparation de semence réfrigérée ou congelée ;

- antibiotique : des pénicillines sont généralement utilisées (5).

Une fois réfrigérée, la semence se dégrade inévitablement au fil des jours. Il est donc recommandé de l'utiliser le plus rapidement possible. En effet, d'après une étude comparant

la semence réfrigérée et congelée de 6 chiens, la semence réfrigérée était nettement supérieure à la semence congelée jusqu'à 2 jours de réfrigération, et était jugée de qualité équivalente au bout de 5 jours (29). Une autre étude a montré que la semence réfrigérée pendant 7 à 11 jours pouvait rester fécondante, avec des taux de gestation corrects : 50% avec une insémination intra-vaginale, et 70% avec 2 inséminations intra-vaginales (28).

c) Semence congelée

Une semence congelée est une semence à laquelle a été rajouté un dilueur, lui permettant d'être conservée indéfiniment dans de l'azote liquide à -196°C.

L'intérêt de la semence congelée est que celle-ci peut être utilisée de nombreuses années après sa collecte. On procède à la congélation de semence pour préserver la semence d'un male de grande valeur, en prévention d'un accident ou d'un décès par exemple. De plus, la congélation est nécessaire lorsque l'on prévoit de faire reproduire 2 individus trop éloignés géographiquement pour envisager un envoi de semence réfrigérée (19).

Par contre, la congélation étant à l'origine d'importantes altérations, celle-ci doit être envisagée pour des semences d'excellente qualité au départ (5).

Le dilueur pour semence congelée contient globalement les mêmes éléments que le dilueur pour semence réfrigérée, mais du glycérol est ajouté en plus du jaune d'œuf pour son effet cryoprotecteur plus important (cryoprotecteur intracellulaire) (5)

E. Techniques d'insémination artificielle

1. Insémination intra-vaginale

L'insémination intra-vaginale consiste en l'introduction de la semence directement dans le vagin le plus près possible du col utérin à l'aide d'une sonde d'insémination adaptée.

L'insémination artificielle intra-vaginale est une technique largement répandue en clientèle car elle est simple à réaliser et ne nécessite pas de matériel coûteux.

a) Matériel nécessaire à l'insémination intra-vaginale

La réalisation d'une insémination artificielle intra-vaginale nécessite :

- une sonde d'insémination stérile de taille adaptée au gabarit de la chienne. La longueur idéale de la sonde correspond à la distance entre le col utérin et la vulve.

Celle-ci peut être déterminée soit par palpation abdominale du col utérin, soit en divisant par 2 la longueur entre l'arc costal et la vulve (5). La plupart des sondes possèdent un

ballonnet à leur extrémité, qui lorsqu'il est gonflé permet de limiter le reflux de la semence en dehors du vagin. La liste des sondes utilisables est décrite dans le tableau I ;

- une seringue stérile ;
- des gants en vinyle.

Tableau I : Caractéristiques des différents types de sonde à ballonnet utilisées pour l'insémination intra-vaginale canine (19).

Type de sonde	Caractéristiques
Sonde Osiris	Rigide Ballonnet gonflable 1 seule taille, qui convient mieux aux chiennes de petite et moyenne taille
Sonde de Foley	Très souple : maniabilité diminuée Ballonnet gonflable Existe en 2 diamètres
Sonde Mavic	Rigide Ballonnet gonflable Existe en 3 longueurs : adaptée à chaque taille de chienne

b) Technique d'insémination intra-vaginale

La chienne est maintenue debout sur ses 4 membres pendant l'insémination. De la même manière que pour la réalisation d'un frottis vaginal, la sonde lubrifiée est introduite d'abord verticalement pour éviter la fosse clitoridienne, puis crânialement le plus loin possible.

Le ballonnet est ensuite gonflé. Puis, la semence est introduite dans la sonde d'insémination à l'aide d'une seringue. Il est possible d'introduire la totalité de l'éjaculat sans séparation des 3 phases, ou bien uniquement la phase spermatique préalablement séparée (26,27).

Afin d'optimiser le passage de la semence à travers le col utérin, il convient ensuite d'injecter 1 à 2 ml d'air dans la sonde (27). Si les 3 phases ont été séparées, il est possible d'injecter plutôt une partie de la fraction prostatique dans le même objectif (26).

Enfin, le ballonnet est dégonflé et la sonde est retirée.

Il est généralement recommandé de garder les postérieurs de la chienne surélevés pendant 5 à 10 minutes (27). Cela favoriserait ainsi le passage de la semence à travers le col par gravité.

Toutefois, une étude s'est intéressée au taux de réussite en insémination artificielle intravaginale en fonction de la durée d'élévation des postérieurs. Pour le premier groupe de chiennes, les membres postérieurs étaient maintenus surélevés pendant 10 minutes, contre seulement 1 minute pour le second groupe de chiennes. L'étude n'a montré aucune différence significative entre les 2 groupes concernant les taux de gestation et la prolificité ($p > 0,30$) (28).

2. Insémination intra-utérine

L'insémination intra-utérine correspond à l'introduction de la semence dans l'utérus. On distingue les techniques d'insémination transcervicales, qui sont les plus employées, des techniques chirurgicales.

L'insémination intra-utérine est indiquée lors de l'utilisation de semence congelée et de manière générale lorsque la semence est de mauvaise qualité, afin d'augmenter les chances de réussite. De plus, l'insémination intra-utérine est conseillée chez les chiennes de grande race ou de race géante, car pour ces chiennes l'insémination intra-vaginale est associée à une perte de semence dans les replis vaginaux (29).

a) Insémination intra-utérine transcervicale

Il s'agit d'une insémination intra-utérine réalisée par cathétérisme du col utérin.

Ce type d'insémination ne requiert généralement pas de tranquillisation. Si nécessaire, une sédation légère à l'aide de butorphanol, d'acépromazine ou d'alpha-2-agonistes (dexmédétomidine, xylazine) peut être réalisée, mais il est important que la chienne reste assez vigile pour se maintenir debout (29).

Deux méthodes sont utilisées en France : la méthode norvégienne et la méthode endoscopique.

(1) Insémination transcervicale par endoscopie

Il s'agit de la méthode d'insémination transcervicale la plus commune aujourd'hui. Le col utérin est visualisé grâce à un endoscope, ce qui permet de guider facilement le passage de la sonde à travers celui-ci. L'endoscope utilisé peut être un cystoscope ou un urétéroscope. Avec un cystoscope, le cathéter d'insémination utilisé est un cathéter vésical classique en polypropylène. Ce type d'endoscope est parfois trop court pour inséminer des chiennes de grand format.

L'avantage de l'urétéroscope est qu'il est plus fin, ce qui est plus pratique pour inséminer des chiennes de très petit format, et également plus long, permettant son utilisation sur des

chiennes de grand format. L'angle de vue de 5°, contre 30° pour la plupart des cystoscopes, permet d'insérer la sonde dans le col utérin avec une plus grande précision. Par contre, les sondes en polypropylène sont inutilisables car trop courtes. Il faut donc prévoir des sondes spécialement adaptées à l'urétroscope (29).

D'après une étude sur 10 chiennes Labrador inséminées avec cette méthode, le cathétérisme du col utérin s'était déroulé sans aucune difficulté dans 80% des inséminations, et le cathétérisme était jugé très difficile dans seulement 6% des cas (30).

(2) Insémination transcervicale par méthode scandinave ou norvégienne

L'insémination intra-utérine par la méthode Norvégienne consiste en l'introduction de la semence dans l'utérus « à l'aveugle », le col utérin étant maintenu par palpation abdominale.

La sonde utilisée est appelée sonde norvégienne ; elle est généralement constituée d'un guide en nylon et d'un cathéter en acier, et existe en différentes tailles selon le gabarit de la chienne.

Les figures 3 et 4 représentent le matériel nécessaire à l'insémination par sonde norvégienne : seringue, guide et sonde.



Figure 3 : Matériel nécessaire à l'insémination intra-utérine par méthode norvégienne (29).



Figure 4 : Matériel en place pour l'insémination intra-utérine par méthode norvégienne (29).

Pour réaliser une insémination par méthode norvégienne, la chienne, non sédatée, est placée sur une table et maintenue debout sur ses 4 membres à l'aide d'un assistant. L'opérateur identifie et saisit le col utérin par palpation abdominale, et réalise un mouvement de traction crânialement et ventralement. Ainsi, l'axe du vagin et du col utérin passe d'un angle physiologique de 45°C à une orientation horizontale. Le guide est introduit dans le vagin jusqu'à l'entrée du col utérin. Le cathéter métallique est alors inséré dans le guide puis à travers le col utérin.

Cette technique, très simple à comprendre, est cependant plus difficile à réaliser que la méthode endoscopique car elle nécessite une plus grande expérience de l'opérateur. De plus, la palpation du col utérin peut être délicate si la chienne est de grand format, en surpoids ou si son abdomen est tendu (29).

b) Insémination intra-utérine chirurgicale

(1) Insémination intra-utérine par laparotomie

Il s'agit de l'injection de semence directement dans les cornes utérines par laparotomie, sous anesthésie générale.

La réalisation d'une insémination par laparotomie est simple. La chienne anesthésiée est placée en décubitus dorsal. Après tonte et désinfection de la peau, l'ouverture est réalisée par laparotomie médiane. L'utérus est extériorisé puis inspecté à la recherche d'éventuelles anomalies. Le col utérin est maintenu fermé avec une main, puis l'injection de la semence est réalisée dans une des cornes utérines grâce à un cathéter ou une aiguille. L'utérus est massé afin de faciliter le déplacement de la semence en direction des oviductes. Puis l'abdomen est refermé de manière classique (26).

Selon différents auteurs, l'insémination intra-utérine par laparotomie serait réalisée pour des raisons de praticité (éviter un cathétérisme difficile du col utérin) ou pour évaluer visuellement l'utérus à la recherche d'anomalies comme des kystes par exemple (27,31).

En réalité, cette méthode, même si elle est efficace, pose un problème éthique car elle nécessite une anesthésie générale, est invasive, et ses indications sont discutables. De nos jours, il est relativement aisé de pratiquer une insémination transcervicale à l'aide d'un endoscope. De plus, les anomalies morphologiques de l'utérus, visibles par échographie, ne sont pas souvent significatives. Pour toutes ces raisons, l'insémination intra-utérine par laparotomie est peu utilisée de nos jours en France.

(2) Insémination intra-utérine par laparoscopie

La technique décrite ci-après est celle employée au cours d'une étude sur 5 chiennes de race Beagle (32).

La chienne anesthésiée est placée en décubitus dorsal. Après tonte et désinfection chirurgicale de l'abdomen, une aiguille de Veress est introduite dans l'abdomen, environ 1 cm crânialement à l'ombilic dans le plan médian. Du CO₂ est alors insufflé dans l'abdomen afin de permettre une meilleure visualisation des organes avec le laparoscope.

Le laparoscope est ensuite introduit dans l'abdomen à l'aide d'un trocart, 1 cm en arrière de l'ombilic dans le plan médian. Les cornes utérines sont localisées.

Un autre trocart est introduit dans l'abdomen latéral et permet le passage d'une pince endoscopique. La corne utérine est saisie et rapprochée de la paroi musculaire abdominale.

Un cathéter est alors introduit à travers la paroi abdominale jusque dans la corne utérine et la semence est injectée. Le matériel est ensuite retiré et les 3 ouvertures sont refermées.

L'objectif de cette étude était de comparer les résultats obtenus par laparoscopie et par saillie naturelle. 5 chiennes étaient inséminées 2 fois en semence fraîche par laparoscopie et 5 chiennes étaient saillies naturellement 2 fois. Toutes les chiennes avaient été gestantes, et il n'avait pas été mis en évidence de différence significative entre les 2 méthodes pour le nombre de chiots moyen par portée (toutefois, la puissance de ce résultat était remise en cause par la faible taille de l'échantillon étudié) (32).

Cette méthode d'insémination, efficace, et un peu moins invasive que la laparotomie, est aussi beaucoup plus technique et coûteuse du fait du matériel nécessaire. Elle n'est donc pas utilisée en pratique courante.

3. Insémination intra-tubaire

Une autre technique chirurgicale consiste à inséminer directement dans les oviductes (33).

Cette technique ne sera pas développée car elle est extrêmement difficile à réaliser et jamais utilisée en pratique courante

III. Partie expérimental : Insémination artificielle

A. Objectifs :

Ce travail a comme objectif de réaliser une insémination artificielle intra-vaginale avec semence fraîche, dans le but d'écartier les cas d'échecs de conception lors de refus d'accouplements.

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

En deuxième lieu nous allons faire une congélation de la semence canine en utilisant un dilueur spéciale avec deux types d'antioxydants (B-Cyto et Stig).

1. Matériels et méthodes :

a) Lieu :

L'expérimentation a été réalisée au niveau de la clinique de reproduction et la clinique des carnivores de l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret (ISVT) : les frottis vaginaux, la coloration, l'observation par le microscope optique, la récolte de sperme et le spermogramme, mais aussi l'insémination artificielle.

b) Animaux :

Notre étude a été réalisée sur une chienne appelée Akita, de Race Akita Américain, âgée de 3ans qui n'ajamais mis bas, c'est une chienne dominante qui a un caractère très agressive contre les mâles lors de la saillie naturel d'après l'anamnèse et les commémoratifs recueillis auprès du propriétaire

Le chien utilisé pour notre expérimentation est un Akita âgé de 3 ans nommé Inzou, Ilappartient à un client de notre clinique.

2. Matériel :

Dans notre expérimentation on a eu recours à un matériel varié.

3. Pour le suivi des chaleurs :

On a utilisé des gants, des écouvillons en coton stérile à usage unique, du sérum physiologique des lames de microscope, du fixateur pour la fixation des prélèvements, la coloration RAL 555 et en fin un microscope pour l'observation.

a) Pour la récolte de sperme :

On a utilisé un cône en plastique souple qui présente l'intérêt d'être atraumatique

etréutilisable relié à un tube à récolte en verre et un gel lubrifiant non spermicide.



Figure 05 : Matériel utilisé pour la récolte de sperme (photo personnelle).

b) Pour le spermogramme :

Des lames, des lamelles, coloration Eosine-Nigrosine, cellule de Thoma et un microscope pour l'observation.

c) Pour l'insémination artificielle :

Des seringues de différents volumes qui ne possèdent pas d'embout en caoutchouc qui est très spermicide, des sondes de différentes tailles et un gel lubrifiant non spermicide.



Figure 06 : Les différents matériels utilisés dans l'insémination artificielle (photo personnelle).

1 Suivi du cycle sexuel : avant le suivi on a vérifié la lice :

- on réalise un examen clinique général.
- Un examen de l'appareil génital afin de détecter l'existence d'une vulve étroite, atrésique....
- La présence d'une infection génitale

Le propriétaire de la chienne nous a fait appel le 24 /11/2021 pour effectuer un examen gynécologique et réaliser des frottis vaginaux qui permettent la détermination de la phase du cycle sexuel et de détecter certaines maladies du tractus génital (des inflammations par la présence de granulocytes neutrophiles et des lésions tumorales par la présence de cellules de formes anormales).

4. Examens gynécologiques :

Il se déroule en deux temps, l'inspection et la palpation.

Un examen visuel permet d'en évaluer la couleur, le volume et de détecter d'éventuelles lésions ou écoulements.

La palpation convient d'en évaluer la consistance, la température ou l'existence d'une douleur.

a) Les frottis vaginaux :

(1) Réalisation :

(a) *Prélèvement :*

L'examen cytologique vaginal permet de recueillir les cellules épithéliales de surface ainsi que les cellules présentes dans la lumière de vagin, pour déterminer la date ou à quel moment on va effectuer l'insémination artificielle. L'écouvillonnage est simple à réaliser. On a utilisé un écouvillon en coton stérile à usage unique de 15 cm minimum. L'humidifier à l'aide d'une goutte d'eau physiologique. On nettoie les parties génitales de la chienne avec le coton et prendre la vulve entre les doigts de la main gauche et la maintenir vers le bas avec des lèvres écartées. Ensuite l'écouvillon est introduit verticalement le long du bord supérieur des lèvres vulvaires afin d'éviter la fosse clitoridienne et le méat urinaire. On redresse horizontalement l'écouvillon et on enfonce doucement, le plus profondément possible, on effectue quelques mouvements de rotation sur lui-même puis le retirer lentement vers l'arrière.

(b) *Étalement et fixation :*

On étale immédiatement le prélèvement afin d'éviter la dessiccation en roulant l'écouvillon sur une lame de microscope propre et étiquetée afin d'y transférer le matériel cellulaires. On doit éviter le frottement qui risque d'écraser les cellules, et le passage deux fois au même endroit.

(c) *Coloration :*

Les colorations différentielles où les cellules différenciées, kératinisées, sont colorées en rouge : Coloration RAL 555.

(d) *Lectures des lames :*

Après séchage la préparation est lue sous un microscope optique aux grossissements 100 et 400. Le premier prélèvement a été fait le 24/11/2021 à 14h30mn au niveau de la clinique des carnivores de l'ISVT : on note la présence des pertes vulvaires, la muqueuse vulvaire est congestionnée l'écouvillon de couleur rouge. Au faible grossissement du microscope(100) : présence des cellules superficielles kératinisées. Elles sont anucléées et de coloration acidophile, elles se présentent en grappes.

5. Récolte de sperme :

Dès l'arrivée du propriétaire nous avons essayé d'obtenir le maximum d'information sur le chien : c'est un Akita âgé de 3 ans qui a déjà effectué des saillies naturelles fécondantes. Ce dernier est mené d'un carnet de vaccination.

Avant qu'on commence la récolte on a effectué un examen clinique attentif de l'appareil génital pour vérifier que les deux testicules sont en place et de taille identique, mais aussi l'absence d'anomalie de la verge et certain affection (balano-postite ; sarcome de sticker), on a aussi vérifié l'appareil locomoteur ostéo-articulaire pour s'assurer qu'il est capable de faire le saut. Après tous ces examens, on a supposé que le chien est expérimenté.

a) La récolte manuelle du sperme :

D'abord on prépare le matériel avant l'arrivée du chien, le nettoyage des cônes doit être effectué avec soin, Les cônes doivent être abondamment rincés car la plupart des détergents sont spermicides. On met des tubes à essai propre, le cône en plastique relié à un tube à essai en verre dans une étuve pour les tiédir avant la collecte afin d'éviter une inhibition de l'érection due au froid. La récolte est effectuée au niveau de l'ISVT à la salle de reproduction le : 24/11/2021 à 15 :00h.

Dès que le chien arrive, on évite la présence d'un grand nombre de personne autour de lui parce que le chien étant un animal parfois timide, il faut toujours penser à s'habituer et familiariser les chiens timides à la récolte manuelle en les conduisant plusieurs fois chez le vétérinaire de façon qu'ils se rendent compte qu'on ne cherche pas à leur faire de mal.

En présence de son maître qui le tient fermement par le collier et qui placé du coté opposé à l'opérateur, nous avons effectué la récolte par masturbation manuelle au travers du fourreau, qui est une technique aisée à pratiqué et bien toléré par les chiens. En exerçant des massages fermes de façon simultanée surtout au niveau du bulbe érectile, de la pointe du gland, et du périnée afin de stimuler le mâle, ce qui provoque un début d'érection.

Lorsque l'érection commence et la verge se durcit, on repousse le fourreau en arrière du bulbe pour décalotter.

A cet instant, le chien donne des coups du rein (des mouvements d'avant en arrière au niveau de bassin). Le pénis est alors coiffé par le cône en plastique. À ce stade l'érection n'est pas complète, et seules quelques gouttes de fraction urétrale sont émises

rapidement on change le 1er tube. Le manipulateur assure une striction dans la région postérieure du bulbe par le pouce et l'index, mimant ainsi la coaptation vaginal qui a lieu pendant la saillie. Lorsque l'érection est complète et maximale, le chien se calme et soulève un membre postérieur. A ce moment-là, on va retourner le verge caudalement entre ses deux membres postérieurs. C'est à ce moment que débute l'émission de la fraction spermatique et dès qu'elle termine on change le 2ème tube et on remplace le 3ème tube. Une pause de quelques secondes à quelques minutes sépare l'éjaculation de cette fraction de celle de la fraction prostatique. En fin de récolte ; le chien est incité à marcher pour lui permettre de recalotter. Les trois phases sont récoltées séparément dans trois tubes de récolte différents. Ils sont conservés à température corporelle jusqu'à l'insémination. On a met les tubes à essai dans un bain marie réglé à une température du 37°C pour garder la T° ambiante des spermatozoïdes.

b) Le spermogramme :

(1) Les étapes du spermogramme

Dans un premier temps, les trois fractions du sperme sont observées macroscopiquement car toute modification importante peut être révélatrice d'une pathologie du tractus génital se traduisant éventuellement par une diminution de la fertilité voire une infertilité. Le volume de l'éjaculat, la couleur et la turbidité de l'éjaculat sont notés; la présence (anormale) d'urine, de sang ou de pus est recherchée.

Le volume de l'éjaculat recueilli est mesuré par lecture directe sur le tube gradué servant à la collecte. La connaissance de ce volume permettra de calculer le nombre total de spermatozoïdes de l'éjaculat.

(2) La mobilité :

Cet examen est réalisé le plus rapidement possible après la récolte du sperme. On observe en premier lieu la motilité massale, sur une goutte de sperme déposée sur une lame et observée au faible grossissement du microscope ($\times 100$), la mobilité massale est estimée, c'est-à-dire les mouvements de vague créés par les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes.

Dans un second temps, une goutte de sperme déposée sur la même lame et recouverte d'une lamelle et observée au fort grossissement du microscope ($\times 400$), on estime la mobilité individuelle. Pour cela, le pourcentage de spermatozoïdes fléchant (c'est-a-dire

qui se déplacent rapidement, en ligne droite) est mesurée.

(3) La numération :

Il s'agit de comptabiliser les spermatozoïdes normaux, et donc potentiellement féconds, contenus dans la phase spermatique. Pour cela, le sperme est dilué au 1/100 (c'est-à-dire on prend 495 μ L NaCl à 4% + 5 μ L du sperme de la phase spermatique on les homogénéise bien, à l'aide de micropipette on prend 10 μ L est observée sur une cellule de Thoma qui est diffusée par capillarité). Cette cellule hématimétrique est une lame d'observation microscopique quadrillée. Les spermatozoïdes sont comptabilisés au microscope optique grossissement 400 grâce à une graduation servant de repère, en tenant compte des instructions fournies par le fabricant de la cellule.

(4) Test de vitalité :

On prend une goutte de la fraction spermatique diluée avec la fraction prostatique dans un tube, on ajoute une goutte d'Eosine laisser agir une seconde on ajoute deux gouttes de Nigrosine. On dépose une goutte de ce mélange sur l'extrémité d'une lame à l'aide d'une autre lame on la dépose sur la goutte pour effectuer un frottis, on sèche la lame et après on met en évidence les anomalies des spermatozoïdes.

Un étalement de sperme (frottis) coloré est examiné au microscope. 200 spermatozoïdes au moins sont alors dénombrés et classés en différentes catégories : normal ou anormal.

(5) Résultat et discussion :

(a) Suivi des chaleurs :

(i) Suivi des chaleurs par les observations cliniques :

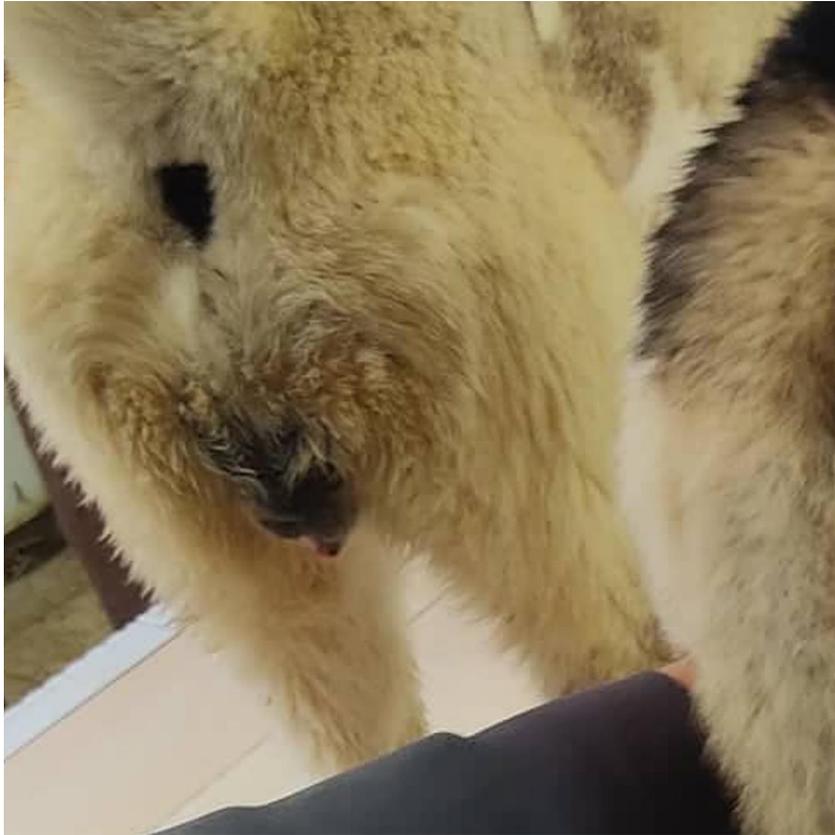


Figure 07 : Ecoulements vaginaux et examen de la vulve (photo personnelle).

Les écoulements vaginaux sont observés et plusieurs éléments sont pris en compte : la présence ou l'absence, la couleur et la quantité. La couleur des écoulements varie de la translucide à marron en passant par le rose et le rouge.

L'examen de la vulve est pratiqué en même que celui des écoulements vaginaux. La taille de la vulve (de petite à oedématiée) ainsi que la béance de l'orifice vaginal (dilaté, non dilaté) sont pris en compte.

(ii) Suivi des chaleurs par les examens complémentaires (la cytologie vaginale) :

(a) Réalisation des frottis vaginaux :

(i) Le prélèvement :



Figure 08 : Ecouvillon de proestrus

(ii) L'étalement et la fixation :

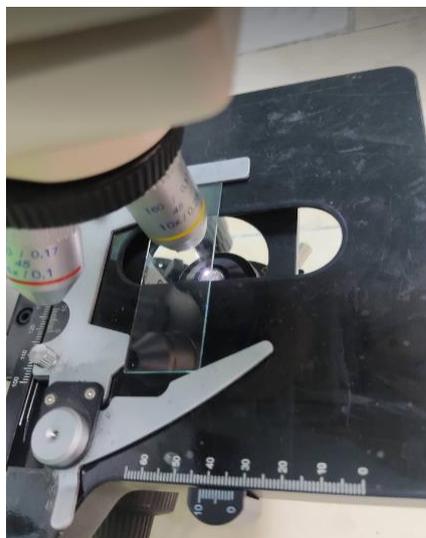


Figure 09 : Etalement et fixation de frottis (photo personnelle).

(iii) La coloration :



Figure 10: Coloration de RAL 555 (photo personnelle).

Lecture des lames au microscope optique :

La préparation est lue sous un microscope optique aux grossissements 100 et 400.

Différents éléments sont archivés :

L'indice éosinophilique qui correspond au rapport entre le nombre de cellules kératinisées sur le nombre total de cellules comptées.

Le pourcentage de cellules basophiles.

La présence d'amas de cellules kératinisées.

La présence de cellules parabasales, d'hématie ou de mucus.

La présence de cellules de l'inflammation : bien que visualisables par la coloration de RAL 555, la présence de granulocytes neutrophiles est confirmée par la coloration RAL 555.

Un indice éosinophilique de l'ordre de 90 à 100%, la présence d'amas, l'absence d'hématies et de mucus sont considérés comme des signes d'œstrus.

Une chute de 20% de cellules superficielles associée à l'apparition de cellules parabasales et de granulocytes neutrophiles signe la survenue du métœstrus et donc la fin de la période fertile.



Figure 11 : Proestrus (coloration RAL 555) (photo personnelle)

Au début de proestrus le frottis est sale et granuleux en raison de l'abondance du mucus (37) à prédominance de cellules basophiles intermédiaires nucléées et quelques globules rouges sont observés, au milieu de proestrus, on observe une augmentation du nombre de cellules présentes sur le frottis vaginal. La quantité des de cellules superficielles augmente tandis que le nombre de cellules intermédiaires diminue. Le noyau des cellules est pycnotique et la coloration de leur cytoplasme est basophile ou acidophile voire les deux en même temps (38). En fin de proestrus, le frottis présente presque exclusivement des cellules superficielle à noyau pycnotique ou anucléés (38). Elles sont de coloration

essentiellement acidophile.

6. Récolte manuelle :



Figure 12 : Les différentes fractions (urétrale, spermatique et prostatique) (photo personnelle).

Il s'agit de la méthode la plus employée puisqu'elle est simple, rapide (2 à 5 minutes) et efficace. La plupart des publications sont univoques sur la technique à utiliser et ce qui suit constitue un résumé des références bibliographiques(39)

Les trois phases de l'éjaculat (urétrale, spermatique et prostatique) sont récoltées séparément.

a) Spermogramme :

(1) Examen macroscopique :

La phase pré-spermatique est translucide et acellulaire, son volume est de 03 ml.

La phase spermatique est de couleur laiteuse et opaque. Son volume est de 02 ml.

La phase post-spermatique est de couleur claire, son volume est important 10 ml.

(2) Examen microscopique :

(a) La mobilité :

La mobilité est évaluée au microscope optique juste après la récolte ; elle est estimée à 70%.

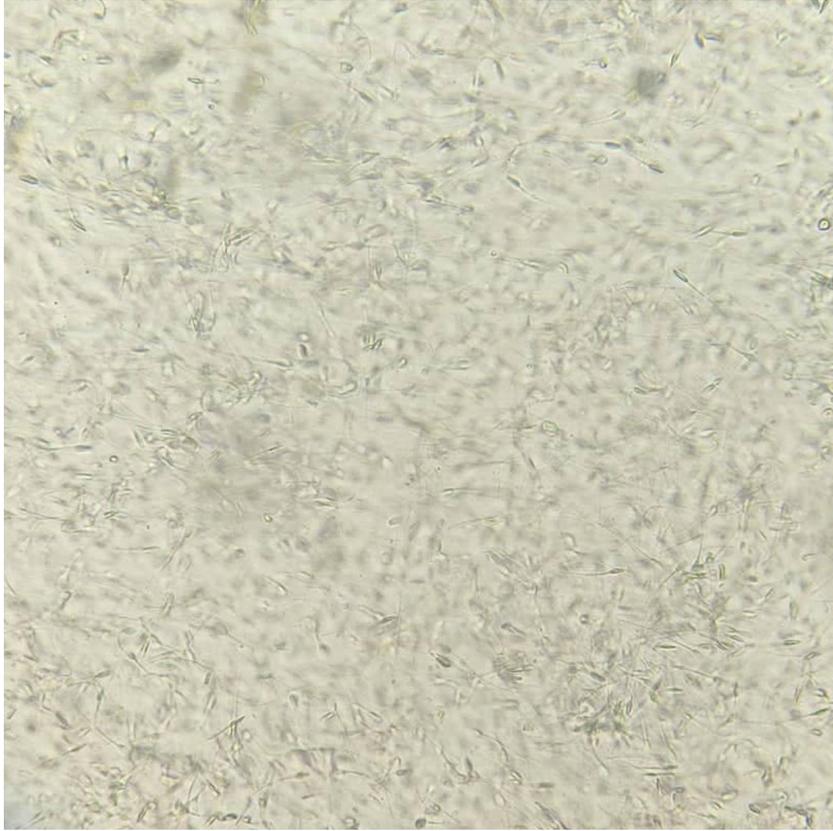


Figure 13: Appréciation de la mobilité (photo personnelle)

Un sperme de bonne qualité présentera plus de 70 % de spermatozoïdes fléchants (39). La semence est jugée de bonne qualité lorsque le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est supérieur à 70% (4 ,38)

(b) La concentration :

Les spermatozoïdes sont comptés sur la cellule de Thoma. Pour calculer le nombre de spermatozoïdes par millilitre de phase spermatique, il suffit d'affecter un coefficient multiplicateur, variable avec l'hématimètre utilisé et la dilution(2)

(c) Test de vitalité :

L'évaluation de la vitalité des spermatozoïdes est effectuée en déterminant le pourcentage de spermatozoïdes vivants dans l'éjaculat.

Les spermatozoïdes vivants apparaissent colorés en bleu-vert et les spermatozoïdes morts sont colorés en rose. Suite à l'observation de 100 à 200 spermatozoïdes, les deux populations de spermatozoïdes, vivants ou morts, sont dénombrées et le pourcentage de chaque population est calculé. Cette technique est simple, rapide et peu onéreuse, mais

elle reste subjective.

Comme nous l'espérons, la semence du Sam est de très bonne qualité et très concentrée en spermatozoïdes.

7. Les techniques d'inséminations artificielles intra-vaginales:

Après avoir été récoltée, la semence du mâle est déposée directement, sans préparation, dans les voies génitales de la femelle lors d'une insémination artificielle avec de la semence fraîche.

a) En absence de la sonde OSIRIS (ballonnet gonflable) :



Figure 14 : Lubrification et intromission de la sonde (photo personnelle).



Figure 15 : Injection de la 1ère fraction urétrale puis la fraction spermatique (photo personnelle).



Figure 16 : Injection de la fraction prostatique et 2ml d'air et le retrait de la sonde (photo personnelle).



Figure 17 : Le massage clitoridien pendant 10 minutes (photo personnelle).

A défaut du ballonnet de la sonde OSIRIS, il était indispensable de maintenir le train arrière de la chienne surélevé pendant 10 minutes, ce qui s'avérait difficile pour des animaux de grande taille ou agressifs (38).

b) Le choix du moment de l'insémination :

Le choix du moment de l'insémination dépend de la technique utilisée, en semence fraîche, la longévité des spermatozoïdes permet de faire l'insémination pour des taux de progestérone équivalents à ceux de l'ovulation (40). Toujours est-il que l'insémination doit être pratiquée au moment de la période fertile de la chienne. Cette période intervient 2 à 5 jours après l'ovulation. Il est donc à la fois nécessaire de cerner le moment de l'ovulation et de suivre la chienne par des dosages hormonaux et par cytologie vaginale (1).

CONCLUSION

L'insémination artificielle de semence fraîche, elle doit devenir un acte de routine à la portée de tout vétérinaire.

L'insémination en semence fraîche est souvent désignée à tort comme une «assistance à saillie». Il s'agit bien d'un mode de reproduction artificiel.

Lors de ce type d'insémination, la semence du mâle est prélevée en présence de la femelle à inséminer. Après avoir contrôlé sa qualité, elle est déposée dans les voies génitales de la femelle.

L'avantage de l'insémination artificielle en semence fraîche par rapport à une saillie naturelle réside dans la maîtrise de la reproduction.

En effet, une étape supplémentaire de contrôle de la qualité de la semence est rajoutée par rapport à la saillie. Il n'y a pas de place pour le hasard : la semence utilisée est de bonne qualité au moment où elle est déposée dans les voies génitales.

Cela diminue les problèmes de fertilité dus à une mauvaise qualité du sperme de l'mâle (azoospermie, oligospermie...), même si celle-ci n'est que ponctuelle.

Références

- (1) BADINAND, F., FONTBONNE, A., MAUREL, M.C., SILIART, B., 1993. Fertilization time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. *J. Reprod. Fert.*, suppl 47, 63-67.
- (2) Blonz O, 1989. Techniques d'examen du sperme du chien. In, City.
- (3) Anatomie comparée des mammifères domestiques – TOME 4 – SPLANCHNOLOGIE. TOME 2, 3^E Edition.
- (4) FONTBONNE A, LEVY X, FONTAINE E, GILSON C. Guide pratique de reproduction clinique canine et féline. Paris: Editions Med'Com; 2007. 272 p.
- (5) JOHNSTON SD, ROOT KUSTRITZ MV, OLSON PNS. Canine and feline theriogenology. 1st ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2001. 592 p. 9.
- (6) V. ROOT KUSTRITZ M. Managing the Reproductive Cycle in the Bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2012 ;42(3):423-37.
- (7) PINEDA MH. McDonald's veterinary endocrinology and reproduction. 5th edition. Ames: Iowa State Press; 1991. 597 p.
- (8) DUMON C, FONTBONNE A. Reproduction du chien et du chat. P.M.C.A.C. 1992. 289 p. (Les indispensables de l'animal de compagnie).
- (9) FONTBONNE A, BUFF S, GARNIER F. Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine. *Point Vét.* 2000 ;31(209):27-33.
- (10) BOGAERTS P. Détermination de l'ovulation chez la chienne. *Point Vét.* 2008 ;39(Numéro spécial):7-12.
- (11) GOGNY A. Comment réaliser un suivi de chaleurs chez la chienne. *Dépêche Tech.* 20 2018 ;(157):6-11
- (12) CONCANNON PW. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci.* 201 2011 ;124(3-4):200-210.
- (13) CONCANNON P, WHALEY S, LEIN D, WISSLER R. Canine gestation length : variation related to time of mating and fertile life of sperm. *Am J Vet Res.* 1983 ;44(10 1819-1821.
- (14) HOLLINSHEAD FK, HANLON DW. Factors affecting the reproductive performance of bitches: A prospective cohort study involving 1203 inseminations with fresh and frozen semen. *Theriogenology.* 2017 ;101:62-72.

- (15) MIR F, BILLAULT C, FONTAINE E, SENDRA J, FONTBONNE A. Estimated pregnancy length from ovulation to parturition in the bitch and its influencing factors : A retrospective study in 162 pregnancies. *Reprod Domest Anim.* 2011 ;46(6):994-8.
- (16) DE CRAMER K, NÖTHLING J. Predicting parturition and timing cesarean section in the bitch, evidence and questions (Towards fixed date, fixed time preparturient cesarean sections in bitches). *Reprod Domest Anim.* 2019 ;54(Supplément 2):9-10.
- (17) FCI. Règlement international d'élevage de la FCI [Internet]. 1979 [cité 1 juill 2019]. Disponible sur :
- (18) FONTBONNE A. Faire reproduire son chien ou sa chienne. Les clés d'une pratique réussie. L'Isle en Dodon: Editions Maradi; 1996. 303 p.
- (19) DUMON C. Insémination artificielle dans l'espèce canine : actualités. *Bull Académie Vét Fr.* 2007 ;160(2):133-41.
- (20) BUFF S, SALESSE H. Suivi de chaleurs chez une chienne. *Point Vét.* 2000 ;31(208):65-8.ez('es
- (21) WALLACE SS, MAHAFFEY MB, MILLER DM, THOMPSON FN, CHAKRABORTY PK. Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. *Am J Vet Res.* 1992 ;53(2):209-15.
- (22) ROSTAGNAT L. Contribution à l'étude de l'insémination artificielle dans l'espèce canine : analyse des dossiers du Centre d'Etude et de Recherche en Reproduction et en Elevage des Carnivores [Thèse de doctorat vétérinaire (Lyon)]. 2003. 148p
- (23) COLLIN B. Anatomie du chien. Liège: Editions Derouaux Ordina; 2003. 562 p.
- (24) SILVA LDM, ONCLIN K, VERSTEGEN JP. Assessment of ovarian changes around ovulation in bitches by ultrasonography, laparoscopy and hormonal assays. *Vet Radiol Ultrasound.* 19 1996 ;37(4):313-20.
- (25) DE CRAMER K, NÖTHLING J. Predicting parturition and timing cesarean section in the bitch, evidence and questions (Towards fixed date, fixed time preparturient

- cesarean sections in bitches). *Reprod Domest Anim.* 2019 ;54(Supplément 2):9-10.
- (26) MASON SJ. Current Review of Artificial Insemination in Dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2018 ;48(4):567-80.
- (27) MAKLOSKI CL. Clinical Techniques of Artificial Insemination in Dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2012 ;42(3):439-44.
- (28) PINTO CRF, EILTS BE, PACCAMONTI DL. The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. *Theriogenology.* 1998 ;50(2):301-5.
- (29) ROMAGNOLI S, LOPATE C. Transcervical Artificial Insemination in Dogs and Cats : Review of the Technique and Practical Aspects. *Reprod Domest Anim.* 2014 ;49:56-63.
- (30) MACEDO SP, MALM C, HENRY MRJM, TELLED LF, FIGUEIREDO MS, Fukushima FB, et al. Endoscopic transcervical intrauterine artificial insemination in Labrador Retriever bitches. *Res Vet Sci.* 2012 ;92(3):494-500.
- (31) BURGESS D, MITCHELL K, THOMAS P. Coeliotomy-assisted intrauterine insemination in dogs : a study of 238 inseminations. *Aust Vet J.* 2012 ;90(8):283-90.
- (32) SILVA LDM, ONCLIN K, SNAPS F, VERSTEGEN J. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology.* 1995 ;43(3):615-23.
- (33) TSUTSUI T, HORI T, YAMADA A, KIRIHARA N, KAWAKAMI E. Intratubal Insemination with Fresh Semen in Dogs. *J Vet Med Sci.* 2003 ;65(5):659-61.
- (34) FARSTAD W. (1996) Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 251-260.

- (35) ENGLAND G.C.W. (1993) Cryopreservation of dog semen : a review. J. Reprod. Fert. Suppl., 47, 243-255.
- (36) AMANN R.P. (1998) Cryopreservation of sperm. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 1. Academic press, San Diego, 773-783.
- (37) GUIOT, A.-L., 1986. Pratique et intérêt des frottis vaginaux chez les carnivores domestiques. In. Méd. Vét, City.
- (38) DUMON, C., 1992. Frottis vaginaux chez la chienne. In: Les indispensables de l'animal de compagnie- Reproduction du chien et du chat, Paris.
- (39) C.LINDE-FORSBERG, 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen- thawed semen in the dog. Seminars in Veterinary Medecine and Surgery. In, City.
- (40) OTOI, T., MURAKAMI, M., FUJII, M., TANAKA, M., OOKA, A., UNE, S., SUZUKI, T., 2000.
- (41) Mao J, Wu GM, Prather RS, Smith MF, Cantley T, Rieke A, Didion BA, Day BN, 2005: Effect of methyl beta cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo developpement in the absence or presence of caffeine. Theriogenology 64, 1913-1927.
- (42) SOCIETE CENTRALE CANINE. Stats LOF 2008 [Internet]. 2009 [cité 3 juin 2019]. Disponible sur : <https://www.centrale-canine.fr/>
- (43) SOCIETE CENTRALE CANINE. Le chien de race en 2018 : Bousculades dans le Top 20 du LOF [Internet]. 2019 [cité 3 juin 2019]. Disponible sur : <https://www.centrale-canine.fr/>

