

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Institut des Sciences  
Vétérinaires- Blida

Université Saad  
Dahleb-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du  
**Diplôme de Docteur Vétérinaire**

**L'insémination artificielle intra-vaginale chez la  
chienne avec semence fraîche.**

Présenté par

*KADI nassima*

**Devant le jury :**

<b>Président(e) :</b>	YAHIMI. A	MCB
<b>Examineur :</b>	DJOUDI. M	MAA
<b>Promoteur :</b>	BELALA. R	MCB

**Année : 2016-2017**

## *Remerciement*

*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  
BELALA.R, pour son accueil, son assistance et son sens de  
former et d'informer.*

*Je tiens à remercier Monsieur le président du jury Mr  
YAHIMI.A pour sa grande disponibilité.*

*Mes profonds remerciements pour le Mr DJOUDI.M membre  
de jury qui ont accepté d'évaluer ce travail.*

*Je remercie aussi toute l'équipe pédagogique de la faculté des  
sciences vétérinaires(ISVB) pour les efforts fournis et les  
conditions de travail afin de mieux réussir dans cette tâche.  
Finalement, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou  
de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicace*

*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 Saïd, le premier et le dernier homme 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 Salîha, 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 leurs 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 : Abdelkrim, Soufienne et Abdelmalik, que Dieu vous garde, je vous souhaite tout le bonheur que vous méritez.*

*A mes sœurs : Ouarda, Samia, Sémilia et ma belle sœur Hayet pour leur patience, soutien et leurs 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 vos chemins.*

*A mes beaux frères ; Boualem et Chaker pour leur soutien, amour et générosité.*

*A ma tante Fatima Zohra,*

*A mes oncles,*

*A ma famille Ath el Kadi,*

*A mes ami(e)s ; Nassia, Lydia, Ferroudja, Samia, Ahlam, Fatima zohra, Nabila, Imene, Soumia, 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.*

## Résumé

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

L'objectif de mon travail de fin d'étude s'attache à développer la technique d'insémination artificielle intra-vaginale en semence fraîche chez l'espèce canine.

Mon étude s'articule sur deux parties ; une partie bibliographique vise à présenter des rappels anatomiques ainsi que physiologique de la reproduction chez les deux sexes, puis j'ai abordé les techniques de suivi de 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 :**

Reproduction, appareil génital, carnivore, insémination artificielle, suivi des chaleurs, sperme, récolte.

## **Abstract**

The theme of reproduction is one of the most common reasons for consultation in veterinary medicine.

The objective of my end-of-study work is to develop the technique of artificial intra-vaginal insemination in fresh semen in the canine species aimed at veterinary students.

My study focuses on two parts; A bibliographical part aims to present anatomical and physiological reminders of reproduction in both sexes, then I approached the techniques of monitoring heat in the dog and the methods of harvesting the semen of the male so the exams that the sperm must undergo to appreciate these qualities and in the end artificial insemination.

In the experimental part, I have described in particular a follow-up of heats of several females to determine the favorable moment to inseminate the bitch, the technique of harvesting and examination of the semen (spermogram) and the act of insemination to him -even.

### **Keywords:**

Reproduction, reproductive system, carnivore, artificial insemination, Followed by heat, sperm, harvest.

## الملخص

إن موضوع الاستنساخ من المواضيع الأكثر شيوعاً في مشاورات الطب البيطري، فالهدف الأساسي من موضوع نهاية الدراسة مرتبط بتطوير تقنية التلقيح الاصطناعي داخل المهبل مع السائل المنوي الطازج عند فئة الكلاب كما أن هذه الدراسة موجهة لطلبة الطب البيطري. ارتكزت دراستي على قسمين ، القسم النظري البييوغرافي ارتكز على التذكير التشريحي وكذا على فيزيولوجية التكاثر لكلا الجنسين، كما تطرقت إلى تقنيات متابعة الشبق عند الكلبة و طريقة حصد الحيوانات المنوية للذكر وفحص السائل المنوي لإنجاح جودة التلقيح, وفي الأخير التلقيح الاصطناعي. أما القسم التطبيقي (التجريبي) تابعت شبق عدد لآس به من اناث الكلاب لتحديد الوقت المناسب لتلقيحهم , تقنية الحصد وفحص الحيوانات المنوية (السائل المنوي) وعملية التلقيح بحد ذاتها.

### الكلمات المفتاحية :

التلقيح، الجهاز التناسلي ، فئة الكلاب(أكلة اللحوم) ،التلقيح الاصطناعي، متابعة الشبق ، النطاف, الحصد.

# Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

## Partie I : Etude bibliographique

1	Rappel anatomo-physiologique de la reproduction.....	2
1.1	Rappel anatomique chez la chienne :.....	2
1.2	Physiologie de la reproduction chez la chienne :.....	3
1.2.1	La puberté :.....	3
1.2.2	Cycle œstral de la chienne :.....	3
1.3	Rappel anatomique chez le chien :.....	6
1.4	Physiologie de la reproduction chez le chien :.....	7
1.4.1	La puberté :.....	7
1.4.2	La spermatogenèse :.....	7
1.5	Caractéristiques générales de la semence canine :.....	8
2	Le suivi des chaleurs chez la chienne :.....	9
2.1	Suivi des chaleurs :.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1.1	Suivi des chaleurs par les observations cliniques :.....	9
2.1.2	suivi des chaleurs par l'utilisation d'examen complémentaire :.....	9
3	Prélèvement et examen de la semence du mâle :.....	17
3.1	Récolte de sperme :.....	17
3.1.1	Présentation de la technique :.....	17
3.1.2	Déroulement :.....	18
3.1.3	Stockage de la semence après la récolte :.....	19
3.2	Evaluation de la semence canine :.....	19
3.2.1	Examen de la semence :.....	20
4	Insémination artificielle :.....	25
4.1	L'insémination en semence fraîche.....	25
4.1.1	Indications :.....	25
4.1.2	Réalisation :.....	25
<b>Partie II: Etude expérimentale.</b>		
1	Objectifs :.....	26
2	Matériels et méthodes :.....	26
2.1	Lieu :.....	26

2.2	Animaux :.....	26
2.3	Matériel :.....	26
2.3.1	Pour le suivi des chaleurs :.....	26
2.3.2	Pour la récolte de sperme :.....	27
2.3.3	Pour le spermogramme :.....	27
2.3.4	Pour l'insémination artificielle :.....	28
3	Suivi du cycle sexuel : avant le suivi on a vérifié la lice :.....	28
3.1	Examens gynécologiques :.....	28
3.2	Les frottis vaginaux :.....	29
3.2.1	Réalisation :.....	29
3.2.1.1	Prélèvement :.....	29
3.2.1.2	Étalement et fixation :.....	29
3.2.1.3	Coloration :.....	29
3.2.2	Lectures des lames :.....	30
4	Récolte de sperme :.....	31
4.1	La récolte manuelle du sperme :.....	31
4.2	Le spermogramme :.....	32
4.2.1	Les étapes du spermogramme.....	32
4.2.1.1	La mobilité :.....	32
4.2.1.2	La numération :.....	33
4.2.1.3	Test de vitalité :.....	33
5	Résultat et discussion :.....	34
5.1	Suivi des chaleurs :.....	34
5.1.1	Suivi des chaleurs par les observations cliniques :.....	34
5.1.2	Suivi des chaleurs par les examens complémentaires (la cytologie vaginale) :.....	34
5.1.2.1	Réalisation des frottis vaginaux :.....	34
5.1.2.1.1	Le prélèvement :.....	35
5.1.2.1.2	L'étalement et la fixation :.....	36
5.1.2.1.3	La coloration :.....	36
5.1.2.1.4	Lecture des lames au microscope optique :.....	37
5.2	Récolte manuelle :.....	40
5.2.1	Spermogramme :.....	40
5.2.1.1	Examen macroscopique :.....	40
5.2.1.2	Examen microscopique :.....	40
5.2.1.2.1	La mobilité :.....	41
5.2.1.2.2	La concentration :.....	42
5.2.1.2.3	Test de vitalité :.....	42
6	Les techniques d'inséminations artificielles intra-vaginales:.....	43

6.1	En absence de la sonde OSIRIS (ballonnet gonflable) : .....	44
6.2	En présence de la sonde OSIRIS (ballonnet gonflable) : .....	45
6.2.1	La technique d'insémination en présence de ballonnet gonflable : .....	46
6.3	Le choix du moment de l'insémination : .....	47
	Conclusion.....	48
	Références.....	49

## Liste des figures

	Titre des figures	Page
<b>Figure 1 :</b>	Schéma de l'appareil génital de la chienne.....	2
<b>Figure 2 :</b>	Variation des taux hormonaux au cours des phases du cycle chez la chienne non gestante.....	5
<b>Figure 3 :</b>	Schéma de l'appareil génital mâle.....	7
<b>Figure 4 :</b>	Coloration de Hariss et Schorr.....	11
<b>Figure 5 :</b>	Sonde OSIRIS.....	25
<b>Figure 6 :</b>	Matériel utilisé en expérimentation.....	27
<b>Figure 7 :</b>	Matériel utilisé pour la récolte de sperme.....	27
<b>Figure 8 :</b>	Le matériel nécessaire pour le spermogramme.....	27
<b>Figure 9 :</b>	Les différents matériels utilisés dans l'insémination artificielle.....	28
<b>Figure 10 :</b>	La coloration de Hariss et Shorr.....	30
<b>Figure 11 :</b>	Ecoulements vaginaux et examen de la vulve.....	34
<b>Figure 12 :</b>	Les étapes de frottis vaginaux.....	35
<b>Figure 13 :</b>	Ecouvillon rouge de proestrus et le marron de début de métœstrus.....	35
<b>Figure 14 :</b>	Etalement et fixation de frottis.....	36
<b>Figure 15 :</b>	Coloration de Hariss et Shorr-complète et simplifiée.....	36
<b>Figure 16 :</b>	La coloration Diff-Quick®.....	36
<b>Figure 17 :</b>	Lecture des lames par un microscope optique.....	37
<b>Figure 18 :</b>	Proestrus (coloration Hariss et Shorr).....	38
<b>Figure 19 :</b>	Proestrus (coloration Diff-Quik®).....	39
<b>Figure 20 :</b>	Œstrus (coloration Hariss et Shorr).....	39
<b>Figure 21 :</b>	Métœstrus (coloration Hariss-Shorr et Diff-Quik).....	39
<b>Figure 22 :</b>	Les différentes fractions (urétrale, spermatique et prostatique).....	40
<b>Figure 23 :</b>	Le chien se lèche pour recalotter.....	40
<b>Figure 24 :</b>	Appréciation de la mobilité massale et individuelle.....	41
<b>Figure 25 :</b>	Microscope à platine chauffante (évaluation automatisée).....	41
<b>Figure 26 :</b>	Le matériel de numération des spermatozoïdes.....	42
<b>Figure 27 :</b>	Technique de réalisation d'un frottis.....	42
<b>Figure 28 :</b>	Evaluation de la vitalité des spermatozoïdes à l'aide de microscope.....	43
<b>Figure 29 :</b>	Préparation de matériel pour l'insémination.....	44

<b>Figure 30 :</b>	Lubrification et intromission de la sonde.....	44
<b>Figure 31 :</b>	Injection de la 1 <sup>ère</sup> fraction urétrale puis la fraction spermatique.....	44
<b>Figure 32 :</b>	Injection de la fraction prostatique et 2ml d'air et le retrait de la sonde....	44
<b>Figure 33 :</b>	Le massage clitoridien pendant 10 minutes.....	45
<b>Figure 34 :</b>	Détail des différents composants du pistolet OSIRIS (Mialot et al., 1985)...	45
<b>Figure 35 :</b>	Photographie de pistolet OSIRIS.....	46
<b>Figure 36 :</b>	La sonde urinaire de FOLLEY.....	46

## Liste des tableaux

	Titre du tableau	Page
<b>Tableau 01 :</b>	Principales modifications cliniques, comportementales et anatomiques lors du cycle œstral.....	<b>4</b>
<b>Tableau 02 :</b>	Description des trois phases de l'éjaculat du chien.....	<b>8</b>
<b>Tableau 03 :</b>	Les différentes colorations.....	<b>10</b>
<b>Tableau 04 :</b>	Aspect des cellules épithéliales vaginales.....	<b>12</b>
<b>Tableau 05 :</b>	Le cycle sexuel et les frottis vaginaux.....	<b>13</b>
<b>Tableau 06 :</b>	Echelle d'appréciation de la motilité massale du sperme du chien.....	<b>21</b>
<b>Tableau 07 :</b>	Coloration des frottis vaginaux par la coloration de Hariss-Shorr.....	<b>30</b>
<b>Tableau 08 :</b>	Caractéristique de semence du Sam.....	<b>43</b>

---

# Introduction

L'insémination artificielle a été découverte au XVIII<sup>ème</sup> 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 XX<sup>ème</sup> 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, 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.

L'insémination artificielle est une méthode de reproduction qui consiste à déposer la semence du mâle dans les voies génitales de la femelle par voies instrumentale, après avoir déterminé le moment propice pour l'intervention.

Dans ce modeste travail, j'ai essayé de montrer comment réaliser une insémination artificielle en semence fraîche, de façon à avoir une partie théorique dans laquelle j'ai abordé l'anatomie et la physiologie des tractus génitaux des deux sexes et les différentes techniques de suivi des chaleurs qui a un intérêt capitale pour déterminer le moment propice de l'insémination artificielle, ainsi que la récolte de sperme et l'évaluation de sa qualité pour effectuer une insémination artificielle.

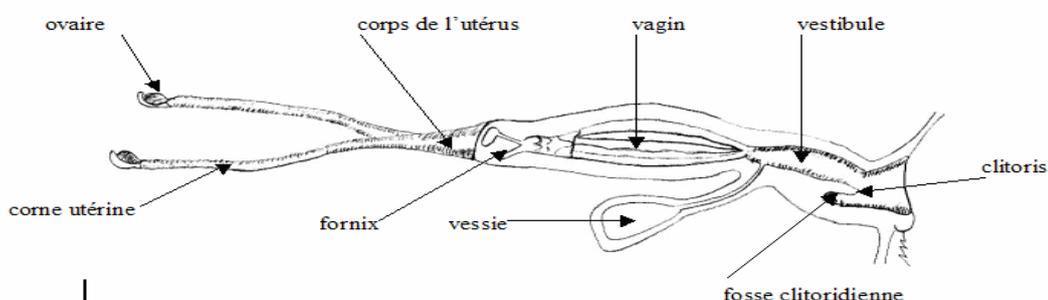
Dans la partie pratique, j'ai réalisé un suivi des chaleurs pour certaines chiennes et la récolte du la semence après l'avoir examiné sur le plan microscopique et en fin j'ai démontré la technique d'insémination artificielle.

### 1 Rappel anatomo-physiologique de la reproduction.

#### 1.1 Rappel anatomique chez 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.

- ✓ **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.
- ✓ **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.
- ✓ **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.
- ✓ **Le vagin** : situé en arrière de l'utérus, accueille avec le vestibule le pénis du mâle lors de l'accouplement.
  - ✓ **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 (vallou, 1917).
  - ✓ **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.



**Figure 01 : Schéma de l'appareil génitale de la chienne (JOHNSTON et al., 2001a)**

Particularité anatomique du vagin de la chienne avec sa partie antérieure horizontale et sa partie postérieure verticale.

## Partie bibliographique :

---

### 1.2 Physiologie de la reproduction chez la chienne :

#### 1.2.1 La puberté :

La puberté marque chez la chienne le début de l'activité cyclique des ovaires et la maturité de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades. Cliniquement, cela correspond chez la chienne à la survenue des premières chaleurs.

Les races de petit format sont pubères plus précocement (6 à 10mois) que les grandes races (1 à 2ans).

Notons que les premières chaleurs (période du cycle repérable par les propriétaires) sont souvent discrètes.(JOHNSTON et al., 2001a)

#### 1.2.2 Cycle œstral de la chienne :

Le cycle est qualifié de mono-oestrien, c'est-à-dire qu'il n'y a qu'une seule période d'ovulation par cycle, et non-saisonnier.

L'ovulation est spontanée et les ovocytes sont expulsés au stade vésicule germinative (prophase I). L'ovocyte achève lentement sa méiose et ce n'est que 48 à 72 heures après l'ovulation que le premier globule polaire est expulsé et que l'ovocyte atteint le stade de (métaphase II) ce sont des ovocytes matures et fécondables (TSUTSUI, 1975), Ainsi les ovocytes obtenus restent fécondable durant 2 jours : c'est la période de fécondation potentielle.(FONTBONNE et al., 2007). Contrairement, la période fertile se définit par la période permettant d'obtenir la gestation si on réalise la saillie à ce moment-là.

Entre deux périodes d'activité ovarienne, la chienne connaît une période de repos sexuel, l'anoestrus, dont la durée varie de 22 à 47 semaines.

##### 1.2.2.1 Différentes phases du cycle œstral :

Chez la chienne, le cycle comporte 4 phases qui sont définies par un certain nombre d'événements hormonaux, comportementaux (CHAKRABORTY et al., 1980) et anatomiques. Ces phases se suivent selon un ordre immuable : le pro- œstrus, l'œstrus, le métœstrus et l'anoestrus. (Tableau 1) ;

**Le pro-œstrus** : la chienne attire le mâle mais refuse d'être saillie, peut même présenter les signes d'agressivité envers les chiens et refuser tout contact.

**L'œstrus** : il correspond à la période des chaleurs, mais aussi la période de l'ovulation durant laquelle la chienne a un comportement sexuel actif et accepte le mâle.

## Partie bibliographique :

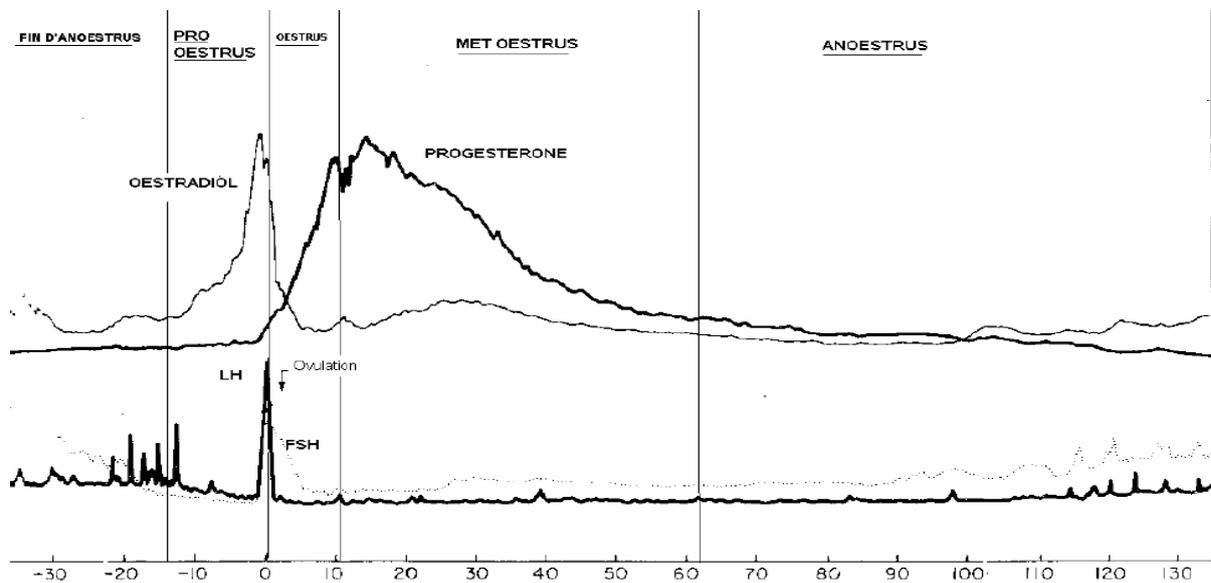
**Le dioestrus ou le métoestrus :** il correspond à la phase lutéale du cycle et à l'activité de corps jaune ovarien qui secrète de progestérone et sa durée est de 65 à 70 jours. Durant cette période la chienne refuse à nouveau la saillie.

**L'anoestrus :** il correspond à la période de repos sexuel. Durant cette période les taux d'hormones sont à leur niveau basal.

**Tableau 1 :** Principales modifications cliniques, comportementales, et anatomiques lors du cycle œstral, d'après (FONTBONNE et al., 2007)

Modification	Phases			
	Période de Chaleur			
	Pro-œstrus 7 à 10 jours	Œstrus 5 à 10 jours	Dioestrus 65 à 70 jours	Anoestrus Variable : 4 à 9 mois
<b>Clinique et comportementales</b>	-vulve de taille augmenté, et pertes sanguines -attraction des mâles mais refus de l'accouplement	-vulve oedématiée -peu de pertes vulvaires -Attraction des mâles et acceptation de l'accouplement	Nidation, Gestation, mise-bas et lactation ou pseudo gestation - Durée de vie du corps jaune (CJ)	Aucun signe extérieur, repos sexuel
<b>Anatomique : ovaires</b>	Croissance folliculaire rapide	Ovulation puis début du développement du CJ	CJ sécrétant, puis régression	Croissance folliculaire lente
<b>Anatomique : Utérus</b>	Congestion de la muqueuse, écoulements sanguins	Prolifération de l'endomètre	Nidation et gestation, phase sécrétoire de l'endomètre, puis desquamation et restauration	Phase de repos
<b>Anatomique : muqueuse vaginale</b>	-Rouge, oedématiée -Nombreux plis -Secrétions fluides	-Un peu moins rouge et moins oedématiée -Plis plus profonds et serrés	-Rose -Plis séparés et peu profonds -surface humide	-Rose -Lisse, Modérément humide

### 1.2.2.2 Les variations hormonales au cours du cycle œstral :



**Figure 02 :** Variation des taux hormonaux au cours des phases du cycle chez la chienne non gestante

➤ **Le proœstrus :** On observe une augmentation de taux plasmatique d'œstradiol (œstradiolémie) jusqu'à atteindre un pic pendant environ 24 heures.

La progestérone, non détectable jusqu'en début d'œstrus, va augmenter progressivement en raison de la lutéinisation pré-ovulatoire des follicules.

Des sécrétion pulsatiles de LH sont constatées.

➤ **L'œstrus :** L'œstradiolémie va décroître et rester à des valeurs basses durant toute la suite du cycle.

La progestérone plasmatique augmente rapidement, et une décharge de LH apparait à chaque début d'œstrus, environ 24h après le pic d'œstradiol, et accompagnée d'une décharge de FSH

➤ **Le métoœstrus ou diœstrus :** L'œstradiolémie reste bas, la concentration de progestérone est maximale et reste élevée pendant la première partie de métoœstrus (15-70 ng/ml) puis qui décroît progressivement jusqu'à la fin du métoœstrus (<2 ng/ml).

LH et FSH sont bas

➤ **L'anoœstrus :** L'œstradiol plasmatique reste bas jusqu'en fin d'anoœstrus ou il commence à augmenter et la progestéronémie est basse.

## Partie bibliographique :

---

### 1.3 Rappel anatomique chez le chien :

L'appareil génital mâle est constitué du scrotum, des testicules et des épидидymes, des canaux déférents, de la prostate, du pénis et du prépuce. (DONE et al., 1996; JOHNSTON et al., 2001a)

#### **Scrotum :**

Le scrotum est une excroissance de la peau, en général fine, pigmentée et dépilée, située en région périnéale basse, qui contient les deux testicules.

La localisation et la composition du scrotum permettent de maintenir les testicules à une température inférieure à celle de l'ensemble du corps.

#### **Testicules et épидидymes :**

##### **• Testicules :**

Chaque testicule est recouvert d'une tunique vaginale puis d'une albuginée.

Les testicules sont divisés en lobules qui contiennent des tubes séminifères. Ceux-ci se prolongent ensuite par le Rete testis puis par l'épididyme et enfin par les canaux déférents.

Entre ces tubes séminifères, se trouve un tissu interstitiel.

Ces testicules sont responsables de la spermatogenèse (élaboration des spermatozoïdes) et de la stéroïdogenèse (élaboration d'hormones sexuelles).

##### **• Epididymes :**

La tête de l'épididyme se situe au pôle crânial du testicule, le corps de l'épididyme longe le bord dorso-latéral du testicule et enfin, la queue de l'épididyme est attachée au bord caudal du testicule par le ligament propre. La queue de l'épididyme se prolonge par les canaux déférents. Il intervient dans la maturation des spermatozoïdes : c'est le lieu d'acquisition du pouvoir fécondant.

#### **Canaux déférents :**

Les canaux déférents partent des testicules et remontent en direction de l'abdomen, croisent ventralement les uretères et pénètrent dans la prostate pour venir s'aboucher à l'urètre prostatique.

#### **Prostate :**

C'est la seule glande accessoire de l'appareil génital mâle chez le chien, elle joue un rôle important dans la production de l'éjaculat.

C'est un organe bilobé, qui se trouve caudalement à la vessie et qui est traversé par l'urètre pelvien.

## Partie bibliographique :

---

### Pénis :

Le pénis est l'organe de copulation composé de trois parties: la racine, le corps, et le gland qui est protégée par le fourreau. Le gland comporte un os pénien au centre et absent chez le jeune et deux bulbes érectiles qui forment les renflements à sa base.

L'os pénien permet la pénétration du pénis dans le vagin alors que l'érection est incomplète.

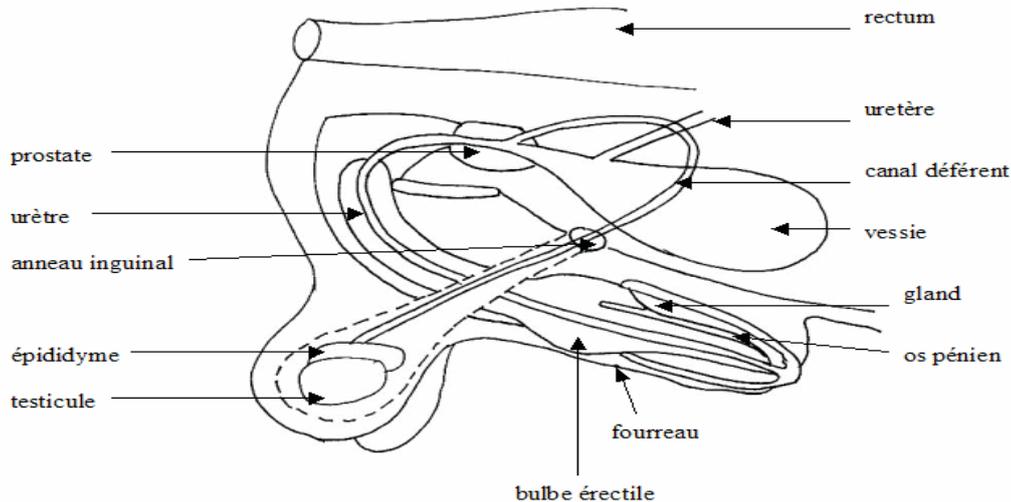


Figure 03 : Schéma de l'appareil génital mâle(DUMON and FONTBONNE, 1992)

## 1.4 Physiologie de la reproduction chez le chien :

### 1.4.1 La puberté :

La puberté est définie comme la période à laquelle le chien est capable d'élaborer des spermatozoïdes fonctionnels, c'est-à-dire apte à féconder un ovocyte.

Celle-ci survient entre 7 et 15 mois en moyenne, cependant dans certaines races de grande taille, elle peut n'apparaître qu'à 2 ans.

En période pré pubertaire des spermatozoïdes sont produits, mais en faible quantité et sans avoir subi de maturation complète, ils sont généralement éliminés avec l'urine. (DUMON and FONTBONNE, 1992)

### 1.4.2 La spermatogenèse :

Elle consiste en la formation de spermatozoïdes féconds et à lieu dans les tubes séminifères.(DUMON and FONTBONNE, 1992; JOHNSTON et al., 2001a)

### Durée et quantification :

- **Durée** : La spermatogenèse chez le chien dure en moyenne 63 jours.

## Partie bibliographique :

---

- **Quantité** : Un éjaculat en moyen contient environ 500 millions de spz. La quantité produite est directement dépendante de la masse de parenchyme testiculaire, ce chiffre est donc augmenté dans les grandes races et diminué dans les petites.

Le nombre de spermatozoïdes produits diminue chez les chiens âgés.

**Elaboration du sperme** : Elle est réalisée par les sécrétions des glandes annexes :

- **La prostate** : sa sécrétion représente la majorité du volume de l'éjaculat.
- **Les glandes bulbo-urétrales** : elles sont à l'origine de la fraction urétrale de l'éjaculat.

### 1.5 Caractéristiques générales de la semence canine :

L'éjaculat de chien est un liquide blanchâtre. Le volume de l'éjaculat dépend de la race et de l'individu ; il varie de un à quatre-vingt millilitres (JOHNSTON et al., 2001b). L'éjaculat de chien est composé de **trois fractions** présentant des caractéristiques différentes tant au niveau de leur origine que de leur composition et de leur volume.

**Tableau 02** : Description des trois phases de l'éjaculat du chien d'après (DUMON and FONTBONNE, 1992)

	<b>Origine</b>	<b>Aspect</b>	<b>Volume</b>	<b>Ph</b>	<b>composition</b>
<b>Phase pré-spermatique</b>	Prostatique	Blanchâtre	0.2 à 2 mL	6.2 -6.5	+ Moins de 3 millions de spermatozoïdes + Liquide prostatique
<b>Phase spermatique</b>	Epididymaire	Plus ou moins laiteuse	0.5 à 3.5 mL	6.3 - 6.6	+ Très riche en Spermatozoïdes + Sécrétion épидидymaire
<b>Phase prostatique</b>	Prostatique	Clair	4 à 30 mL et plus	6.5 -7.0	+ Très rare Spermatozoïdes + Liquide prostatique

## **2 Le suivi des chaleurs chez la chienne :**

### **2.1 Suivi des chaleurs :**

Les indications d'un suivi de chaleur chez la chienne :

Il existe une période optimale pour la saillie (fécondation) qui s'étend de 2 à 4 jours après l'ovulation. Ainsi l'utilité est de déterminer la date ou à quel moment l'éleveur va effectuer la saillie ou faire réaliser l'insémination artificielle de sa chienne.

#### **2.1.1 Suivi des chaleurs par les observations cliniques :**

##### **2.1.1.1 Les écoulements vulvaires :**

Méthode peu fiable, les écoulements sont inconstants selon les chiennes, certaines ont des chaleurs avec des écoulements vulvaires, et d'autres ont des chaleurs sans les écoulements qui s'étend jusqu'au début de métoestrus

##### **2.1.1.2 Le vaginoscopie, ou endoscopie vaginale :**

Le but est de suivre l'aspect de la muqueuse vaginale, la couleur, la présence ou non de fluide, et l'évolution qui est modifiée au cours du cycle selon l'imprégnation hormonale.

Lors de la période féconde (2 à 4 jours après l'ovulation), la muqueuse vaginale présente des replis anguleux et blancs: c'est ce qu'on appelle la crénulation vaginale.

Cette technique est intéressante car rapide et invasive mais aussi présente des inconvénients non négligeables, et ne donne pas avec exactitude le jour de l'ovulation.

Ces méthodes sont donc assez peu fiables, et peuvent éventuellement être utilisées en première approximation, en complément d'autres techniques présentées ci-dessous.

#### **2.1.2 Suivi des chaleurs par l'utilisation d'examens complémentaires :**

L'examen cytologique vaginal permet de recueillir les cellules épithéliales de surface ainsi que les cellules présentes dans la lumière de vagin.

##### **2.1.2.1 Le frottis vaginal :**

Cette méthode simple et basée sur le fait que la muqueuse vaginale subit l'influence des hormones sexuelles secrétées pendant les chaleurs, principalement les œstrogènes qui vont entraîner une prolifération de l'épithélium vaginal, visible au frottis. On relève les paramètres suivants: la richesse en cellules et leur morphologie, la présence ou non de mucus, de leucocytes et l'affinité tinctoriale (coloration Harris Shorr) de frottis.

## Partie bibliographique :

---

### 2.1.2.1.1 La technique de réalisation d'un frottis vaginal :

#### 2.1.2.1.1.1 Le prélèvement :

On utilise d'abord un écouvillon en coton stérile à usage unique, long de 15cm minimum. L'humidifier à l'aide d'une goutte d'eau physiologique, en évitant l'eau distillé et l'eau de robinet qu'altèrent les cellules. Avant de réaliser le prélèvement faut d'abord bien nettoyer les parties génitales de la chienne. Prendre la vulve entre le pouce et l'index et la maintenir vers le bas avec les lèvres écartées. Ensuite introduit l'écouvillon verticalement le long de bord supérieur des lèvres vulvaires afin d'éviter la fosse clitoridienne (traumatisme pour la chienne et pourrait aussi fausser le frottis). Ensuite, il convient de redresser horizontalement l'écouvillon pour atteindre la région antéro-médiane du vagin, tourné doucement l'écouvillon sur lui-même et enfin retiré lentement vers l'arrière.

#### 2.1.2.1.1.2 L'étalement :

Etaler aussitôt le prélèvement afin d'éviter la dessiccation en roulant l'écouvillon sur une lame de microscope propre afin d'y transférer le matériel cellulaire.

En évitant le frottement qui risque d'écraser les cellules, et le passage d'écouvillon deux fois au même endroit.

#### 2.1.2.1.1.3 La Fixation :

Cette étape permet de conserver le frottis environ 15 jours avant d'être coloré, elle est effectuée immédiatement après l'étalement.

La fixation consiste à plonger la lame après l'étalement dans un mélange d'Alcool-Ether (AA) pendant 5 minutes. Des cytofixateurs en aérosol existent et permettent une fixation plus facile et plus rapide.

#### 2.1.2.1.1.4 La coloration :

Il existe trois types de coloration usuellement pratiquées :

**Tableau 03** : Les différentes colorations

Coloration	Avantages	Inconvénients
Bleu de méthylène	Coloration unichrome Rapide et facile Lecteur immédiat	-Appréciation uniquement morphologique -Mauvaise visualisation de cellules sanguines -Altération au bout de quelque minute
May-Grünwald-Giemsa	-Rapide	Les cellules épithéliales

## Partie bibliographique :

(MGG)	-Coloration différentielle du cytoplasme et de noyau -Bonne visualisation des polynucléaires et les hématies	vaginales sont monochromes
Harris-Shorr	-La kératinisation des cellules vaginales est bien mise en évidence par l'apparition d'une couleur rouge (éosinophilie ou acidophile) -Les cellules non kératinisées se colorent en bleu(basophilie)	Méthode longue

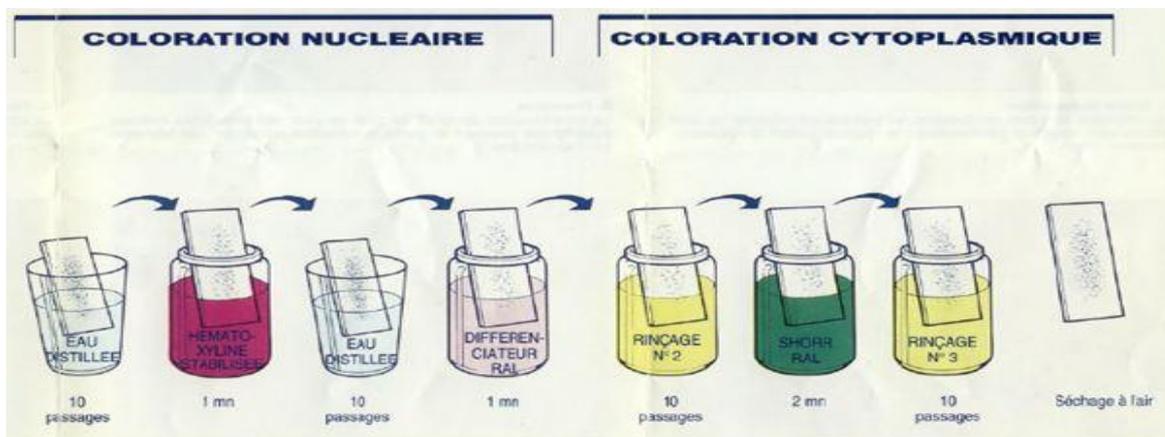


Figure 04 : coloration de Hariss et Schorr

### 2.1.2.1.2 Interprétation d'un frottis vaginal :

Différents éléments à considérer au lecteur microscopique du frottis : d'après (GUIOT, 1986) (DUMON, 1992)

- La forme des cellules ainsi que la taille du noyau par rapport à celle du cytoplasme.
- La couleur de cytoplasme, à la coloration de Hariss-Shorr, les cellules bleues sont dites **basophiles**, les cellules rouges, **éosinophiles**. Certaines cellules présentent les deux types de coloration au sein de leur cytoplasme : on parle de cellules **polychromatiques**.

Les colorations May-Grünwald-Giemsa et monochromatiques au bleu de méthylène ne permettent pas de différencier aussi précisément ces cellules.

- La présence d'autre type cellulaire comme des hématies ou des granulocytes polynucléaires neutrophiles. La présence de mucus s'avère aussi important à prendre en compte.

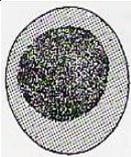
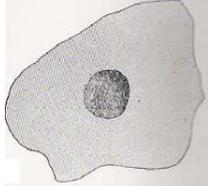
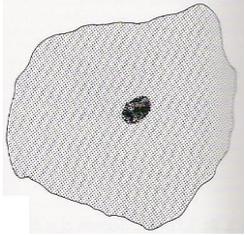
#### 2.1.2.1.2.1 Les différents types de cellules vaginales visibles sur un frottis :

La paroi du vagin possède un épithélium de revêtement pavimenteux stratifié non kératinisé (type malpighien non kératinisé).

## Partie bibliographique :

Cet épithélium voit sa structure varier avec l'âge et l'activité hormonale. Avant la puberté ainsi que durant l'anoestrus, l'épithélium est mince. Pendant la période d'activité génitale, il s'épaissit en réponse à la stimulation oestrogénique. Ses cellules basales et parabasales présentent un indice mitotique élevé. Les cellules plus superficielles augmentent en nombre et en taille et des précurseurs de la kératine et de dégénérescence du noyau apparaissent. Ces modifications sont maximales à l'œstrus et notamment à l'ovulation. On observe donc différents types de cellules vaginales dont la présence sur le frottis est inconstante et dépend de la phase du cycle

**Tableau 04** : Aspect des cellules épithéliales vaginales (JOHNSTON et al., 2001a)

	Diamètre	Forme	Noyau	Coloration	Schéma
<b>Cellules parabasales</b>	Petit	Ronde ou ovale	Gros	Basophile	 Rose dans le coloration de MGG
<b>Cellules intermédiaires</b>	Légèrement	Contours irréguliers	Bien visible	Basophile et/ou acidophile	 Rose ou violet dans la coloration de MGG
<b>Cellules superficielles</b>		Contours irréguliers	Pycnotique ou absent	Acidophile	 violet dans la coloration de MGG

**Les cellules basales** : ce sont de petites cellules rarement visibles sur le frottis.

**Les cellules parabasales** : Ce sont de petites cellules aux contours bien marqués, ronds ou en forme de goutte d'eau. Le noyau, souvent légèrement excentré, est relativement gros par rapport au cytoplasme. A la coloration de Harris Schorr, le cytoplasme prend une couleur bleue (basophile). Ces cellules peuvent contenir des leucocytes ou des granulocytes neutrophiles.

## Partie bibliographique :

On parle alors de cellule « métoestrale ».

**Les petites cellules intermédiaires :** Ces cellules sont plus grandes que les cellules parabasales. Leurs contours sont aussi moins bien définis : Ils prennent des formes variables mais généralement arrondies. Leur noyau est pycnotique et le cytoplasme éosinophile (rouge) ou basophile en début de cycle.

**Les cellules intermédiaires superficielles :** ces cellules sont plus grandes que les précédentes. Leurs noyaux sont pycnotiques. Le cytoplasme peut apparaître polychromatique ou entièrement éosinophile. Le contour de ces cellules est irrégulier : on dit que ces cellules prennent la forme de feuilles mortes ou de chips.

**Les cellules superficielles :** Ce sont les cellules les plus grands visibles sur un frottis vaginal. De contours anguleux et festonnés, elles sont souvent regroupées en amas. Le noyau est pycnotique et le cytoplasme entièrement éosinophile

### Cycle sexuel et frottis vaginaux:

Les frottis vaginaux permettent l'analyse cytologique de la muqueuse vaginale, et de déterminer dans quelle phase se situe la chienne

**Tableau 05 :** Le cycle sexuel et les frottis vaginaux

	Anoestrus	Proestrus			Œstrus	Métoestrus
Couleur du l'écouvillon	Blanc	Rouge vif en début de Proestrus et devient rosé au fur et à mesure que l'œstrus approche			Rose pale ou blanc	Marron ou grisâtre au début puis blanc
Frottis vaginale	Sale	Sale	Sale	Assez propre	Propre	+ou- propre
	-Pauvre en cellules Avec présence quasi exclusive de cellules	Présence de cellules basophiles intermédiaires IE<30% et une	Riche en cellules présence de cellules superficielles à noyau pycnotique	Riche en cellules acidophiles superficielles non regroupées en amas	Riche encellules présence de cellules superficielles acidophiles nucléées	Les cellules parabasales et intermédiaire s basophiles prédominent rapidement

## Partie bibliographique :

Richesse en cellules	basophiles parabasales ou intermédiaires (IE<10%)	coloration commence à apparaître signant un début de kératinisation	s IE 50%	IE sup à 70% présence de globule rouge	(kératinisation) regroupées en amas IE supérieur à 80% absence de globule rouge	polynucléaires neutrophiles sont présents et les érythrocytes sont absents
----------------------	---	---	-------------	---	---	--

Un seul frottis isolé ne présente aucun intérêt : le but de cette technique est de suivre l'évolution de la muqueuse. De façon optimale, (FONTBONNE et al., 2007) conseillent de suivre le pro-œstrus à l'aide des frottis vaginaux, jusqu'à atteindre un indice éosinophilique de 80% dans le frottis vaginal, et de commencer les dosages hormonaux et/ou de prévoir le déplacement de la chienne ou de l'étalon pour la saillie ou l'insémination artificielle.

### 2.1.2.2 Dosage de progestérone :

Une particularité du cycle de la chienne est que la lutéinisation des follicules commence dans la période pré-ovulatoire, entraînant une augmentation de la progestéronémie qui commence environ 2 jours avant l'ovulation.

D'après (MARSELOO et al., 2004), la progestéronémie le jour de l'ovulation est assez reproductible d'une chienne à l'autre, et est de  $6,25 \pm 1,55$  ng/ml.

- Après une prise de sang, la mesure de la **progestéronémie** donne une très bonne estimation de l'instant de l'OVULATION.

De manière générale, un frottis est réalisé à partir du 5ème ou 6ème jour des chaleurs :

- si ce frottis et l'examen de la chienne indiquent que celle-ci est en PRO-OESTRUS, un autre frottis est fait 3 à 5 jours plus tard.
- Si ce frottis et l'examen de la chienne indiquent que celle-ci est en phase d'OESTRUS, un dosage de la progestéronémie est effectué :
  - ✓ si la progestéronémie est basale (inférieure à 1 ng/mL), un nouveau dosage est réalisé 4 à 6 jours après.
  - ✓ Si la progestéronémie est comprise entre 1 et 3 ng/mL (elle commence alors à augmenter), un autre dosage est fait toutes les 24 à 48 heures jusqu'à atteindre 6 ng/ml, moment de l'OVULATION présumé.

#### 2.1.2.2.1 L'intérêt du dosage de la progestéronémie :

L'intérêt de dosage est augmenté lorsqu'on le couple avec une autre technique, celle des frottis vaginaux : l'association de ces deux techniques permet une bonne précision de la

## Partie bibliographique :

---

détermination du moment de l'ovulation car moins de dosage sont ainsi réalisés, et donc une bonne connaissance de la période optimale pour la mise à la reproduction de la chienne.

### **2.1.2.3 L'échographie ovarienne :**

Cette technique est utilisée pour déceler toute anomalie dans l'utérus (pyomètre, métrorragie, hyperplasie glandulo-kystique), ou dans les ovaires (kystes, follicules en croissance), pour mettre en évidence des tumeurs de l'appareil génital, et pour réaliser un diagnostic de gestation (JOHNSTON et al., 2001a)

Cette méthode permet de suivre l'évolution et la croissance des follicules ovariens, et de constater directement l'ovulation. Durant le cycle de la chienne, on peut observer une évolution morphologique de l'aspect de l'ovaire :

- Durant l'anoestrus, les ovaires sont petits, homogènes, et leur échogénicité est proche de celle du cortex rénal
- Pendant le pro-œstrus, on note une augmentation progressive de la taille des ovaires, et l'apparition de nombreuses structures petites, sphériques anéchogènes avec une paroi fine, qui sont les follicules ovariens. Ces follicules vont progressivement augmenter de taille
- Pendant l'œstrus, on observe une diminution du nombre de follicules ovariens, voire une complète disparition, et leur remplacement par des structures plus petites et hypoéchogènes. Il y a également l'apparition de liquide entre l'ovaire et la bourse ovarique, par accumulation du liquide intrafolliculaire expulsé lors de l'ovulation.

Cette technique présente plusieurs avantages : elle est peu invasive, et d'après (MARSELOO et al., 2004), elle améliore de 10% la précision de la détection du moment de l'ovulation par rapport à un dosage de progestérone seul ; dans cette étude, cette technique permet la détection du jour exact de l'ovulation chez 91,7% des chiennes.

En contre partie, cette technique présente également des inconvénients : elle nécessite un opérateur expérimenté du fait de la difficulté à visualiser les ovaires dans l'abdomen, et peut devenir moins efficace chez les chiens de races géantes, chez les chiens obèses, ou à peau épaisse.

Cet examen doit être répété plusieurs jours de suite, afin de suivre l'évolution des ovaires et des follicules, jusqu'à atteindre le moment de l'ovulation. Cela représente donc un coût non négligeable. En pratique, elle n'est donc utilisée que pour les inséminations avec semence congelée ou réfrigérée, pour lesquelles la durée de vie des spermatozoïdes est diminuée, ou chez des chiennes infertiles ou âgées.

### 3 Prélèvement et examen de la semence du mâle :

#### 3.1 Récolte de sperme :

##### 3.1.1 Présentation de la technique :

Plusieurs techniques sont utilisables pour effectuer la récolte du sperme :

- La technique manuelle par masturbation. Cette méthode simple a été utilisée dès 1780 par l'abbé Spallanzani. (FONTBONNE and DUMONT, 1992)

- L'électroéjaculation.

- Les vagins artificiels.

➤ **Les vagins artificiels** présentent l'avantage de mimer au mieux l'accouplement, mais elle n'est plus employée. En effet, elle est plus difficile à mettre en œuvre, nécessite un matériel adapté à la taille de chaque chien, ne permet pas le fractionnement de l'éjaculat, et altérerait la qualité du sperme. (DUMONT and FONTBONNE, 1992) (JOHNSTON et al., 2001a)

➤ **L'électroéjaculation** a été peu étudiée chez le chien, utilisée principalement chez le chat. Cette méthode de récolte n'est pas couramment utilisée car elle nécessite une anesthésie générale et qu'elle augmente les risques de contamination de la semence par l'urine.(JOHNSTON et al., 2001a)

Nous détaillerons donc la technique de **récolte manuelle**.

- **matériel** : Le matériel nécessaire à la récolte de la semence par masturbation est simple :

Cône en plastique souple relié à un tube de récolte → Technique actuellement utilisée.

Les tubes de récolte en verre doivent être évités en raison du risque de blessure, ils sont remplacés par des tubes de centrifugation stérile en plastique, gradués et incassables, qui s'adapte parfaitement au manchon souple. (DUMONT and FONTBONNE, 1992; FONTBONNE et al., 1998)

- **Précautions** :

L'idéal est de laisser les cônes dans une étuve afin qu'ils soient tièdes au moment du prélèvement pour éviter une inhibition de l'érection due au froid.

Des précautions sont à prendre dans le nettoyage du matériel de récolte Les cônes doivent être abondamment rincés car les détergents ménagers sont très spermicides.

En effet, la semence est sensible à de nombreux agents chimiques, le caoutchouc, le chlore, les sulfamides... Puis, les cônes doivent être soigneusement séchés afin d'ôter les résidus d'eau qui sont toxiques pour les spermatozoïdes. (DUMONT and FONTBONNE, 1992)

## Partie bibliographique :

---

### 3.1.2 Déroulement :

- **Environnement de la récolte :**

Le prélèvement doit être effectué dans un endroit calme, peu bruyant, en présence d'un nombre restreint de personnes.

La récolte doit s'effectuer au sol qui ne doit pas être glissant. Selon les cas, le maître doit ou ne doit pas être présent. En effet, certains chiens seront inhibés par la présence du propriétaire alors que d'autres seront stimulés par celle-ci. (DUMONT and FONTBONNE, 1992; FONTBONNE et al., 1998)

- **Mise en condition :**

La présence d'une **chienne en œstrus** est recommandée sans être absolument nécessaire. Cependant, elle peut faciliter la récolte de chiens timides, à faible libido ou nerveux. De plus, la présence d'une chienne en chaleur augmente la qualité de l'éjaculat. (JOHNSTON et al., 2001a)

Des **phéromones** synthétiques peuvent être appliquées sur la vulve et l'arrière train d'une femelle en anoestrus voire sur un mâle castré (FELDMAN and NELSON, 1987). Plus simplement, des écouvillons de chiennes en œstrus peuvent être conservés à - 20 °C et présentés à la truffe du mâle pendant le prélèvement ou être appliqués à la base de la queue d'une chienne. (KUTZLER, 2005)

- **stimulation digitale :**

Si l'opérateur est droitier, il se positionne à gauche du chien. Sa main droite masse le pénis du chien tandis que la gauche tient le cône de récolte. Le propriétaire se tient à la droite du chien au niveau de la tête et il oriente la tête du chien vers la vulve de la chienne si celle-ci est présente, le chien peut chevaucher la chienne. (FELDMAN and NELSON, 1987; KUTZLER, 2005)

**La récolte** débute par un massage vigoureux en arrière des bulbes érectiles à travers le fourreau jusqu'à l'obtention de l'érection partielle. Le prépuce est alors récliné en arrière des bulbes érectiles. Parfois, le fourreau ne peut pas être repoussé en arrière des bulbes érectiles notamment lorsque les bulbes sont trop engorgés ou lorsque le chien souffre d'un paraphimosis (DUMONT and FONTBONNE, 1992; KUTZLER, 2005). Le chien éprouve dans ce cas de l'inconfort voire de la douleur et l'érection peut s'arrêter (FELDMAN and NELSON, 1987). Une pression est ensuite appliquée à l'arrière des bulbes érectiles avec le pouce et l'index. Cette pression mime la coaptation vaginale du pénis lors du coït (DUMONT and FONTBONNE, 1992). Le chien va présenter des mouvements de bassin d'avant en arrière pendant quelques minutes puis il va s'arrêter et soulever un postérieur pour essayer de se retourner. Le pénis

## Partie bibliographique :

---

peut alors être orienté caudalement. La pression en arrière des bulbes érectiles doit être maintenue (KUTZLER, 2005). A ce stade, l'érection est totale et l'éjaculation des deux premières phases a lieu ; elle dure entre deux et cinq minutes (FELDMAN and NELSON, 1987). Si l'érection a tendance à diminuer, un massage de l'urètre périnéal peut être nécessaire (DUMONT and FONTBONNE, 1992).

La séquence se poursuit par l'éjaculation de la troisième phase ; la récolte intégrale de celle-ci n'est pas nécessaire car elle peut être longue. Il est cependant important de récolter une quantité suffisante de la troisième phase afin d'en observer l'aspect.

### **Echecs :**

Les principales causes d'échec sont (DUMON and FONTBONNE, 1992; FONTBONNE et al., 1998)

- Physiologiques : chien trop âgé, trop jeune ou inexpérimenté
- Environnementales : bruit, blouses blanches, trop de personnes présentes...
- Comportementales : agressivité, zoophilie...
- Liés à la race : races naines plus timides, chiens de défense agressifs...
- Pathologiques : fracture ancienne de l'os pénien, calculs urétraux.
- Pas de chienne en chaleur.
- liés à l'expérimentateur. Une masturbation trop ferme ou à l'inverse trop douce peut aboutir à un échec du prélèvement. (DUMONT and FONTBONNE, 1992; FELDMAN and NELSON, 1987)

### **3.1.3 Stockage de la semence après la récolte :**

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

## **3.2 Evaluation de la semence canine :**

L'évaluation de la semence est une étape importante pour estimer la fertilité du mâle (EILTS, 2005). L'évaluation de la semence fraîche a pour but d'évaluer le fonctionnement testiculaire et épидидymaire alors que l'évaluation de la semence congelée permet d'évaluer les dommages subis par les spermatozoïdes au cours du processus de congélation (MARTINEZ, 2004).

Dans cette partie, nous évoqueront les examens de routine, réalisables par le vétérinaire et nécessitant peu de matériel, les examens réalisés en seconde intention et les nouvelles méthodes d'études du sperme utilisées dans les centres spécialisés.

## Partie bibliographique :

---

### 3.2.1 Examen de la semence :

Ces examens sont **simples** ; ils sont effectués avant une (IA), une congélation de semence ou plus simplement dans le cadre d'une analyse de sperme en vue d'en apprécier sa qualité, il s'agit du spermogramme et du spermocytogramme.

Un examen macroscopique et microscopique du sperme est effectué en vue de qualifier la qualité de la semence qui est étroitement lié à la fertilité.

#### 3.2.1.1 Le spermogramme :

C'est **l'étude du sperme** au sens strict. Le volume, l'aspect, l'odeur, le pH, la mobilité des spz, le nombre de spz ainsi que leur vitalité sont analysés. (DUMONT and FONTBONNE, 1992)

##### 3.2.1.1.1 Examen macroscopique :

- **Le volume** : La mesure du volume donne quelques indications ; si celui-ci est trop faible, il se peut que la phase spermatique n'ait pas été entièrement (DUMONT and FONTBONNE, 1992).

Si l'éjaculat n'a pas été fractionné, sa mesure a peu de signification car la phase post-spermatique à un volume beaucoup plus important que celui des autres phases. De plus, le volume de l'éjaculat dépend également de la taille du chien, de son âge et de la fréquence de ses éjaculations. Le volume est également important pour calculer le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat. (JOHNSTON et al., 2001a) Ejaculat normal : entre 3 et 30 ml suivant la race et le fractionnement de l'éjaculat.

- **L'aspect** : L'aspect de l'éjaculat est un élément important. Par exemple, l'opacité de la phase spermatique donne une première indication sur la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat. L'opérateur doit obtenir un liquide plus ou moins laiteux.

Certaines **modifications de couleur** peuvent orienter vers des affections spécifiques :

- la couleur jaune indique la présence d'urine ou la présence d'un exsudat inflammatoire

- la couleur verte met en évidence la présence de pus ;

- la couleur rouge ou brune indique la présence de sang respectivement en nature ou digéré. Le sang digéré provient généralement de la prostate. Le sang en nature peut provenir de petites hémorragies qui se produisent pendant l'érection.

- un échantillon clair est évocateur d'une azoospermie (absence de spz dans l'éjaculat).

(FELDMAN and NELSON, 1987; FRESHMAN, 2002; JOHNSTON et al., 2001a)

La présence d'éléments anormaux tels que l'urine, le sang ou le pus peut entraîner une diminution de la concentration, de la motilité et de la vitalité des spz. Une coloration anormale

## Partie bibliographique :

---

du sperme nécessite donc un approfondissement de l'examen du tractus génital. (FELDMAN and NELSON, 1987)

- **L'odeur** : Le sperme canin est inodore sauf s'il est contaminé par de l'urine, du pus ou des bactéries. (FONTBONNE, 1995)

**Le pH** : Le pH doit être compris **entre 6.4 et 6.8**. Il est important d'effectuer cette analyse lors d'asthénozoospermie afin d'écartier une affection de la prostate, de l'urètre ou de la vessie (DUMONT and FONTBONNE, 1992). De plus, la mesure du pH est intéressante à connaître si une antibiothérapie doit être entreprise, les antibiotiques étant inhibés à certaines valeurs de pH (FRESHMAN, 2002).

### 3.2.1.1.2 Examen microscopique :

Différents critères sont étudiés d'après (DUMON and FONTBONNE, 1992; FONTBONNE et al., 1998)

- **La mobilité** : L'examen de la mobilité des spz se fait sur une platine chauffante à 37°C entre lame et lamelle. Il doit être effectué rapidement après le prélèvement. Une corrélation importante est notée entre la mobilité et la fertilité. La mobilité est diminuée par les températures extrêmes, les diluants acides, l'urine, le pus, le sang et le lubrifiant. Il faut noter que la mobilité est augmentée à proximité des bulles d'air et est diminuée au niveau des bords de la lamelle. (FELDMAN and NELSON, 1987; JOHNSTON et al., 2001a)

Dans un premier temps, le sperme est regardé au faible grossissement de façon à apprécier **la mobilité massale**, c'est-à-dire les mouvements de réunions et de dispersion des spz. Cette observation est subjective. Une échelle d'appréciation peut être utilisée : une note variant de zéro à cinq est attribuée. Le zéro correspond à un échantillon dans lequel les spz sont tous immobiles et le cinq correspond à un échantillon dans lequel les spz ont un mouvement d'ensemble dense donnant une impression de vagues.

Dans un deuxième temps, le sperme est examiné au fort grossissement entre lame et lamelle afin d'apprécier la mobilité progressive : le pourcentage de spz qui sont en mouvement ainsi que leur vitesse et leur trajectoire est estimé. Les spermatozoïdes qui traversent rapidement le champ du microscope sont nommés **spermatozoïdes fléchants**. (DUMONT and FONTBONNE, 1992; FONTBONNE, 1995)

## Partie bibliographique :

---

**Tableau 06** : Echelle d'appréciation de la motilité massale du sperme du chien (d'après FONTBONNE, 1993)

ECHELLE D'APPRECIATION DE LA MOTILITE MASSALE DU SPERME DE CHIEN	
Note	Interprétation
0	Aucun mouvement
1	Les spermatozoïdes bougent sans former de mouvement d'ensemble.
2	Les spermatozoïdes ébauchent des mouvements d'ensemble circulaires.
3	Les mouvements d'ensemble représentent des cercles centrés sur eux-mêmes.
4	Les spermatozoïdes ont un mouvement d'ensemble. Ils forment des vagues rondes qui se déplacent.
5	Les mouvements d'ensemble se densifient. Les spermatozoïdes bougent en tous sens.

### • La numération :

La numération est la détermination du **nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat**.

Le comptage se fera en pratique à l'aide d'une cellule hématimétrique et de mélangeurs capillaires dits « mélangeurs de Potain ».

Le sperme est tout d'abord dilué dans un liquide hypertonique comme du chlorure de sodium à 3% qui immobilise les spz. Les spermatozoïdes dilués sont ensuite comptés au microscope à l'aide des graduations de la cellule hématimétrique.

Le sperme, selon l'aspect macroscopique, sera dilué au 1/10ème ou 1/20ème (mélangeurs à bille blanche), ou au 1/100ème ou 1/200ème (mélangeurs à bille rouge).

Après mélange, une goutte de sperme diluée est ensuite déposée sur la cellule hématimétrique : cellule de Neubauer, de Malassez ou de Thoma.

Les spermatozoïdes sont comptés selon des règles strictes et des facteurs multiplicatifs permettent d'obtenir la concentration et le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat.

L'interprétation de la concentration est délicate car elle dépend de la quantité de fluide prostatique récoltée lors du prélèvement. (DUMONT and FONTBONNE, 1992; FELDMAN and NELSON, 1987)

### Numération des spermatozoïdes

**L'oligozoospermie** qualifie une insuffisance du nombre de spermatozoïdes. Celle-ci peut évoluer vers une **azoospermie** (= absence de spermatozoïde). Elle est souvent liée à un problème hormonal.

### La vitalité :

La vitalité est le pourcentage de **spermatozoïdes vivants**. Ce paramètre donne une bonne indication de la qualité de la semence. L'éosine-nigrosine est un colorant permettant d'évaluer

## Partie bibliographique :

---

la vitalité. En effet, il permet de différencier les spermatozoïdes morts qui seront colorés en rose des spermatozoïdes vivants qui eux resteront incolores. Il faut toutefois noter que cette coloration donne des résultats variables suivant l'origine du colorant et le temps de trempage dans celui-ci. (FONTBONNE, 1995)

### 3.2.1.2 Le spermocytogramme:

Le spermocytogramme est l'étude de la **morphologie des spermatozoïdes**. Elle s'effectue sur un étalement de semence colorée au microscope optique en contraste de phase.

Le spermatozoïde est formé de quatre parties distinctes : la tête, le col, la pièce intermédiaire et la flagelle (ou queue du spermatozoïde).

L'examen et le dénombrement des spermatozoïdes anormaux sont importants pour juger de la qualité d'une semence. Plusieurs types d'anomalies peuvent être rencontrés. Elles sont qualifiées de majeures ou mineures. selon qu'elles sont ou non corrélées avec une diminution de la fertilité. (FELDMAN and NELSON, 1987; JOHNSTON et al., 2001a)

Le seuil de tolérance est, selon les auteurs, de 5 à 30%.

**EN PRATIQUE** : L'éosine-nigrosine permet également de reconnaître les spermatozoïdes ayant déjà effectué leur réaction acrosomique et qui ne sont donc plus fertiles.

En effet, l'acrosome des spermatozoïdes ayant effectué leur réaction acrosomique sera colorée. (EILTS, 2005)

La **tératozoospermie** qualifie la présence d'un trop grand nombre de spermatozoïdes anormaux.

Le syndrome **OAT (oligo-asthéo-térato-zoospermie)** qualifie une semence pauvre en spermatozoïdes, ces derniers étant peu mobiles et contenant beaucoup de formes anormales.

#### • Autres éléments

- Cellules épithéliales : on retrouve souvent des cellules épithéliales de l'urètre ou de la vessie en faible quantité. Si leur nombre est important, cela peut être le signe d'une inflammation des voies urinaires.
- Globules rouges : ils sont souvent trouvés en faible nombre car des petits capillaires de la verge éclatent au moment de l'érection, mais si leur nombre est exagéré, cela est anormal.
- Bactéries, cellules inflammatoires, polynucléaires : la présence de ces éléments correspond à un sperme pathologique et doit inciter à faire un examen complet de l'appareil uro-génital.

#### Interprétation du spermogramme

## Partie bibliographique :

---

Pour que la semence puisse assurer une fécondation de la chienne, la plupart des auteurs s'accordent à dire qu'elle doit avoir les caractéristiques suivantes :

La dose nécessaire pour féconder une chienne est comprise entre **100 et 150 millions de spermatozoïdes normaux et mobiles par éjaculat**. De plus, le pourcentage de **spermatozoïdes anormaux** ne doit pas excéder **vingt à trente pour cent** et la **mobilité** doit être supérieure à **soixante dix pour cent** pour que la semence soit de bonne qualité. (DUMON and FONTBONNE, 1992; FELDMAN and NELSON, 1987; JOHNSTON et al., 2001a)

Il semble que les caractéristiques de la semence étant les plus corrélées avec la fertilité soient la concentration de l'éjaculat en spermatozoïdes, le pourcentage de mobilité progressive et la morphologie des spermatozoïdes (FELDMAN and NELSON, 1987). Une étude réalisée par Oettle en 1993 a montré que les chiens ayant 60% ou plus de spermatozoïdes normaux ont une fertilité de 60%. Alors que si les chiens ont moins de 60% de spermatozoïdes normaux, leur fertilité chute à 13%. (OETTLE, 1993).

Une semence ne peut être qualifiée de mauvaise qualité que si l'évaluation de la semence a été répétée plusieurs fois à quelques jours d'intervalle et que les anomalies observées sont pérennes. En effet, après une longue abstinence, la semence peut être de mauvaise qualité avec notamment un pourcentage élevé de spermatozoïdes anormaux. (JOHNSTON et al., 2001a).

### **Rappels des définitions concernant les anomalies du spermogramme :**

**Oligospermie** : Volume de sperme insuffisant.

**Aspermie** : Absence de sperme.

**Oligozoospermie** : Insuffisance du nombre de spermatozoïdes.

**Azoospermie** : Absence de spermatozoïde.

**Asthénozoospermie** : Trop grande quantité de spermatozoïdes à mobilité anormale.

**Térazozoospermie** : Trop grande quantité de spermatozoïdes anormaux.

Remarquons que la qualité de la semence est moins bonne après une période d'abstinence, il est donc conseillé de prélever deux ou trois éjaculats en l'espace de 2-3 jours avant de conclure à une mauvaise qualité de la semence.

## Partie bibliographique :

---

### 4 Insémination artificielle :

#### 4.1 L'insémination en semence fraîche

La semence du mâle est prélevée en présence de la femelle, sa qualité est contrôlée au microscope, puis elle est déposée dans les voies génitales de la chienne. (DUMON and FONTBONNE, 1992; FONTBONNE et al., 1998; JOHNSTON et al., 2001a)

##### 4.1.1 Indications :

L'insémination en semence fraîche permet de remplacer l'accouplement dans un certain nombre de situations :

- Du fait de la femelle : refus du mâle, agressivité, femelle plus dominante que le mâle, étroitesse ou malformations des voies génitales.
- Du fait du mâle : inexpérience, manque de libido, douleur lors du chevauchement due à une pathologie orthopédique, petite taille de la verge empêchant sa captation dans les voies génitales femelles.
- Du fait des deux partenaires : maladresse, disproportion mâle-femelle.
- Accouplement non souhaité par les propriétaires : atteinte d'un des deux partenaires par une maladie infectieuse (vaginite, balanoposthite, séropositivité à l'herpès virus canin), chienne très remuante pouvant faire craindre un accident de saillie (fracture de l'os pénien par exemple).

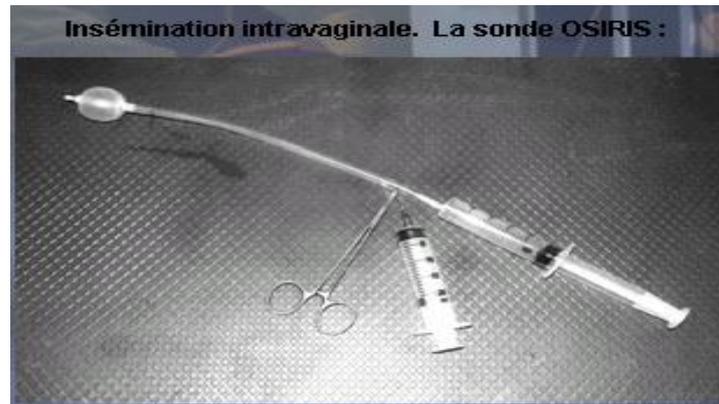
Parmi ces indications, **il s'en trouve** un certain nombre de « mauvaises ». En effet, l'IA devrait être considérée comme un outil d'amélioration génétique, or les chiennes qui présentent des malformations, en étant inséminées, vont avoir des filles qui auront les mêmes malformations. De même, la semence utilisée est parfois de médiocre qualité, or la qualité de la semence à une forte héritabilité, elle est transmissible de père en fils.

Dans certains pays, à savoir qu'au-delà de trois générations se reproduisant par IA à cause de malformations de voies génitales, on n'inscrit plus la descendance au livre des origines.

##### 4.1.2 Réalisation :

###### 4.1.2.1 Matériel :

La sonde Osiris est constituée d'un tube en plastique souple s'adaptant à l'anatomie du vagin. Son extrémité est entourée d'un ballonnet gonflable qui est supposé empêcher les écoulements de semence vers l'arrière tout en stimulant les contractions vaginales de la chienne. (FONTBONNE et al., 1998)



**Figure 05 :** Sonde OSIRIS

### **4.1.2.2 Technique :**

Les fractions spermatiques et prostatiques du mâle sont récoltées dans le même tube jusqu'à obtenir un volume compatible avec la taille de la chienne à inséminer : de 2 ml pour les petites races à 10 ml pour les grandes.

La sonde est introduite en longeant le plafond du vagin le plus profondément possible. Le ballonnet est ensuite gonflé jusqu'à ce que le corps de la sonde, qui dépasse à la commissure vulvaire, amorce un léger recul. L'arrivée d'air est fermée grâce à une pince clamp. Voir **figure 05 : sonde Osiris**

La semence est alors introduite au fond du vagin.

Rappel : la sonde ne peut pas passer dans l'utérus car la présence du conduit cervical (oblique d'avant en arrière et de haut en bas) entre l'utérus et le vagin l'en empêche.

Il est ensuite indiqué de maintenir la chienne en position de brouette pendant 10 minutes pour éviter les reflux.

Des techniques voisines, n'utilisant pas la sonde Osiris mais des sondes en plastique rigide existent.

Dans ces cas, il semble important de maintenir la chienne en position de brouette quelques minutes et l'opérateur doit favoriser les contractions vaginales en stimulant le clitoris et le plafond vaginal.

## La partie expérimentale :

---

### **1 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.

### **2 Matériels et méthodes :**

#### **2.1 Lieu :**

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

#### **2.2 Animaux :**

Notre étude a été réalisée sur une chienne appelée Ritta, Berger allemand, âgée de 6ans qui n'a jamais 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 au près du propriétaire

Le chien utilisé pour notre expérimentation est un Berger allemand âgé de 5 ans nommé Sam, Il appartient à un client de notre clinique.

#### **2.3 Matériel :**

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

##### **2.3.1 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 l'Alcool-Ether(AE) pour la fixation des prélèvements, la coloration de Hariss-Shorr et en fin un microscope pour l'observation.

## La partie expérimentale :



Figure 06: Matériel utilisé en expérimentation (photo personnelle).

### 2.3.2 Pour la récolte de sperme :

On a utilisé un cône en plastique souple qui présente l'intérêt d'être atraumatique et réutilisable relié à un tube à récolte en verre et un gel lubrifiant non spermicide.



Figure 07 : Matériel utilisé pour la récolte de sperme (photo personnelle).

### 2.3.3 Pour le spermogramme :

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



Figure 08 : Le matériel nécessaire pour le spermogramme (photo personnelle).

## La partie expérimentale :

---

### 2.3.4 Pour l'insémination artificielle :

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



Figure 09 : Les différents matériels utilisés dans l'insémination artificielle (photo personnelle).

### 3 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 25 /04/2017 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).

#### 3.1 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.

## La partie expérimentale :

---

### 3.2 Les frottis vaginaux :

#### 3.2.1 Réalisation :

##### 3.2.1.1 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 de 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.

##### 3.2.1.2 Etalement 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 cellulaire. On doit éviter le frottement qui risque d'écraser les cellules, et le passage deux fois au même endroit.

Pour la fixer, on plonge la lame pendant 5 min dans un mélange d'Alcool-Ether (AE) à 50°, et la sécher à l'air libre dans le but de conserver 15 jours avant d'être coloré.

##### 3.2.1.3 Coloration :

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

Préparation des solutions dans des flacons de 50ml :

On a besoin de 14 flacons de 50ml, de l'eau distillé, de l'alcool à 100°(Ethanol), de l'ammoniac à 25%, hématoxyline de Hariss, coloration de Shorr et une pipette.

Selon la règle de concentration :  $(C1) \times (V1) = (C2) \times (V2)$

- $\left. \begin{array}{l} \text{Alcool à } 70^\circ : 50\text{ml} \rightarrow 100^\circ \\ X \rightarrow 70^\circ \end{array} \right\} X = \frac{70 \times 50}{100} \rightarrow X = 35$

## La partie expérimentale :



**Figure 10:** La coloration de Hariss et Shorr (photo personnelle).

**Tableau 07 :** Coloration des frottis vaginaux par la coloration de Hariss-Shorr

ETAPES	DUREE
Fixation alcool-éther	5mn
Alcool à 70°	Plonger 10 fois
Alcool à 50°	Plonger 10 fois
Eau distillée	Plonger 10 fois
Hématoxyline de Hariss	2mn
Eau distillée	Passage
Eau distillée	Passage
Alcool ammoniacal	1mn
Eau distillée	Passage
Alcool à 70°	Passage
Alcool à 95°	Passage
Coloration de Shorr	2mn
Alcool à 95°	Passage
Alcool à 100°	Passage

Sécher la lame après coloration à l'air libre

### 3.2.2 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 25/04/2017 à 14h30mn et le second est fait le

## La partie expérimentale :

---

30/04/2017 à 13h 30min au niveau de la clinique de l'ISVB : on note l'absence des pertes vulvaires, la muqueuse vulvaire est de couleur rose pâle l'écouvillon est blanc et propre.

Au faible grossissement du microscope(100) : le frottis est pauvre en cellules, la coloration dominante est le bleu (cellules basophiles nucléées).

Au fort grossissement du microscope(400) : Le frottis présent des cellules parabasales et quelques cellules intermédiaires avec l'absence de cellules inflammatoire et les globules rouges. La chienne refuse le mâle.

Le second prélèvement à été fait le 30/04/2017 à 13 h 30min. La femelle est jugée en dioestrus ou anoestrus.

### **4 Récolte de sperme :**

Dés l'arrivé du propriétaire nous avons essayé d'obtenir le maximum d'information sur le chien : c'est un berger allemand âgé de 5 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.

#### **4.1 La récolte manuelle du sperme :**

D'abord on prépare le matériel avant l'arrivé 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 un étuve pour les tiédir avant la collecte afin d'éviter une inhibition de l'érection due au froid. La récolte est effectué au niveau de l'ISVB à la salle de reproduction le : 02/05/2017 à 14h.

Dés 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

## La partie expérimentale :

---

présence de son maître qui le tient fermement par le collier et qui placé du côté 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 l'étalon, ce qui provoque un début d'érection.

Lorsque l'érection commence et le 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 1<sup>er</sup> 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 2<sup>ème</sup> tube et on remplace le 3<sup>ème</sup> tube. Une pause de quelque 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.

### 4.2 Le spermogramme :

#### 4.2.1 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.

## La partie expérimentale :

---

### 4.2.1.1 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-à-dire qui se déplacent rapidement, en ligne droite) est mesuré.

### 4.2.1.2 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  $\mu$ L NaCl à 4% + 5  $\mu$ L du sperme de la phase spermatique on les homogénéise bien, à l'aide de micropipette on prend 10  $\mu$ 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.

### 4.2.1.3 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.

## La partie expérimentale :

---

### 5 Résultat et discussion :

#### 5.1 Suivi des chaleurs :

##### 5.1.1 Suivi des chaleurs par les observations cliniques :



**Figure 11** : 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 oedématisée) ainsi que la béance de l'orifice vaginal (dilaté, non dilaté) sont pris en compte.

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

###### 5.1.2.1 Réalisation des frottis vaginaux :

## La partie expérimentale :

---

Les frottis sont réalisés du début de prise en charge des chiennes, dans le but de cerner avec plus de précision la période de l'ovulation mais aussi de déterminer la période fertile afin d'effectuer l'insémination.

### 5.1.2.1.1 Le prélèvement :



**Figure 12** : Les étapes de frottis vaginaux (photo personnelle) .



**Figure 13** : Ecouvillon rouge de proestrus / Ecouvillon marron de début de métœstrus

## La partie expérimentale :

### 5.1.2.1.2 L'étalement et la fixation :



Figure 14 : Etalement et fixation de frottis (photo personnelle).

### 5.1.2.1.3 La coloration :



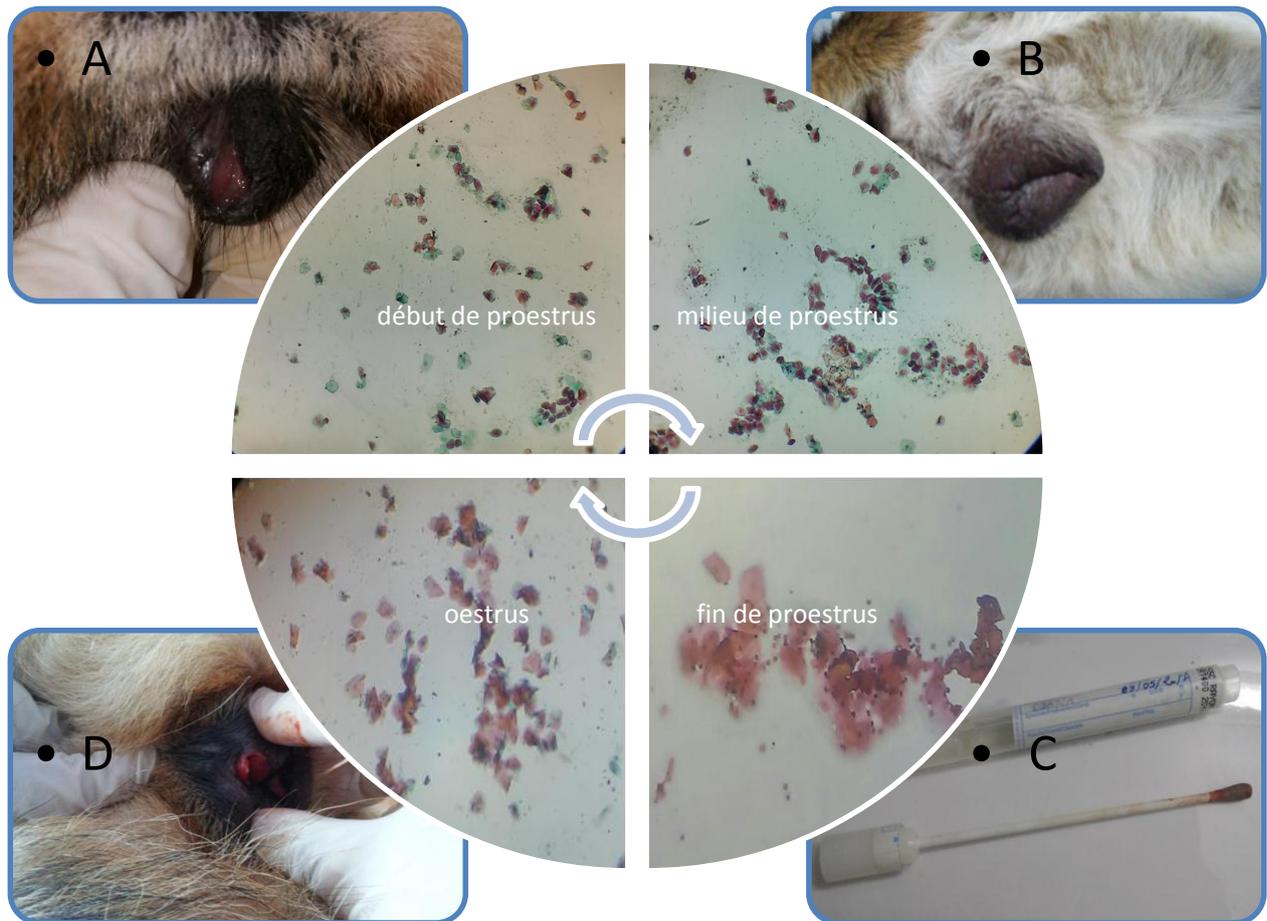
Figure 15: Coloration de Hariss et Shorr-complète / Coloration de Hariss et Shorr simplifiée.



Figure 16 : La coloration Diff-Quick® (photo personnelle).

## La partie expérimentale :

### 5.1.2.1.4 Lecture des lames au microscope optique :



**A** : écoulement vulvaire / **B** : vulve tuméfiée / **C** : écouvillon de couleur rouge / **D** : muqueuse congestionnée (photo personnelle).



**Figure 17** : Lecture des lames par un 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.

## La partie expérimentale :

---

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 Harris-Schorr, la présence de granulocytes neutrophiles est confirmée par la coloration May-Grünwald-Giemsa (La coloration Diff-Quick®).

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.

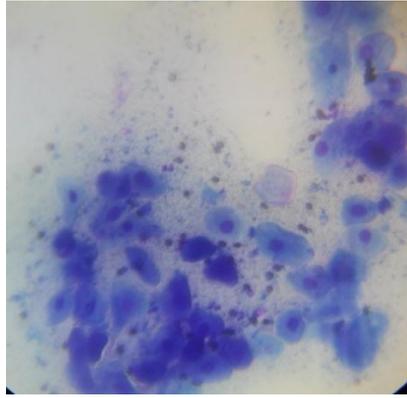


**Figure 18** : Proestrus (coloration Hariss et Shorr) (photo personnelle)..

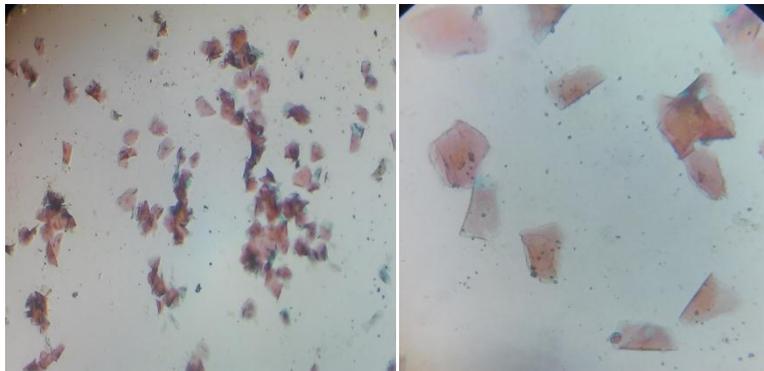
Au début de proestrus le frottis est sale et granuleux en raison de l'abondance du mucus (GUIOT, 1986) à prédominance de cellules basophiles intermédiaires nucléées et quelques globules rouges sont observés, au milieu de proestrus, on observe une augmentation du nombre de cellules présentes sur le frottis 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 (DUMON, 1992). En fin de proestrus, le frottis présente presque exclusivement des cellules superficielle à noyau pycnotique ou anucléés (DUMON, 1992). Elles sont de coloration essentiellement acidophile.

## La partie expérimentale :

---

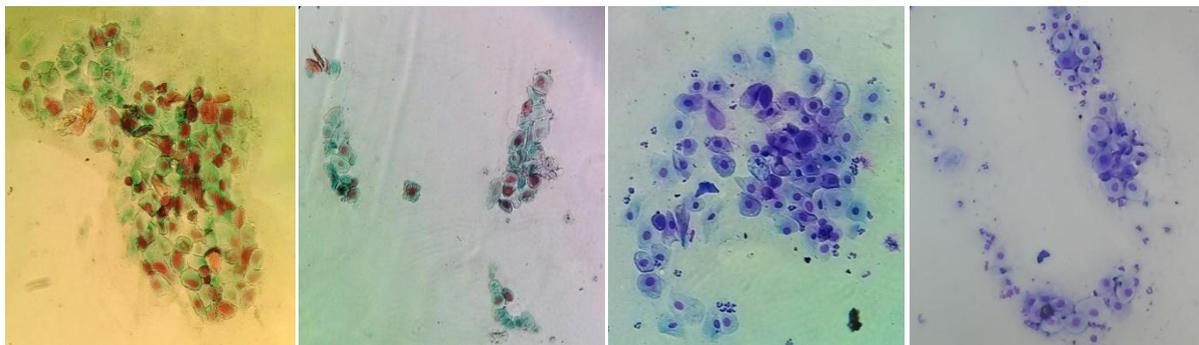


**Figure 19 :** Proestrus (coloration Diff-Quik®)(photo personnelle).



**Figure 20 :** Œstrus (coloration Hariss et Shorr) (photo personnelle).

Les cellules vaginales sont très nombreuses sur un frottis d'œstrus. Ce sont des cellules superficielles kératinisées. Elles sont anucléées et de coloration acidophile, elles se présentent en grappes (DUMON, 1992).



**Figure 21 :** Métœstrus (coloration Hariss-Shorr et Diff-Quik) (photo personnelle).

Le frottis présente en parallèle, une diminution des cellules superficielles et une augmentation des cellules parabasales et intermédiaires. Ces cellules typiques du métœstrus sont associées à des polynucléaires neutrophiles.

## La partie expérimentale :

### 5.2 Récolte manuelle :



**Figure 22** : Les différentes fractions (urétrale, spermatique et prostatique).



**Figure 23** : Le chien se lèche pour recalotter (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 suivantes : (C.LINDE-FORSBERG, 1995; E.FELDMAN and R.NELSON, 2004; FRESHMAN, 2002; KUTZLER, 2005; S.JOHNSTON, 1991).

Ce fut d'ailleurs par cette technique de récolte que procéda Spallanzani en 1780 pour réaliser ses inséminations artificielles (FONTBONNE and DUMONT, 1992).

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

#### 5.2.1 Spermogramme :

##### 5.2.1.1 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.

## La partie expérimentale :

---

### 5.2.1.2 Examen microscopique :

#### 5.2.1.2.1 La mobilité :



**Figure 24** : Appréciation de la mobilité massale et individuelle (photo personnelle).

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



**Figure 25**: Microscope à platine chauffante (évaluation automatisée)

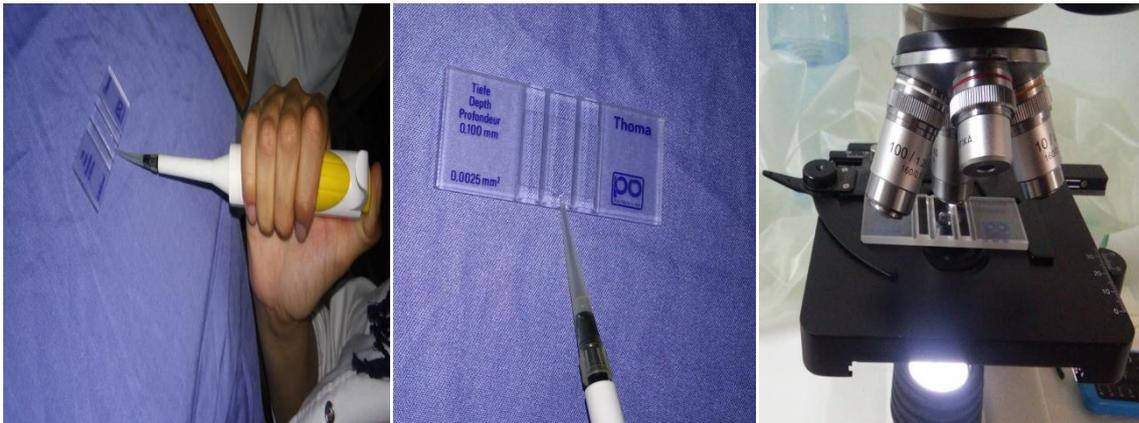
Le système d'analyse de la semence assistée par ordinateur ou CASA (Computer-Aided Semen Analysis) qui est un système d'évaluation objectif et standardisé.

Un sperme de bonne qualité présentera plus de 70 % de spermatozoïdes fléchants (C.LINDEFORSBERG, 1995). La semence est jugée de bonne qualité lorsque le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est supérieur à 70% (FONTBONNE and DUMONT, 1992)

## La partie expérimentale :

---

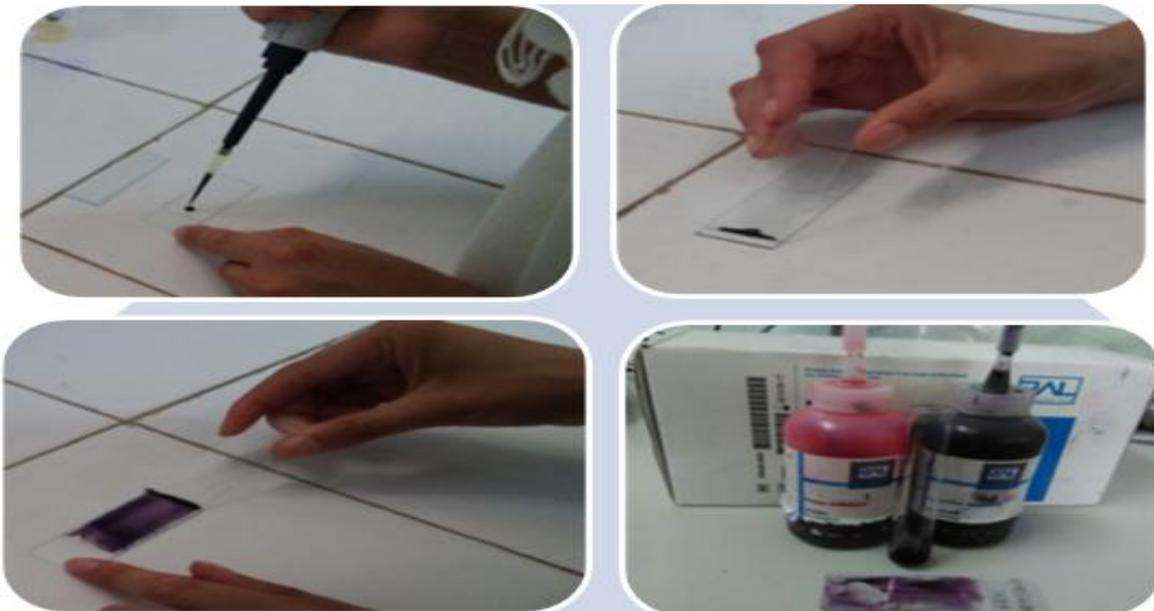
### 5.2.1.2.2 La concentration :



**Figure 26** : Le matériel de numération des spermatozoïdes (photo personnelle).

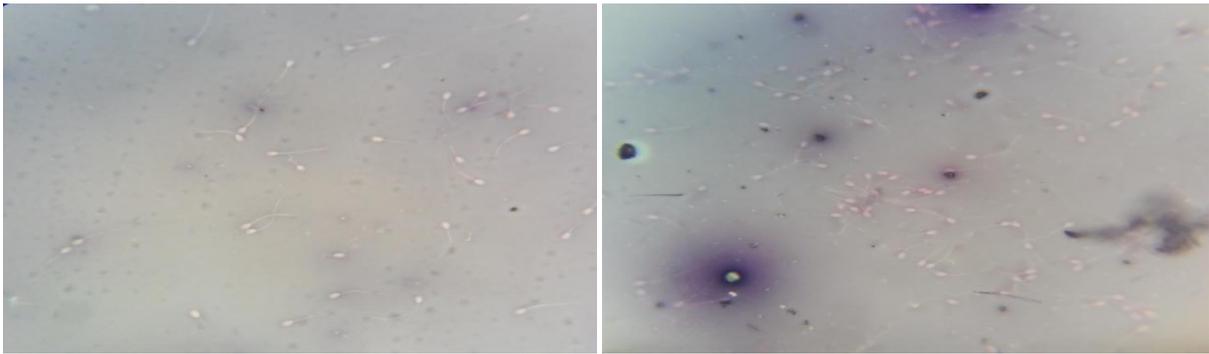
Les spermatozoïdes sont comptés sur la cellule de Thoma. Pour calculer le nombre de spermatozoïdes par millilitre de phase spermatique, il suffit d'affecter un coefficient multiplicateur, variable avec l'hématimètre utilisé et la dilution (O. Blonz, 1989)

### 5.2.1.2.3 Test de vitalité :



**Figure 27** : Technique de réalisation d'un frottis (photo personnelle).

## La partie expérimentale :



**Figure 28** : Evaluation de la vitalité des spermatozoïdes à l'aide de microscope optique (photo personnelle).

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.

**Tableau 8** : Caractéristique de semence du Sam

Chien Sam	Volume	Mobilité	Concentration	Vitalité
La phase spermatique	2ml	Massale : 4-4,5 Individuel : 60%	$270 \times 10^6$ spz/ml	Spz vivants : 73% Spz morts : 27%

Les spermatozoïdes contenus dans l'éjaculat doivent être en quantité suffisante et présenter une structure et une mobilité correctes pour rendre maximales les chances de réussite de la fécondation (FONTBONNE and DUMONT, 1992)

## 6 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.

## La partie expérimentale :



Figure 29 : Préparation de matériel pour l'insémination (photo personnelle).

### 6.1 En absence de la sonde OSIRIS (ballonnet gonflable) :



Figure 30 : Lubrification et intromission de la sonde (photo personnelle).



Figure 31 : Injection de la 1<sup>ère</sup> fraction urétrale puis la fraction spermatique (photo personnelle).

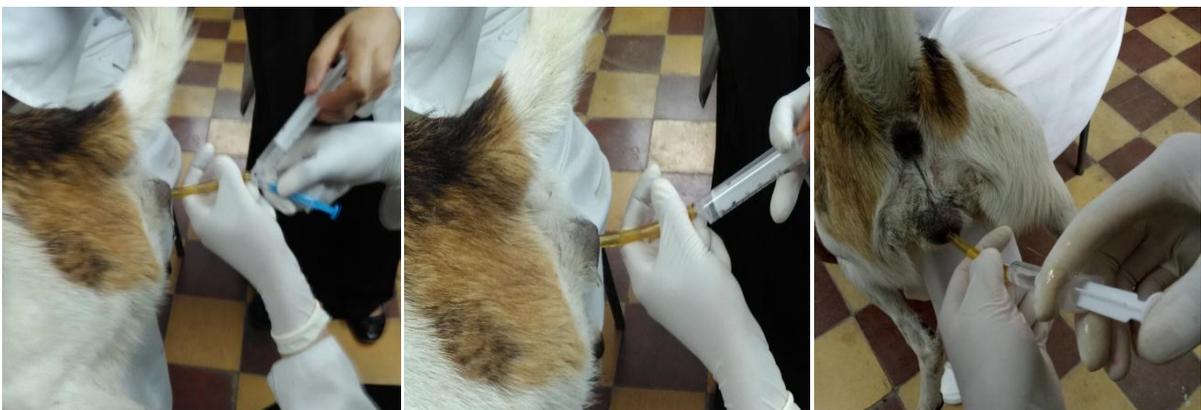


Figure 32 : Injection de la fraction prostatique et 2ml d'air et le retrait de la sonde.

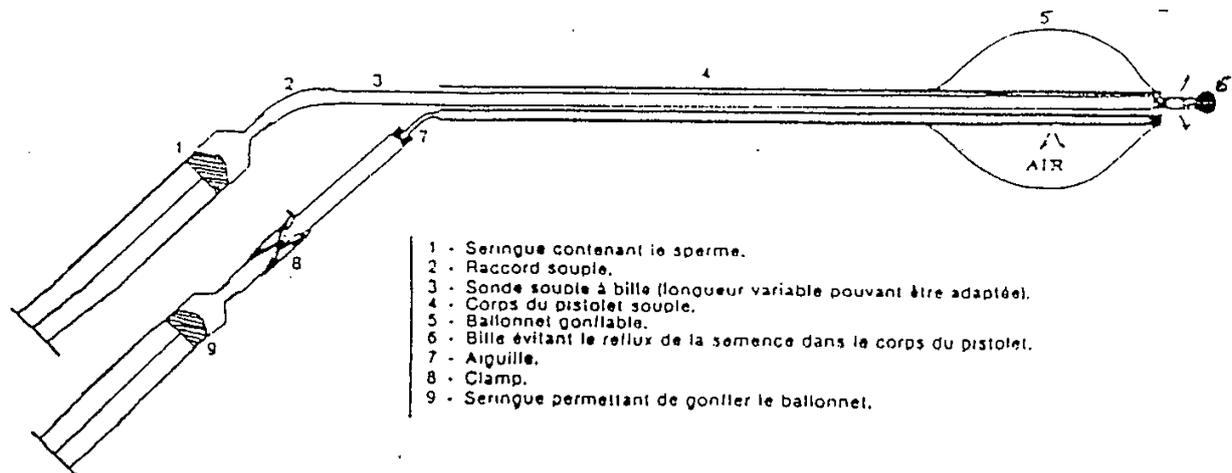
## La partie expérimentale :



**Figure 33** : 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 (DUMON, 1992).

### 6.2 En présence de la sonde OSIRIS (ballonnet gonflable) :



**Figure 34** : Détail des différents composants du pistolet OSIRIS (Mialot et al., 1985)

Ces auteurs (Mialot et al., 1985) préconisent ce mode d'insémination car ils le considèrent moins traumatisant pour la chienne que la méthode de cathétérisme du col utérin. De plus, d'après eux, lors d'une saillie naturelle, l'insémination est vaginale et la turgescence des bulbes érectiles et du gland empêchent le reflux de la semence tout en stimulant les contractions vaginales, celles-ci étant bénéfiques au transport des spermatozoïdes.

Ils ont donc mis au point un système non traumatisant permettant de mimer les conditions naturelles de saillie : le pistolet OSIRIS

## La partie expérimentale :

---



**Figure 35 :** Photographie de pistolet OSIRIS.

Le ballonnet gonflable à l'extrémité antérieure de la sonde évite le reflux du sperme dans le vagin et provoque chez la chienne des mouvements de contractions vaginales en région périnéale, ces mouvements favoriseraient le transport de la semence jusque dans l'utérus (Mialot et al., 1985).

### **6.2.1 La technique d'insémination en présence de ballonnet gonflable :**

la chienne est maintenue par terre, le pistolet OSIRIS est introduit dans les voies génitales de la femelle jusqu'au col utérin. Puis, le ballonnet est gonflé à l'aide de la 2<sup>ème</sup> seringue remplie d'air et le conduit est clampé pour éviter qu'il ne se dégonfle. La sonde est alors poussée vers l'avant et le sperme est injecté. Un à deux millilitres d'air sont insufflés dans la sonde pour enchasser la semence restante.

Puis, la sonde est tirée en arrière pour que la bille située à son extrémité terminale vienne obstruer le dispositif afin d'éviter tout reflux de semence.

Ce dispositif est laissé en place pendant 10 minutes (il peut être fixé à la queue avec un élastique), la chienne étant au calme. Il n'est pas nécessaire de surélever son arrière train.

Enfin, après avoir égonflé le ballonnet le pistolet est retiré lentement.

On peut remplacer la sonde OSIRIS par la sonde urinaire (FOLLEY)



**Figure 36 :** La sonde urinaire de FOLLEY (photo personnelle).

## La partie expérimentale :

---

Les meilleurs résultats sont obtenus pour des inséminations avec une semence fraîche, c'est-à-dire tout juste récolté. Dans l'étude menée par (LINDE-FORSBERG and FORSBERG, 1989) , le taux de gestation obtenu avec une semence fraîche est de 65,7%, il n'est que de 41,5 % avec une semence congelée.

### **6.3 Le choix du moment de l'insémination :**

Le choix du moment de l'insémination dépend de la technique utilisé, en semence fraîche, la longévité des spermatozoïdes permet de faire l'insémination pour des taux de progestérone équivalents à ceux de l'ovulation (OTOI et al., 2000). 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 (BADINAND et al., 1993).

### 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'étalon (azoospermie, oligospermie...), même si celle-ci n'est que ponctuelle.

Les avantages de cette technique par rapport à un accouplement classique sont :

- la rapidité,
- l'absence de transmission d'agents infectieux éventuellement présents sur les organes génitaux externes,
- la reproduction d'une femelle agressive avec les mâles ou qui présente des anomalies génitales (vulvaires en particulier),
- la reproduction d'un mâle qui a des difficultés à s'accoupler à cause d'une douleur par exemple (comme de l'arthrose),
- le croisement de deux partenaires de tailles très différentes ou dont la morphologie est particulière (par exemple les Bulldogs anglais peinent à s'accoupler en raison d'un thorax très profond et de pattes courtes relativement à leur poids),
- l'insémination de plusieurs chiennes avec un seul éjaculat,
- la reproduction de deux animaux éloignés géographiquement.

L'insémination artificielle doit être considérée comme une technique de routine, elle consiste à prélever la semence du mâle en présence d'une chienne en chaleur et à l'inséminer dans les minutes qui suivent après en avoir vérifié la qualité de sperme au microscope avant le dépôt dans les voies génitales femelles.

---

## 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) C.LINDE-FORSBERG, 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*. In, City.
- (4) CHAKRABORTY, P.K., PANKO, P.W., FLETCHER, W.S., 1980. Serum hormone concentrations and their relationships to sexual behaviour at the first and second oestrus cycle of the Labrador Bitch. *Biol. Reprod* 22.
- (5) DONE, S., GOODY, P., EVANS, S., 1996. *Color atlas of veterinary anatomy*, Vol. 3, London: Mosby-Wolfe.
- (6) DUMON, C., 1992. Frottis vaginaux chez la chienne. In: *Les indispensables de l'animal de compagnie- Reproduction du chien et du chat*, Paris.
- (7) DUMON, C., FONTBONNE, A., 1992. *Reproduction du chien et du chat*. Coll. *Les indispensables de l'animal de compagnie*.
- (8) DUMONT, C., FONTBONNE, A., 1992. *Reproduction du chien et du chat*.
- (9) EILTS, B.E., 2005. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation.
- (10) FELDMAN, E.C., NELSON, R.W., 1987. *Disorders of the canine male reproductive tract*. Saunders compagny, Philadelphia.
- (11) FELDMAN E.C, NELSON R.W, 2004. Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In : *Canine and feline endocrinology and reproduction*. WB Saunders, Philadelphia.
- (12) FONTBONNE, A., 1993. Prélèvement et examen de la semence chez le chien. In, *Encyclopédie Vétérinaire*, City, p. 8.
- (13) FONTBONNE, A., 1995. Infécondité du chien mâle. *ELVESIER* 5, 1-13.
- (14) FONTBONNE, A., BUFF, S., BOENDER, G., 1998. *Le vétérinaire et la reproduction*.
- (15) FONTBONNE, A., DUMONT, C., 1992. Prélèvement et examen de la semence chez le chien., Paris.
- (16) FONTBONNE, A., LEVY, X., FONTAINE, E., GILSON, C., 2007. *Guide pratique de reproduction clinique canine et féline*, Paris.
- (17) FRESHMAN, J.L., 2002. Semen collection and evaluation.

- 
- (18) GUIOT, A.-L., 1986. Pratique et intérêt des frottis vaginaux chez les carnivores domestiques. In. Méd. Vét, City.
- (19) JOHNSTON.S., 1991. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. Veterinary Clinics of North America : Small Animal Practice, Vol. 21.
- (20) JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OLSON, P.N.S., 2001a. Canine and Feline Theriogenology, Philadelphia.
- (21) JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OLSON, P.N.S., 2001b. Semen Collection, Evaluation, and Preservation. Saunders compagny, Philadelphia.
- (22) KUTZLER, M.A., 2005. Semen collection in the dog.
- (23) LINDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M., 1989. fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. J. Reprod. Fert., suppl 39, 299-310.
- (24) MARSELOO, N., FONTBONNE, A., G, G.B., 2004. Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in the bitch. In : Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Sao Paulo, Brazil.
- (25) MARTINEZ, A.I.P., 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation.
- (26) Mialot, J.P., DUMON, C., Cassou, B., 1985. Insémination artificielle chez la chienne: Mise en place de semence fraîche avec le pistolet souple (OSIRIS) - Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie.
- (27) OETTLE, E.E., 1993. Sperm morphology and fertility in the dog.
- (28) OTOI, T., MURAKAMI, M., FUJII, M., TANAKA, M., OOKA, A., UNE, S., SUZUKI, T., 2000. Development of canine oocytes matured and fertilised in vitro. Veterinary Record 146, 52-53.
- (29) TSUTSUI, T., 1975. Studies on the physiology of reproduction in the dog. On cleavage and transport of fertilized ova in the oviduct 21.