



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida



Université Saad
Dahlab-Blida 1-

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

**Analyse de la semence et détermination du moment de l'ovulation chez
l'espèce canine**

Présenté par

IGUEDAD Mohand Ameziane

TEBOUDELETTE Zine Eddine

Devant le jury :

Président(e) : Mimoun Nora

MCA

Examineur : Yahia Achour

MCA

Promoteur : KAIDI Rachid

Professeur

Co-promoteur : DAHMANI Omar Rafik

Docteur vétérinaire

Année : 2019/2020

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu **{Allah}** le tout puissant de nous avoir donné le courage ainsi que la volonté pour préparer ce travail.

A Notre Promoteur Monsieur le Professeur Rachid KAIDI,

Directeur du Laboratoire des Biotechnologies liés à la Reproduction Animale (LBRA), institut des Sciences Vétérinaires de l'université SAAD DAHLAB de Blida -1-

Qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être le directeur de notre projet de fin d'étude et de nous avoir guidé dans ce travail et donné l'envie d'approfondir nos connaissances en reproduction animales avec ces judicieux conseils qui ont

Contribué à alimenter notre réflexion,

Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Mokrane IGUEROUADA

Professeur à l'université de Bejaïa Département des Sciences Biologiques de l'Environnement
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Qui nous a accordé son temps et son savoir tout le long de notre travail ce qui a grandement contribué à la réussite de notre PFE

Hommages respectueux.

A Notre Co-promoteur : Docteur Vétérinaire Omar Rafik DAHMANI

Propriétaire du cabinet vétérinaire UMC Vet avec **Dr. Abdelbaqui EZZIANE,**
Pour sa disponibilité et son aide et ces conseils au cours de la réalisation de ce travail,

Sincères remerciements.

A Docteur Vétérinaire Mdm D. TARZALI,

Pour sa grande disponibilité, sa gentillesse et son aide précieuse,

Sincères remerciements.

Nous tenons à remercier spécialement le **professeur HADADI,**

Dr Djoudi, Dr Kalem pour leurs contributions à la réalisation de notre projet de fin d'étude ainsi que toute l'équipe pédagogique de l'université qui ont participé de loin ou de près

Sincères remerciements.

Dédicace

« **Nous dédions ce modeste travail accompagné d'un profond amour et respect** »

Nous témoignons toute notre gratitude à **nos familles** et **amis** qui nous ont soutenu tout le long de l'année et c'est grâce à leurs encouragements qu'on a pu achever notre cursus universitaire d'une manière honorable.

Je tiens à remercier en particulier

Mon **Père**, **sibel Rana Deniz**, **Mohamed Dahmani Rafik** et **Abdel Baki Ezziane** pour leur soutien

moral et leur suivi

De mon travail,

Merci infiniment

Zine Eddine TEBOUDELETTE

Je tiens à remercier en particulier **Mes chers parents** pour leurs efforts, sacrifices et leurs prières qui ont fait de moi l'homme que je suis aujourd'hui. J'implore Dieu, tout puissant de vous accorder une bonne santé, une longue vie et beaucoup de bonheur.

A **mes sœurs, mon frère**, un grand merci à vous d'avoir été toujours là même sans l'avoir demandé

A **mes camarades** de la promotion, de la cité universitaire avec lesquels on a des souvenirs inoubliables

A **mes amis** de Boumerdes leurs soutiens sont de grande valeur

A **QLF** Merci pour tout.

Mohand Ameziane IGUEDAD

Résumé :

L'insémination artificielle est l'une des biotechnologies la plus avancée dans le domaine de la reproduction des carnivores, notre objectif est de pouvoir la maîtriser et montrer sa fiabilité pour cela on a réalisé une série de recherches théoriques portant sur la physiologie de la reproduction chez les mâles mais aussi chez les femelles ainsi que les différents procédés et méthodes utilisés pour l'analyse et l'étude des différents prélèvements effectués pour l'insémination artificielle, ces dernières étaient accompagnées de plusieurs méthodes et techniques expérimentales pour tester la validité de certaines hypothèses telles que le type de coloration utilisé lors de l'étude de frottis vaginales (**Papanicolaou**), les méthodes de l'étude micro et macroscopique de la semence mâle en utilisant les colorants appropriés tels que l'éosine-nigrosine mais aussi le matériel nécessaire comme le système casa et un outillage de collecte propre et stérile (écouvillons, entonnoir, gants.. etc.). Les résultats obtenus suite à ces expériences ont montré certaines différences entre elles surtout au niveau budgétaire et d'une autre part il y a aussi le facteur temps et la rapidité de l'obtention des résultats, mais pour l'ensemble des méthodes expérimentales utilisées la finalité est sans appel et leur fiabilité n'est relativement pas remise en question.

L'insémination artificielle est une solution aux différents problèmes rencontrés par les éleveurs lors de l'accouplement de leurs chiens voilà pourquoi il convient de réaliser d'autres expérimentations sur elle à fin de la perfection et limiter les risques liés à son procédé au maximum on se base sur la partie collecte de la semence et son analyse mais aussi la détermination du moment optimale de l'ovulation plus que l'acte de l'insémination en lui-même car il est très facile à réaliser .

Mots clés : L'insémination artificielle, semence, reproduction, fécondation, système casa, frottis vaginales, ovulation, accouplement

ملخص :

يعد التلقيح الاصطناعي أحد أكثر التقنيات الحيوية تقدمًا في مجال تكاثر الحيوانات آكلة اللحوم ، وهدفنا هو أن نكون قادرين على التحكم فيه وإظهار موثوقيته لذلك قمنا بإجراء سلسلة من الأبحاث النظرية بما في ذلك فسيولوجيا التكاثر في الذكور والإناث أيضًا ، وكذلك العمليات والأساليب المختلفة المستخدمة في تحليل ودراسة العينات المختلفة لإجراء التلقيح الاصطناعي المسبق ، وقد رافق ذلك عدة طرق وتقنيات تجريبية لاختبار صحة فرضيات معينة مثل نوع التلوين المراد استخدامه أثناء دراسة اللطاخة المهبلية (بابانيكولاو) ، وطرق الدراسة الدقيقة والماكروسكوبية للسائل المنوي الذكري باستخدام الأصباغ المناسبة مثل إيوزين- نيجروزين وأيضا المواد الضرورية مثل نظام كازا وأدوات جمع نظيفة ومعقمة (مسحات ، قمع ، قفازات ، إلخ)

النتائج التي تم الحصول عليها بعد هذه التجارب تظهر بعض الفروق بينها خاصة على مستوى الميزانية ومن ناحية أخرى هناك عامل الوقت وسرعة الحصول على النتائج ولكن لجميع الطرق التجريبية استخدم نهائية بدون استئناف وموثوقيتها غير موضع تساؤل نسبياً.

يعتبر التلقيح الاصطناعي حلاً للعديد من المشاكل التي يواجهها المربون عند تزاوج كلابهم ، ولهذا من الضروري إجراء تجارب أخرى عليه من أجل تحقيق الكمال والحد من المخاطر المصاحبة لاستمراره قدر الإمكان. بناءً على الجزء الذي يجمع السائل المنوي وتحليله ولكن أيضاً تحديد اللحظة المثلى للإباضة أكثر من عملية التلقيح نفسها لأنها سهلة التنفيذ جداً.

الكلمات المفتاحية: التلقيح الاصطناعي ، السائل المنوي ، التكاثر ، الإخصاب ، نظام كاسا ، مسحة المهبل

، الإباضة ، التزاوج

Abstract:

Artificial insemination is one of the most advanced biotechnologies in the field of carnivore reproduction, our objective is to be able to control it and show its reliability for this we have carried out a series of theoretical research including on the physiology of reproduction in males but also in females as well as the different processes and methods used for the analysis and study of the different samples to carry out artificial pre-insemination, these were accompanied by several methods and experimental techniques to test the validity of certain hypotheses such as the type of staining to use during the study of vaginal smear (Papanicolao), the methods of the micro and macroscopic study of the male semen using the appropriate dyes such as Eosin-nigrosine but also the necessary material such as the casa system and clean and sterile collection tools (swabs, funnel, gloves, etc.). The results obtained following these experiments show some differences between them especially at the budgetary level and on the other hand there is also the time factor and the speed of obtaining the results, but for all the experimental methods use the finality is without appeal and their reliability is relatively not questioned. Artificial insemination is a solution to the various problems encountered by breeders when mating their dogs, which is why it is necessary to carry out other experiments on it in order to achieve perfection and limit the risks associated with its proceeding as much as possible. based on the part collecting the semen and its analysis but also the determination of the optimal moment of ovulation more than the act of insemination itself because it is very easy to perform.

Keywords: Artificial insemination, semen, reproduction, fertilization, casa system, pap smear, ovulation, mating

Table des matières

Introduction :1

Première partie : Etude bibliographique2

I.Chapitre 01 : Généralités3

3

3

1.1. 3

1.2. 4

II.Chapitre 02 : La semence canine6

6

1.1. 6

1.2. Récolte via un vagin artificiel :9

1.3. Le flush ou l'aspiration de l'épididyme :9

10

2.1. 10

2.2. Le spermocytogramme :18

3. Conservation de la semence :22

3.1. 22

III.Chapitre 03 : La reproduction chez la chienne24

24

2. Le cycle sexuel et ses caractéristiques :27

2.1. 28

2.2. L'œstrus :29

2.3. Le met-œstrus ou di-œstrus :30

2.4. L'an-œstrus :30

3. Suivre des chaleurs et détermination de la date d'ovulation :31

3.1. 31

3.2. Quelques caractéristiques chez la chienne :32

3.3. Les outils qui permettent de déterminer le moment optimum de fécondation:32

4. Induction de l'œstrus :37

4.1. 37

4.2. Les différentes techniques d'induction de l'œstrus :38

IV.Chapitre 04 : L'insémination artificielle42

1. 42

2. L'insémination intra-utérine :43

3. Insémination artificielle intra-tubaire :45

4. Insémination artificielle en semence fraîche :46
5. Ajout de liquide prostatique avant insémination :46

Deuxième partie : Etude expérimentale48

1.Objectifs :49

Première partie l'examen du mâle :49

2.Matériels et méthodes :50

2,1. La méthode de collecte :50

51

53

53

53

2,2,2,1. 55

58

2,2,3,1. 59

3.Discussion :60

Deuxième partie Détermination de la date d'ovulation :61

1.Objectifs :61

2.Matériels et méthodes :61

62

2,2. Lecture du frottis vaginal :63

64

3.Résultats :65

4.Discussion :66

66

Références bibliographiques :68

Liste des figures :

| | |
|--|-------------------------------------|
| Figure 01 :Matériel nécessaire à la récolte de la semence canine (A : différentes tailles de cônes en fonction de la race de chien récolté) (Stéphanie, 2015) | 7 |
| Figure 02 : Présence d'une femelle en œstrus lors de la récolte (Stéphanie, 2015)..... | 7 |
| Figure 03 : Technique de récolte par l'aspiration de l'épididyme (Brummer, 2006) | 10 |
| Figure 04 : Couleur et aspect d'un éjaculat normal (Stéphanie, 2015) | 12 |
| Figure 05 : Dépôt d'une goutte de semence sur une lame (Stéphanie, 2015) | 13 |
| Figure 06 : Observation d'une goutte spermatique au microscope (Stéphanie, 2015) | 13 |
| Figure 07 : Comptage sur une cellule hématimétrique (Johnston et al. 2001). | 17 |
| Figure 08 : un spectrophotomètre | 18 |
| Figure 09 : Exemples d'anomalies morphologiques de la queue de spermatozoïde, Coloration à l'éosine-nigrosine | 21 |
| Figure 10 : boîte de transport faite en Neopor (isolant thermique) | 22 |
| Figure 11 : Protège tube en feutre..... | 23 |
| Figure 12 : Schémas du contrôle hormonal chez la chienne (Catherine et al. 2008) | 24 |
| Figure 13 : prélèvement du frottis vaginal (Fontbonne A. 2007)..... | 32 |
| Figure 14 : Les cellules parabasales (Fontbonne A. 2007) | 33 |
| Figure 15 : Les cellules intermédiaires(Fontbonne A. 2007) | 34 |
| Figure 16 : Les cellules superficielles (Fontbonne A. 2007) | 34 |
| Figure 17 : epithelium vaginal lors de l'anoestrus (Fontbonne A. 2007) | 35 |
| Figure 18 : epithelium vaginal lors du pro-oestrus (Fontbonne A. 2007) | 35 |
| Figure 19 : epithelium vaginal lors de l'oestrus (Fontbonne A. 2007). | 35 |
| Figure 20 : epithelium vaginal lors du métoestrus(Fontbonne A. 2007) | Error! Bookmark not defined. |
| Figure 21 : Technique d'utilisation du cathéter Osiris à ballonnet..... | 43 |
| Figure 22 : Méthode de cathétérisme utérin. Fontbonne A. | 44 |
| Figure 23 : Matériels stérile de récolte de semence (2020)..... | 50 |
| Figure 24 : Prélèvements de semences effectuer à Alger le 03/03/2020..... | 51 |
| Figure 25 : Résultats de la numération et la mobilité individuelle des spermatozoïdes chez l'épagneul d'Alger..... | 54 |
| Figure 26 : Résultats de la numération et la mobilité individuelle des spermatozoïdes chez le malinois 02 d'Alger. | 55 |

| | |
|--|----|
| Figure 27 : Résultats de la numération et la mobilité individuelle des spermatozoïdes chez le malinois de Boumerdes. | 56 |
| Figure 28 : Résultats de la numération et la mobilité individuelle des spermatozoïdes chez l'épagneul de Boumerdes. | 57 |
| Figure 29 : Réalisation d'un frottis. | 58 |
| Figure 30 : Résultats de la morphologie et la vitalité des spermatozoïdes chez le malinois de Boumerdes. | 59 |
| Figure 31 : Résultats de la morphologie et la vitalité des spermatozoïdes chez l'épagneul de Boumerdes. | 59 |
| Figure 32 : Matériel nécessaires pour le frottis vaginal. | 61 |
| Figure 33 : réalisation du frottis vaginal. | 62 |
| Figure 34 : étalement. | 63 |
| Figure 35 : Observation du frottis N°01 vaginale au grossissement ×100 et au grossissement ×400. | 64 |
| Figure 36 : Figure 36 Observation du frottis N°02 vaginale au grossissement ×100 et au grossissement ×400. | 64 |
| Figure 37 : Observation du frottis N°03 vaginale au grossissement ×100 et au grossissement ×400. | 65 |

Liste des tableaux :

| | |
|--|----|
| Tableau 01 : Caractéristiques d'un volume de l'éjaculat moyen (Johnston et al. 2001) | 11 |
| Tableau 02 : Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992) | 14 |
| Tableau 03 : Note d'appréciation subjective de la mobilité progressive des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992) | 15 |
| Tableau 04 : Caractéristiques attendues de la semence en fonction de l'espèce (d'après : Noakes et al. 2009) | 17 |
| Tableau 05 : Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (d'après : Rigal, 2008) | 19 |
| Tableau 06 : Différents caractéristiques du pro-œstrus | 29 |
| Tableau 07 : Avantages et inconvénients des deux outils | 37 |
| Tableau 08 : représentations des sujets prélevé (semence)..... | 49 |
| Tableau 09 : Examen Macroscopique..... | 52 |
| Tableau 10 : Note de la mobilité massale de chaque sujet..... | 53 |
| Tableau 11 : Tableau représentant les sujets prélevé (frottis). | 62 |
| Tableau 12 : Observation cytologique et déterminations de la phase du cycle. | 65 |

Introduction :

Depuis que l'homme a domestiqué le chien, la faculté de ce dernier a été utilisée dans le but d'obtenir voire prendre une place indispensable pour son aide. Certains propriétaires de chiens préfèrent les stériliser, tandis que d'autres en font plutôt des reproducteurs pour préserver leurs bonnes caractéristiques vu les différents services apportés à l'homme (guide pratique d'élevage Royal canin 2008) . Qu'il s'agisse d'envisager une ou plusieurs portées au cours de la vie de son animal, la saillie ne va pas être réalisée au hasard, Il existe plusieurs données à prendre en compte pour que tout se déroule comme prévu, et même avec cela les éleveurs et les propriétaires rencontrent énormément de problèmes lors de l'accouplement de leurs chiens tel que :

La présence d'un male inexpérimenté, problèmes sanitaires ou inconfort du propriétaire, agressivité de la femelle envers le mâle ; n'acceptant pas d'être saillie naturellement ou physiologiquement en étant en phase de met-œstrus, difficultés anatomiques pour une saillie (par exemple la présence d'une vulve trop étroite) , le refus de la saillie par l'un ou l'autre des partenaires que l'on a mis en présence pour un accouplement programmé, la protection de l'étalon contre des affections à transmission vénérienne; la prévalence de ces maladies, qui peuvent compromettre tout un élevage, ne cesse d'augmenter et certains propriétaires refusent que leur étalon de valeur pratique la saillie naturelle et demandent qu'il soit utilisé pour l'insémination artificielle. (Christian DUMON 2007), douleur orthopédique : arthrose, tendinite, ancienne hernie discale, male très lourd. Le chien mâle a la particularité de posséder un os pénien qui expose les individus à tempérament nerveux à des fractures lors des saillies ou de tentatives de séparation brutale d'un couple « verrouillé ».

Voilà pourquoi beaucoup se tournent vers l'insémination artificielle vu sa fiabilité, peu coûteuse, facile à réaliser et sans risque pour l'animal.

Première partie : Etude bibliographique

I. Chapitre 01 : Généralités

1. Historique :

L'insémination artificielle est une « *biotechnologie* » qui se définit comme étant une technique de reproduction assistée consistant à placer la semence d'un mâle dans l'utérus d'une femelle sans qu'il y ait de rapport sexuel. À fin d'obtenir une fécondation et par la suite une gestation. Le chien est un mammifère carnivore de la famille des Canidés. C'est la première espèce animale qui a été domestiquée par l'homme dans le but de la chasse, son anatomie et sa physiologie portent certaines spécificités.

L'insémination était déjà pratiquée par les Arabes au xiv^e siècle sur les juments. C'est Lazzaro Spallanzani, un prêtre scientifique italien qui, en 1780, a découvert et décrit la fécondation d'ovules par des spermatozoïdes et qui fut le premier à réaliser une insémination artificielle chez la chienne. La technique a été perfectionnée au début du xx^e siècle par des vétérinaires et des scientifiques, et a commencé à être utilisée couramment à partir des années 1940³. Elle a dans le but d'améliorer les races bovines, avant de voir son champ d'applications étendu à d'autres espèces.

2. Physiologie de la reproduction :

1.1. Physiologie de la reproduction des mâles :

1.1.1. Puberté :

La puberté est la période de la croissance où débute la maturation sexuelle chez les Mammifères : les glandes génitales deviennent fonctionnelles et les caractères sexuels secondaires se manifeste, essentiellement par : modifications morphologiques, développement musculaire, modifications de la répartition des graisses. Selon les races la puberté du chien mâle apparaît entre 6 et 10-18 mois : 6 mois pour les races très petites et 18 mois pour les très grandes. Elle est déclenchée par un mécanisme hormonal (mise en route de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope) qui provoque toute une série de transformations. Cependant les spermatozoïdes éjaculés ne sont pas toujours déjà féconds.

1.1.2. Sperme :

Le sperme (contenant des spermatozoïdes) est expulsé lors de l'éjaculation, et cela se fait en trois phases (fraction) séparément qui sont assez longue (environs 30min) :

1 Première fraction : le liquide prostatique, il a pour but de nettoyer le canal de l'urètre. Ce premier jet est donc souillé, car plein de bactéries. Lors de la saillie naturelle, ce premier éjaculat est évacué avant la pénétration.

2 Seconde fraction : la fraction riche en sperme, celle à utiliser pour l'insémination artificielle de la chienne.

3 Troisièmes fractions : le liquide prostatique qui vient faire une purge. Le chien peut parfois avoir de petits saignements lors de cette troisième fraction, or le sang est spermicide. Lors de l'insémination artificielle, à fin d'optimisé la qualité du sperme recueillie il est recommandé de ne pas mélangé le contenu de ces trois fractions, car parfois chez les chiens âgés la première fraction ou la troisième peuvent nuire à la deuxième en neutralisant les spermatozoïdes.

1.2. Physiologie de la reproduction des femelles :

1.2-1. La puberté :

La puberté est définie comme le moment où la capacité à se reproduire est effective. Chez la chienne elle est mise en évidence par la survenue des premières chaleurs qui apparaissent entre le 7e et le 10e mois, 12 mois pour des races de grande taille, L'âge à la puberté varie de 6 à 23 mois.(Feldman et Nelson 1996)

Le cycle œstral des chiennes pubères peut différer de celui des chiennes adultes. Lors du premier cycle on peut observer de « fausses chaleurs » (« split heat » ou « false heat »). Les chiennes présentent des signes de chaleurs pour attirer les mâles tels que des écoulements vulvaires sérohémorragiques, un œdème vulvaire. On observe une récession de ces signes après quelques jours(Christie et Bell 1971). On constatera un véritable œstrus plusieurs semaines après (une semaine à deux mois) Les chiennes pubères peuvent présenter également des chaleurs silencieuses, durant lesquelles une ovulation se produit en l'absence d'un comportement de pro-œstrus et d'œstrus ou de signe clinique notable, Ceci s'explique par des concentrations plasmatiques basses de LH, d'estradiol et de progestérone. La capacité maximale de reproduction n'est pas atteinte avant le deuxième, troisième voire le quatrième,

cycle c'est pourquoi une chienne ne doit être mise à la reproduction qu'à partir de deux ans avec un cycle sexuel normal et complet (Kreeger et Seal 1992).

1.2-2. Les différentes phases du cycle sexuel :

Le cycle chez la chienne est qualifié de mono-oestrien (une seule période d'ovulation par cycle) à ovulation spontanée (c'est à dire que l'ovulation n'est pas déclenchée par un stimulus extérieur). Ce qui explique la possibilité d'observer chez les jeunes chiennes des chaleurs qui se terminent avant l'ovulation donnant un cycle anovulatoire. Dans ce cas, les chaleurs réapparaissent fréquemment quelques semaines plus tard pour être, cette fois-ci fécondable. Ce phénomène de chaleurs disjointes n'est pas considéré comme pathologique chez la chienne lorsqu'il survient avant l'âge de 2 ans (Concannon 1987). C'est ce qu'on appelle les fausses chaleurs. Le cycle sexuel est divisé en 4 étapes (définies dès 1900 par Heape) :

1. Le pro-œstrus correspond au début des chaleurs chez la chienne.
2. L'œstrus est la période de réceptivité sexuelle. Ce terme est dérivé du grec « oistros » qui signifie désir violent.
3. Le met-œstrus ou di-œstrus est la phase lutéale et de réparation de l'endomètre.
4. L'an-œstrus est la phase de repos sexuel.

1.2-3. Particularité de la chienne lors des chaleurs :

Contrairement à la majorité des espèces, les ovaires des chiennes commencent à sécréter de la progestérone quelques jours avant l'ovulation. Son taux sanguin (progestérone) augmente alors progressivement, que la chienne soit fécondée ou non. Les dosages de la progestérone permettent donc de témoigner de l'ovulation, mais pas de la gestation. Les ovocytes (futurs ovules) libérées lors de l'ovulation ne sont pas immédiatement fécondables. Ceux-ci doivent murir pendant une période de deux à trois jours en moyenne avant de pouvoir être fécondés par un spermatozoïde. Ainsi le début de la période optimale de fécondation se situe deux jours après l'ovulation (Johnston et al. 2001)

II. Chapitre 02 : La semence canine

1. Collecte :

Pour le prélèvement de la semence du chien Il est toujours recommander d'utiliser du matériel de collection stérile ou propre afin d'éviter tout risque sanitaire pour la chienne, il existe plusieurs méthodes de collecte :

1.1. Récolte manuelle (masturbation) :

La méthode de récolte manuelle par masturbation est utilisée uniquement dans l'espèce canine et constitue la méthode de choix pour cette dernière. Elle permet une récupération facile d'une semence de meilleure qualité et en plus grande quantité que lors de l'utilisation d'un vagin artificiel (autre méthode utilisée chez le chien (décrite plus loin). En effet, il a été montré un effet délétère du latex constituant du vagin artificiel sur la semence canine et de plus, la récolte par masturbation manuelle est celle qui mime au mieux l'accouplement naturel (Noakes et al. 2009)

Le matériel nécessaire à la récolte de la semence par masturbation est simple : des cônes en caoutchouc raccordés à des tubes de centrifugation stériles en plastique Même s'il a été prouvé que l'exposition au latex entraîne une altération de la mobilité des spermatozoïdes, l'exposition de la semence au latex durant l'éjaculation serait minimale avec une technique appropriée. Avant la récolte, il faut préparer trois cônes ajustés sur des tubes de centrifugation afin de pouvoir séparer les trois phases de l'éjaculat. La taille des cônes est fonction du gabarit du chien. L'idéal est de laisser les cônes dans une étuve afin qu'ils soient tièdes au moment du prélèvement (Johnston et al. 2001).



Figure01 : Matériel nécessaire à la récolte de la semence canine (A : différentes tailles de cônes en fonction de la race de chien récolté) (Stéphanie, 2015)

NB : Le nettoyage des cônes doit être effectué avec soin (une solution de Na Cl est suffisante). Les cônes doivent être abondamment rincés avec de l'eau distillée car les détergents sont pour la plupart spermicides. Puis, les cônes doivent être soigneusement séchés afin d'ôter les résidus d'eau qui sont toxiques pour les spermatozoïdes (Johnston et al. 2001).

Afin de stimuler le mâle la présence d'une chienne est recommandée sans pour autant que ce soit obligatoire, car ça peut être remplacé par des phéromones synthétiques ou bien l'utilisation d'écouvillons vaginaux de chiennes en œstrus peuvent être conservés à -20 °C et présentés à la truffe du mâle pendant le prélèvement.

En ce qui concerne la méthode de récolte en elle-même, deux opérateurs sont nécessaires, un pour tenir la chienne en chaleurs et un autre pour le mâle. Le premier opérateur s'assure que la femelle reste debout tandis que le second se place à la gauche du chien. Sa main droite masse le pénis du chien tandis que la gauche tient le cône de récolte.



Figure 02 : Présence d'une femelle en œstrus lors de la récolte manuelle de semence canine (Stéphanie, 2015)

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.

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. Le chien éprouve dans ce cas de l'inconfort voire de la douleur, ce qui peut causer une éjaculation incomplète. Mais certains chiens ne sont pas gênés et éjaculeront de façon normale. Une pression est ensuite appliquée à l'arrière des bulbes érectiles, simulant la coaptation vaginale du pénis lors du coït. Le chien va présenter des mouvements de bassin d'avant en arrière pendant quelques minutes et éjaculer les deux premières fractions, la phase pré-spermatique et la phase spermatique riche en spermatozoïdes. Puis il va s'arrêter et soulever un postérieur pour essayer de se retourner. Le pénis peut alors être orienté caudalement tout en maintenant la pression en arrière des bulbes érectiles. La dernière fraction, la phase prostatique, est alors éjaculée. La récolte intégrale de celle-ci n'est pas nécessaire car elle peut être longue, jusqu'à trente minutes. Il est cependant important de récolter une quantité suffisante de la troisième phase afin d'en observer l'aspect (Stéphanie, 2015)

1.1.1. Causes d'échec lors de la récolte :

- 1.1.1-1. Causes physiologiques : lorsque le chien se trouve dans l'intervalle des âges extérieur jeune ou inexpérimenté (chien n'ayant jamais sailli).
- 1.1.1-2. Causes environnementales : telles qu'un excès de bruit ou un nombre trop important de personnes dans la salle de prélèvement.
- 1.1.1-3. L'absence d'une femelle en chaleurs peut également être une cause d'échec de la récolte chez certains chiens.
- 1.1.1-4. Causes comportementales : lorsque l'animal est agressif ou encore trop timide, ce qui est le cas principalement des races naines, qu'il faut habituer à l'avance.
- 1.1.1-5. Causes pathologiques : lorsque l'animal souffre d'une affection de l'appareil urogénital telle qu'une fracture ancienne de l'os pénien ou des calculs urétraux ou encore lors de problèmes locomoteurs (douleur aux hanches ou aux articulations). (Fontbonne et al. 1992)

1.2. Récolte via un vagin artificiel :

C'est une méthode de récolte qui présente l'avantage de se rapprocher le plus possible des conditions de l'accouplement naturel. Chez le chien, c'est une méthode facilement réalisable mais bien moins utilisée que la récolte par masturbation manuelle, car elle nécessite la quantité de vagins artificiels de taille adaptée à chaque race et vu qu'il n'est pas volumineux elle interdit le fractionnement de l'éjaculat. De plus, il a été démontré que le latex du vagin artificiel présente un effet délétère sur la semence canine (Johnston et al. 2001).

- **Les avantages de cette technique sont :**

- Un faible coût.
- L'absence de contraintes physique ou chimique pour l'animal.
- La possibilité qu'une seule personne puisse réaliser la récolte.
- Elle offre également la possibilité d'une inspection rapprochée du pénis.

La collecte au vagin artificiel donne un éjaculat naturel, induit par une libido nécessaire et suffisante, et produit par un comportement physiologiquement proche du coït, c'est pourquoi elle permet d'obtenir le meilleur sperme possible à un moment donné.

Un des inconvénients de cette technique est que la présence d'une femelle en œstrus ou traitée aux œstrogènes est nécessaire afin d'initier la suite d'événements menant à l'accouplement (guide pratique d'élevage Royal canin 2008).

1.3. Le flush ou l'aspiration de l'épididyme :

Le prélèvement de l'épididyme est une technique très intéressante dans le cas d'une blessure grave compromettant la capacité de reproduire de l'animal, ou encore en cas de castration pour des raisons médicales ou de décès. Elle est pratiquée dans l'espèce équine et féline également. Cela permet de conserver le sperme d'animaux de grande valeur génétique après leur décès pour des expérimentations diverses ou une congélation en vue d'une insémination artificielle ou de fécondation in vitro (Bruemmer, 2006).

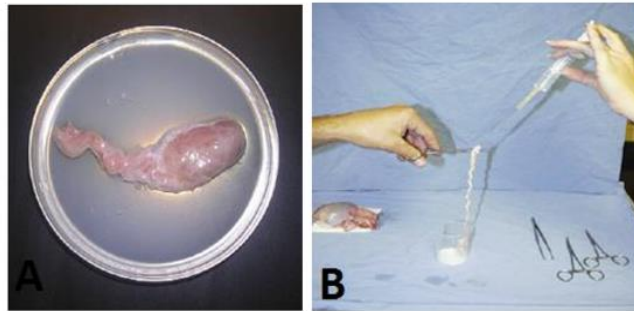


Figure 28 - A : Technique de flottaison. B : Technique de collecte rétrograde (Bruemmer, 2006)

Figure 03 : Technique de récolte par l'aspiration de l'épididyme (Bruemmer, 2006)

En effet, la semence récupérée par flush épидидymaire est capable de féconder des ovocytes in vitro. (Zambelli et al. 2006 ; Korochkina et al. 2014). On peut réaliser le prélèvement jusqu'à douze heures post-mortem sur des animaux conservés au froid (environ 4 à 6 °C). Il y a également une démarche croissante des propriétaires et des éleveurs qui souhaitent conserver le sperme de leur animal post-castration ou post-mortem pour réaliser de nouvelles descendance.

La récolte se fait suite à une intervention chirurgicale qui se résume par l'ablation de l'épididyme et le canal déférent et l'extraction de leurs contenu avec une méthode de flottaison après cathétérisation de ces derniers. (Bruemmer 2006).

Plus simplement, une autre méthode peut être utilisée. Elle consiste à écraser ou hacher finement l'épididyme et le canal déférent et récupérer la semence (Zambelli et al. 2006)

2. L'évaluation de la semence :

L'évaluation de la semence est une étape importante pour estimer la fertilité du mâle. 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.

2.1. Le spermogramme :

Le spermogramme permet d'évaluer la qualité de la semence au niveau macroscopique et microscopique. Celle-ci est fortement corrélée à sa fertilité, sa survie dans les voies génitales femelles et sa résistance aux différentes techniques de conservation dont la cryoconservation. Un spermogramme sera donc réalisé avant et après toute congélation. Sa réalisation est aussi indispensable pour diagnostiquer les cas d'infertilité. Le spermogramme comprend l'étude du

sperme au sens strict c'est-à-dire la détermination du volume et de la couleur de l'éjaculat ainsi que de la concentration en spermatozoïdes, du nombre total de spermatozoïdes et du pourcentage de spermatozoïdes mobiles dans l'éjaculat (Pena Martinez 2004)

2.1.1. Examen macroscopique :

2.1.1-1. Le volume :

Le volume de l'éjaculat est évalué par lecture directe sur le tube de collecte gradué juste après la récolte. Celui-ci est très variable en fonction des individus, de leur âge, de leur taille et de la fréquence des récoltes ainsi que de la méthode de récolte (Tableau 01). Par exemple, le volume d'un éjaculat obtenu par électroéjaculation est nettement supérieur à celui obtenu spontanément à l'aide d'un vagin artificiel. En effet, le volume de la semence éjaculée dépend des sécrétions des glandes annexes et celles-ci sont plus importantes lors de stimulations électriques. La mesure du volume donne quelques indications, elle est importante pour calculer le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat mais elle n'est pas indicatrice de la qualité de la semence. Chez le chien, si l'éjaculat n'a pas été fractionné, sa mesure a peu de signification car la phase post-spermatique a un volume beaucoup plus important que celui des autres phases. (Johnston et al. 2001 ; Zambelli et al. 2006)

Tableau 01 : Caractéristiques d'un volume de l'éjaculat moyen (Johnston et al. 2001)

| | Volume de l'éjaculat moyen (en ml) |
|-------------------------|---|
| Caractéristiques | 1 à 80 ml Phase pré-spermatique : 0,5-5 ml Phase spermatique : 1-4 ml Phase post-spermatique : 1-80 ml |

2.1.1-2. La couleur, l'aspect :

L'aspect de l'éjaculat représente un élément important dans l'évaluation de la semence. Par exemple, il est intéressant de noter que l'intensité de l'opacité de la seconde phase est corrélée à la concentration en spermatozoïdes ainsi un échantillon clair est évocateur d'une azoospermie (absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat). Normalement, la semence présente un aspect blanc laiteux, homogène mais trouble (Figure 04). Elle est également inodore. La présence d'une odeur anormale peut évoquer une contamination de l'éjaculat par de l'urine, du pus ou des bactéries (Johnston et al. 2001).



Figure 04 : Couleur et aspect d'un éjaculat normal (Stéphanie, 2015)

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 (Johnston et al. 2001). Lorsque la couleur de la semence est anormale, la cause peut être établie par observation microscopique. En présence de leucocytes, d'érythrocytes ou d'urine, la semence est centrifugée à 300-1000 tours par minute pendant 5 minutes avec un dilueur Tris ou une solution saline associé à des antibiotiques. Le surnageant est ensuite enlevé et le culot est à nouveau suspendu dans un dilueur frais avec des antibiotiques. La semence peut ensuite être utilisée pour une insémination artificielle. (Simpson et al. 1998)

2.1.2. Examen microscopique :

2.1.2-1. Evaluation de la mobilité des spermatozoïdes :

La mobilité des spermatozoïdes, c'est-à-dire le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, doit être évalué le plus rapidement possible, dans les 10 à 15 minutes après la récolte. Elle peut être évaluée par observation au microscope ou de façon automatisée

- **Evaluation au microscope :**

L'estimation de la mobilité par observation au microscope est la méthode la plus simple, la plus rapide et la moins chère pour évaluer la qualité du sperme bien qu'elle soit subjective et ne constitue donc pas une méthode répétable par différentes personnes pour prédire le pouvoir fécondant de la semence observée (Johnston et al. 2001; Freshman 2002; Pena Martinez 2004).



- Dépôt d'une goutte de semence sur une lame pour évaluation (UCEAR, Centre de collecte de semences bovines)

Figure 05 : Dépôt d'une goutte de semence sur une lame (Stéphanie, 2015)

Lors d'une évaluation au microscope, on observe une goutte de phase spermatique déposée entre lame et lamelle (Figure 5). Idéalement, l'observation doit se faire sur un microscope à contraste de phase, muni d'une platine chauffante à 37°C pour éviter un ralentissement des spermatozoïdes dû à leur refroidissement. 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.

Dans un premier temps, le sperme est regardé au faible grossissement (x10) afin d'apprécier de façon subjective la mobilité massale, c'est-à-dire les mouvements de réunion et de dispersion des spermatozoïdes. Une note variant de zéro à cinq est attribuée par l'observateur (Tableau 02).



Figure 06 : Observation d'une goutte spermatique au microscope (Stéphanie, 2015)

Cette observation simple mais peu précise est révélatrice à la fois de la vitesse de progression et de la concentration des spermatozoïdes. (Fontbonne et al. 1992)

Tableau 02 : Note d'appréciation subjective de la mobilité massale des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après : Fontbonne, 1992)

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

Dans un second temps, le sperme est examiné au fort grossissement (x400) afin d'apprécier la mobilité individuelle. Le sperme doit être relativement peu concentré, afin que chaque spermatozoïde soit individualisable. Dans l'espèce canine par exemple, il n'est pas nécessaire de diluer le sperme au préalable. Cependant, si la concentration est élevée, il est possible de diluer la semence dans une solution de NaCl isotonique tiédie à 37°C.

On distingue deux aspects :

- La mobilité simple : on considère tous les spermatozoïdes plus ou moins mobiles par opposition aux immobiles. Deux comptages sont réalisés par observation de quatre champs microscopiques à fort grossissement (X 400). Celle-ci s'exprime en pourcentage (note de 0 à 100%) et reflète partiellement la qualité du sperme (sperme de bonne qualité : plus de 70% de spermatozoïdes mobiles).
- La mobilité progressive : elle permet d'affiner le déplacement réel des spermatozoïdes. La vitesse de progression est appréciée subjectivement par l'opérateur dans le champ de vision du microscope. Les spermatozoïdes peuvent avoir des mouvements oscillants (ils vibrent et n'ont pas de direction définie) et des mouvements fléchant (ils se déplacent de façon rapide et en ligne droite).

Sur une échelle de 1 à 5, on classe les spermatozoïdes en fonction de leur mouvement (Tableau 17) (Fontbonne et al. 1992 ; Olivier Salson 2008)

Tableau 03 : Note d'appréciation subjective de la mobilité progressive des spermatozoïdes dans un échantillon (d'après: Fontbonne, 1992)

| Note | Interprétation |
|------|--|
| 0 | Pas de mouvement |
| 1 | Mouvements oscillants légers sans progression |
| 2 | Mouvements oscillants et progression faible et intermittente |
| 3 | Mouvements oscillants fléchissant et progression lente régulière |
| 4 | Mouvements fléchissant et progression régulière vers l'avant |
| 5 | Mouvements fléchissant avec progression rapide vers l'avant |

Pour déterminer la mobilité générale des spermatozoïdes en considérant à la fois la motilité et la mobilité progressive, on calcule l'Index de Mobilité Spermatique (SMI = Sperm Mobility Index) de la manière suivante : $SMI = [mobilité\ simple\ (\%) + (20 \times mobilité\ progressive)] / 2$ (Zambelli et Cunto 2006)

Une diminution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles peut représenter un indicateur précoce mais non spécifique d'une infection du tractus génital. Il existe également des diminutions artéfactuelles de ce pourcentage dues à des résidus plastiques provenant du matériel de collecte ou une exposition trop longue au latex.

Aucune corrélation n'a été établie entre la vitesse de progression des spermatozoïdes, le pourcentage de mobilité progressive et la capacité de fécondation. Cependant, chez le chien, le pourcentage de mobilité progressive des spermatozoïdes est un meilleur indicateur de la qualité de la semence que ne l'est le test de viabilité des spermatozoïdes. (Johnston et al. 2001)

L'évaluation de la mobilité ne permet cependant pas de connaître la fertilité du mâle avec certitude car des spermatozoïdes qui sont mobiles peuvent tout de même présenter des altérations de la membrane plasmique ou de l'acrosome qui auront des répercussions sur la fertilité mais pas sur la mobilité. Ainsi l'évaluation de la mobilité au microscope est simple, rapide et peu onéreuse. Elle est cependant très subjective et présente d'importantes variations en fonction de l'opérateur (30 à 60%). Les biais sont nombreux (matériel sale, tube à essai non lavé avant son premier usage, mauvaise manipulation...) et peuvent engendrer une baisse de la mobilité. Les différents biais seront tout de même réduits si l'évaluation est toujours effectuée par la même personne expérimentée. (Eilts 2005a).

2.1.2-2. Evaluation de la numération en spermatozoïdes dans l'éjaculat :

La numération correspond à la détermination du nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat. La concentration en spermatozoïdes est déterminée dans un premier temps et va permettre le calcul du nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat qui représente le

nombre d'intérêt. La détermination de la concentration peut être effectuée par des méthodes manuelles ou par des méthodes automatisées réservées aux centres spécialisés (utilisation d'un système CASA). Cette analyse n'a pas de valeur prédictive quant à la qualité de la semence sauf si l'animal présente une azoospermie c'est-à-dire une absence totale de spermatozoïdes. La taille de l'animal doit être prise en compte lors de cet examen car le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat est proportionnel au poids des testicules lui-même corrélé à la taille de l'animal. (Johnston et al. 2001)

2.1.2.2-1. Evaluation par utilisation d'une cellule hématimétrique :

Il s'agit de la méthode la moins chère pour déterminer la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat et elle consiste en un comptage direct des spermatozoïdes observés individuellement.

Le sperme est tout d'abord dilué dans une solution hypertonique, comme du chlorure de sodium à 3%, destinée à tuer les spermatozoïdes afin d'en faciliter le dénombrement. Cette dilution est effectuée dans des mélangeurs de Potain utilisés habituellement pour le comptage des cellules sanguines. Si le sperme semble concentré en spermatozoïdes à l'examen microscopique au faible grossissement, une dilution au centième voire au deux-centième est effectuée alors que si le sperme est peu concentré, une dilution au dixième voire au vingtième suffit. Une fois la dilution effectuée, une goutte de la préparation est déposée sur une cellule hématimétrique : cellule de Neubauer, de Malassez ou de Thoma. Ce sont des lames spéciales composées d'un quadrillage très fin de compartiments d'un volume donné dans lesquels on compte simplement le nombre de spermatozoïdes présents. Le comptage est effectué à l'aide de l'objectif x400 du microscope. Les spermatozoïdes sont dénombrés en fonction de la technique relative à chaque type de cellule. Par convention, les spermatozoïdes situés sur le bas ou sur le côté droit du carré sont pris en compte et on ignore ceux situés en haut et à gauche. On peut également ne prendre en compte que les spermatozoïdes dont la tête se trouve dans le carré en question (Johnston et al. 2001).

D'autres méthodes d'évaluation du nombre de spermatozoïdes présents dans un éjaculat peuvent être utilisées, telles que les systèmes CASA (SQA) ou encore la cytométrie en flux. Chez l'étalon, la méthode par coloration nucléaire à l'iodure de propidium après lyse membranaire et détermination électronique du nombre de noyaux colorés représente actuellement la méthode la plus rapide et la moins biaisée pour évaluer le nombre de spermatozoïdes total dans un éjaculat (Ponthier et al. 2014)

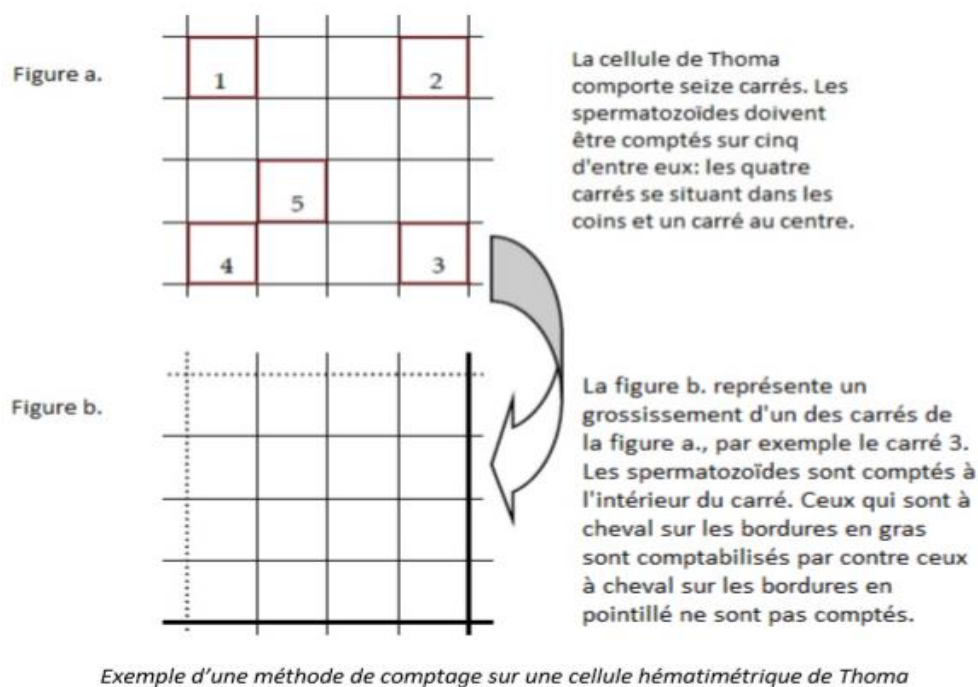


Figure 07 : Comptage sur une cellule hématimétrique (Johnston et al. 2001).

Tableau 04 : Caractéristiques attendues de la semence en fonction de l'espèce (d'après : Noakes et al. 2009)

| Caractéristiques | Taureau | Etalon | Chien |
|---|-----------------|--------------|--------------|
| Volume (ml) | 4 (2-10) | 60 (30-250) | 10 (2-19) |
| Concentration (x10 ⁶ /ml) | 1250 (600-2800) | 120 (30-600) | 125 (20-540) |
| Mobilité des spermatozoïdes (%) | >70 | >60 | >85 |
| Pourcentage de spermatozoïdes normaux (%) | >75 | >60 | >90 |

2.1.2.2-2. L'évaluation par utilisation d'un spectrophotomètre :

Cette technique mesure la densité optique d'un échantillon de sperme dilué et en détermine la concentration. L'estimation de la concentration en spermatozoïdes d'un éjaculat

par mesure de la densité optique doit être considérée comme assez juste et utilisable en routine pour la préparation de doses d'insémination (Allimant 2010).



- Spectrophotomètre AccuRead® (Cliché issu de chez IMV technologies)

Figure 08 : un spectrophotomètre

2.2. Le spermocytogramme :

Le spermocytogramme correspond à l'étude de la morphologie des spermatozoïdes. Les pourcentages de spermatozoïdes normaux et anormaux sont déterminés.

Les anomalies morphologiques peuvent être classées de différentes façons :

- En fonction de leur localisation sur le spermatozoïde : anomalies de la tête, de la pièce intermédiaire ou de la queue (Tableau 05).
- En anomalie primaire ou secondaire selon leur origine : les anomalies primaires trouvent leur origine au cours de la spermatogenèse alors que les anomalies secondaires apparaissent lors du stockage des spermatozoïdes dans l'épididyme ou les voies urétrales hautes. On peut citer des anomalies tertiaires survenant lors des managements de l'animal, lors des chocs osmotiques que l'on fait subir au sperme, ou provoquées par la toxicité des colorants.
- En anomalie mineure ou majeure : les anomalies majeures se trouvent souvent associées à une baisse de la fertilité et les anomalies mineures provoquent une diminution de la fertilité seulement si elles sont suffisamment nombreuses. La présence de gouttelettes proximales constitue une anomalie majeure entraînant une diminution de la fertilité. (Ponthier et al. 2014 ; Brito 2007 ; Pena Martinez 2004)

Tableau 05 : Classification des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (d'après : Rigal, 2008)

| | |
|--|--|
| Anomalies du flagelle | Flagelle replié Flagelle rudimentaire ou cassé Flagelle enroulé Gouttelette cytoplasmique distale |
| Anomalies de la pièce intermédiaire | Pièce intermédiaire dédoublée Déformations de la pièce intermédiaire Gouttelette cytoplasmique proximale |
| Anomalies de la tête | Tête piriforme Tête repliée Tête décapitée Tête ronde |

Les anomalies les plus fréquemment observées sont celles citées dans le tableau précédent mais on retrouve également les spermatozoïdes micro et macrocéphales, bicéphales, les anomalies d'acrosome, les doubles flagelles, et les têtes, flagelles ou pièces intermédiaires collés (Zambelli et al. 2006).

Lorsque plusieurs anomalies sont rencontrées sur le même spermatozoïde, c'est l'anomalie la plus importante qui est comptabilisée. Si les anomalies sont d'importance équivalente, c'est l'anomalie la plus fréquente qui est prise en compte (Brito 2007 ; Gailliard 2008).

Les anomalies associées à une infertilité sont majoritairement situées au niveau de la pièce intermédiaire et de ses attaches. Les éjaculats contenant un pourcentage élevé de spermatozoïdes avec des gouttelettes cytoplasmiques proximales, des queues pliées ou enroulées, ou des pièces intermédiaires anormales peuvent être utilisés en semence fraîche mais ne doivent pas être congelés (Johnston et al. 2001) ; conséquences néfastes sur l'état de santé individuel.

Les causes d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes peuvent être un stress thermique associé à une inflammation locale ou une hyperthermie, une infection du tractus génital, une diminution de la sécrétion de LH ou de testostérone ou bien l'origine peut être iatrogène. Des chiens en bonne santé subissant un changement environnemental ou un changement de propriétaire peuvent montrer une augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux, probablement lié à une augmentation de la sécrétion de corticoïdes endogènes. (Pena Martinez 2004).

2.2.1. Evaluation au microscope :

L'étude de la morphologie des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un microscope optique, avec un objectif à immersion au grossissement x1000. Les microscopes à lumière directe peuvent être utilisés pour examiner les frottis de semence à condition que les colorants utilisés soient appropriés. Une goutte de sperme et une goutte de colorant sont mélangées sur la lame avant d'être étalées pour obtenir un frottis qui est séché à l'air puis observé au microscope avec objectif à immersion. La visualisation des détails de la structure du spermatozoïde est considérablement améliorée par fixation des cellules dans une solution tamponnée de formol ou dans un fixatif similaire tel que le glutaraldéhyde (Allimant 2010). Les colorants utilisables pour observer la morphologie des spermatozoïdes sont l'éosinenigrosine, l'éosine-bleu d'aniline, le Giemsa, le Diff Quik®, le Spermac®...

- Prenons le cas d'éosine-nigrosine :

L'éosine-nigrosine représente la coloration la plus utilisée en routine. Le colorant est constitué d'un mélange isotonique de 10% de nigrosine et de 4% d'éosine. Il s'agit d'une coloration différentielle qui permet d'évaluer la vitalité en plus de l'observation de la morphologie des spermatozoïdes (Figure 34). Elle permet de distinguer les spermatozoïdes vivants qui restent incolores, ou se colorent partiellement en rose à la partie supérieure de la tête, des spermatozoïdes morts qui s'imprègnent intensément de colorant et apparaissent en rouge sur un fond rosé. Il faut toutefois noter que cette coloration donne des résultats variables suivant l'origine du colorant et le temps de trempage dans celui-ci.

L'éosine B présente l'avantage supplémentaire de colorer les spermatozoïdes non mobiles en plus des spermatozoïdes morts. On peut donc dénombrer les morts et les vivants, les mobiles et les non mobiles, ainsi que les formes anormales.

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 apparaîtra colorée.

La technique de coloration est la suivante : une goutte de semence est prélevée à l'aide d'une pipette, dans l'échantillon de sperme maintenu à 37°C à l'aide d'un bain d'eau chaude. Cette goutte est mélangée à une goutte de colorant, et le nouvel échantillon est laissé 5 minutes à 37°C. On réalise ensuite un étalement sur une lame comme on le ferait pour un frottis sanguin (Pena Martinez 2004; Brito 2007; Gailliard 2008)

Cependant, la solution d'éosine-nigrosine peut être hypotonique et comme la procédure de coloration n'implique pas d'étape de fixation chimique, cela peut être à l'origine d'artéfacts

en ce qui concerne la morphologie des spermatozoïdes et notamment les défauts de la queue des spermatozoïdes. C'est pourquoi l'osmolarité de la solution contenant le colorant doit être ajustée en ajoutant du glucose, du tampon TES-Tris ou du citrate de sodium (Pena Martinez 2004)

Interprétation d'après (brito. 2007) :

Courbure dans la région distale de la pièce intermédiaire associée le plus souvent à une gouttelette cytoplasmique distal (a,b). Courbure ou enroulement de la pièce intermédiaire (c à e). Courbure/ enroulement de la pièce intermédiaire ou de la queue associée à une rupture des fibres de l'axonème (f à j).



Figure 09 : Exemples d'anomalies morphologiques de la queue de spermatozoïde, Coloration à l'éosine-nigrosine (Brito, 2007)

- Le cas du « Spermac® » :

Le Spermac® est un colorant qui permet également de vérifier l'intégrité de l'acrosome des spermatozoïdes. Avec cette coloration, l'acrosome apparaît vert, le noyau rouge, la région équatoriale verte pâle, la pièce intermédiaire et la queue verte. Cette coloration présente l'avantage d'être rapide (quinze minutes de préparation) et facile d'emploi (Pena Martinez 2004).

NB : Pour toutes les colorations autres que l'éosine-nigrosine, un frottis avec une goutte de semence est effectué. Puis, après fixation par séchage à l'air libre, la lame est plongée dans les différents colorants selon la technique et le temps indiqué par le fabricant.

2.2.2. Evaluation automatisée :

Des méthodes automatisées d'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes ont été développées dans le but de pallier le manque d'objectivité et l'importante variabilité inhérente aux méthodes d'évaluation au microscope. En effet, l'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes à l'aide d'un microscope est influencée par de nombreux facteurs tels que la technique de fixation et de coloration utilisée, les procédures de traitement de la semence, la qualité du microscope ou encore les compétences de l'observateur. Par conséquent, d'importantes variations pouvaient être observées lors de l'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes d'un même éjaculat par différents opérateurs (Rijsselaere et al. 2004).

Ces systèmes automatisés sont les systèmes CASA, Parmi eux, le système SQA est capable, en utilisant la densité optique, de déterminer la concentration et d'évaluer la mobilité des spermatozoïdes mais également de définir le pourcentage de spermatozoïdes ne présentant pas d'anomalies morphologiques. L'inconvénient de ce système est qu'il est peu fiable pour les semences de mauvaise qualité et pour les semences très concentrées (Rijsselaere et al. 2005)

3. Conservation de la semence :

Il existe plusieurs technique et outils utilisé après la collecte de la semence afin de gardé celle-ci intacte et la plus fonctionnelle possible, parmi ces méthodes on a :

3.1. L'utilisation de matériel spécifique (de courte durée) :

Boite de transport « sperme-canin » :

Cette boite de transport spécialement conçue pour le transport de sperme canin garantit le maintien de la température constante à +5°C : température idéale et nécessaire pour la bonne préservation de la semence canine.

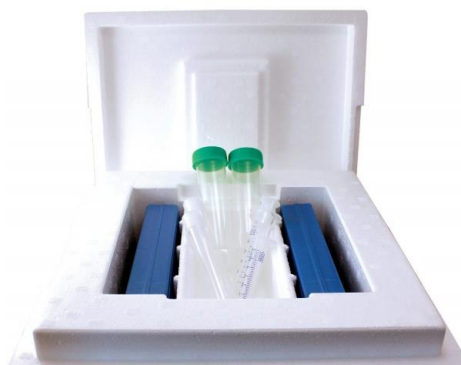


Figure 10 : boite de transport faite en Neopor (isolant thermique)

L'utilisation d'isolant thermique :

Protège tube en feutre :

Une fois que le sperme a été prélevé sur le chien, il faut le garder dans un tube de récolte à bonne température si on compte l'utiliser dans les minutes qui suivent lors d'une insémination artificielle, le temps de préparation de la chienne à l'acte prend un certain temps voilà pourquoi on a recours à ce protège tube à fin d'empêcher le refroidissement de la semence collectée.



Figure 11 : Protège tube en feutre

III. Chapitre 03 : La reproduction chez la chienne

1. Endocrinologie de la reproduction :

Le contrôle de l'activité gonadique fait intervenir le système neuroendocrinien. Par l'intermédiaire de neurotransmetteurs, le système nerveux régule l'axe hypothalamo-hypophysaire, qui lui-même oriente l'activité gonadique.

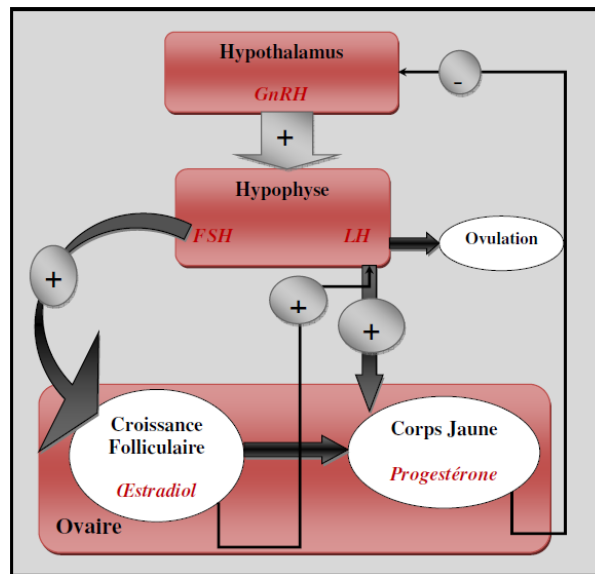


Figure 12 : Schémas du contrôle hormonal chez la chienne (Catherine et al. 2008)

❖ Les hormones hypothalamiques :

La GnRH (Gonadotrophine releasing hormone ou gonadolibérine) est sécrétée de manière pulsatile et permanente par l'hypothalamus. Elle stimule la synthèse de LH et de FSH. La libération de GnRH est influencée par des sollicitations nerveuses (ouïe, odorat, vue) et hormonales.

❖ Les hormones antéhypophysaires :

Ce sont les gonadotrophines (LH, FSH et Prolactine). Il s'agit de glycoprotéines synthétisées par le lobe antérieur de l'hypophyse.

Les taux sériques de LH et de FSH sont caractérisés par un niveau de base faible : *la sécrétion tonique*, soumise à de petites fluctuations rythmiques à peine perceptibles. Il se produit périodiquement un pic important de sécrétion de ces hormones : *la sécrétion cyclique*, peu avant l'ovulation. (LENNOZ M. 1978)

L'alternance entre les sécrétions de LH et de FSH est régie par l'hypothalamus d'une part, et par les hormones gonadiques d'autre part.

➤ FSH :

La FSH (Folliculo Stimulating Hormone) déclenche le retour en chaleurs de la chienne et stimule sa croissance folliculaire. Elle agit en synergie avec la LH en induisant la synthèse d'œstrogènes par les cellules de la thèque interne des follicules ovariens.

➤ LH :

La LH (Luteostimulating Hormone) est l'hormone de la lutéinisation, sa durée de vie est plus courte que celle de la FSH. Elle active la maturation folliculaire, provoque l'ovulation et stimule la synthèse de progestérone par les corps jaunes ovariens. Elle est aussi responsable, chez la chienne, avec la prolactine, du maintien en activité de ces corps jaunes au cours de la gestation (action lutéotrope).

➤ Prolactine :

La sécrétion de prolactine par les cellules lactotrophes de l'antéhypophyse est réglée par de multiples neurotransmetteurs et hormones. Le mécanisme de contrôle principal de cette sécrétion est inhibiteur, il provient de neurones dopaminergiques à action anti-prolactinique situés dans l'hypothalamus.

La prolactine semble être responsable de certains changements comportementaux comme la fabrication de nid, et de l'apparition de la lactation. (CORRE J., ROZENBAUM M. 2004)

Cette hormone est également une hormone lutéotrope importante et semble être une condition absolue pour la sécrétion de progestérone à partir du trentième jour après ovulation. (ROMAGNOLI S)

❖ Les hormones gonadiques :

➤ Œstrogènes :

Ils sont présents principalement sous forme d'œstrone et de 17-β-œstradiol, sécrétés par les cellules de la thèque interne des follicules ovariens et par le corps jaune. Les œstrogènes sont responsables des manifestations comportementales et histologiques des chaleurs.

Ils ont pour effet :

- La congestion et l'œdème de la vulve et du vagin.
- La multiplication des cellules de l'épithélium vaginal, la kératinisation et la desquamation des cellules de la couche épithéliale superficielle.
- L'hyperplasie de l'utérus.
- L'augmentation de la contractilité de l'utérus et l'ouverture du col.

➤ Progestérone :

Elle est principalement sécrétée par le corps jaune et accessoirement par les follicules ovariens matures. Cette lutéinisation pré-ovulatoire des cellules de la granulosa est une particularité du cycle sexuel de la chienne.

Les effets de cette hormone sur le tractus génital sont :

- La mucification du vagin.
- L'épaississement de la muqueuse utérine et la préparation à la nidation.
- L'inhibition de la motricité utérine et le maintien de la fermeture du col utérin.
- La stimulation de l'activité sécrétoire de l'endomètre (prolifération des glandes).

La progestérone permet le maintien de la gestation en stimulant le développement de l'endomètre et du placenta et en inhibant les contractions utérines. Chez la chienne, l'unique source de progestérone est l'ovaire, il n'y a pas de relais placentaire, ce qui est une autre particularité de l'espèce canine. Une ovariectomie pendant la gestation conduit donc à un avortement.

Même si la progestéronémie des chiennes gestantes est similaire à celle des non gestantes pendant le di-œstrus, elle ne reflète pas réellement la production ovarienne. En effet, la production de progestérone est significativement augmentée chez une lice gestante. Mais cette dernière présente également un métabolisme beaucoup plus important ce qui aboutit à une concentration importante des métabolites de la progestérone dans le plasma et les fèces.

(VERSTEGEN J., ONCLIN K. 2002)

La synthèse de progestérone par le corps jaune (CJ) est régulée par d'autres hormones, des *hormones lutéotropes* qui stimulent la synthèse de progestérone par le corps jaune :

-La prolactine (PRL) (à partir de 30 jours de gestation) : des anti-prolactiniques utilisés en fin de gestation entraînent un avortement.

-La LH : l'hypophysectomie provoque un avortement immédiat (Concannon 1980, Okkens et al. 1986)

Le rôle de ces hormones est surtout net lors du deuxième mois de gestation, les mécanismes lutéotropes lors du premier mois sont moins connus. La dépendance du corps jaune vis-à-vis de la prolactine et de la LH semble varier lors de la gestation. Le CJ est plus indépendant pendant le premier tiers de la gestation, et plus on est proche de pic de LH plus l'indépendance est grande. Il n'y a pas encore d'explications connues à ce phénomène.

- des *hormones lutéolytiques*, les prostaglandines F2_α, qui provoquent une diminution de la synthèse de progestérone après 10 à 15 jours de gestation. Ces dernières sont synthétisées en fin de gestation par l'utérus gravide, peut être en réponse à la sécrétion foétale de cortisol.

➤ **Relaxine :**

La relaxine est un polypeptide de la même famille que l'insuline, c'est actuellement la seule hormone connue, qui est spécifique de la gestation chez la chienne. Elle est sécrétée par le placenta dès la nidation.

Elle est détectable à partir de 3 à 4 semaines de gestation, son taux le plus élevé (4-6 ng/ml) est atteint 2 à 3 semaines avant la mise bas puis il commence à décliner dans les 48 heures précédant le part et reste à des valeurs comprises entre 0,5 et 2 ng/ml pendant 4 à 9 semaines. (HOFFMANN B., 2004)

Le placenta est la principale source de relaxine mais sa sécrétion post-partum laisse supposer une production utérine et ovarienne. (HOFFMANN B., 2004)

Elle joue un rôle important dans le maintien de la gestation : elle inhibe les contractions du myomètre et favorise la croissance utérine : dans la deuxième moitié de la gestation, elle est un protagoniste de la maturation cervicale car elle induit la prolifération épithéliale et stromale. Elle prépare également l'appareil génital au part en rendant plus élastique la ceinture pelvienne et en dilatant le col de l'utérus et en induisant la formation de récepteurs à l'ocytocine. (FREVILLE A., 2005.)

2. Le cycle sexuel et ses caractéristiques :

Le cycle sexuel de la chienne dure de quatre à douze mois (en moyenne six mois). Il comprend quatre phases au cours desquelles la chienne présente des modifications comportementales, hormonales et anatomiques. Ces quatre phases sont le pro-œstrus, l'œstrus, le met-œstrus et l'ANOESTRUS.

Le pro-œstrus (en moyenne 9 jours), correspond au début des chaleurs chez la chienne.

L'œstrus (en moyenne 5 jours) est la période de réceptivité sexuelle, ce terme est dérivé du grec « oistros » qui signifie désir violent. Le met-œstrus ou di-œstrus (en moyenne 2 mois) est la phase lutéale et de réparation de l'endomètre. L'an-œstrus (en moyenne 4 mois) est la phase de repos sexuel.

Chaque phase est caractérisée par :

- Des manifestations cliniques.
- Un comportement.

- Un profil hormonal.
- Des modifications anatomiques de l'appareil génital.
- Une cytologie vaginale particulière.

2.1. Le pro-œstrus :

- **Définition** : C'est la première période des chaleurs au cours de laquelle la femelle n'accepte pas encore l'accouplement. Elle correspond à la maturation folliculaire ovarienne. Il dure en moyenne 9 jours mais la durée est très variable d'une chienne à l'autre et d'un cycle à l'autre (0 à 27 jours).
- **Manifestations cliniques** : La vulve est œdématiée. Des pertes vulvaires sanguines abondantes apparaissent.
- **Comportement** : La femelle attire le mâle mais n'accepte pas la saillie.
- **Profil hormonal** : La sécrétion de progestérone plasmatique est minimale, le taux d'œstrogènes plasmatique augmente donc jusqu'au pic, or lorsque leur taux est élevé, les œstrogènes exercent un rétro contrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, ils déclenchent la montée brutale de FSH et LH, le pic de LH débute.
- **Modifications anatomiques de l'appareil génital** : Les ovaires subissent une croissance folliculaire rapide (apparition des follicules de Degraaf). L'utérus est congestionné, la muqueuse vaginale est rouge, œdématiée, et présente des plis arrondis. (Justine CORRE Et Magalie ROZENBAUM, 2004)
- **Cytologie vaginale** : Les frottis vaginaux permettent de déterminer dans quelle phase du cycle se situe la chienne. Ils permettent l'analyse cytologique de la muqueuse vaginale. L'écouvillon utilisé pour réaliser le frottis vaginal est rouge vif en début de pro-œstrus et devient rosé au fur et à mesure que l'œstrus approche. (DUMON C et al. 1992. FONTBONNE A, et al. 1998)

Tableau 06 : Différents caractéristiques du pro-œstrus

| Début de pro-œstrus | Milieu de pro-œstrus | Fin de pro-œstrus |
|---|---|--|
| Frottis sale. Prédominance de cellules basophiles intermédiaires (indice éosinophilique < 30%). Présence habituelle de globules rouges. | Frottis sale, riche en cellules. Présence en nombre équivalent de cellules basophiles et éosinophiles (indice éosinophilique = 50%). Présence de globules rouges. | Frottis assez propre, riche en cellules. Présence de cellules acidophiles, intermédiaires et superficielles, non regroupées en amas (indice éosinophilique > 70%). Présence de globules rouges |

2.2. L'œstrus :

- **Définition** : C'est la phase des chaleurs correspondant à l'acceptation du mâle et pendant laquelle se produit l'ovulation. Il dure en moyenne 5 jours mais la durée est très variable d'une chienne à l'autre et d'un cycle à l'autre (0,5 à 10 jours).
- **Manifestations cliniques** : La vulve est œdématisée. Des pertes vulvaires sanguines deviennent plus claires et moins abondantes.
- **Comportement** : La femelle attire le mâle et accepte la saillie.
- **Profil hormonal** : Tandis que le taux d'œstrogènes diminue, le pic de LH s'observe sur 24 à 48 heures, cela a pour effet de déclencher, 48 heures plus tard, l'ovulation, peu avant l'ovulation, le taux de progestérone commence à augmenter. Cette lutéinisation pré ovulatoire est une particularité de la physiologie sexuelle de la chienne (au moment du pic de LH ou dans les 24 heures qui suivent, la progestéronémie dépasse 2 ng/ml), après l'ovulation, la progestérone augmente fortement, par mise en action du rétrocontrôle inhibiteur, LH et FSH s'effondrent.
- **Modifications anatomiques de l'appareil génital** : L'ovulation a lieu et le corps jaune se développe, l'endomètre utérin prolifère, la muqueuse vaginale est rose pâle, plissée et sèche. Des plis anguleux marqués sont visibles par vaginoscopie. (Justine CORRE et al. 2004)
- **Cytologie vaginale** : L'écouvillon vaginal est rose pâle ou blanc. Le frottis est propre, riche en cellules. Il y a présence d'une majorité de cellules superficielles acidophiles regroupées en amas (indice éosinophilique >80%), et pas de globules rouges. (DUMON C et al. 1992. FONTBONNE A, et al. 1998)

2.3. Le met-œstrus ou di-œstrus :

- **Définition** : C'est la phase de sécrétion du corps jaune (sécrétion de progestérone) correspondant à un état de gestation, ou à un état de pseudo gestation. Il dure, selon les auteurs, de 60 à 90 jours.
- **Manifestations cliniques** : La vulve n'est plus œdématiée et il n'y a pas de pertes vulvaires.
- **Comportement** : La femelle n'attire pas le mâle, et n'accepte pas la saillie.
- **Profil hormonal** : L'œstradiol plasmatique reste bas. La progestérone atteint sa concentration maximale (15-70 ng/ml) trois ou quatre semaines après le début du met-œstrus puis redescend à des concentrations basales (< 2 ng/ml) à la fin du met-œstrus. LH et FSH sont bas. Les profils hormonaux d'une chienne gestante et d'une chienne non gestante sont très proches. La seule variation concerne la chute de progestérone lors du met-œstrus :
 - lors de non gestation, celle-ci diminue progressivement à partir du deuxième tiers du met-œstrus
 - lors de gestation, celle-ci chute brutalement dans les 24 à 36 heures avant le part.
- **Modifications anatomiques de l'appareil génital** : Le corps jaune est sécrétant puis régresse. L'endomètre utérin sécrète puis se desquame et se régénère. La muqueuse vaginale est rose avec des zones hyper-hémies et lisses. (Justine CORRE et al. 2004)
- **Cytologie vaginale** : L'écouvillon est marron ou grisâtre en tout début de met-œstrus puis blanc. Le frottis vaginal est plus ou moins propre. Les cellules nucléées basophiles prédominent rapidement. Des cellules parabasales réapparaissent. Des polynucléaires neutrophiles sont habituellement présents, et parfois des globules rouges dans les tous premiers jours du met-œstrus. La forme caractéristique « cellules de met-œstrus » est formée par des polynucléaires neutrophiles accolés à des cellules vaginales. (DUMON C et al. 1992. FONTBONNE A, et al. 1998)

2.4. L'an-œstrus :

- **Définition** : C'est la phase de « repos sexuel » (en fait, une activité hormonale résiduelle se produit dans l'organisme, surtout vers la fin de l'an-œstrus). Il dure, selon les races, 3 à 4 mois.
- **Manifestations cliniques** : La vulve n'est pas œdématiée, il n'y a pas de pertes vulvaires.
- **Comportement** : La femelle n'attire pas le mâle.

- **Profil hormonal** : L'œstradiol plasmatique est bas jusqu'en fin d'an-œstrus où il commence à augmenter. La progestérone plasmatique est basse. Des sécrétions pulsatiles de LH et de FSH se produisent, surtout en fin d'an-œstrus.
- **Modifications anatomiques de l'appareil génital** : La croissance folliculaire est lente. L'utérus est au repos. La muqueuse vaginale est rose pâle, lisse, avec du mucus transparent. (Justine et al. 2004)
- **Cytologie vaginale** : L'écouvillon vaginal est blanc. Le frottis est sale, pauvre en cellules avec présence quasi exclusive de cellules basophiles, parabasales ou intermédiaires (indice éosinophilique < 10%). Des hématies ou des polynucléaires peuvent être observés, mais toute fois en très faible nombre. (DUMON C et al. 1992. FONTBONNE A, et al. 1998)

Le cycle hormonale de la chienne se traduit par :

- Un pic pré-ovulatoire de LH, 48h avant l'ovulation
- Une lutéinisation pré-ovulatoire des follicules avec production de progestérone avant l'ovulation
- Une croissance en plateau de la progestérone, suite à l'ovulation. Chez la chienne l'augmentation de la progestéronémie traduit l'ovulation et non la gestation. (Catherine et al. 2008)

3. Suivre des chaleurs et détermination de la date d'ovulation :

3.1. Importance du suivi des chaleurs :

La chienne peut être souvent saillie avec succès pendant une période d'environ 6 jours (de 2 jours avant l'ovulation à 4 jours après). Cependant, **le moment optimum de fécondation se situe deux jours après l'ovulation**. En effet lorsque la chienne ovule, les ovocytes sont immatures, la maturation ovocytaire dure 48 heures.

Une saillie ou une insémination artificielle effectuée au moment optimum de fécondation augmentent la prolificité (taille de la portée) et la fertilité.

Lorsque la saillie est effectuée un peu en avance, il est possible qu'elle soit fécondante, du fait de la longue survie des spermatozoïdes dans les voies génitales de la femelle (jusqu'à une semaine) mais la probabilité que la saillie soit fécondante et la prolificité sont diminuées. De plus, si une insémination artificielle utilisant une semence réfrigérée ou congelée est envisagée,

la semence survit moins longtemps et il est indispensable qu'elle soit effectuée au moment optimum de fécondation.

3.2. Quelques caractéristiques chez la chienne :

- Le début des chaleurs correspond aux premières pertes vulvaires (normalement sanguines).
- L'ovulation survient environ 2 jours après le début de l'œstrus.
- Moment optimum de fécondation : 2 à 4 jours après l'ovulation (temps de maturation ovocytaire)
- Taux de progestérone plasmatique à l'ovulation : environ 5 ng/ml (entre 4 et 10 ng/ml)
- Taux de progestérone plasmatique au moment idéal de fécondation : **très variable** d'une chienne à l'autre : 12 à 50 ng/ml

3.3. Les outils qui permettent de déterminer le moment optimum de fécondation:

La détermination du moment optimum de fécondation utilise 2 outils principaux :

- Le frottis vaginal.
- Le dosage de progestérone.

3.3.1. Les frottis vaginaux :

Les frottis vaginaux permettent de déterminer dans quelle phase du cycle se situe la chienne. Ils permettent l'analyse cytologique de la muqueuse vaginale

3.3.1-1. Réalisation du frottis vaginal :

- **Prélèvement** : Le prélèvement est réalisé à l'aide **d'un écouvillon** d'une quinzaine de centimètres de long légèrement humidifié avec du sérum physiologique de manière à récolter plus de cellules. Celui-ci est introduit dans la vulve **d'abord verticalement puis est progressivement basculé à l'horizontal** et enfoncé jusqu'au milieu du vagin. Après quelques mouvements de rotations, il est retiré lentement vers l'arrière.

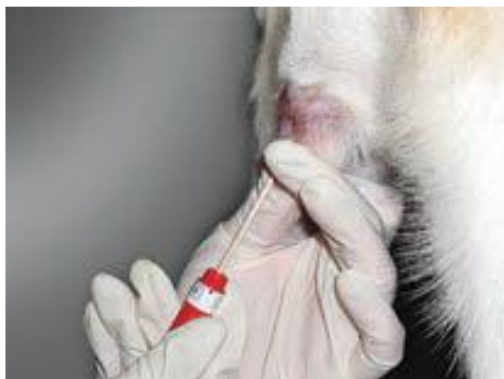


Figure 13 : prélèvement du frottis vaginal. (Fontbonne A. 2007)

- **Etalement** : Le prélèvement est étalé sur une lame propre en faisant rouler l'écouvillon. On réalise ainsi trois ou quatre lignes parallèles.

- **Fixation et coloration** : Le frottis est immédiatement fixé par un mélange alcool éther puis coloré. La coloration de **type Harris Shorr** est préférentiellement utilisée au CERCA. Cette méthode de coloration polychrome permet en effet de **distinguer les cellules kératinisées acidophiles** (Rouge orangé) des cellules non kératinisées basophiles (Bleu).

La coloration May-Grünwald-Giemsa peut aussi être utilisée. Elle permet de bien visualiser les hématies et les polynucléaires mais ne permet pas de calculer l'index éosinophilique (pourcentage de cellules kératinisées).

3.3.1-2. Lecture du frottis vaginal :

L'observation microscopique se réalise en deux temps :

Au **grossissement $\times 100$** , on détermine **l'aspect général du frottis**, la coloration dominante.

Au **grossissement $\times 400$** , on identifie les **cellules observées** (couleur, taille, forme, aspect du noyau).

Les différents types de cellules observées sur frottis vaginal selon Alain Fontbonne sont représenter dans les figures suivantes : Les cellules parabasales (Figure 14) :

Ce sont de **petites cellules** avec un **grand rapport nucléo-plasmique**. Le cytoplasme est **basophile**.

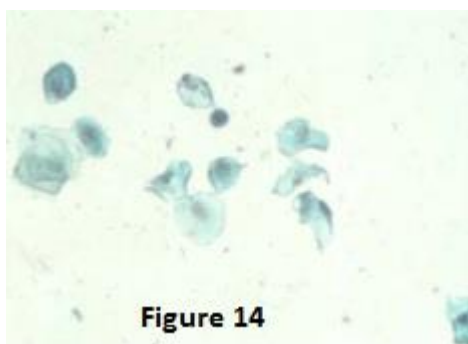


Figure 14 : Les cellules parabasales (Fontbonne A. 2007)

Les cellules intermédiaires (Figure 15) :

Elles font en général **deux fois la taille d'une cellule parabasale** avec un noyau de la même taille. Leur **contour est irrégulier** et leur **coloration est acidophile ou basophile selon le moment du prélèvement.**

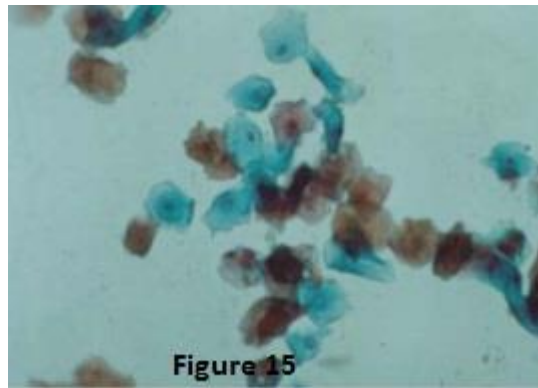


Figure 15 : cellules intermédiaires (Fontbonne A. 2007)

Les cellules superficielles (Figure 16) : De **contours irréguliers et de coloration acidophile**, ces cellules sont les plus grandes de l'épithélium vaginal. Le noyau n'est plus visible.

Les hématies :

Elles sont visibles sur le frottis pendant les chaleurs. Leur quantité est plus importante au début des chaleurs **Les leucocytes :** Ils sont visibles en début de met-œstrus.

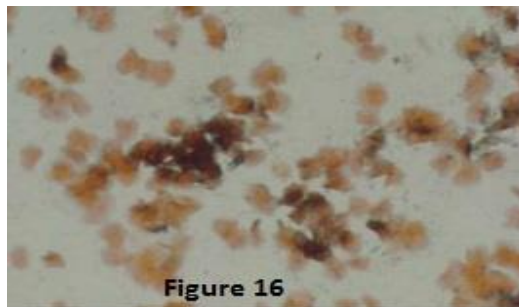


Figure 16 : cellules superficielles (Fontbonne A. 2007)

3.3.1-3. Modification de la cytologie vaginale au cours du cycle sexuel :

Figures 17, 18, 19, 20 nous montrent l'épithélium vaginal au cours du cycle sexuel d'après Alain Fontbonne.

An-œstrus : *Cellules parabasales.* Les cellules sont **peu différenciées**, elles sont **peu nombreuses.**

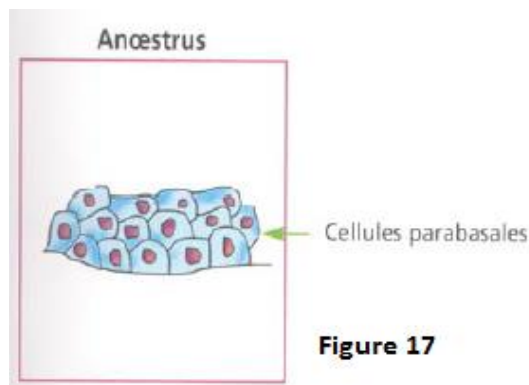


Figure 17 : épithélium vaginal lors de l'anoestrus (Fontbonne A. 2007)

Pro-œstrus : Cellules petites et grandes intermédiaires, hématies. Différentiation des cellules vaginales et **apparition de cellules chargées en kératine**. Les **hématies** sont en général **nombreuses**. Le fond du frottis a un **aspect sale**.

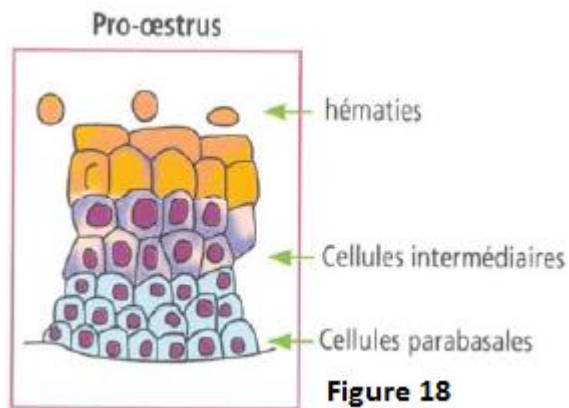


Figure 18 : épithélium vaginal lors du pro-œstrus. (Fontbonne A. 2007)

Œstrus : Cellules superficielles kératinisées en grand nombre, cellules intermédiaires. On observe **plus de 90 pour cent de cellules superficielles**. Le fond du frottis est propre.

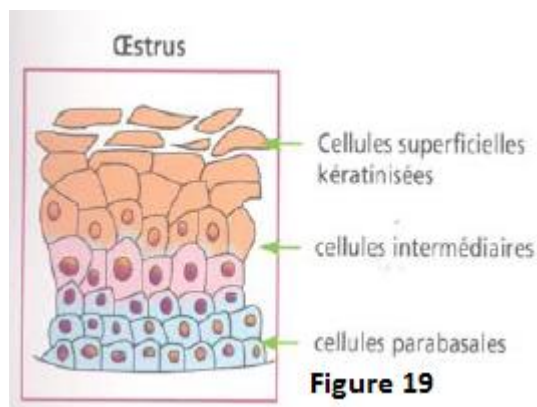


Figure 19 : épithélium vaginal lors de l'œstrus. (Fontbonne A. 2007)

Met-œstrus : Cellules parabasales et polynucléaires neutrophiles. La coloration auparavant acidophile devient **basophile**. **Le fond du frottis est sale**. Des **neutrophiles** peuvent être présents.

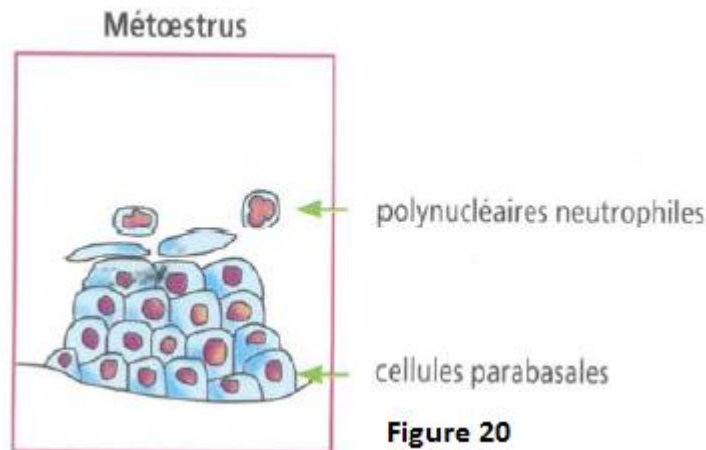


Figure 20 : épithélium vaginal lors du met-œstrus. (Fontbonne A. 2007)

3.3.1-4. Intérêts et limites des frottis vaginaux :

Cette méthode est **facile à mettre en œuvre** et peu contraignante. Cependant la cytologie vaginale n'est pas toujours aussi caractéristique de chaque phase du cycle comme nous l'avons décrit plus haut. Les frottis vaginaux s'avèrent de bons indicateurs du déroulement des chaleurs mais sont **insuffisants seuls pour la détermination du moment de l'ovulation**. Leur utilisation reste donc indissociable des dosages de progestérone. (Nathalie et al. 2007)

3.3.2. Le dosage de la progestérone :

- Le taux basal de progestérone est < 2 ng/ml
- Il y a une lutéinisation des follicules pré ovulatoires qui se mettent à sécréter de la progestérone avant que l'ovulation ne se produise. Ainsi, il y a une première augmentation du taux de progestérone de < 2 ng/ml à environ 2,5 ng/ml.
- A l'ovulation, le taux de progestérone augmente brusquement, il est compris entre 4 et 10 ng/ml.
- On considère que l'ovulation a eu lieu lorsque la valeur de 6 à 10 ng/ml est dépassée, de ce fait, la mesure de la progestéronémie est un témoin fiable de l'ovulation.
- En période post ovulatoire, le taux de progestérone continue d'augmenter pouvant atteindre des valeurs comprises entre 15 et 90 ng/ml.
- Au moment idéal de fécondation, le taux de progestérone plasmatique est très variable, il varie de 12 à 50 ng/ml. (Justine CORRE et al. 2004)

Tableau 07 : Avantages et inconvénients des deux outils

| | AVANTAGES | INCONVENIENTS |
|-------------------------------|----------------------------------|--|
| FROTTIS VAGINAL | Peu coûteux Résultat immédiat | Peu précis |
| DOSAGE DE PROGESTERONE | Précis | Coût élevé Technique de dosage variable (quantitatif ou semi-quantitatif) |

Conclusion : Lors d'insémination artificielle la détection très précise de la date d'ovulation est primordiale pour la réussite de l'IA. La période optimale d'insémination est donc courte. L'idéal est d'associer plusieurs techniques de détection de l'ovulation. Le contrôle direct de l'ovulation par échographie associé à des dosages de progestérone est une méthode à préconiser lors d'insémination artificielle. (Nathalie et al. 2007)

4. Induction de l'œstrus :

L'induction de l'œstrus chez la chienne peut être utilisée dans plusieurs cas de reproduction pathologique ou de reproduction assistée.

4.1. Indications de l'induction des chaleurs chez la chienne :

Les indications pour l'induction de l'œstrus chez la chienne sont multiples. (KUTZLER, M. A 2007) Elles incluent :

- ✓ La volonté de contrôler le moment de l'œstrus après de précédents échecs de conception ou d'opportunités manquées de reproduction (signes d'œstrus peu visibles par exemple).
- ✓ Le traitement d'an-œstrus primaire ou secondaire.
- ✓ La présence d'un inter-œstrus prolongé, réduisant le nombre d'opportunité de gestation.
- ✓ La synchronisation de l'ovulation entre la chienne donneuse et la chienne receveuse, indispensable lors d'un transfert d'embryons ;
- ✓ La recherche concernant la physiologie du cycle œstral ou certaines troubles de la reproduction.

4.2. Les différentes techniques d'induction de l'œstrus :

De multiples protocoles existent pour l'induction des chaleurs, car la diversité des molécules utilisables est grande. On retrouve notamment : les gonadotrophines exogènes (LH, FSH, hCG, eCG...), les œstrogènes de synthèse (diéthylstilbestérol), les analogues de la GnRH (lutréline, desloréline, leuprolide...) et les agonistes de la dopamine (cabergoline, bromocryptine, métergoline). (KUTZLER, M. A 2005, CIRIT, Ü., et al. 2007). Ces méthodes varient largement dans leur efficacité et dans la fertilité de l'œstrus induit. (KUTZLER, M. A 2005).

4.2.1. Utilisation de GnRH et de ses analogues :

Parmi les principaux protocoles d'induction de l'œstrus chez les chiennes, on retrouve ceux utilisant la GnRH mais surtout ses analogues : desloréline, lutréline et leuprolide. Des études ont montré que l'administration pulsatile de GnRH à des doses de 0,2-0,4 µg/kg à 90min d'intervalle est suffisante pour obtenir une augmentation de LH similaire aux pulses endogènes qui se produisent normalement en fin de pro-œstrus. (KUTZLER, M. A 2005). Cependant, compte-tenu des frais qu'ils engendrent (par l'hospitalisation de l'animal et l'utilisation des pompes à injection pulsatile), ces protocoles ne sont pas applicables en clientèle. Une bonne alternative à l'utilisation de la GnRH est l'utilisation d'un de ses analogues : lutréline, desloréline ou leuprolide. En effet, une injection à débit constant d'analogues de la GnRH conduit à une induction de l'œstrus et produit des taux de gestation similaires à une injection pulsatile de GnRH. (KUTZLER, M.A 2005).

L'utilisation d'un analogue de la GnRH doit être continue pendant au moins 7 à 9 jours pour induire l'œstrus. Ainsi, l'utilisation des implants de desloréline est une méthode pratique, efficace et à moindre coût, d'obtenir un œstrus rapide et synchrone chez la chienne en an-œstrus. (KUTZLER, M. A 2007), plusieurs sortes d'implants sont disponibles :

- **Le Suprëlorin®** : avec un dosage à 4,7mg ou à 9,4 mg de desloréline. Seul implant disposant une **Autorisation de Mise sur le Marché (AMM)** pour le chien mais sans AMM pour l'induction de l'ovulation chez la chienne.

- **l'Övuplant®** : avec un dosage à 2,1 mg de desloréline. Cet implant présente une AMM pour l'induction de l'ovulation mais chez la jument uniquement. Trois à cinq jours après la pose de l'implant, il est possible d'observer le début du pro-œstrus, chez toutes les chiennes en an-œstrus ayant été traitées. (VOLKMANN, D. H et al. 2006.) Les taux de gestation et de fertilité observés chez ces chiennes sont aussi satisfaisants que pour des chiennes n'ayant pas été

induites, avec des taux d'ovulation de 62 à 87,5%. Après insémination artificielle, des taux de gestation de 66,7% (VOLKMANN, D. H et al. 2006.) et 78,3% ont pu être obtenus. (FONTAINE, E et al 2011).

Cependant, les études font également état de défaillances lutéales prématurées avec un raccourcissement du di-œstrus et de la gestation et donc un avortement, après l'utilisation d'agonistes de la GnRH. (KUTZLER, M. A 2005, FONTAINE, E et al. 2011).

L'induction de l'œstrus chez des chiennes en di-œstrus a été réalisée grâce à un traitement à base de prostaglandines PGF2 α précédant la pose de l'implant (à 2,1 ou 1,05 mg). (VOLKMANN, D. H et al. 2006) Le prétraitement avec les PGF2 α est réalisé selon le protocole suivant :

- 1er jour : 50 μ g/kg deux fois par jour ;
- 2ème jour : 100 μ g/kg deux fois par jour ;
- puis 250 μ g/kg deux fois par jour pendant 5 jours ;
- pose de l'implant de desloréline.

Ce protocole a permis d'obtenir un œstrus synchrone des chiennes de l'étude. Cependant, après insémination artificielle, les résultats de fécondation chez les chiennes en di-œstrus étaient insatisfaisants, avec des taux de fécondation de seulement 13%, contre 41,7 à 54,8% chez les chiennes en an-œstrus au début de l'étude. (VOLKMANN, D. H et al. 2006).

4.2.2. Utilisation des agonistes de la dopamine :

Les agonistes de la dopamine sont à l'origine d'une suppression de la sécrétion de prolactine par divers mécanismes. Leurs modes de fonctionnement reposent sur le rôle de la prolactine dans la sécrétion de gonadotropines et/ou la réponse ovarienne aux gonadotropines. Ils ont ainsi un effet indirect sur la durée de l'an-œstrus et sur l'induction de l'œstrus en cas d'an-œstrus prolongés. (BARONE, R, 2001).

Parmi les agonistes de la dopamine nous retrouvons :

- **La bromocryptine** : elle cause souvent des vomissements dans les stades précoces de traitement et peut également être à l'origine d'anorexie. Elle n'est pas autorisée en médecine vétérinaire. (KUTZLER, M. A 2005) Après insémination artificielle ou saillie naturelle, des taux de gestation de 83% ont été rapportés suite à l'induction de l'œstrus. (ZÖLDÁG, L et al. 2001).
- **La métergoline** : il s'agit d'un antagoniste des récepteurs à la sérotonine. A faible dose, elle diminue la concentration en prolactine mais n'induit pas l'œstrus. En revanche, à fortes doses (12,5 mg par voie intramusculaire tous les 3 jours), elle induit également un effet agoniste de la dopamine et l'œstrus. (KUTZLER, M. A 2007).

- **La cabergoline** : elle possède une très forte affinité pour les récepteurs D2 de la dopamine. Elle est l'agoniste de la dopamine ayant obtenu les résultats les plus satisfaisants en termes d'application pratique et d'effets indésirables.

L'administration de cabergoline, même à faible dose (0,6 µg/kg/j), induit avec succès un œstrus fertile et une ovulation spontanée chez la plupart des chiennes à différents stade d'an-œstrus. Cet œstrus survient plus précocement chez des chiennes en fin ou au milieu d'an-œstrus. (VERSTEGEN, J. P et al. 1999) Après insémination artificielle, des taux de gestation de 75% ont été obtenus suite à l'induction de l'œstrus par la cabergoline. (CIRIT, Ü et al. 2007).

Ces méthodes d'induction de l'œstrus peuvent nécessiter plus de 30 jours de traitement avant que le début du pro-œstrus ne démarre, ceci étant dépendant du stade d'avancement de l'an-œstrus. (KUTZLER, M. A 2005).

4.2.3. Utilisation des gonadotrophines exogènes :

La LH et la FSH sont toutes les deux des hormones folliculotropiques chez la chienne. La LH ou la FSH peuvent induire à elles seules un œstrus physiologique, sans qu'il ne soit nécessaire de mimer une sécrétion pulsatile. (KUTZLER, M. A 2007).

L'eCG, l'hCG et l'HMG ont également été utilisés dans l'induction de l'œstrus. Des défaillances prématurées du corps jaune, avec un raccourcissement du di-œstrus et de la gestation, ont été rapportées après l'utilisation de l'eCG. (KUTZLER, M. A 2005). L'utilisation d'hCG dans l'induction de l'œstrus n'a pas montré de différence significative sur les taux d'ovulation, de gestation et la taille de la portée, après saillie ou insémination artificielle, par rapport aux chiennes ayant présenté un œstrus spontané. (CIRIT, Ü et al. 2007).

Un protocole utilisant l'HMG, à 75 UI/jour pendant 7 jours, a permis d'induire l'œstrus chez 90% des chiennes de l'étude, 3 à 9 jours après le traitement. Après insémination, 50% des chiennes étaient gestantes. (WANKE, M. M et al. 1997) .

4.2.4. Utilisation des œstrogènes de synthèse :

Trente jours avant le début de l'œstrus, une augmentation discrète mais significative de la concentration plasmatique en œstradiol se produit. Cette augmentation serait à l'origine du déclenchement du fonctionnement de l'axe hypothalamo-pituitaire-ovarien et donc initierait une augmentation du taux de relargage pulsatile de LH. Ce mécanisme a pu être confirmé par le succès de l'induction d'œstrus fertile chez des chiennes après l'administration d'œstradiol de synthèse (le DES) seul. (KUTZLER, M. A. 2005) Cette technique reste cependant peu employée.

Les œstrogènes de synthèse sont souvent associés avec à d'autres molécules (FSH, LH, eCG, hCG) dans le but de déclencher l'ovulation après l'induction de l'œstrus. L'association des œstrogènes avec la FSH n'a cependant permis d'obtenir des taux de gestation que de 33% après insémination. (BOUCHARD, G et al. 1991), Une fois la date d'ovulation estimée, la saillie ou l'insémination sont programmées. L'insémination peut être réalisée par le biais de différents types de semence. Quel que soit le type utilisé, il sera essentiel d'évaluer la qualité, et donc la capacité de fécondation, de la semence avant son emploi, afin d'obtenir les meilleurs taux de fécondation possible. (BREUILLÉ Juliette, 2017).

iv. Chapitre 04 : L'insémination artificielle

Pour une insémination artificielle réussie, il est important de la réaliser au moment optimal, avec une semence de bonne qualité et de déposer la semence au meilleur site de fécondation. A l'heure actuelle, il existe 3 principales techniques d'insémination artificielle : l'insémination intra-vaginale (IAIV), l'insémination intra-utérine (IAIU) et l'insémination-tubaire (IAIT).

1. L'insémination artificielle intra-vaginale :

L'insémination intra-vaginale correspond au dépôt de la semence dans le vagin crânial, à l'entrée du col de l'utérus. Elle peut être utilisée quand la qualité du sperme et la fertilité de la femelle sont bonnes, mais aussi lorsque la saillie naturelle ne peut être réalisée soit à cause d'une incapacité physique ou de problèmes comportementaux. (MAKLOSKI et MACEDO 2012). Elle peut être pratiquée avec un simple cathéter en plastique. Le cathéter est introduit le long de la commissure dorsale de la vulve et est dirigé crânio-dorsalement puis crânialement. Un doigt ganté peut être placé dans la vulve pour guider le passage du cathéter. Celui-ci est poussé jusqu'à l'entrée du col. La semence est déposée dans le vagin, poussée par 1 à 2 mL d'air à l'aide d'une seringue (MAKLOSKI 2012).

Il a longtemps été recommandé de soulever l'arrière-train de la chienne pendant une dizaine de minutes après l'introduction, pour éviter que la semence ne soit éliminée par des contractions du tractus génital. Cependant, une étude a montré que cette étape ne présente en réalité aucune incidence sur les résultats d'insémination puisque, pour des temps de 1 à 10 minutes, aucune différence sur les taux de gestation et les tailles de portée n'a été observée. Cette technique n'est donc pas nécessaire (PINTO, C. R. F et al. 1998).

Une seconde méthode d'IA intra-vaginale a été mise au point avec l'utilisation d'un cathéter présentant un ballon en latex à son extrémité. Il s'agit du cathéter Osiris. L'utilisation de ce type de cathéter est une technique d'IA intra-vaginale mimant la copulation naturelle. Le reflux de la semence est empêché par l'intermédiaire du ballon gonflable, mimant l'action des bulbes caverneux du pénis. Il permet ainsi de prévenir le reflux de la semence et de potentiellement stimuler les contractions vaginales et utérines (NIŻAŃSKI, W 2006).

La technique d'insémination avec l'utilisation de ce cathéter est expliquée dans la Figure ci-dessous :

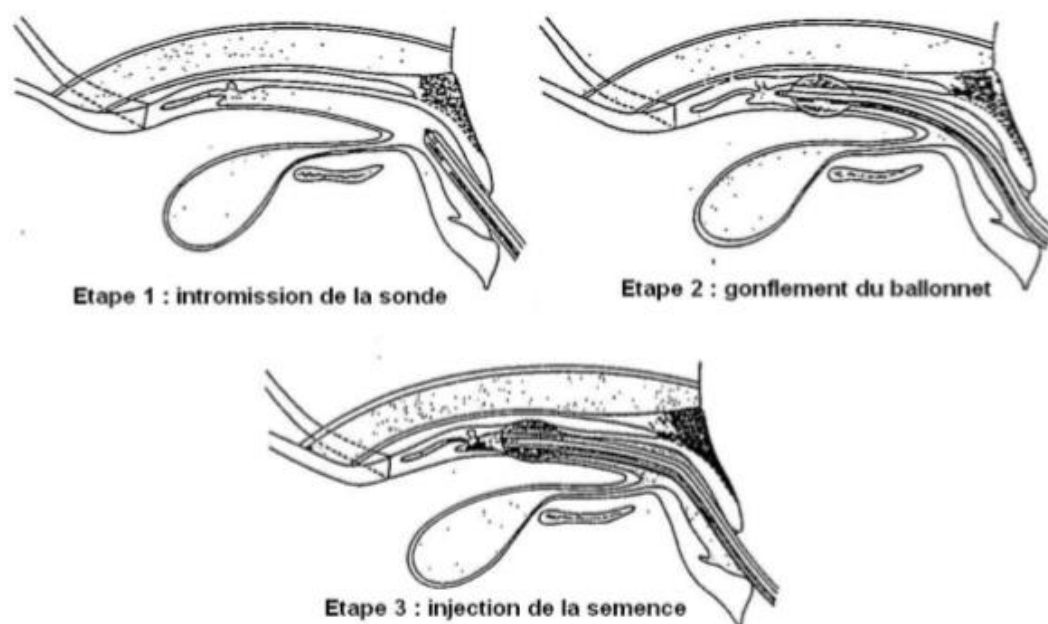


Figure 21 : Technique d'utilisation du cathéter Osiris à ballonnet. (D'après MIALOT, J. P et al. 1985)

Les taux de gestation obtenus en insémination intra-vaginale sont entre 60 et 95% selon les études réalisées. De tels écarts peuvent être dus à des variations dans la qualité de la semence, dans l'exactitude de la date d'ovulation ou à des différences interindividuelles au sein des chiennes (MAKLOSKI 2012).

Cette technique présente des résultats médiocres lorsqu'elle est comparée à l'IA intra-utérine et ceci peut notamment s'expliquer par le fait que le vagin constitue un environnement néfaste pour la survie des spermatozoïdes.

2. L'insémination intra-utérine :

C'est la technique présentant les meilleurs taux de gestation, quelle que soit le type de semence utilisée (BENCHARIF, D et al. 2008).

L'insémination intra-utérine peut être utilisée pour des raisons similaires à l'IAIV et notamment en cas d'incapacité pour le mâle ou la femelle de participer à une saillie naturelle. L'IAIU sera préférée à l'IAIV lorsque la qualité du sperme n'est pas optimale. En effet, elle permet un meilleur rapprochement des gamètes mâles et femelles et la mobilité spermatique a donc de ce fait une moindre incidence sur les taux de gestation que lors d'IAIV.

Il existe plusieurs méthodes d'IA intra-utérine : l'insémination intra-utérine par cathétérisation du col et l'insémination intra-utérine par laparotomie.

2.1. IAIU par Trans-cervicale par cathétérisation du col de l'utérus :

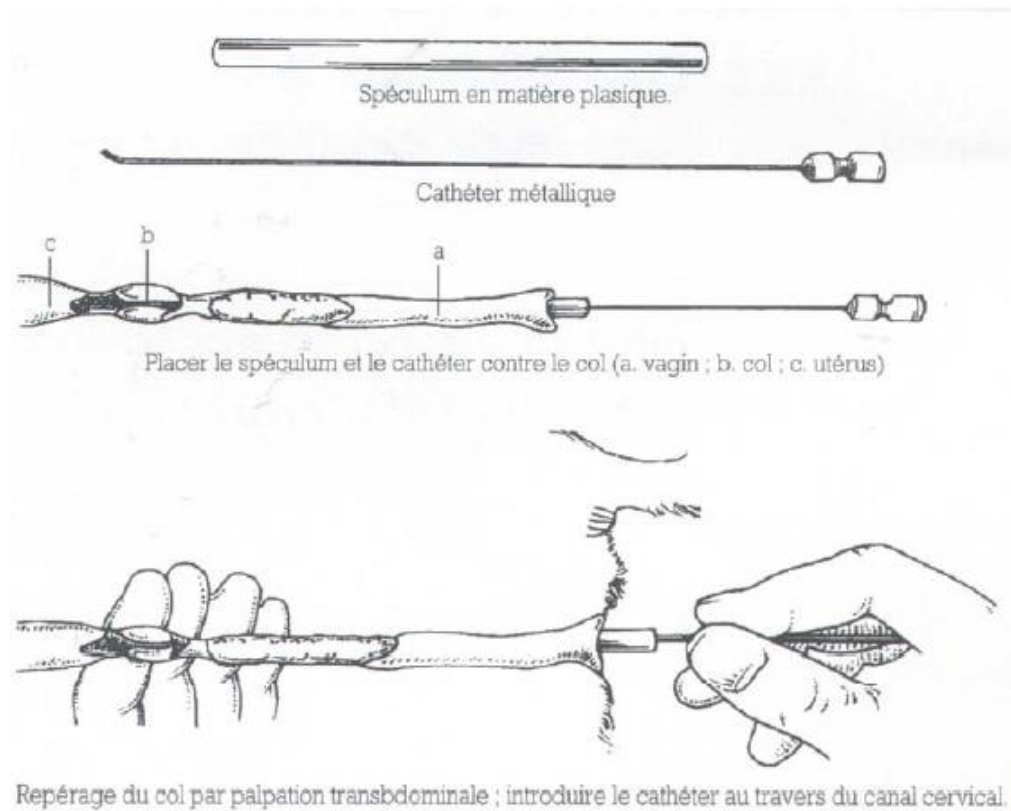


Figure 22 : Méthode de cathétérisme utérin. Fontbonne A.

Dans cette méthode, un cathéter est introduit au travers du col de l'utérus pour déposer la semence directement dans la lumière utérine. Elle regroupe deux techniques (NIZAŃSKI 2006) (MAKLOSKI 2012) :

La méthode Norvégienne : le col de l'utérus est maintenu d'une main en position horizontale, par voie trans-abdominale. Un cathéter rigide est ensuite introduit au travers du col. Cette technique est inutilisable chez les chiennes obèses et/ou nerveuses pour qui un maintien efficace du col est impossible. Chez les chiennes de petite taille, la réalisation de cette technique est plus délicate, compte-tenu de la taille de la lumière de la région para-cervicale ;
La méthode Néozélandaise : un cysto-urétroscope rigide est utilisé pour visualiser la portion vaginale du col de l'utérus. Un cathéter urinaire permet d'effectuer le dépôt intrautérin de la semence. Chez les chiennes de grandes races ayant un vagin de taille importante, la visualisation du col et sa cathétérisation nécessitent l'utilisation d'un endoscope de grand format.

De façon générale, quelle que soit la méthode utilisée, la cathétérisation du col est difficile pour des raisons anatomiques. En effet, le vagin est considérablement long et le col est partiellement obstrué par le repli médian dorsal post-cervical, qui crée la région étroite para-cervicale. De plus, l'axe du col est positionné crâniaux-dorsalement. Cette conformation rend cette technique difficile pour un opérateur inexpérimenté.

L'insémination Trans-cervicale intra-utérine a permis d'obtenir des taux de gestations de plus de 84% avec une seule insémination, chez des races présentant une bonne fertilité, comme le Greyhound (PRETZER, et ALTHOUSE 2006).

2.2. IAIU par laparotomie :

Deux types de techniques chirurgicales ont été étudiés :

Conventionnelle : la plus courante. La chienne est anesthésiée et placée en décubitus dorsal. Une incision de 2-3 cm est réalisée sur la ligne blanche. Le corps et la corne utérine sont isolés et un cathéter hypodermique est introduit dans la lumière de l'utérus, dans le corps ou à la base de la corne. La semence est introduite sans qu'aucune incision n'ait été réalisée sur l'utérus ;

Approche par laparoscopie : peu réalisée en pratique compte tenu de l'équipement nécessaire et de son coût. Si elles sont réalisées correctement, par un chirurgien expérimenté, il s'agit de méthodes avec peu de risques. Cependant, elles nécessitent une anesthésie générale et des complications postopératoires peuvent être observées : douleur post-opératoire, déhiscence de plaie, formation de sarcome post-opératoire...

Une étude comparative a montré que les taux de gestation obtenus par cathétérisme Trans cervical sont significativement meilleurs que ceux obtenus par laparotomie, avec respectivement 65 et 45% (Mason 2014). L'insémination par laparotomie ne présente donc aucun avantage par rapport à la méthode par cathétérisation et c'est cette dernière qui est la plus utilisée en pratique.

3. Insémination artificielle intra-tubaire :

L'insémination artificielle intra-tubaire consiste en un dépôt de la semence directement dans l'oviducte. Cette procédure nécessite l'ouverture de la bourse ovarique dans laquelle est contenu l'ovaire. Une quantité moins importante de spermatozoïdes est nécessaire mais les études réalisées montrent un taux de gestation inférieur à celui rencontré dans les techniques d'IA intra-utérine (20% seulement). (KIRIHARA, N. et KAWAKAMI 2003) (JANG, G. et KIM 2007)

Cependant, peu d'études ont été menées et cette technique nécessite d'autres investigations notamment concernant le site de dépôt et la quantité de spermatozoïdes à inséminer.

4. Insémination artificielle en semence fraîche :

L'IA en semence fraîche consiste à inséminer la chienne directement après le prélèvement de la semence chez le mâle. Elle sera le plus souvent réalisée en par voir vaginale mais une IAIU est également possible, ce type d'IA est indiqué lors de refus de saillie par l'un des 2 partenaires, qu'elle qu'en soit la raison. Elle peut aussi être utilisée pour protéger le mâle d'éventuelles affections sexuellement transmissibles (DUMON, 2007).

Lors d'insémination artificielle par voie vaginale avec de la semence fraîche, au moins 200x10⁶ spermatozoïdes motiles sont nécessaires pour obtenir un taux de fertilité similaire à celui obtenu par saillie naturelle (MARTÍNEZ 2004) (NIZAŃSKI, 2006).

Le taux de gestation peut atteindre 95% lors d'IA par voie intra-vaginale associée à de la semence fraîche, si une bonne conduite est réalisée (suivi de chaleurs rigoureux et sperme de bonne qualité notamment) (DUMON, 2007).

Les mauvais résultats de prolificité et les échecs de gestation sont le plus souvent imputables à une IA trop tardive. La présence d'une vaginite ou la mauvaise qualité de la semence (concentration en spermatozoïdes trop basse, mobilité des spermatozoïdes diminuée...) peuvent également conduire à une diminution de la prolificité. Dans le cas où la qualité de la semence est réduite, l'IA intra-utérine peut être indiquée (DUMON 2007). En effet, en semence fraîche, l'IAIV nécessite 200x10⁶ spermatozoïdes pour obtenir un taux de gestation et une taille de portée similaires à ceux obtenus en saillie naturelle, tandis que seul 20x10⁶ spermatozoïdes sont nécessaires pour obtenir les mêmes résultats en IAIU (LINDE-FORSBERG et GOVETTE 1999).

5. Ajout de liquide prostatique avant insémination :

Du liquide prostatique peut être rajouté à la semence, après décongélation et juste avant insémination. Il a pour effets de : (NÖTHLING et all 2005).

- Diminuer la motilité et la viabilité des spermatozoïdes lorsqu'il est ajouté à de la semence fraîche avant l'incubation, le refroidissement, la dilution ou la congélation.
- Diminuer le pourcentage de spermatozoïdes motiles et viables mais il n'a pas d'effet sur le fonctionnement de l'acrosome.

- Prévenir la fixation de la progestérone dans la région de l'acrosome et donc de retarder la réaction acrosomique.

Après sensibilisation par du liquide prostatique avant leur congélation, une augmentation significative du pourcentage de spermatozoïdes présentant un acrosome intact, de la motilité et de la viabilité des spermatozoïdes est observée, ainsi qu'une amélioration de taux de conception, que lorsque le liquide prostatique est remplacé par une simple solution à base d'albumine. (NÖTHLING et all 2005) (HORI, T., HAGIUDA 2005).

Cette amélioration significative des taux de gestation par sensibilisation des spermatozoïdes avec du liquide prostatique, est observée quelle que soit l'IA pratiquée. (NIZAŃSKI 2006)(HORI, T., HAGIUDA et all 2005).

Cet effet sur la fertilité n'est probablement pas seulement dû à une augmentation du volume, mais aussi à un effet intrinsèque du liquide prostatique sur les caractéristiques des spermatozoïdes. Le mécanisme par lequel le liquide prostatique augmente la fertilité n'est pas connu mais il pourrait être dû à une interaction directe avec le spermatozoïde, à une amélioration de la migration du spermatozoïde à travers le col ou encore à une amélioration de la longévité des spermatozoïdes dans l'utérus ou la jonction tubulo-utérine (NÖTHLING et all 2005).

L'insémination artificielle est la biotechnologie la plus utilisée en pratique vétérinaire, compte tenu de son accessibilité et de son moindre coût. Elle nécessite malgré tout un suivi rapproché de la chienne à inséminer et une analyse minutieuse de la semence, afin d'obtenir les résultats les plus satisfaisants. Des technologies plus poussées se sont développées ces dernières années, par le biais de celles ayant été mises en place chez les bovins ou chez l'Homme par exemple. Ces techniques se retrouvent aux autres stades de la reproduction : lors de la maturation, de la fécondation ou encore du développement embryonnaire.

Deuxième partie : Etude expérimentale

1. Objectifs :

Nous avons choisi ce thème dans le but d'améliorer voir facilité la reproduction dans l'espèce canine, c'est un sujet intéressant et riche en informations suite aux différentes particularités qui caractérisent cette espèce et cela fait un excellent sujet pour une initiation dans le monde de la recherche et l'amélioration de la reproduction canine. Le travail est constitué de 2 parties ; La première partie consiste en l'étude de la semence canine (sperme), la seconde partie est le suivie des chaleurs et la détermination de la date d'ovulation.

Première partie l'examen du mâle :

Tout d'abord avant de passer à un prélèvement on devrait effectuer un examen clinique qui consiste en l'anamnèse, le TRIAS (T° corporelle : 38 °C et 39 °C, pouls : 60 et 110 pulsations par minute, fréquence respiratoire : 14 et 22 mouvements par minute). On a pu prélever 7 chiens de différentes race et âge qui appartiennent à 2 élevages différant, dont : 2 Bergers malinois, 2 Bergers Allemand, et 1 épagneul breton présent dans l'élevage d'Alger, et 1 Berger malinois et 1 épagneul breton présent dans l'élevage de Boumerdes.

Tableau 08 : représentations des sujets prélevé (semence)

| Chien | Race | Age | Caractère | TRIAS |
|----------------------|------------------|---------|-----------|---------------|
| Epagneul (Alger) | épagneul breton | 26 mois | Docile | Physiologique |
| Malinois 01 (Alger) | Berger malinois | 28 mois | Agressive | Physiologique |
| Malinois 02 (Alger) | Berger malinois | 25 mois | Nerveux | Physiologique |
| Berger 01 (Alger) | Bergers Allemand | 32 mois | Docile | Physiologique |
| Berger 02 (Alger) | Bergers Allemand | 29 mois | Docile | Physiologique |
| Epagneul (Boumerdes) | épagneul breton | 34 mois | Docile | Physiologique |
| Malinois (Boumerdes) | Berger malinois | 36 mois | Agressive | Physiologique |

2. Matériels et méthodes :

Tout d'abord pour faire un recueil de semence il est nécessaire d'utiliser un matériel stérile afin d'éviter toute sorte de contamination :

- Les tubes et les cônes de récolte de sperme.
- Et il est conseillé d'utiliser un lubrifiant non spermicide.

En second temps on a évalué la semence en utilisant un matériel de laboratoire :

- Un microscope optique à analyse automatique (CASA)
- Une micropipette, lame lamelle, NaCl Isotonique (pour la dilution)
- Un bain marré pour conserver la température des échantillons
- Des colorants, exemple ; L'éosine-nigrosine,

Tout cela nous permettra de déterminer les caractéristiques de la semence afin de les classer dans un tableau pour connaître la fertilité du mâle.



Figure 23 : Matériels stérile de récolte de semence (2020).

2,1. La méthode de collecte :

Maintenir la base du pénis en arrière des bulbes érectiles ensuite repousser le fourreau en arrière (des bulbes) Le chien va présenter des mouvements de bassin d'avant en arrière pendant quelques minutes et éjaculer la première fraction, lorsqu'il essaye de soulever un postérieur pour essayer de se retourner, le pénis peut alors être orienté caudalement pour terminer la récolte à la fin on devra appliquer le lubrifiant sur le prépuce avant sa rétraction.



Figure 24 : Prélèvements de semences effectués à Alger le 03/03/2020.

2.1.1. Résultats :

À la suite du prélèvement, on fait une observation macroscopique sur la couleur de chaque échantillon collecté pour chaque sujet différent, ce qui ne diffère pas, c'est que pour chaque collecte, on observe 3 fractions :

Première fraction (fraction pré spermatique) : ou fraction urétrale, est essentiellement composée d'urine. Elle est normalement claire ou légèrement trouble, parfois jaunâtre. Ce premier jet est donc sale, car plein de bactéries.

Seconde fraction (Fraction spermatique) : est la fraction riche en spermatozoïdes. Elle est normalement opaque à laiteuse, celle à utiliser pour l'insémination artificielle de la chienne.

Troisième fraction (fraction prostatique) : le liquide prostatique qui vient faire une purge, généralement pauvre en spermatozoïdes mais propre, ce qui permet de l'utiliser dans le but de la dilution pour une insémination artificielle.

Tableau 09 : Examen Macroscopique

| Chien | Durée du Prélèvement | Couleur, Aspect et volume de la semence |
|-----------------------------|----------------------|---|
| Epagneul (Alger) | De 15min à 30min | Un aspect blanc laiteux, homogène, à la fin du prélèvement on a observé la présence de gouttes de sangs Environs 9ml |
| Malinois 01 (Alger) | De 10min à 25min | Un aspect blanc laiteux, homogène, à la fin un liquide quasi transparent Environs 6ml |
| Malinois 02 (Alger) | De 15min à 25min | Un aspect blanc laiteux, homogène, à la fin un liquide quasi transparent Environs 8ml |
| Berger 01 (Alger) | De 10min à 30min | Un aspect blanc laiteux, homogène, à la fin un liquide quasi transparent Environ 5ml |
| Berger 02 (Alger) | De 10min à 25min | Un aspect blanc laiteux, homogène, à la fin un liquide quasi transparent Environs 6ml |
| Epagneul (Boumerdes) | De 15min à 25min | Un aspect blanc laiteux, homogène , à la fin un liquide quasi transparent Environs 8ml |
| Malinois (Boumerdes) | De 15min à 30min | Un aspect blanc laiteux, homogène, à la fin un liquide quasi transparent Environ 5ml |

Remarque :

La présence de gouttes de sang à la fin du prélèvement chez le chien Epagneul (Alger) nous mène vers un diagnostic clinique ;

Puisque on est à la fin du prélèvement c'est donc la fraction prostatique qui est éjaculé alors l'accompagnement de sang fait penser à une atteinte de la prostate.

2,2. Analyse des échantillons :

Par la suite du prélèvement les échantillons de semences ont été transportés au laboratoire de recherche en biotechnologies liées à la reproduction situé à l'université, Saad Dahleb Blida -1- Institut des sciences vétérinaires, dans le but de faire une analyse sur les caractéristiques de la semence et la fertilité de chaque sujet.

2.2.1. L'évaluation de la mobilité massale des spermatozoïdes :

Elle peut être évaluée par observation manuellement ou de façon automatisée. Après la préparation d'un frottis on observe au microscope le résultat obtenu avec un faible grossissement (x10) et on établit une note sur 5 pour notre prélèvement de spermatozoïdes, les résultats sont démontrés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Note de la mobilité massale de chaque sujet

| | Epagneul (Alger) | Malinois 01 (Alger) | Malinois 02 (Alger) | Berger 01 (Alger) | Berger 02 (Alger) | Epagneul (Boumerdes) | Malinois (Boumerdes) |
|---------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Mobilité massale | 0/5 | 01/5 | 4.5/5 | 4/5 | 2.5/5 | 0/5 | 0/5 |

2.2.2. L'évaluation de la numération et la mobilité individuelle des spermatozoïdes dans l'éjaculat :

La numération correspond à la détermination du nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat et la mobilité individuelle de chaque spermatozoïde, La concentration en spermatozoïdes est déterminée dans un premier temps et va permettre le calcul du nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat, dans ce cas on a utilisé la méthode automatisée suite à la disponibilité du logiciel CASA. Dans ce second examen, le sperme est examiné au fort grossissement (x400) afin d'apprécier la mobilité individuelle. Le sperme doit être relativement peu concentré, afin que chaque spermatozoïde soit individualisable, donc les échantillons vont être dilués dans une solution de NaCl isotonique tiédie à 37°C, on prélève une goutte avec la micropipette, on la dépose entre lame et lamelle puis on observe.

Les échantillons qui ont été évalués par l'analyse automatique sont ; Epagneul (Alger), Malinois 02 (Alger), Epagneul (Boumerdes), Malinois (Boumerdes).

Epagneul (Alger)

Fraîche (03/03/2020 17:00:17)

| Concentration | | |
|------------------------|------------------------|-------------------|
| 1 349,58 Millions / ml | 3 373,96 M/Echantillon | Volume (ml): 2,50 |

| Progression | Total | % | Concentration | |
|---------------------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Progressif (PR) | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Non-progressif (NP) | 5 | 0,92 | 12,47 | 31,18 |
| Immobile (IM) | 536 | 99,08 | 1 337,11 | 3 342,78 |

| | Total | % | Concentration | |
|--------|-------|------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Motile | 5 | 0,92 | 12,47 | 31,18 |

| Vitesse | Total | % | Concentration | |
|---------------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Rapide | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Moyen | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Lent | 5 | 0,92 | 12,47 | 31,18 |
| Immobile (IM) | 536 | 99,08 | 1 337,11 | 3 342,78 |

| Vélocité et progressivité | Total | % | Concentration | |
|---------------------------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Progressif rapide | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Progressif moyen | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Non progressif | 5 | 0,92 | 12,47 | 31,18 |
| Immobile | 536 | 99,08 | 1 337,11 | 3 342,78 |

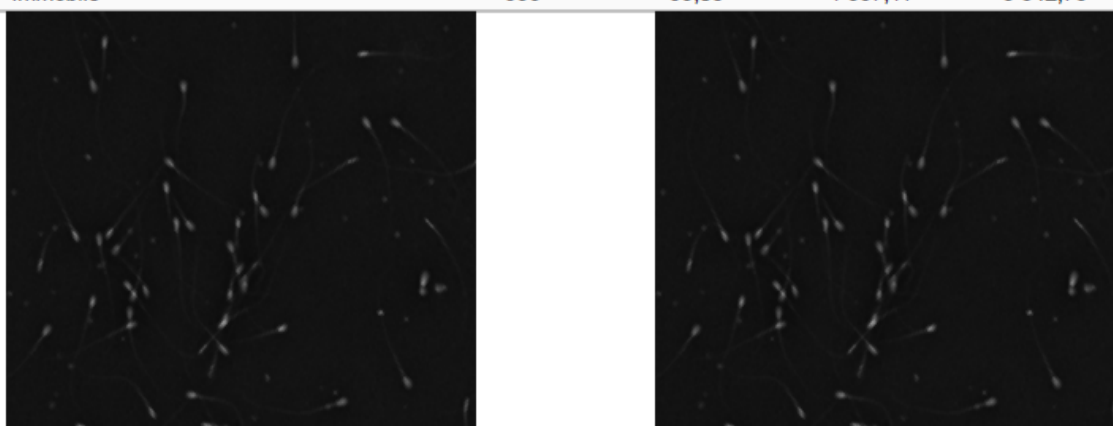


Figure 25 : Résultats de la numération et la mobilité individuelle des spermatozoïdes chez l'épagneul d'Alger.

2,2,2,1. Résultats :

Chez l'épagneul d'Alger on observe une mobilité de 0,92%, les spermatozoïdes sont complètement immobiles à 99,08% ce qui est due à la présence de sang dans le prélèvement car le sang est spermicide. Ces résultats représentent un indicateur précoce mais non spécifique d'une infection du tractus génital, mais on ne peut toujours rien dire sur la fertilité du chien d'autres examens seront nécessaire.

Malinois 02 (Alger)

Fraîche (03/03/2020 16:11:20)

| Concentration | | |
|------------------------|-------------------------|-------------------|
| 6 254,76 Millions / ml | 15 636,89 M/Echantillon | Volume (ml): 2,50 |

| Progression | Total | % | Concentration | |
|---------------------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Progressif (PR) | 74 | 10,31 | 644,64 | 1 611,60 |
| Non-progressif (NP) | 562 | 78,27 | 4 895,79 | 12 239,46 |
| Immobile (IM) | 82 | 11,42 | 714,33 | 1 785,83 |

| | Total | % | Concentration | |
|--------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Motile | 636 | 88,58 | 5 540,43 | 13 851,07 |

| Vitesse | Total | % | Concentration | |
|---------------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Rapide | 16 | 2,23 | 139,38 | 348,45 |
| Moyen | 102 | 14,21 | 888,56 | 2 221,40 |
| Lent | 518 | 72,14 | 4 512,49 | 11 281,21 |
| Immobile (IM) | 82 | 11,42 | 714,33 | 1 785,83 |

| Vélocité et progressivité | Total | % | Concentration | |
|---------------------------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Progressif rapide | 1 | 0,14 | 8,71 | 21,78 |
| Progressive moyen | 73 | 10,17 | 635,93 | 1 589,82 |
| Non progressif | 562 | 78,27 | 4 895,79 | 12 239,46 |
| Immobile | 82 | 11,42 | 714,33 | 1 785,83 |

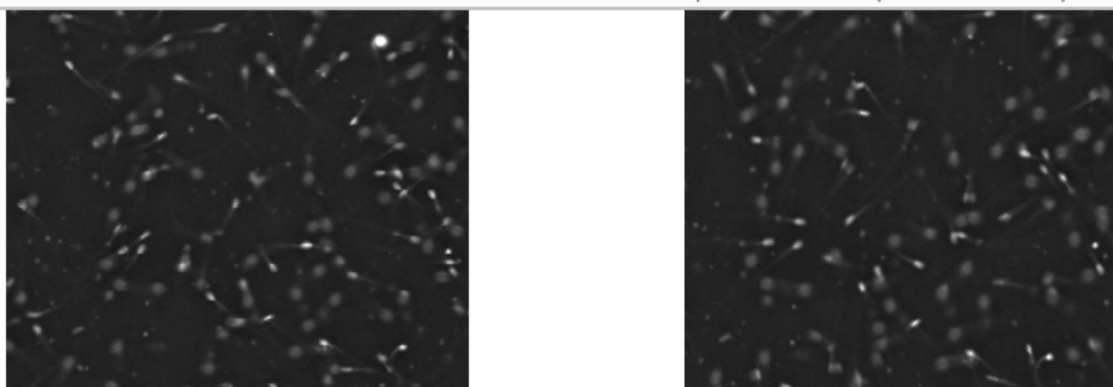


Figure 26 : Résultats de la numération et la mobilité individuelle des spermatozoïdes chez le malinois 02 d'Alger.

Chez le Malinois d'Alger on observe une mobilité de 88.58%, les spermatozoïdes sont immobiles à 11,42% ce qui nous confirme que la diminution des résultats de l'épagneul d'Alger n'a pas été due à des causes environnementales (température ambiante, matériel sale, tube à essai non lavé avant son premier usage, mauvaise manipulation...) Car le prélèvement des 2 sujets a été effectué sous les mêmes conditions.

Malinois (Boumerdes)

Fraîche (12/03/2020 12:18:26)

| Concentration | | |
|------------------------|-------------------------|-------------------|
| 4 262,17 Millions / ml | 10 655,41 M/Echantillon | Volume (ml): 2,50 |

| Progression | Total | % | Concentration | |
|---------------------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Progressif (PR) | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Non-progressif (NP) | 94 | 17,34 | 739,19 | 1 847,99 |
| Immobile (IM) | 448 | 82,66 | 3 522,97 | 8 807,43 |

| | Total | % | Concentration | |
|--------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Motile | 94 | 17,34 | 739,19 | 1 847,99 |

| Vitesse | Total | % | Concentration | |
|---------------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Rapide | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Moyen | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Lent | 94 | 17,34 | 739,19 | 1 847,99 |
| Immobile (IM) | 448 | 82,66 | 3 522,97 | 8 807,43 |

| Vélocité et progressivité | Total | % | Concentration | |
|---------------------------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Progressif rapide | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Progressive moyen | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Non progressif | 94 | 17,34 | 739,19 | 1 847,99 |
| Immobile | 448 | 82,66 | 3 522,97 | 8 807,43 |

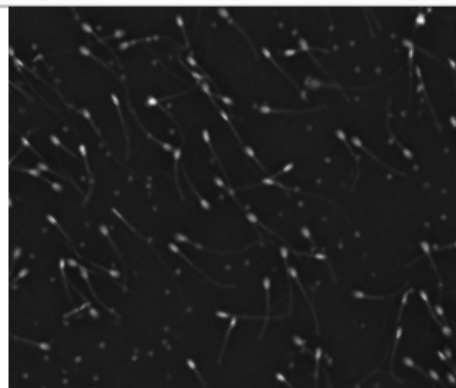
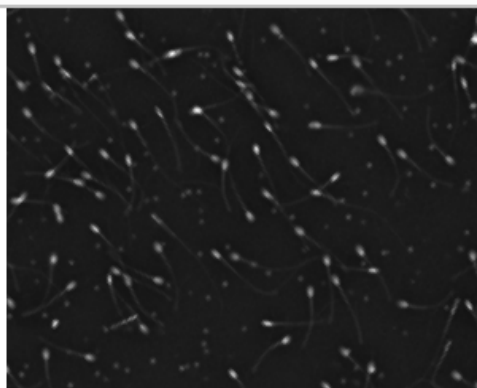


Figure 27 : Résultats de la numération et la mobilité individuelle des spermatozoïdes chez le malinois de Boumerdes.

Chez le Malinois de Boumerdes on observe une mobilité de 17,34%, les spermatozoïdes sont immobiles à 82.66% ce qui nous amène à revoir les circonstances dans lesquelles les prélèvements se sont effectués à savoir que ; les prélèvements ont été faits à 8h30 à Boumerdes dans une température basse ne dépassant pas les 16°C, transportés ensuite à Blida

sans l'utilisation de conservateurs et analysé à 12h18 ce qui a affecté la mobilité des spermatozoïdes.

Epagneul (Boumerdes)

Fraîche (12/03/2020 11:46:29)

| Concentration | | |
|----------------------|------------------------|-------------------|
| 566,07 Millions / ml | 1 415,17 M/Echantillon | Volume (ml): 2,50 |

| Progression | Total | % | Concentration | |
|---------------------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Progressif (PR) | 2 | 0,67 | 3,79 | 9,47 |
| Non-progressif (NP) | 50 | 16,72 | 94,66 | 236,65 |
| Immobile (IM) | 247 | 82,61 | 467,62 | 1 169,06 |

| | Total | % | Concentration | |
|--------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Motile | 52 | 17,39 | 98,45 | 246,12 |

| Vitesse | Total | % | Concentration | |
|---------------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Rapide | 1 | 0,33 | 1,89 | 4,73 |
| Moyen | 2 | 0,67 | 3,79 | 9,47 |
| Lent | 49 | 16,39 | 92,77 | 231,92 |
| Immobile (IM) | 247 | 82,61 | 467,62 | 1 169,06 |

| Vélocité et progressivité | Total | % | Concentration | |
|---------------------------|-------|-------|---------------|---------------|
| | | | Millions / ml | M/Echantillon |
| Progressif rapide | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Progressive moyen | 2 | 0,67 | 3,79 | 9,47 |
| Non progressif | 50 | 16,72 | 94,66 | 236,65 |
| Immobile | 247 | 82,61 | 467,62 | 1 169,06 |

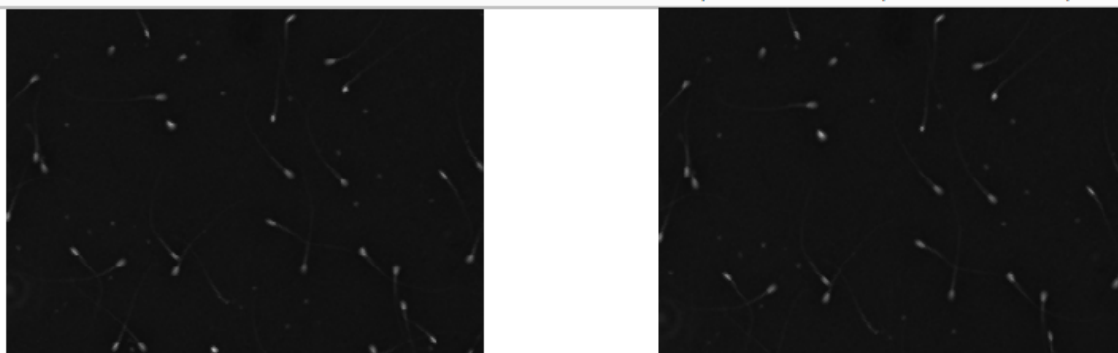


Figure 28 : Résultats de la numération et la mobilité individuelle des spermatozoïdes chez l'épagneul de Boumerdes.

Chez l'épagneul de Boumerdes on observe une mobilité de 17,39%, les spermatozoïdes sont immobiles à 82.61% à savoir que les circonstances dont les lesquels les prélèvements se sont effectuer sont les mêmes que pour le Malinois ; température, transport sans conservateur, longue durée avant l'analyse.

Suite à la faible motilité démontrée chez les sujets prélevés à Boumerdes les analyses ci-dessous ont étaient rajouter pour mieux connaitre les critères de la semence.

2.2.3. L'évaluation de la morphologie et la vitalité des spermatozoïdes :

L'étude de la morphologie des spermatozoïdes est réalisée à l'aide d'un microscope optique. Le colorant utilisé pour ce cas est l'éosine-nigrosine, le colorant est constitué d'un mélange isotonique de 10% de nigrosine et de 4% d'éosine. Il s'agit d'une coloration différentielle qui permet d'évaluer la vitalité en plus de l'observation de la morphologie des spermatozoïdes. Elle permet de distinguer les spermatozoïdes vivants qui restent incolores, ou se colorent partiellement en rose à la partie supérieure de la tête, des spermatozoïdes morts qui s'imprègnent intensément de colorant et apparaissent en rouge sur un fond rosé.

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 apparaîtra colorée.

La technique de coloration est la suivante : une goutte de semence est prélevée à l'aide d'une pipette, dans l'échantillon de sperme maintenu à 37°C à l'aide d'un bain d'eau chaude. Cette goutte est mélangée à une goutte de colorant, et le nouvel échantillon est laissé 5 minutes à 37°C. On réalise ensuite un étalement sur une lame comme on le ferait pour un frottis sanguin comme démontré dans la figure suivante :

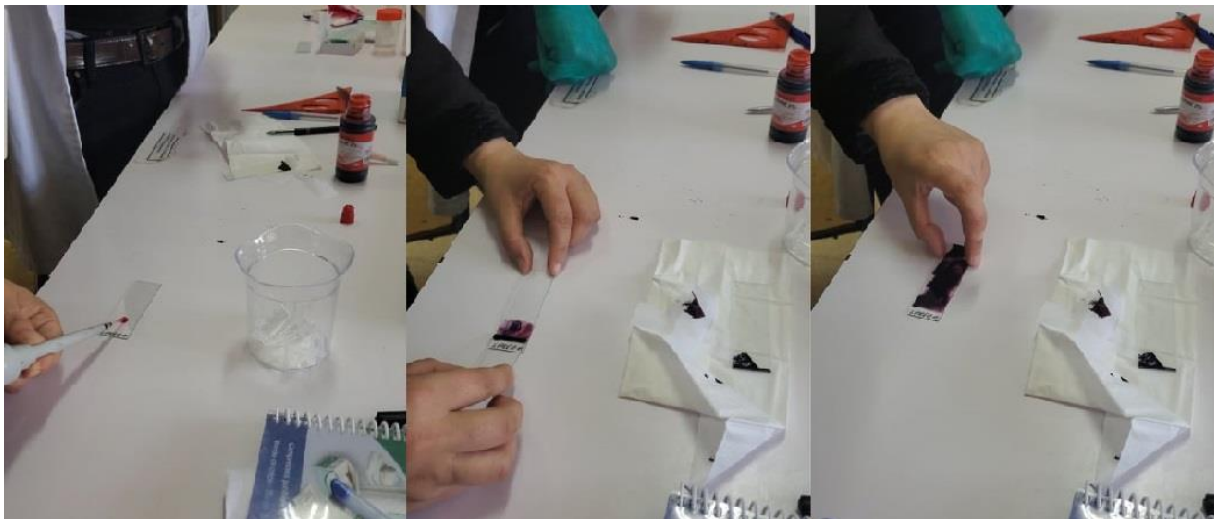


Figure 29 : Réalisation d'un frottis.

L'étude de la morphologie et la vitalité des spermatozoïdes est ensuite réalisée à l'aide d'un microscope optique possédant un système d'évaluation automatique afin de pouvoir définir le pourcentage de spermatozoïdes ne présentant pas d'anomalies morphologiques et le pourcentage de vitalité.

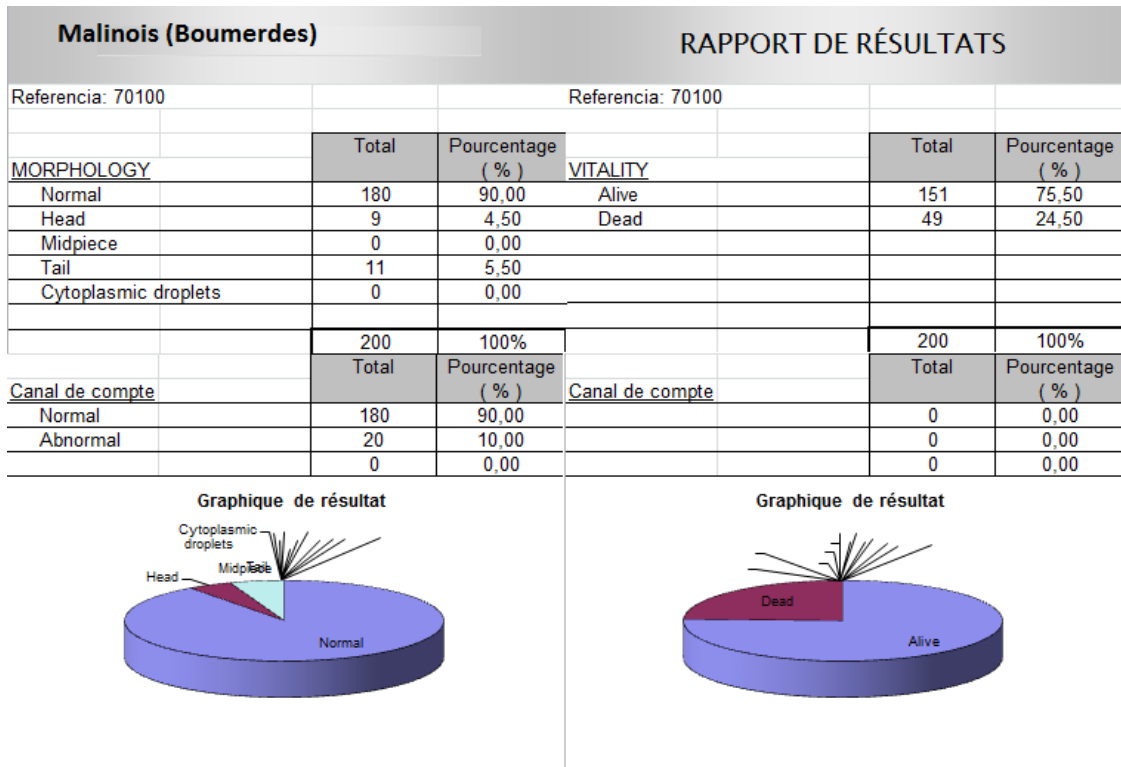
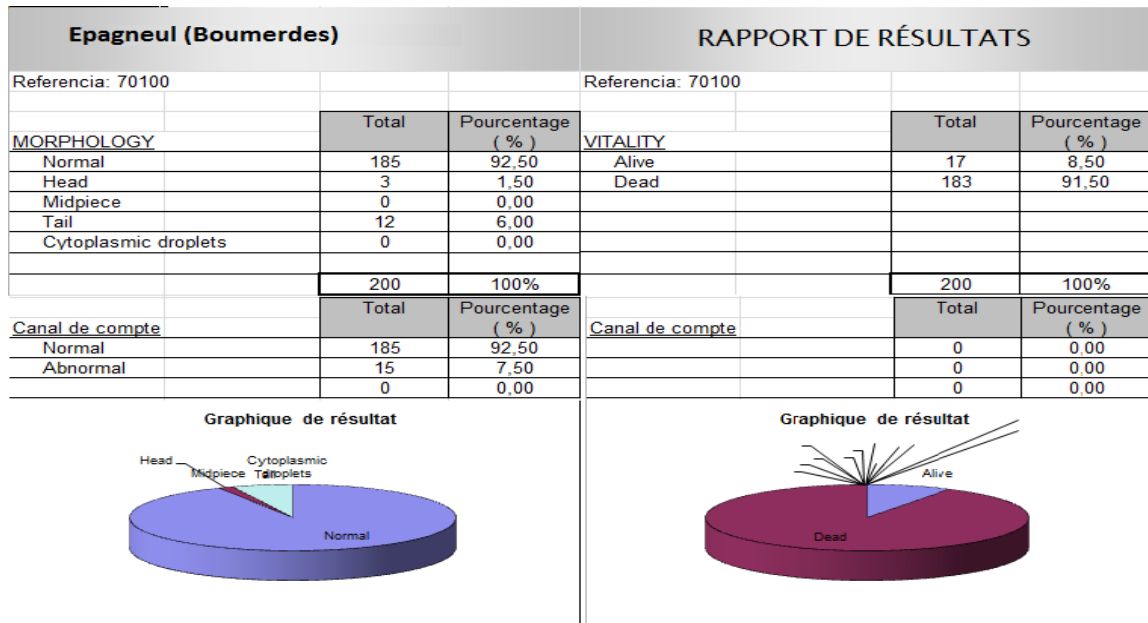


Figure 30 : Résultats de la morphologie et la vitalité des spermatozoïdes chez le malinois de Boumerdes.

2,2,3,1. Résultats :



2,2,3,2. Résultats :

Figure 31 : Résultats de la morphologie et la vitalité des spermatozoïdes chez l'épagneul de Boumerdes.

3. Discussion :

Les résultats démontrent que malgré la faible motilité mais y'a un pourcentage de spermatozoïdes vivant et qui diffèrent d'un sujet à l'autre ; chez le malinois on observe une vitalité de 75.50% alors que chez l'épagneul la vitalité est seulement à 8.50% tandis que pour la morphologie elle est bonne pour les 2 sujets (> 90%).

Dans ce cas le mieux serait de refaire les prélèvements avec un respect plus strict des conditions de travail car la mobilité et la vitalité sont deux critères sensible qui changent ou disparaissent complètement suite à un ou plusieurs facteurs.

La mobilité des spermatozoïdes, c'est-à-dire le pourcentage de spermatozoïdes mobiles, doit être évalué le plus rapidement possible, dans les 10 à 15 minutes après la récolte D'après Johnston et al. 2001, Freshman 2002, Pena Martinez 2004.

Ainsi l'évaluation de la mobilité au microscope est simple, rapide et peu onéreuse. Elle est cependant très subjective et présente d'importantes variations en fonction de l'opérateur (30 à 60%). Les biais sont nombreux (matériel sale, tube à essai non lavé avant son premier usage, mauvaise manipulation...) et peuvent engendrer une baisse de la mobilité. Les différents biais seront tout de même réduits si l'évaluation est toujours effectuée par la même personne expérimentée selon Eilts 2005.

Dans l'espèce canine, pour que la semence soit considérée de bonne qualité afin d'être congelée, la mobilité totale doit être supérieure à 70%, le pourcentage de spermatozoïdes anormaux ne doit pas dépasser 20 à 30% et la concentration doit être comprise entre 100 et 150 millions de spermatozoïdes par dose inséminante, d'après Johnston et al. 2001.

Il faudrait donc voir a utilisé un conservateur et savoir choisir le type de conservateur adéquat pour chaque situation (boite de transport, isolant thermique ou un produit de dilution par exemple : le sérum glucosé).

Choisir un meilleur moment de la journée ou la température n'est pas trop basse pour éviter d'altérer la mobilité, et présenter les sujets au laboratoire afin d'effectuer l'analyse directement après le prélèvement.

Deuxième partie Détermination de la date d'ovulation :

1. Objectifs :

Reconnaitre le moment optimum de l'insémination nécessite la détermination de la date d'ovulation. Afin de pouvoir la réaliser, on a fait une étude approfondie sur le cycle sexuel de la chienne avec connaissance de ces différentes caractéristiques : les quatre phases du cycle, les manifestations cliniques, le comportement, le profil hormonal, les modifications anatomiques de l'appareil génital, la cytologie vaginale particulière.

Pour cela les frottis vaginaux permettent de déterminer dans quelle phase du cycle se situe la chienne. Ils permettent l'analyse cytologique de la muqueuse vaginale.

2. Matériels et méthodes :

La disponibilité d'un matériel adéquat est nécessaire, qui est constitué de :

- Ecouvillon, lame, lamelle.
- Fixateur (alcool), boîtes de pétries.
- Colorants (HEMATOXYLINE, OG6, EA50)
- Microscope optique.



Figure 32 : Matériel nécessaires pour le frottis vaginal (2020)

Comme pour le mâle avant de passer à un prélèvement on devrait effectuer un examen clinique qui consiste en l'anamnèse, le TRIAS (T corporelle, pouls, fréquence respiratoire). On a pu prélever 3 chiennes de race et âge différents, les prélèvements ont été effectués au sein de la clinique de l'institut des sciences vétérinaires, puis transporter les lames dans un laboratoire d'anatomie pathologie à Alger pour la coloration et l'observation.

Tableau 11 : Tableau représentant les sujets prélevés (frottis).

| Chien | Race | Age | Caractère | TRIAS |
|-----------------|-----------------|---------|-----------|---------------|
| Husky | Husky sibérien | 8 mois | Agité | Physiologique |
| Epagneul | Epagneul breton | 18 mois | Docile | Physiologique |
| Caniche | Caniche | 11 ans | Docile | Physiologique |

2,1. La réalisation du frottis vaginal :

2.1.1. Prélèvement (Figure 33)

Le prélèvement est réalisé à l'aide d'un écouvillon d'une quinzaine de centimètres de long légèrement humidifié avec du sérum physiologique de manière à récolter plus de cellules. Celui-ci est introduit dans la vulve d'abord verticalement puis est progressivement basculé à l'horizontal et enfoncé jusqu'au milieu du vagin.

Après quelques mouvements de rotations, il est retiré lentement vers l'arrière.

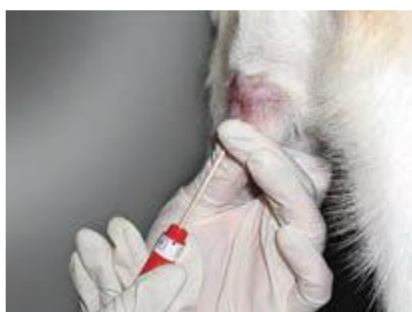


Figure 33 : réalisation du frottis vaginal.

2.1.2. Étalement (Figure 34)

Le prélèvement est étalé sur une lame propre en faisant rouler l'écouvillon. On réalise ainsi trois ou quatre lignes parallèles.



Figure 34 : étalement.

2.1.3. Fixation et coloration

Le frottis est immédiatement fixé par un mélange alcool éther puis transporter au laboratoire pour la coloration, le protocole choisit est la coloration de Papanicolaou, Réactifs utilisés : HEMATOXYLINE, OG6, EA50

Elle se caractérise par l'association d'une coloration nucléaire par l'hématoxyline de Harris à une coloration cytoplasmique différentielle :

Cellules épithéliales superficielles : rose,

Cellules intermédiaires et basales : bleu – vert, Noyau : bleu à bleu foncé

2.2. Lecture du frottis vaginal :

L'observation microscopique se réalise en deux temps. Au grossissement $\times 100$, on détermine l'aspect général du frottis, la coloration dominante. Au grossissement $\times 400$, on identifie les cellules observées (couleur, taille, forme, aspect du noyau). Dans la lecture d'un frottis vaginal, trois éléments sont considérés :

-Présence d'hématies ou de leucocytes

-Forme des cellules, présence ou absence de noyau et forme du noyau s'il existe

-Affinité tinctoriale du cytoplasme de ces cellules (bleu = basophile, jaune/orangé = acidophile)

2.2.1. Résultats :

Pour le Frottis N°01 : Réalisé sur une chienne de race Husky Agée de 8 mois le 16/02/20

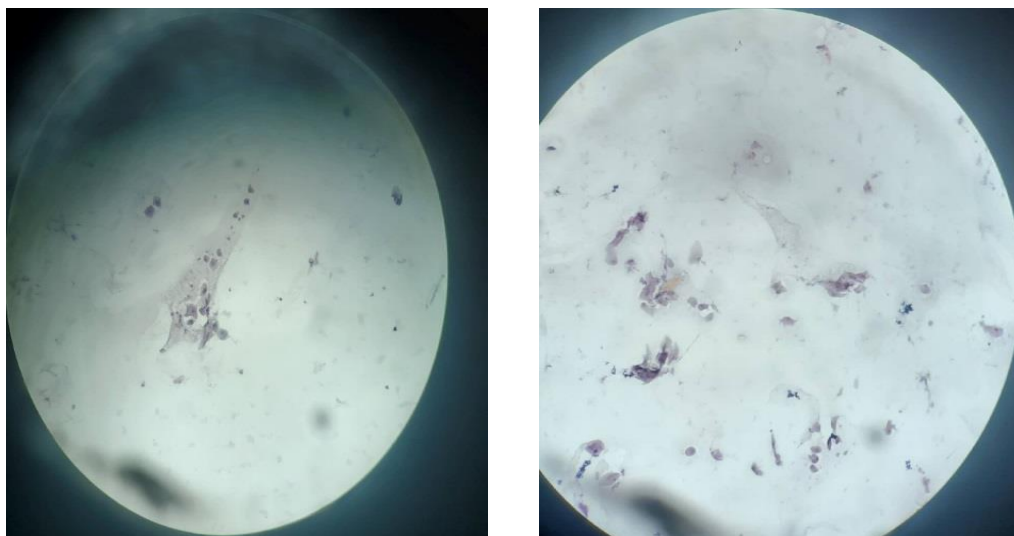


Figure 35 : Observation du frottis N°01 vaginale au grossissement $\times 100$ et au grossissement $\times 400$.

Pour le Frottis N°02 : Réalisé sur une chienne de race Epagneul Breton Agée de 18 mois le 16/02/20.

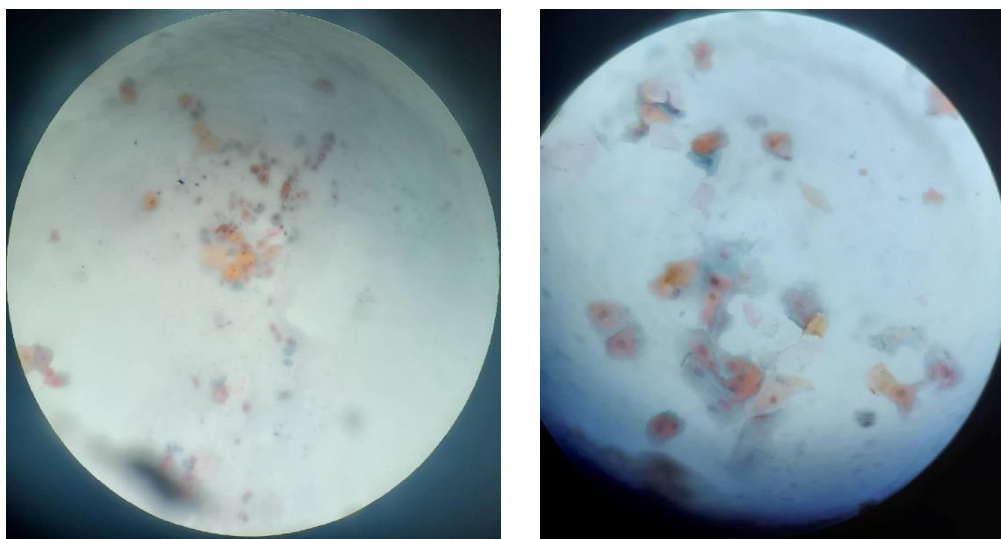


Figure 36 : Observation du frottis N°02 vaginale au grossissement $\times 100$ et au grossissement $\times 400$.

Pour le Frottis N°03 : Réalisé sur une chienne de race Caniche Agée de 11 ans le 16/02/20

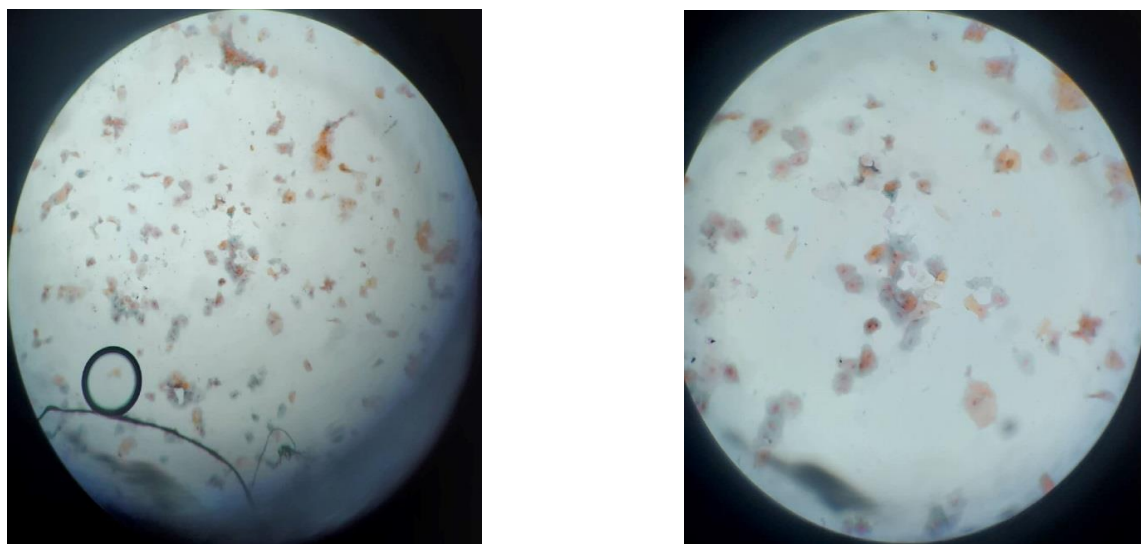


Figure 37 : Observation du frottis N°03 vaginale au grossissement $\times 100$ et au grossissement $\times 400$

3. Résultats :

Tableau 12 : Observation cytologique et déterminations de la phase du cycle.

| Frottis | Observation cytologique et déterminations de la phase du cycle |
|---------|---|
| N°01 | Le frottis est pauvre en cellules avec présence quasi exclusive de cellules basophiles, parabasales ou intermédiaires. Absence d'hématies ou de polynucléaires, ce qui nous fait dire que la chienne est en <u>An-œstrus</u> |
| N°02 | Frottis riche en cellules. Présence de cellules acidophiles, intermédiaires et superficielles, regroupées en amas, présence en nombre équivalent de cellules basophiles et éosinophiles avec présence de globules rouges dans ce cas la chienne est entre <u>le milieu du pro-œstrus</u> et <u>la fin du pro-œstrus</u> |
| N°03 | Le frottis est riche en cellules par observation microscopique on trouve qu'il y a présence de cellules superficielles kératinisées en grand nombre, cellules intermédiaires. On observe plus de 90 pour cent de cellules superficielles, on déduit alors que la chienne est en <u>Œstrus</u> |

4. Discussion :

Le frottis vaginal est simple à réaliser et efficace pour déterminer dans quelle phase du cycle se trouve la chienne, mais pour un meilleur suivi des phases du cycle il faudrait programmer plusieurs séances de prélèvements, car comme dans notre cas les 2 sujets (Épagneul et Caniche) après première analyse on découvre que le moment de l'ovulation est proche et y'avais pas de possibilité à les faire revenir que soit pour d'autres examens ou pour l'insémination artificielle.

Malgré que les frottis vaginaux s'avèrent de bons indicateurs du déroulement des chaleurs mais sont insuffisants seuls pour la détermination du moment de l'ovulation, leur utilisation reste donc indissociable des dosages de progestérone, ce qui n'a pas été possible pour nous de le réaliser suite aux inconvénients qu'on a pu rencontrer.

Conclusion et perspectives :

L'insémination artificielle est une solution aux différents problèmes rencontrés par les éleveurs lors de l'accouplement de leurs chiens tels que les affections à transmission vénérienne qui peuvent compromettre tout un élevage, difficultés anatomiques pour une saillie ou l'agressivité de la femelle envers le mâle.

L'acte de l'insémination artificielle est la partie la plus facile à réaliser, le plus important des examens à faire est la récolte, transport, analyse de la semence, pour choisir le meilleur reproducteur. Ensuite faire le suivi de chaleur pour détecter le moment optimum de l'ovulation pour assurer une insémination fécondante. Ce qu'on a pu établir c'est 70% du travail total à faire suite aux inconvénients rencontrés durant cette année.

Malgré cela on peut dire que les résultats qu'on a trouvés sont satisfaisants. Du côté des prélèvements de semence les sujets prélevés étaient bons car on n'a pas trouvé d'anomalies spécifiques qui nous laisse dire que tel sujet n'est pas fertile, seulement une diminution de la mobilité et sa s'explique avec des causes bien claires donc il suffit de refaire les analyses avec un respect plus strict des conditions de travail.

Uniquement pour l'épagneul d'Alger la présence de sang dans le prélèvement fait illusion à une affection de tractus génitale ce qui est noté comme résultats positifs du côté duquel on peut

dire que le prélèvement de semence n'est pas uniquement réalisable dans le but de l'insémination artificielle mais aussi pour la détection de maladies du tractus génitale. Du côté femelle on a prouvé la facilité de réalisation du frottis vaginale et son efficacité dans la détection de la phase du cycle et le moment de l'œstrus suite à l'analyse de la cytologie vaginale.

Malheureusement le travail n'a pas été achever jusqu'au bout donc on n'a pas pu réaliser l'insémination mais nos efforts ne s'arrêtent pas ici, comme on l'a mentionné au début ce travail est une initiation dans le monde de la recherche et de la reproduction on espère continuer nos recherches dans des études de post-graduations.

Références bibliographiques :

- ALLIMANT M. (2010)** Actualités sur les méthodes d'évaluation de la qualité de la semence de l'éta lon. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude- Bernard, Lyon, 138p.
- BARONE, R. 2001.** Anatomie comparée des mammifères domestiques. Splanchnologie II. 3^e édition. In : Appareil uro-génital. Foetus et ses annexes. Péritoine et topographie abdominale. 3^eme édition. Vigot.
- BOUCHARD, G., YOUNGQUIST, R. S., CLARK, B., CONCANNON, P. W. et BRAUN, W. F. 1991.** Estrus induction in the bitch using a combination diethylstilbestrol and FSH-P. Theriogenology. Vol. 36, n° 1, pp. 51-65.
- BRITO Leonardo F.C. (2007)** Evaluation of Stallion Sperm Morphology. Clinical Techniques in Equine Practice. Vol. 6, n° 4, p 249-264.
- BRUEMMER Jason E. (2006)** Collection and Freezing of Epididymal Stallion Sperm. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. Vol. 22, n° 3, p 677-682.
- CIRIT, Ü., BACINOGLU, S., CANGUL, I. T., KAYA, H. H., TAŞ, M. et AK, K. 2007.** The effects of a low dose of cabergoline on induction of estrus and pregnancy rates in anestrus bitches. Animal Reproduction Science. Vol. 101, n° 1-2, pp. 134-144.
- CORRE J., ROZENBAUM M. 2004** Elaboration d'un document pédagogique de reproduction canine. Thèse Méd. Vét., Alfort.
- DUMON C, FONTBONNE A, 1992,1998** Reproduction du chien et du chat. Coll. Les indispensables de l'animal de compagnie, PMCAC, 287p.
- DUMON, C. 2007.** Insémination artificielle dans l'espèce canine : actualités. Bulletin Académique Vétérinaire France. Vol. 160, n° 2, pp. 133-141.
- EILTS B.E. (2005)** Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. Theriogenology. Vol. 64, n° 3, p 685-691.
- FONTAINE, E., MIR, F., VANNIER, F., GÉRARDIN, A., ALBOUY, M., NAVARRO, C. et FONTBONNE, A. 2011.** Induction of fertile oestrus in the bitch using Deslorelin, a GnRH agonist. Theriogenology. Vol. 76, n° 8, pp. 1561-1566.
- FONTBONNE Alain et DUMON Christian (1992)** Prélèvement et examen de la semence chez le chien. In : Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat .P.M.C.A.C. Editions. 2006. Vol. 66, n° 2, pp. 470-483.
- FONTBONNE, A. 2008.** In vivo ovulation, oocyte maturation and fertilisation. Thèse de doctorat de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. pp. 116.
- FREVILLE A., 2005** Conduite à tenir en obstétrique canine et féline. Thèse Méd. Vét., Alfort.
- FUKUSHIMA, F. B., NEVES, M. M., DE OLIVEIRA CAVALCANTI, G. A., CHAVES, M. S., MASCARENHAS, GAULLIARD Laure (2008)** La congélation de la semence de chat domestique : étude bibliographique et expérimentale. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Créteil. 156p.
- HOFFMANN B. 2004,** Hormonal control of pregnancy and parturition in the dog, Proceedings of the world congress WSAVA, [<http://www.ivis.org>].
- JOHNSTON S.D., ROOT KUSTRITZ M.V. et OLSON P.N.S. (2001)** Canine and Feline Theriogenology. Saunders Company. 592p.

- KUTZLER, M. A. 2007.** Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology*. Vol. 68, n° 3, pp. 354–374.
- KUTZLER, M. A. 2005.** Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology*. Vol. 64, n° 3, pp. 766–775.
- LENNOZ M. 1978,** Physiologie de la reproduction. *Point Vet.*, 7, 11-17
- LÉVY, X. et FONTBONNE, A. 2007.** Determining the optimal time of mating in bitches : particularities. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* Vol. 31, n° 1, pp. 128–134.
- MIALOT, J. P., DUMON, C. et CASSOU, B. 1985** Insémination artificielle chez la chienne : mise en place de la semence fraîche avec le pistolet souple « Osiris ». *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*. Vol. 20, n° 3, pp. 213–220.
- NETO C.R., MONTEIRO G.A., SANCLER-SILVA Y.F.R., PAPA P., GUASTI P.N., RESENDE H.L., PAPA F.O., DELLAQUA JR. J.A. et ALVARENGA M.A. (2014)** Comparison of different freezing extenders for semen cryopreservation from stallions with poor and good semen freezability. *Journal of Equine Veterinary Science*. Vol. 1, n° 34, pp. 58-60.
- NIŻAŃSKI, W. 2012.** Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid : use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology. North America : Small Animal Practice*. Vol. 42, n° 3, pp. 439–444.
- NOAKES D.E., PARKINSON Timothy J, et ENGLAND G.C. (2009)** Veterinary reproduction and obstetrics. Ninth Edition. Saunders Elsevier. 961p.
- NÖTHLING J.O. et SHUTTLEWORTH R. (2005)** The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology*. Vol. 63, n° 5, p. 1469-1480.
- ÖLDÁG, L., FEKETE, S., CSÁKY, I. et BERSÉNYI, A. 2001.** Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist : a clinical trial. *Theriogenology*. Vol. 55, n° 8, pp. 1657–1666.
- OLIVIER S. (2008)** Récolte et conservation du sperme chez les félins : étude bibliographique. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Créteil. 201p.
- PENA MARTINEZ A.I. (2004)** Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.* Vol. 82-83, p. 209-224.
- PINTO, C. R. F, EILTS, B. E et PACCAMONTI, D. L. 15 juillet 1998.** The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. *Theriogenology*. Vol. 50, n° 2, pp. 301–305.
- PONTHIER J., VAN DEN BERGHE F., PARRILLA-HERNANDEZ S., HANZEN C. et DELEUZE S. (2014)** Congélation du sperme dans l'espèce équine: état des lieux et perspectives.
- R. M., DE ALBUQUERQUE LAGARES, M. et GHELLER, V. A. 2012.** Endoscopic transcervical intrauterine artificial insemination in Labrador Retriever bitches. *Research in Veterinary Science*. Vol. 92, n° 3, pp. 494–500.
- RIGAL F.B.G. (2008)** Comparaison de la qualité de la semence de taureaux collectés à l'électro-éjaculateur ou au vagin artificiel. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul Sabatier, Toulouse, 99p.
- RIJSSELAERE T., VAN SOOM A., HOFACK G., MAES D. et DE KRUIF A. (2004)** Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology*. Vol. 62, n° 7, pp. 1292-1306.

- RIJSSELAERE T., VAN SOOM A., TANGHE S., CORYN M., MAES D. et DE KRUIF A. (2005)** New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology*. Vol. 64, n° 3, pp. 706-719.
- ROMAGNOLI S. 2006.** Control of reproduction in dogs and cats: use and misuse of hormones. Proceedings of the world congress WSAVA, , [<http://www.ivis.org>].
- SIMPSON G., ENGLAND G.C. et HARVEY, M. (1998)** Manual of small animal reproduction and neonatology. British Small Animal Veterinary Association. Gloucester (United Kingdom). 246p.
- FRESHMAN J.L. (2002)** Semen collection and evaluation. *Clin. Tech. Small. Anim. Pract.* Vol. 17, n° 3, p 104-107.
- VERSTEGEN J., ONCLIN K. 2002,** Estrus control in the bitch. Proceedings of the world congress WSAVA, [<http://www.ivis.org>].
- VERSTEGEN, J. P, ONCLIN, K, SILVA, L. D. M et CONCANNON, P. W. 1999.** Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology*. Vol. 51, n° 3, pp. 597–611
- VOLKMANN, D. H., KUTZLER, M. A., WHEELER, R. et KREKELER, N. 2006.** The use of deslorelin implants for the synchronization of estrous in diestrous bitches. *Theriogenology*. Vol. 66, n° 6–7, pp. 1497–1501.
- WANKE, M. M., FARINA, J., LOZA, M. H., REBUELTO, M. et CONCANNON, P. W. 1997.** Induction of estrus in bitches with normal and persistent anestrus using human menopausal gonadotropin (hMG). *Theriogenology*. Vol. 47, n° 4, pp. 935–942.
- ZAMBELLI D. et CUNTO M. (2006)** Semen collection in cats: Techniques and analysis. *Theriogenology*. Vol. 66, n° 2, pp. 159-165.