

Année 2016

**INSÉMINATION ARTIFICIELLE EN SEMENCE
CONGELÉE CHEZ LA CHIENNE:
ANALYSE DES DOSSIERS DES CHIENNES SUIVIES
AU CENTRE D'ÉTUDE EN REPRODUCTION DES
CARNIVORES DE L'ÉCOLE NATIONALE
VÉTÉRINAIRE D'ALFORT (CERCA) DE JANVIER
2007 À DÉCEMBRE 2015**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

Le 23/09/2016

par

Célia Maringue

Née le 3 septembre 1990 à Lyon (Rhône)

JURY

Président : Pr. Serge PISSARD

Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL

Membres

Directeur : M. Alain FONTBONNE

Maître de Conférences à l'ENVA

Assesseur : Mme Fabienne CONSTANT

Maître de Conférences à l'ENVA

Liste des membres du corps enseignant

Directeur : M. le Professeur Gogny Marc

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs : Cotard Jean-Pierre, Mialot Jean-Paul, Moraillon Robert, Parodi André-Laurent, Pilet Charles, Toma Bernard.

Professeurs émérites : Mme et MM. : Bénét Jean-Jacques, Chermette René, Combrisson Hélène, Courreau Jean-François, Deputte Bertrand, Niebauer Gert, Paragon Bernard, Pouchelon Jean-Louis.

Département d'élevage et de pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC) Chef du département :

Pr Grandjean Dominique - Adjoint : Pr Blot Stéphane

Unité pédagogique de cardiologie - Pr Chetboul Valérie* - Dr Gkouni Vassiliki, Praticien hospitalier - Dr Séchi-Tréhiou Emilie, Praticien hospitalier Unité pédagogique de clinique équine - Pr Audigé Fabrice - Dr Bertoni Lélia, Maître de conférences - Dr Bourzac Céline, Maître de conférences contractuel - Dr Coudry Virginie, Praticien hospitalier - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Praticien hospitalier * - Dr Jacquet Sandrine, Praticien hospitalier - Dr Mespoulhès-Rivière Céline, Praticien hospitalier Unité pédagogique de médecine interne - Dr Benchekroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Campos Miguel, Maître de conférences associé - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticien hospitalier - Dr Maurey-Guénec Christelle, Maître de conférences Discipline : imagerie médicale - Dr Stambouli Fouzia, Praticien hospitalier	Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport - Dr Cléro Delphine, Maître de conférences - Dr Fontbonne Alain, Maître de conférences - Pr Grandjean Dominique* - Dr Maenhoudt Cindy, Praticien hospitalier - Dr Nudelman Nicolas, Maître de conférences Unité pédagogique de pathologie chirurgicale - Pr Fayolle Pascal - Dr Mailhac Jean-Marie, Maître de conférences - Dr Manassero Mathieu, Maître de conférences - Pr Moissonnier Pierre - Pr Viateau-Duval Véronique* - Dr Zilberstein Luca, Maître de conférences Discipline : ophtalmologie - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences Discipline : Urgences - soins intensifs - Dr Steblaj Barbara, Praticien Hospitalier Discipline : nouveaux animaux de compagnie - Dr Pignon Charly, Praticien hospitalier
--	---

Département des Productions Animales et de la Santé Publique (DPASP) Chef du département : Pr

Millemann Yves - Adjoint : Pr Dufour Barbara

Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments - Pr Augustin Jean-Christophe - Dr Bolnot François, Maître de conférences * - Pr Carlier Vincent Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie - Pr Dufour Barbara* - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Praud Anne, Maître de conférences - Dr Rivière Julie, Maître de conférences contractuel Unité pédagogique de pathologie des animaux de production - Pr Adjou Karim* - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences - Pr Millemann Yves - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences - Dr Troistsky Karine, Praticien hospitalier	Unité pédagogique de reproduction animale - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr El Bay Sarah, Praticien hospitalier - Dr Mauffré Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel - Dr Ribeiro Dos Santos Natalia, Maître de conférences contractuel Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Pr Bossé Philippe* - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Dr Leroy-Barassin Isabelle, Maître de conférences - Pr Ponter Andrew - Dr Wolgust Valérie, Praticien hospitalier
--	--

Département des sciences biologiques et pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Pr Chateau Henry - Adjoint : Dr Pilot-Storck Fanny

Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Degueurce Christophe - Pr Robert Céline* Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie - Pr Boulouis Henri-Jean* - Dr Le Poder Sophie, Maître de conférences - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences - Pr Quintin-Colonna Françoise Unité pédagogique de biochimie - Pr Bellier Sylvain* - Dr Lagrange Isabelle, Praticien hospitalier - Dr Michaux Jean-Michel, Maître de conférences Discipline : éducation physique et sportive - M. Philips Pascal, Professeur certifié Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques* - Dr Laloy Eve, Maître de conférences - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences	Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Dr Desquilbet Loïc, Maître de conférences (Biostatistique, Epidémiologie) * - Dr Fournel Christelle, Maître de conférences contractuelle (Gestion et management) Unité de parasitologie, maladies parasitaires, dermatologie - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticien hospitalier (rattachée au DEPEC) - Dr Darmon Céline, Maître de conférences contractuel (rattachée au DEPEC) - Pr Guillot Jacques* - Dr Polack Bruno, Maître de conférences - Dr Risco-Castillo Verónica, Maître de conférences Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie - Pr Enriquez Brigitte, - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences * - Pr Tissier Renaud Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences contractuel (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Dr Gilbert Caroline, Maître de conférences (Ethologie) - Pr Panthier Jean-Jacques, (Génétique) - Dr Pilot-Storck Fanny, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - - Pr Tiret Laurent, (Physiologie, Pharmacologie) *
---	---

* responsable d'unité pédagogique

REMERCIEMENTS

Au **Président du jury**,

Professeur à la faculté de médecine de Créteil,

Qui nous fait l'honneur de présider notre jury,

Hommage respectueux.

À **Monsieur Alain Fontbonne**,

Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport,

Pour m'avoir proposé ce sujet, pour la confiance que vous m'avez accordée pour ce projet de thèse,
et pour votre aide et votre gentillesse,

Très sincères remerciements.

À **Madame Fabienne Constant**,

Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Unité pédagogique de reproduction animale,

Pour avoir accepté d'être l'assesseur de cette thèse, et pour vos corrections pertinentes,

Sincères remerciements.

À mes parents, pour votre soutien tout au long de mes études, pour votre amour, votre patience aussi. Maman pour ta douceur, ta prévenance et toutes tes attentions, Papa pour m'avoir toujours donné la force de me battre, pour ta bienveillance et tes conseils. Je n'en serais pas là sans vous.

À ma sœur adorée, ma Chouquette, ma grande petite sœur, à tous nos fous rires et nos délires, à tout ce qu'on a partagé ensemble, à notre complicité qui m'est si précieuse, et que je ne veux jamais perdre. Je serais toujours là pour toi.

À ma Paupiette, ma meilleure amie, pour tous nos apéros, notre multitude de points communs, nos discussions, et surtout notre amitié rare et irremplaçable. Je te souhaite le meilleur, tu es formidable, ne l'oublie jamais. Tu vas tellement me manquer. On garde le paupiette power !

À ma grand-mère, Mamie Alice, d'avoir été toujours là pour moi, pour ton soutien et ton intérêt pour mes études, tes bons petits plats pendant le concours, ton inquiétude qui nous montre à quel point tu nous aimes.

À ma marraine, à tonton et à Jeph, Will et Meddy pour votre bonne humeur et votre générosité, et car chaque moment passé ensemble est synonyme de joie et de partage.

À mes tantes, Pascale et Agnès, pour nos discussions captivantes, pour votre ouverture d'esprit et votre compréhension, pour vos pensées tout au long de mes études, et pour tous les bons moments.

À Aude, mon Audounette, car notre amitié sera toujours présente malgré la distance, on a partagé des moments difficiles comme des fous rires, tu es une fille en or.

À Perrine, pour ta gentillesse, ta douceur, et ta sérénité, c'est toujours un plaisir de se retrouver.

À Géraldine, pour ta façon d'être, ta franchise et ta cool attitude, et à nos papotages sans fin !

À Pilou et Marc, à ta gentillesse Pilou, Marc à tes vannes. À notre équipe de choc au CHUVA, nos combats de scotch, et vos expériences colorées bizarres. Je n'aurais pas pu tomber mieux en arrivant à Alfort. Je vous kiffe les gars.

À Colline, pour ta spontanéité, ta joie de vivre, ta bonne humeur sans faille, et ton sens du partage et de la fête. Reste telle que tu es !

À Pauline, Eugénie et Aurélie, pour le groupe au top que nous avons formé à Lyon, pour notre entraide et notre solidarité (et pour votre patience avec mes chansons).

À mes poulottes, Morgane et Elodie, qui sont maintenant devenues grandes, à cet accueil passé à vos côtés, je vous souhaite énormément de bonheur et de réussite.

À Kévin, pour nos souvenirs de lycée, puis nos retrouvailles, et pour tes photos !

À Camille L., au duo de compèt' que nous avons formé pendant les nuits et à ta façon de travailler, tu es une fille adorable.

À Cécilia, pour ta bonne humeur et ta franchise présentes à tout moment!

À Audrey, pour ta compréhension dans mes choix, et pour le plaisir qu'on a à se revoir, je suis très heureuse qu'on ait gardé contact. Je te souhaite plein de bonheur avec ton p'tit bout.

À mes collègues ASV, Carine et Maud, pour votre efficacité et votre gentillesse.

À Pascal, mon cuistot préféré, pour tes « Mimiiii », ta gentillesse, et tes p'tits plats en VIP !

À toute l'équipe de la clinique des Portes de Sologne, et notamment à **Olivier C. et Soline** pour votre accueil et votre gentillesse, à **Olivier F.** pour votre disponibilité et votre patience, et à **Nathalie** pour ta bonne humeur et ton efficacité, un grand merci.

À Mamie Marie, Gilles et Christine, Johanna, Florian, toute la famille.

À mes grands-pères qui ne sont plus là mais que je n'oublie pas.

À Sandrine, Claire, Marine RC, Gaëlle B., Stella, Yorick, Sandra, Fanny, Camille R., Agnès S.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES TABLEAUX.....	7
LISTE DES GRAPHIQUES	8
INTRODUCTION.....	10
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	11
1. L'INSEMINATION ARTIFICIELLE.....	11
1.1. <i>Intérêts, indications et inconvénients de l'insémination artificielle (England et Millar, 2008), (Peña et al., 2006).....</i>	11
1.1.1. Intérêts et indications de l'insémination artificielle.....	11
1.1.2. Inconvénients	12
1.2. <i>Principes généraux de congélation de la semence (Fontbonne, 1995), (Simpson et al., 1998) 12</i>	12
1.2.1. Vérification de la qualité de la semence (Simpson et al., 1998).....	12
1.2.2. Effets de la congélation sur la semence	16
1.2.3. Etapes de la congélation.....	17
1.2.4. Résultats.....	19
1.3. <i>Effets des techniques utilisées sur les caractéristiques de la semence.....</i>	20
2. LE SUIVI DE CHALEURS CHEZ LA CHIENNE (FELDMAN ET NELSON, 2004) , (JOHNSTON ET AL., 2001).....	21
2.1. <i>Généralités (England et al., 2002)</i>	21
2.2. <i>Frottis et cytologie vaginaux</i>	21
2.2.1. Méthode de réalisation du frottis	21
2.2.2. Lecture et interprétation du frottis	22
2.2.2.1. Types cellulaires observés sur le frottis.....	23
2.2.2.2. Evolution du frottis au cours du cycle	25
2.2.3. Frottis, période fertile et ovulation.....	27
2.2.4. Avantages et inconvénients du frottis	28
2.3. <i>Suivi de la progestérone</i>	28
2.3.1. Evolution de la concentration en progestérone	28
2.3.2. Méthodes de mesure	29
2.4. <i>Echographie ovarienne.....</i>	30
2.4.1. Matériel et méthodes (Lévy et Fontbonne, 2007).....	30
2.4.2. Principe (England et al., 2002), (Lévy et Fontbonne, 2007)	30
2.4.3. Résultats.....	31
2.4.4. Avantages et inconvénients.....	32
2.4.5. Difficultés rencontrées	32
2.5. <i>Résultats de différentes études sur les méthodes de détermination du moment de l'ovulation.....</i>	32
3. LES TECHNIQUES D'INSEMINATION ARTIFICIELLE (ROOT KUSTRITZ, 2003)	33

3.1.	<i>Rappels anatomiques (Romagnoli et Lopate, 2014).....</i>	33
3.2.	<i>Insémination intravaginale.....</i>	34
3.2.1.	<i>Matériel.....</i>	34
3.2.2.	<i>Principe.....</i>	34
3.2.3.	<i>Avantages et inconvénients.....</i>	34
3.3.	<i>Insémination intra-utérine.....</i>	35
3.3.1.	<i>Technique chirurgicale par laparotomie ou laparoscopie.....</i>	35
3.3.2.	<i>Insémination trans-cervicale par méthode Scandinave ou Norvégienne.....</i>	36
3.3.3.	<i>Insémination trans-cervicale par endoscopie.....</i>	37
3.4.	<i>Comparaison des différentes techniques d'insémination artificielle en semence congelée</i> <i>38</i>	
3.5.	<i>Résultats en fonction du nombre d'inséminations réalisées.....</i>	39
4.	<i>CONCLUSION.....</i>	40
PARTIE 2 : ETUDES DES DOSSIERS DES CHIENNES DU CERCA.....		41
1.	<i>METHODES UTILISEES AU CERCA.....</i>	41
1.1.	<i>Objectifs de l'étude.....</i>	41
1.2.	<i>Protocole de suivi de chaleur.....</i>	41
1.3.	<i>Protocole de congélation de la semence.....</i>	41
1.4.	<i>Méthodes d'insémination.....</i>	41
2.	<i>MATERIEL ET METHODES.....</i>	42
2.1.	<i>Recueil et enregistrement des données.....</i>	42
2.2.	<i>Animaux.....</i>	42
2.3.	<i>Critères d'exclusion.....</i>	42
2.4.	<i>Analyse statistique.....</i>	42
2.5.	<i>Suivi de chaleurs.....</i>	42
2.6.	<i>Qualité de la semence.....</i>	43
3.	<i>RESULTATS.....</i>	43
3.1.	<i>Paramètres concernant la femelle.....</i>	43
3.1.1.	<i>Taux de gestation.....</i>	43
3.1.2.	<i>Calcul d'un taux de gestation corrigé.....</i>	44
3.1.3.	<i>Durée de gestation.....</i>	44
3.1.4.	<i>Prolificité.....</i>	44
3.1.5.	<i>Pourcentage de mâles, de femelles et sex-ratio.....</i>	45
3.1.6.	<i>Age moyen.....</i>	46
3.1.6.1.	<i>Nombre de chiennes inséminées en fonction de l'âge.....</i>	46
3.1.6.2.	<i>Taux de gestation en fonction de l'âge.....</i>	46
3.1.6.3.	<i>Prolificité en fonction de l'âge de la chienne.....</i>	47
3.1.7.	<i>Groupe cynophile.....</i>	48
3.1.7.1.	<i>Répartition des chiennes selon le groupe cynophile.....</i>	48
3.1.7.2.	<i>Taux de gestation en fonction du groupe cynophile.....</i>	48
3.1.7.3.	<i>Prolificité en fonction du groupe cynophile.....</i>	49
3.1.8.	<i>Poids.....</i>	50
3.1.8.1.	<i>Répartition des chiennes en fonction du poids.....</i>	50

3.1.8.2. Taux de gestation en fonction du poids	50
3.1.8.3. Prolificité en fonction du poids	51
3.1.9. Antécédents d'infertilité.....	52
3.1.10. Rang de portée.....	52
3.1.10.1. Taux de gestation en fonction du rang de portée.....	52
3.1.10.2. Prolificité moyenne en fonction du rang de portée.....	54
3.1.11. Qualité du suivi de chaleurs	55
3.1.11.1. Répartition du nombre de chiennes en fonction de la qualité du suivi de chaleur	55
3.1.11.2. Taux de gestation en fonction de la qualité du suivi de chaleur.....	55
3.1.12. Taux de progestérone le jour de l'insémination artificielle.....	56
3.1.12.1. Taux de progestérone moyen.....	56
3.1.12.2. Taux de progestérone en fonction de la réussite de l'IAC	56
3.1.13. Diagnostic de gestation	57
3.2. Paramètres concernant l'insémination artificielle.....	57
3.2.1. Méthode d'insémination	57
3.2.1.1. Nombre de chiennes en fonction de la méthode d'insémination.....	57
3.2.1.2. Taux de gestation en fonction de la méthode d'insémination	58
3.2.1.3. Prolificité en fonction de la méthode d'insémination.....	59
3.2.2. Date de l'insémination	60
3.2.2.1. Répartition des chiennes en fonction de la date d'insémination	60
3.2.2.2. Taux de gestation en fonction de la date d'insémination	61
3.2.3. Nombre d'inséminations artificielles.....	61
3.2.3.1. Répartition des chiennes en fonction du nombre d'insémination.....	61
3.2.3.2. Taux de gestation en fonction du nombre d'insémination	62
3.2.3.3. Prolificité en fonction du nombre d'insémination artificielle	63
3.2.4. Année de réalisation de l'IAC.....	64
3.2.4.1. Répartition des chiennes en fonction de l'année de réalisation de l'IAC.....	64
3.2.4.2. Taux de gestation en fonction de l'année de réalisation de l'IAC.....	64
3.2.4.2.1. Episodes antérieurs d'infertilité en fonction de l'année	65
3.2.4.2.2. Nombre d'inséminations réalisées.....	66
3.2.4.2.3. Délai entre insémination et ovulation.....	66
3.2.4.2.4. Taux de progestérone au moment de l'insémination.....	67
3.2.4.2.5. Age des chiennes	68
3.2.4.2.6. Rang de portée	69
3.2.4.2.7. Qualité du suivi de chaleurs	69
3.2.4.2.8. Qualité de la semence	70
3.2.4.2.9. Mobilité des spermatozoïdes	71
3.2.4.2.10. Bilan	72
3.2.4.3. Difficultés rencontrées lors de l'insémination	72
3.2.4.4. Tranquillisation	72
3.2.4.5. Reflux.....	73
3.5. Paramètres concernant la semence	74
3.5.2. Provenance de la semence	74
3.5.3. Conditionnement de la semence	75

3.5.3.10. Répartition des chiennes en fonction du conditionnement de la semence	75
3.5.3.11. Taux de gestation en fonction du conditionnement de la semence	75
3.5.4. Dose inséminante	76
3.5.4.10. Répartition du nombre de chiennes en fonction de la dose inséminante.....	76
3.5.4.11. Taux de gestation en fonction de la dose inséminante	77
3.5.4.12. Prolificité en fonction de la dose inséminante.....	77
Les résultats sont présentés sur le Graphique 48.....	77
3.5.5. Mobilité totale des spermatozoïdes.....	78
3.5.5.10. Répartition des chiennes en fonction de la mobilité totale	78
3.5.5.11. Taux de gestation en fonction de la mobilité totale des spermatozoïdes :	79
3.5.5.12. Prolificité en fonction de la mobilité totale des spermatozoïdes	80
3.5.6. Qualité de la semence	80
3.5.6.10. Répartition des chiennes en fonction de la qualité de la semence inséminée.....	80
3.5.6.11. Taux de gestation en fonction de la qualité de la semence inséminée	81
3.5.6.12. Prolificité et écart-type en fonction de la qualité de la semence inséminée	82
3.5.7. Date de congélation de la semence	82
3.5.7.10. Date de congélation de la semence	82
3.5.7.11. Délai entre la date de congélation et la date d'insémination	84
4. BILAN :	86
PARTIE 3 : DISCUSSION.....	87
1. RECUEIL DES DONNEES :	87
2. ECHANTILLON D'ETUDE :	87
3. PARAMETRES DE REPRODUCTION CONCERNANT LA FEMELLE :	87
3.1. Taux de gestation :	87
3.1.1. Rappel des résultats obtenus :	87
3.1.2. Comparaison des résultats.....	88
3.2. Durée de la gestation.....	88
3.3. Prolificité.....	89
3.4. Sex ratio.....	90
3.5. Age.....	90
3.6. Groupe cynophile	90
3.7. Poids de la chienne.....	90
3.8. Antécédents d'infertilité.....	91
3.9. Rang de portée.....	91
3.10. Qualité du suivi de chaleurs	91
3.11. Taux de progestérone en fonction de la réussite de l'IAC	91
3.12. Diagnostic de gestation	92
4. PARAMETRES DE REPRODUCTION CONCERNANT L'IAC	92
4.1. Méthode d'insémination	92
4.2. Date de réalisation de l'insémination	93
4.3. Nombre d'inséminations.....	93
4.4. Année de réalisation de l'IAC	94
4.5. Difficultés rencontrées lors de l'insémination.....	94

4.6.	<i>Reflux</i>	94
5.	PARAMETRES CONCERNANT LA SEMENCE	95
5.1.	<i>Provenance de la semence</i>	95
5.2.	<i>Conditionnement de la semence</i>	96
5.3.	<i>Dose inséminante</i>	96
5.4.	<i>Mobilité totale des spermatozoïdes</i>	96
5.5.	<i>Qualité de la semence</i>	97
5.6.	<i>Date de congélation de la semence</i>	97
CONCLUSION		98
BIBLIOGRAPHIE		100
LISTE DES ANNEXES		103

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Grille de comptage, d'après Canine and Feline Theriogenology	13
Figure 2 : Schéma d'un spermatozoïde, d'après Canine and Feline Theriogenology.....	14
Figure 3 : Exemples d'anomalies morphologiques, d'après Canine and Feline Theriogenology	15
Figure 4 : Méthode de réalisation du frottis, d'après Canine and Feline Theriogenology	22
Figure 5 : Schéma (à gauche) et photo (à droite) d'une cellule parabasale au grossissement x1000, d'après Canine and Feline Theriogenology	23
Figure 6 : Schéma (à gauche) et photo (à droite) d'une cellule petite intermédiaire au grossissement x1000, d'après Canine and Feline Theriogenology.....	23
Figure 7 : Schéma (à gauche) et photo (à droite) d'une cellule grande intermédiaire au grossissement x1000, d'après Canine and Feline Theriogenology.....	24
Figure 8 : Schémas d'une cellule superficielle, d'après Canine and Feline Theriogenology.....	24
Figure 9 : Photos d'une cellule superficielle au grossissement x1000, d'après Canine and Feline Theriogenology.....	24
Figure 10 : Photo d'une cellule metœstrale au grossissement x 1000, d'après Canine and Feline Theriogenology	25
Figure 11 : Frottis d'œstrus, au grossissement x400, d'après Canine and Feline Theriogenology...	25
Figure 12 : Frottis de pro-œstrus, au grossissement x400, d'après Canine and Feline Theriogenology	26
Figure 13 : Frottis d'œstrus, au grossissement x400, d'après Canine and Feline Theriogenology	26
Figure 14 : Frottis de diœstrus, au grossissement x400, d'après Canine and Feline Theriogenology	27
Figure 15 : Echographie ovarienne A : aspect de l'ovaire un jour avant l'ovulation, B : collapsus folliculaire, d'après A.Fontbonne	31
Figure 16 : Vue dorsale de la conformation interne de l'appareil génital de la chienne, d'après Barone	33
Figure 17 : Méthode norvégienne de cathéterisme utérin, d'après Fontbonne A.	36

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Evolution du frottis au cours du cycle	27
Tableau 2: Valeur de la progestérone au moment de l'ovulation selon différentes études	29
Tableau 3 : Taux de gestation obtenu en fonction de la méthode d'IAC utilisée selon les études	39
Tableau 4 : Taux de gestation de différentes études en fonction du nombre d'inséminations réalisées	39
Tableau 5 : Calcul du taux de gestation	43
Tableau 6 : Calcul du taux de gestation corrigé	44
Tableau 7 : Prolificité minimale et maximale en fonction du poids	51
Tableau 8: Résultats du CERCA de 2007 à 2015	88

LISTE DES GRAPHIQUES

Graphique 1 : Diagramme en boîte représentant la prolificité.....	45
Graphique 2 : Répartition du nombre de chiennes en fonction du nombre de chiots mis bas.....	45
Graphique 3 : Répartition du nombre de chiennes inséminées en fonction de l'âge	46
Graphique 4 : Taux de gestation en fonction de l'âge de la chienne.....	47
Graphique 5 : Prolificité moyenne et écart-type en fonction de l'âge.....	47
Graphique 6 : Répartition du nombre de chiennes inséminées en IAC fonction du groupe cynophile	48
Graphique 7 : Taux de gestation en fonction du groupe cynophile	49
Graphique 8 : Prolificité moyenne et écart-type en fonction du groupe cynophile	49
Graphique 9 : Répartition du nombre de chiennes en fonction du poids.....	50
Graphique 10 : Taux de gestation en fonction du poids	50
Graphique 11 : Prolificité moyenne et écart-type en fonction du poids	51
Graphique 12 : Taux de gestation en fonction des épisodes d'infertilité ultérieurs	52
Graphique 13 : Taux de gestation en fonction de la parité	53
Graphique 14 : Taux de gestation en fonction du rang de portée	53
Graphique 15 : Prolificité moyenne et écart-type en fonction de la parité	54
Graphique 16 : Prolificité moyenne et écart-type en fonction du rang de portée	54
Graphique 17 : Répartition du nombre de chiennes en fonction de la qualité du suivi de chaleur.....	55
Graphique 18 : Taux de gestation en fonction de la qualité du suivi de chaleur	56
Graphique 19 : Taux de progestérone et écart-type le jour de la 1ère IAC en fonction de la réussite de l'IAC.....	57
Graphique 20 : Répartition du nombre de chiennes en fonction de la méthode d'insémination.....	58
Graphique 21 : Taux de gestation en fonction de la méthode d'insémination utilisée.....	59
Graphique 22 : Prolificité moyenne et écart-type en fonction de la méthode d'insémination	59
Graphique 23: Répartition du nombre de chiennes en fonction du délai entre l'IA1 et l'estimation du moment de l'ovulation	60
Graphique 24 : Répartition du nombre de chiennes en fonction du délai entre l'IA2 et l'estimation du moment de l'ovulation	60
Graphique 25 : Taux de gestation en fonction du délai entre l'IA1 et l'estimation du moment de l'ovulation	61
Graphique 26 : Répartition du nombre de chiennes en fonction du nombre d'IAC réalisées.....	62
Graphique 27 : Taux de gestation en fonction du nombre d'IAC réalisées	62
Graphique 28 : Prolificité moyenne et écart-type en fonction du nombre d'IAC réalisées	63
Graphique 29 : Répartition du nombre de chiennes en fonction de l'année de l'IAC	64
Graphique 30 : Taux de gestation en fonction de l'année de réalisation de l'IAC	65
Graphique 31 : Pourcentage de chiennes ayant des antécédents d'infertilité en fonction de l'année...	65
Graphique 32 : Pourcentage de chiennes ayant eu 1 ou 2 IA en fonction de l'année	66
Graphique 33 : Pourcentage de chiennes inséminées à 2 ou 3-4 jours après ovulation en fonction de l'année	67
Graphique 34 : Pourcentage de chiennes ayant un taux de progestérone >30 ng/mL ou <30 ng/mL en fonction de l'année	68
Graphique 35 : Pourcentage de chiennes de plus ou moins de 6 ans en fonction de l'année.....	68

Graphique 36 : Pourcentage de chiennes primipares ou multipares en fonction de l'année	69
Graphique 37 : Pourcentage de chiennes ayant eu un suivi de chaleurs A ou B/C en fonction de l'année	70
Graphique 38 : Pourcentage de chiennes inséminées avec une semence A ou B/C en fonction de l'année	71
Graphique 39 : Pourcentage de chiennes inséminées avec une semence >50% ou <50% de mobilité en fonction de l'année	72
Graphique 40 : Taux de gestation en fonction de la réalisation ou non d'une tranquillisation	73
Graphique 41 : Taux de gestation en fonction de la visualisation d'un reflux ou non	73
Graphique 42 : Provenance de la semence	74
Graphique 43: Taux de gestation en fonction de la provenance de la semence	74
Graphique 44 : Répartition du nombre de chiennes en fonction du conditionnement de la semence	75
Graphique 45 : Taux de gestation en fonction du conditionnement de la semence	76
Graphique 46 : Répartition du nombre de chiennes en fonction de la dose inséminante	76
Graphique 47 : Taux de gestation en fonction de la dose inséminante	77
Graphique 48 : Répartition des chiennes en fonction de la mobilité totale des spermatozoïdes	79
Graphique 49 : Taux de gestation en fonction de la mobilité totale des spermatozoïdes	79
Graphique 50: Prolificté moyenne et écart-type en fonction de la mobilité totale des spermatozoïdes de la semence inséminée	80
Graphique 51 : Répartition des chiennes en fonction de la mobilité des spermatozoïdes	81
Graphique 52 : Taux de gestation en fonction de la qualité de la semence inséminée	81
Graphique 53 : Prolificté moyenne et écart-type en fonction de la qualité de la semence	82
Graphique 54: Nombre de chiennes en fonction de la date de congélation de la semence	83
Graphique 55 : Nombre de chiennes en fonction de la date de congélation de la semence au CERCA	83
Graphique 56 : Taux de gestation en fonction de la date de congélation de la semence	84
Graphique 57 : Taux de gestation en fonction de la date de congélation de la semence au CERCA	84
Graphique 58 : Répartition du nombre de chiennes en fonction du délai entre la congélation de la semence et l'insémination	85
Graphique 59 : Taux de gestation en fonction du délai entre la congélation de la semence et l'insémination	85

INTRODUCTION

L'insémination artificielle en semence congelée en espèce canine est pratiquée par des centres de reproduction et d'insémination, tels que le CERCA, et par certains vétérinaires spécialistes ; et est utilisée essentiellement en élevage et en sélection, afin d'apporter une amélioration des races et des lignées futures.

La congélation assure en effet la conservation et la disponibilité des patrimoines génétiques, donnant ainsi à deux individus la possibilité de transmettre leurs qualités phénotypiques et génétiques, malgré leur éloignement géographique ou l'indisponibilité temporaire ou définitive du mâle (décès, maladie...).

Au cours du temps, les méthodes de suivi de chaleurs et les techniques d'insémination ont évolué et sont devenues de plus en plus précises et rigoureuses, pour permettre l'obtention de résultats optimaux.

Le CERCA (Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores de l'école nationale vétérinaire d'Alfort) est un des principaux centres de reproduction pratiquant l'insémination artificielle et la congélation de la semence canine en France. Du fait du nombre important de propriétaires et d'éleveurs se présentant au CERCA chaque année, de nombreuses informations ont pu être recueillies depuis plusieurs années.

Le but de cette thèse est d'étudier les dossiers du CERCA, afin de présenter les résultats des inséminations artificielles en semence congelée entre 2007 et 2015, et de répertorier les paramètres essentiels à l'obtention d'un taux de gestation optimal, tout en les comparant aux résultats obtenus par d'autres centres d'insémination canine.

Dans un premier temps, nous détaillerons les indications de l'insémination artificielle en semence congelée, ainsi que les moyens à mettre en œuvre pour détecter le meilleur moment pour inséminer, et nous décrirons les principes et méthodes de l'insémination.

Ensuite, les résultats concernant les chiennes inséminées en semence congelée au CERCA seront étudiés, et présentés en fonction des différents paramètres répertoriés concernant les femelles, la semence, et l'insémination, et pouvant influencer le taux de gestation.

Enfin, nous discuterons des résultats obtenus, en les comparant aux résultats d'autres centres d'insémination, et à ceux obtenus par le CERCA auparavant, et en proposant des moyens de les améliorer.

1. L'insémination artificielle

1.1. Intérêts, indications et inconvénients de l'insémination artificielle (England et Millar, 2008), (Peña *et al.*, 2006)

1.1.1. Intérêts et indications de l'insémination artificielle

- **Indications thérapeutiques :**

- L'insémination empêche la transmission de maladies infectieuses ou contagieuses (Herpesvirus canin, vaginite, balanoposthite...), traitement possible de la semence avant insémination.
- L'insémination peut être réalisée lorsque l'accouplement spontané est impossible :
 - ➔ Lors de disproportion mâle/femelle.
 - ➔ Lorsque l'accouplement spontané est impossible du fait de la femelle, d'origine comportementale (refus du mâle, agressivité, dominance), ou d'origine anatomique (malformation des voies génitales, contraction des muscles vaginaux, rétrécissement vaginal, hyperplasie de la muqueuse vaginale).
 - ➔ Lorsque l'accouplement spontané est impossible du fait du mâle, d'origine comportementale (inexpérience, libido insuffisante) ou d'origine anatomique (douleur lors du chevauchement, petitesse du pénis, adhérence entre le prépuce et le pénis, rétrécissement de l'orifice du prépuce).

- **Indications zootechniques :**

- L'insémination est utile lorsque la distance géographique est importante entre le mâle et la femelle.
- Lorsque les races sont à très faible effectif, la recherche des partenaires est difficile, et est simplifiée par l'insémination.
- De plus, le contrôle de la qualité du sperme avant l'insémination permet d'ajuster la dose à inséminer.

- **Intérêt génétique :**

L'insémination a un rôle très important dans la génétique :

- Elle permet un choix varié des reproducteurs, favorise les échanges internationaux de semence, augmente la multiplicité et l'accessibilité à des patrimoines génétiques variés, autres que ceux de l'élevage.
- Elle autorise la conservation de gènes et de patrimoines génétiques des mâles (même lorsque l'animal est trop âgé pour se reproduire, décédé, indisponible temporairement ou définitivement).
- Elle intervient dans la sauvegarde des races en voie de disparition.

1.1.2. Inconvénients

- Il existe un risque de traumatisme ou de lésion des voies génitales femelles lors de la réalisation de l'insémination artificielle et de transmission de maladies héréditaires.
- En cas d'utilisation trop importante d'un mâle dans un programme d'élevage, l'amélioration génétique sera limitée.
- Des erreurs de filiation sont possibles.

BILAN : Intérêts et inconvénients de l'insémination artificielle

- **Intérêts** : L'insémination artificielle et la congélation de la semence ont, en plus des indications thérapeutiques et zootechniques, un **intérêt génétique**, et permettent à l'éleveur à la fois de conserver un patrimoine génétique mâle et d'avoir accès à un large patrimoine génétique.
- **Inconvénients** : L'inconvénient majeur est l'utilisation trop fréquente d'un seul mâle dans un élevage, s'opposant à l'amélioration génétique.

1.2. Principes généraux de congélation de la semence (Fontbonne, 1995), (Simpson *et al.*, 1998)

Les inséminations artificielles peuvent être réalisées avec plusieurs types de semence : de la semence fraîche, de la semence refroidie conservée pendant quelques jours, ou de la semence congelée.

1.2.1 Vérification de la qualité de la semence (Simpson *et al.*, 1998)

- Après avoir prélevé le mâle, et avant de congeler la semence, la vérification de la qualité est indispensable.
- D'après Thomassen *et al.*, l'utilisation d'une semence de meilleure qualité, c'est-à-dire avec une mobilité importante et un pourcentage de spermatozoïdes anormaux faible, en semence congelée, permet d'obtenir un meilleur taux de gestation (Thomassen *et al.*, 2006).

En accord avec l'étude précédente, Mickelsen *et al.* (Mickelsen *et al.*, 1993) ont mis en évidence que le taux de gestation était influencé par le nombre total de spermatozoïdes progressivement mobiles ou normaux morphologiquement, et que la taille de la portée n'était pas dépendante ni de la mobilité ni de la morphologie.

⇒ Ceci montre l'importance de contrôler la qualité de la semence après l'avoir prélevée, et juste avant l'insémination si la semence est congelée.

- **Volume :**

Le volume récolté est variable, et permet de connaître la dose à inséminer. Il varie de 1 à 50 mL en fonction des individus, et est essentiellement dépendant du volume de la fraction prostatique.

- **Aspect macroscopique :**

La couleur et l'opacité donnent une indication sur la densité de l'éjaculat. Une semence est normalement blanche et opalescente.

Une couleur jaunâtre correspond à une contamination par de l'urine, ou à une inflammation.

Une couleur rougeâtre correspond à la présence de sang, provenant soit du pénis soit de la prostate.

Un aspect clair et relativement transparent est en faveur d'une azoospermie.

- **Densité/Concentration :**

La concentration varie de 4 à 400 millions de spermatozoïdes par millilitre, et dépend de la quantité de liquide prostatique récolté.

La concentration en spermatozoïdes est évaluée par une chambre de comptage (hémocytomètre).

- ***Hémocytomètre*** : La semence est aspirée dans une pipette de 20µL, et est diluée avec 2 mL de dilueur. La semence diluée est déposée dans les chambres de l'hémocytomètre, et une grille de comptage (Figure 1) permet de compter le nombre de spermatozoïdes au microscope au grossissement x10.

La grille est composée de 9 carrés, et chaque carré de 25 petits carreaux de 1 mm.

Le nombre de spermatozoïdes comptabilisés dans le carré central (en rouge sur la Figure 1) de la grille est la concentration en millions de spermatozoïdes par mL.

Figure 1 : Grille de comptage, d'après Canine and Feline Theriogenology



⇒ A l'aide du volume et de la concentration mesurés, le nombre total de spermatozoïdes dans l'échantillon est déterminé. Le nombre total de spermatozoïdes dans un éjaculat varie de 300 millions à 2 000 milliards. Le nombre de spermatozoïdes à inséminer varie en fonction du type de semence utilisée (fraîche, réfrigérée, congelée). Lors d'utilisation de semence congelée, une concentration de 100 à 200 millions de spermatozoïdes/mL est nécessaire.

- **Mobilité, mobilité progressive, et vitesse :**

- **Mesure :**

- ➔ Elles sont évaluées par visualisation au microscope au grossissement 100. La lame sur laquelle la semence est déposée doit être préalablement réchauffée, pour ne pas sous-estimer les valeurs.
- ➔ La mobilité doit être évaluée aussitôt que la semence a été déposée sur la lame.
- ➔ La vitesse doit être rapide, et le mouvement des spermatozoïdes doit être rectiligne et linéaire. Les mouvements circulaires sont souvent corrélés à des anomalies morphologiques.
- ➔ La mobilité progressive correspond au nombre de spermatozoïdes ayant une progression vers l'avant.

- **Valeurs attendues :**

- ➔ La mobilité doit être supérieure à 70% en semence fraîche. Une diminution de la mobilité traduit le plus souvent une infection de l'appareil génital ou une atteinte testiculaire.
- ➔ La vitesse est gradée à l'aide d'une échelle allant de 0 à 5, et doit être comprise entre 3 et 5.
- ➔ La mobilité progressive doit être au minimum de 50%. Elle est diminuée par la congélation et est augmentée après 5 jours de repos sexuel, et par l'addition de dilueur.

⇒ La mobilité progressive est un indicateur fiable de la qualité de la semence, plus que la viabilité des spermatozoïdes.

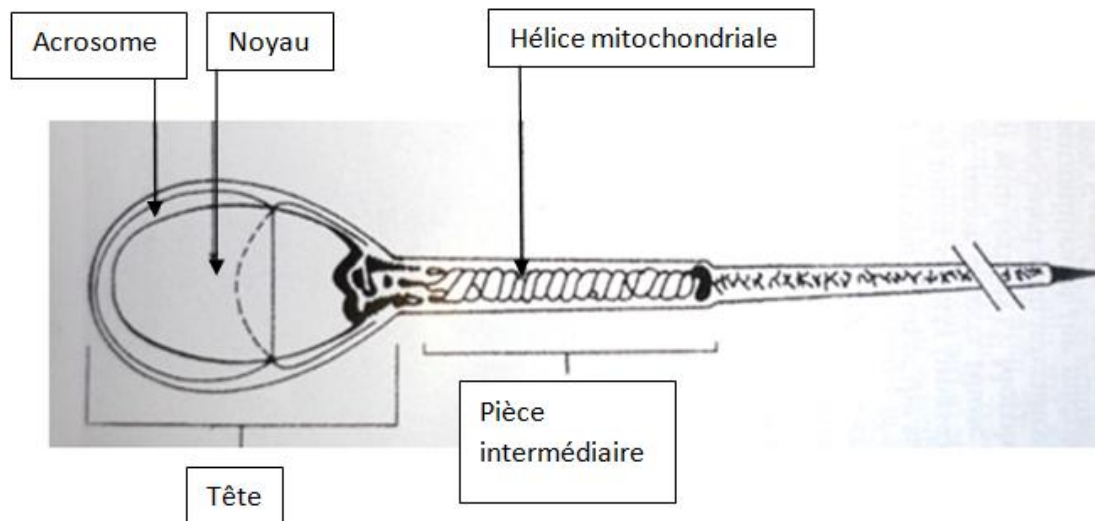
- **Morphologie (**

-

- **Figure 2) :**

Si un mâle n'a pas été prélevé depuis longtemps, le nombre de spermatozoïdes anormaux est plus important (car les spermatozoïdes sont plus âgés). Cependant si un deuxième prélèvement est réalisé peu après le premier (dans les 2 heures), le nombre de spermatozoïdes est diminué.

Figure 2 : Schéma d'un spermatozoïde, d'après Canine and Feline Theriogenology



- **Mesure :**

La morphologie correspond au pourcentage de spermatozoïdes normaux. Elle est évaluée après coloration, au microscope, à l'objectif à immersion (x1000). Cent spermatozoïdes sont observés, et le nombre et le type d'anomalie sont comptabilisés et répertoriés.

- **Valeurs attendues :**

Le pourcentage de spermatozoïdes normaux doit être supérieur à 70%. La morphologie influence la mobilité des spermatozoïdes.

- **Anomalies morphologiques (Figure 3) :**

➔ Anomalies majeures : anomalies pendant la spermatogenèse dans le testicule

- Tête : anomalie de taille ou de forme
- Pièce intermédiaire : courbure ou fixation abaxiale
- Gouttelettes cytoplasmiques proximales
- Partie du spermatozoïde en double (deux têtes/deux flagelles...)

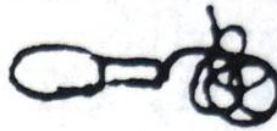
➔ Anomalies mineures : anomalies pendant la maturation épидидymaire, pendant l'avancée dans les canaux déférents ou l'urètre ; ou anomalies pendant le prélèvement ou la préparation de la semence :

- Flagelle : courbé, enroulé
- Têtes détachées
- Gouttelettes cytoplasmiques distales

Figure 3 : Exemples d'anomalies morphologiques, d'après Canine and Feline Theriogenology



Anomalie de la tête : double



Anomalie de la queue : enroulée proximale



Anomalie de la pièce intermédiaire : gouttelette distale

BILAN : Evaluation de la qualité de la semence

La vérification de la qualité de la semence est fondamentale avant toute insémination, une semence de qualité est nécessaire pour obtenir une gestation. Les différents paramètres de qualité seront pris en compte notamment pour déterminer la dose à inséminer.

Les paramètres de qualité de la semence et les valeurs attendues sont :

- **Le volume** de semence
- **L'aspect macroscopique** : blanc et opalescent
- **La concentration** : 100 à 200 millions de spermatozoïdes/mL pour de la semence congelée
- **La mobilité** : > 70%
- **La mobilité progressive** : > 50%
- **La vitesse** : comprise entre 3 et 5
- **La morphologie** : pourcentage de spermatozoïdes normaux >70%

1.2.2. Effets de la congélation sur la semence

- **Effets physico-chimiques de la congélation sur la semence :**

La congélation est à l'origine d'une baisse du métabolisme

La congélation et la décongélation peuvent entraîner, lorsqu'elles sont mal maîtrisées, une mortalité importante des spermatozoïdes :

- **Congélation trop rapide** : des cristaux de glace se forment en position intra-cellulaire, et aboutissent à la mort du spermatozoïde.

- **Congélation trop lente** : l'eau du dilueur cristallise, par conséquent le reste de la solution est hypertonique. Cela crée un appel d'eau hors des spermatozoïdes, et entraîne une contraction cellulaire et des dégradations membranaires.
- **Décongélation trop lente** : les petits cristaux contenus dans le spermatozoïde recristallisent et forment des cristaux plus volumineux qui endommagent la cellule.
- **Décongélation trop rapide** : cela crée un stress osmotique, et le spermatozoïde se gonfle d'eau présente dans le milieu extracellulaire.

- **Influence de la congélation sur la qualité de la semence :**

La qualité de la semence est toujours vérifiée avant la congélation. En effet, la congélation altère la semence, donc une qualité minimale est nécessaire.

- **Sur la mobilité** : Varesi *et al.* (Varesi *et al.*, 2014) ont analysé les effets de la congélation sur les spermatozoïdes de la fraction épидидymaire de la semence, et ont mis en évidence que la mobilité était significativement plus élevée avec de la semence fraîche (74.5% de spermatozoïdes motiles en semence fraîche contre 37.5% en semence congelée).
- **Sur la morphologie** : La quantité de spermatozoïdes anormaux est semblable que la semence soit fraîche ou congelée.
- **Sur l'ADN** : Varesi *et al.* (Varesi *et al.*, 2014) et Prinosilova *et al.* (Prinosilova *et al.*, 2012), ont mis en évidence que l'intégrité de l'ADN est conservée lors de la congélation.

- **Sur l'intégrité de l'acrosome :**

➔ Rappels : L'acrosome est une vésicule sécrétoire couvrant le noyau du spermatozoïde. Il contient des enzymes permettant de traverser la zone pellucide de l'ovocyte, libérées lors de la réaction acrosomiale. L'acrosome contient notamment, au niveau de sa membrane, la pro-acrosine, qui, une fois activée en acrosine, est responsable de la dégradation de la zone pellucide de l'ovocyte.

=> L'acrosome a un rôle majeur dans la fécondation

➔ D'après Varesi *et al.* (Varesi *et al.*, 2014), l'intégrité de l'acrosome est affectée lors de la congélation (perte de l'acrosome, acrosome résiduel ou avec une vésicule). Le pourcentage d'acrosomes intègres passe de 66.6% en semence fraîche à 37.2% en semence congelée.

➔ Cortes *et al.* (Cortes *et al.*, 2006) ont eux aussi mis en évidence une altération de l'acrosome lors de la congélation/décongélation.

Dans cette étude, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'acrosine a permis, par marquage, de mettre en évidence une perte d'acrosine, entre les spermatozoïdes congelés et décongelés, probablement liée aux altérations de l'acrosome au cours du processus de congélation ou de décongélation.

La mesure de l'activité enzymatique de l'acrosine a révélé qu'une activation prématurée de la pro-acrosine en acrosine a lieu lors de la congélation/décongélation, probablement liée à l'augmentation de pH due aux altérations membranaires.

BILAN : Utilisation de la semence congelée et influence de la congélation

- Utilisée principalement pour l'amélioration génétique de l'élevage
- La congélation et la décongélation sont des étapes à risque, qui sont responsables de nombreuses altérations, sur la motilité des spermatozoïdes, la membrane, et l'acrosome. Elles sont donc à l'origine d'une diminution du pouvoir fécondant.
 - ⇒ Cela montre l'importance d'une **qualité minimale de la semence avant la congélation.**

1.2.3. Etapes de la congélation

- **Centrifugation :**

Lors du prélèvement, seule la phase épидидymaire, riche en spermatozoïdes est prélevée.

La centrifugation permet de récolter à partir de cette phase épидидymaire un culot riche en spermatozoïdes et de limiter le volume total à inséminer. En effet, si l'intégralité de l'éjaculat est utilisée, le volume inséminé est alors important, et le risque de reflux (semence expulsée des voies génitales femelles) est augmenté.

La centrifugation se fait à 600-700 g (avec g l'unité d'accélération).

Seul le culot est conservé, le surnageant est éliminé.

- **Dilution:**

Pour préserver la semence lors de la congélation, l'utilisation d'un dilueur est nécessaire.

- Les rôles du dilueur sont :

- Pouvoir tampon : ions (citrate de soude ou bicarbonate de soude)
- Nutrition : sucres (glucose, fructose)
- Isotonicité : colloïdes (jaune d'œuf)
- Antioxydant
- Stabilisation
- Protection : cryoprotecteurs (glycérol, TRIS (trihydroxyméthylaminométhane) qui limite le choc thermique)
- Antibactérien (pénicilline, streptomycine, sulfamides...).

La présence de cryoprotecteurs (glycérol...) permet de conserver l'intégrité cellulaire lors des étapes de congélation et décongélation.

Le taux de dilution dépend de la concentration initiale de l'éjaculat. Une concentration minimale de 100 à 200 millions de spermatozoïdes par mL est nécessaire.

- La dilution peut se faire en une fois ou en plusieurs étapes (ajout d'une partie du dilueur avant l'équilibration et d'une partie après par exemple).

D'après Silva et al (Silva *et al.*, 2003), le nombre d'étapes de dilution n'a pas d'influence sur les caractéristiques (mobilité, anomalies morphologiques...) de la semence après décongélation.

La fraction riche en spermatozoïdes est diluée par ajout en goutte-à-goutte du dilueur, maintenue à 35°C, jusqu'à obtention de la concentration voulue.

- **Refroidissement et équilibration :**

Un refroidissement préalable de la semence peut être réalisé avant l'équilibration.

L'équilibration correspond au fait de laisser les spermatozoïdes en présence avec le dilueur, de façon à ce que les différents composants, tels que le cryoprotecteur, pénètre dans la cellule. Elle se fait à 4°C pendant environ une à deux heures.

D'après Okano *et al.* (Okano *et al.*, 2004), lors d'un protocole avec 2 étapes de dilution, si un refroidissement est fait pendant au moins une heure sans glycérol, l'étape suivante d'équilibration avec le glycérol n'est pas nécessaire.

- **Conditionnement :**

Le conditionnement se fait en paillettes (0,25 mL ou 0,5 mL) ou en pellets.

Après le refroidissement, la semence diluée est remise en suspension, puis placée dans des paillettes. La paillette est remplie à moitié, et une petite bulle d'air est introduite, et le reste de la paillette est remplie jusqu'à 1 cm du bord. La bulle d'air permet d'éviter l'expulsion de semence hors de la paillette lors du changement de pression pendant la congélation. Puis la paillette est fermée par des ultrasons, ou par de systèmes assurant l'étanchéité (poudre...).

- **Congélation :**

La congélation et la décongélation sont les étapes les plus à risque pour la semence, qui si elles sont mal maîtrisées, entraînent une mortalité des spermatozoïdes.

La congélation consiste à mettre les paillettes dans de l'azote liquide à -196°C, en une fois ou en réalisant une congélation par paliers.

Le fait de congeler en plusieurs étapes, avec plusieurs paliers de refroidissement, permet de limiter les altérations de la semence (voir Partie 1, I, 2, g).

Le stockage se fait dans des containers remplis d'azote liquide.

- **Décongélation :**

- La décongélation est réalisée en plongeant les paillettes dans un bain-marie.

La température du bain-marie et le temps de décongélation utilisés sont variables ; Pena *et al.* (Peña et Linde-Forsberg, 2000a) ont mis en évidence une meilleure viabilité et une meilleure mobilité après décongélation des spermatozoïdes lors d'une décongélation à 70°C pendant 8 secondes qu'à 37°C pendant 15 secondes.

- Les paillettes sont ainsi maintenues verticalement, l'extrémité du filtre vers le bas. Elles sont ensuite homogénéisées, la bulle d'air au milieu de la paillette est ainsi chassée vers le haut de la paillette. L'extrémité de la paillette est coupée, une goutte de sperme est observée au microscope afin d'en vérifier la qualité, et le contenu de la paillette est versé dans un tube préalablement placé dans le bain-marie.
- Une dilution peut être réalisée après la décongélation, mais elle n'est pas obligatoire. Elle permet notamment de diminuer la toxicité liée aux cryoprotecteurs, en les diluant. Si elle est réalisée, c'est le plus fréquemment un dilueur à effet tampon qui est ajouté. Cet ajout doit être fait lentement pour éviter un choc osmotique.

1.2.4. Résultats

Les résultats sont très variables, et dépendent de la qualité de la semence utilisée, des procédés de congélation/décongélation, des dilueurs et de la technique d'insémination (dépôt intra-utérin, intravaginal...).

Le taux de gestation est donc très variable : de 55 à 70 %.

La prolificité est diminuée de 15 à 20 % par rapport à l'accouplement naturel.

BILAN : Principes et étapes de congélation et décongélation de la semence

- **Centrifugation** : récupération du culot riche en spermatozoïdes
- **Dilution** : indispensable pour préserver la semence lors de la congélation (effets cryoprotecteur, nutritif, tampon, antioxydant, isotonique, antibactérien...)
- **Refroidissement et équilibration** : les composants du dilueur, tels que les cryoprotecteurs rentrent dans la cellule. A 4°C pendant 1 à 2 heures.
- **Conditionnement** : paillettes ou pellets
- **Congélation** : En une ou plusieurs étapes. Stockage final à -196°C dans l'azote liquide.
- **Décongélation** : au bain-marie (exemple 37°C pendant 15 secondes). Une dilution après décongélation peut être réalisée.

1.3. Effets des techniques utilisées sur les caractéristiques de la semence

- Une étude sur 55 semences congelées issues de 5 chiens (Nöthling *et al.*, 1997) a montré que la fertilité, mesurée par le taux de gestation de 9 chiennes, était uniquement corrélée à la dose totale de spermatozoïdes utilisée, et au nombre de spermatozoïdes motiles. Ainsi, la mobilité est un meilleur indicateur de fertilité que la morphologie des spermatozoïdes.

- **Influence de la concentration de la semence sur la survie des spermatozoïdes après décongélation :**

Pena et Linde-Forsberg (Peña et Linde-Forsberg, 2000b) obtiennent une meilleure thermorésistance de la semence à des concentrations élevées en spermatozoïdes qu'à des concentrations faibles. En effet la mobilité, et l'intégrité de la membrane plasmique des spermatozoïdes sont meilleures après décongélation avec des concentrations de 200 ou 400 millions de spermatozoïdes. Cela pourrait être dû au fait qu'une forte concentration limiterait l'« effet solution » et la formation de cristaux de glace.

Cependant, l'intégrité de l'acrosome est meilleure avec des concentrations plus faibles.

- **Influence du taux de dilution sur la survie des spermatozoïdes après décongélation :**

D'après Pena et Linde-Forsberg (Peña et Linde-Forsberg, 2000b), les échantillons avec un fort taux de dilution présente une mobilité plus importante que lorsque la dilution est faible.

Un fort taux de dilution après décongélation, d'après Pena et Linde-Forsberg (Peña et Linde-Forsberg, 2000b), a un effet négatif sur la mobilité progressive, mais l'intégrité de la membrane plasmique est meilleure que pour des taux de dilution plus faible. En effet,

une forte dilution est à l'origine d'un stress osmotique plus important, qui limite le déplacement des spermatozoïdes mais maintient les membranes plasmiques intègres.

De plus la longévité est augmentée par un fort taux de dilution, car la concentration en glycérol dans les spermatozoïdes est diminuée, et le glycérol a des effets cytotoxiques à haute température.

Le taux de dilution n'a pas d'effet sur la proportion d'acrosomes intacts.

- **Influence de la vitesse de refroidissement lors de la congélation :**

- Rota *et al.* (Rota *et al.*, 2005) ont congelé des semences soit de manière rapide, soit de manière plus progressive, avec des paliers de température. Le dilueur et les manipulations étaient les mêmes quelle que soit la vitesse de congélation.

Lors d'un refroidissement progressif, la mobilité et le nombre de spermatozoïdes avec une membrane intacte étaient plus élevés après décongélation que lors d'un refroidissement rapide. L'intégrité de la chromatine n'était pas influencée par la vitesse de refroidissement.

- Szász *et al.* (Szász *et al.*, 2000) ont montré que la vitesse de refroidissement avait plus d'impact sur la qualité du sperme (évaluée uniquement par la morphologie) que la nature du dilueur ; et que lorsqu'il y avait moins de paliers de refroidissement (deux paliers au lieu de trois), le nombre d'acrosomes intacts était plus faible (de 15%). Ainsi quand le refroidissement est progressif, avec plus de paliers, il y a moins de conséquences sur la morphologie (intégrité de l'acrosome).
- D'après Schäfer-Somi *et al.* (Schäfer-Somi *et al.*, 2006), un refroidissement rapide au début de la procédure permet de limiter les dommages membranaires en évitant la formation de cristaux.

2. Le suivi de chaleurs chez la chienne (Feldman et Nelson, 2004) , (Johnston *et al.*, 2001)

2.1. Généralités (England *et al.*, 2002)

- Les oocytes, une fois libérés lors de l'ovulation, correspondent à des oocytes primaires, qui ne sont pas fécondables. Quarante-huit heures après l'ovulation a lieu la première division de la méiose, appelée aussi maturation, transformant les oocytes primaires en oocytes secondaires qui sont fécondables.
 - **La période fertile** correspond à l'intervalle de temps pendant lequel une insémination ou un accouplement pourra permettre une gestation. Elle s'étend de 3 jours avant le pic de LH à 5 jours après ce pic ; soit de 1 jour avant l'ovulation à 7 jours après l'ovulation.
 - **La période de fécondation** correspond à la période où les ovocytes sont matures (ovocytes secondaires) et dans les cornes utérines, et peuvent être fécondés par les spermatozoïdes. Elle s'étend de 4 jours après le pic de LH à 6 jours après le pic de LH ; soit 2 à 4 jours après l'ovulation.
- ⇒ **Lors de la réalisation d'une insémination artificielle en semence congelée, les spermatozoïdes ont une durée de vie limitée dans le tractus génital femelle, ce qui**

nécessite une détection précise du moment de l'ovulation. L'insémination artificielle doit être réalisée 2 à 4 jours après l'ovulation.

2.2. Frottis et cytologie vaginaux

2.2.1. Méthode de réalisation du frottis

- **Matériel :**

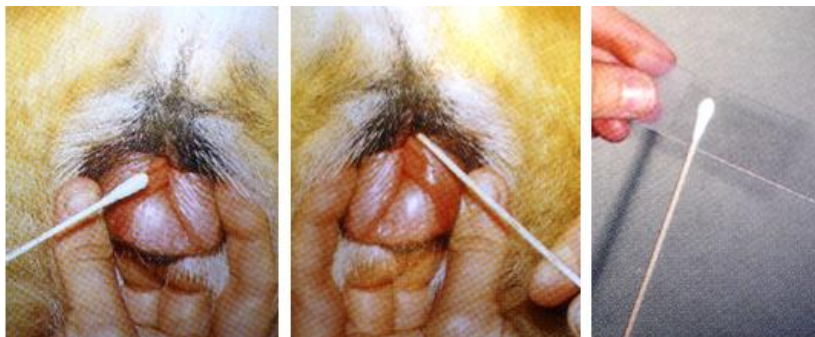
- Ecouvillon stérile de 15 cm environ
- Sérum physiologique
- Gants
- Lames

- **Prélèvement (Figure 4) :**

L'écouvillon stérile est humidifié à l'aide de sérum physiologique, afin de prélever plus de cellules.

L'écouvillon est introduit vers le haut, de manière verticale, dans la vulve de la chienne, pendant que l'autre main, gantée, écarte les lèvres vulvaires. Puis l'écouvillon est basculé en position horizontale. Une fois que l'écouvillon est enfoncé environ à 10 cm dans le vagin, il est tourné plusieurs fois sur lui-même, puis retiré.

Figure 4 : Méthode de réalisation du frottis, d'après Canine and Feline Theriogenology



- **Etallement :**

Le matériel ainsi récolté est étalé sur la lame en tournant l'écouvillon.

- **Fixation :**

La fixation est réalisée à l'aide d'un mélange alcool-éther ou à l'aide d'un spray fixateur.

- **Coloration :**

Deux types de colorations peuvent être réalisés :

- ***May-Grünwald-Giemsa (MGG) :***
 - ➔ Rapide
 - ➔ Mise en évidence des polynucléaires et des érythrocytes.

→ Différenciation entre les cellules se fait sur leurs caractéristiques morphologiques (taille, forme, aspect et présence ou absence du noyau) uniquement, car les cellules sont toutes colorées en bleu.

- **Harris-Shorr :**

→ Plus longue (environ 10 à 15 minutes)

→ Différenciation des cellules par leur couleur, en plus de leur morphologie.

Les cellules basophiles (bleues) correspondent à des cellules non kératinisées, et les cellules acidophiles (rouges/oranges) correspondent à des cellules kératinisées.

2.2.2. Lecture et interprétation du frottis

Après avoir coloré le frottis, la lame est observée au microscope :

- Le faible grossissement (x100) permet d'observer la cellularité, l'aspect général et le fond du frottis.
- Le fort grossissement (x400) permet de différencier les cellules, par observation de la morphologie, la couleur, la taille, la forme et l'aspect du noyau et du cytoplasme.

2.2.2.1. Types cellulaires observés sur le frottis

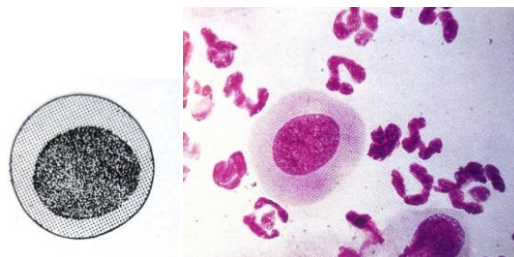
Les différentes cellules présentes sur le frottis vaginal sont facilement identifiables de par leurs caractéristiques histologiques.

- **Cellules parabasales (Figure 5) :**

Elles sont de petite taille, rondes, basophiles. Le cytoplasme est peu étendu, et le noyau est large et vacuolisé. Le rapport nucléo-cytoplasmique est élevé.

Ces cellules sont les plus profondes de la paroi vaginale, à proximité de l'approvisionnement sanguin.

Figure 5 : Schéma (à gauche) et photo (à droite) d'une cellule parabasale au grossissement x1000, d'après Canine and Feline Theriogenology

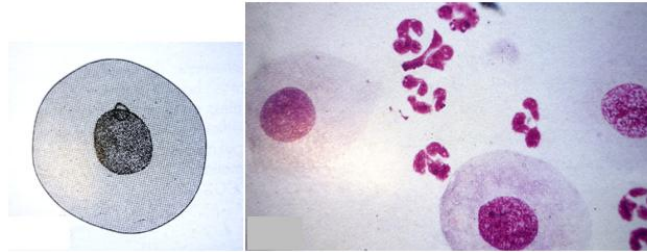


- **Cellules intermédiaires :**

Elles sont classées en deux types :

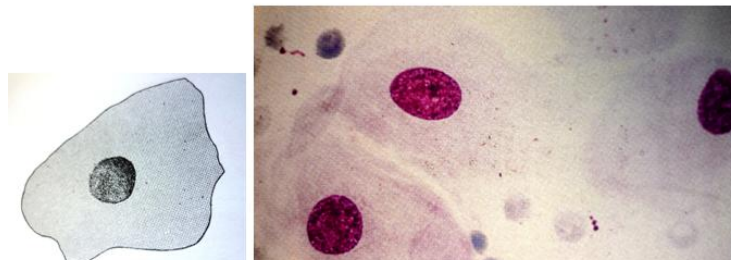
- **Cellules petites intermédiaires (Figure 6)**: elles sont légèrement plus grandes que les cellules parabasales, de forme ovale. Leur cytoplasme est plus développé, elles sont basophiles. Le noyau est de la même taille que celui des cellules parabasales.

Figure 6 : Schéma (à gauche) et photo (à droite) d'une cellule petite intermédiaire au grossissement x1000, d'après Canine and Feline Theriogenology



- **Cellules grandes intermédiaires (Figure 7)** : elles sont de grande taille, de forme anguleuse, les contours sont irréguliers. Le cytoplasme est de grande taille, et se kératinise progressivement.

Figure 7 : Schéma (à gauche) et photo (à droite) d'une cellule grande intermédiaire au grossissement x1000, d'après Canine and Feline Theriogenology



- **Cellules superficielles (Figure 8, Figure 9)** : elles sont de grande taille, les contours sont irréguliers et angulaires. Le cytoplasme est très étendu et kératinisé (acidophile). Elles sont de deux types : les cellules superficielles à noyau de petite taille, pycnotique et dense ; et les cellules superficielles à noyau absent.

Figure 8 : Schémas d'une cellule superficielle, d'après Canine and Feline Theriogenology.

A : Noyau peu apparent par désintégration de la chromatine en granules- B : Condensation et contraction du noyau.

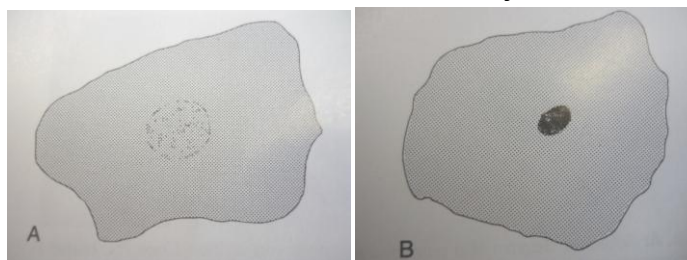
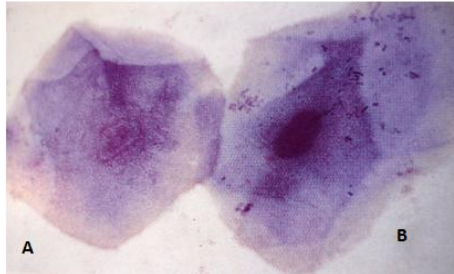


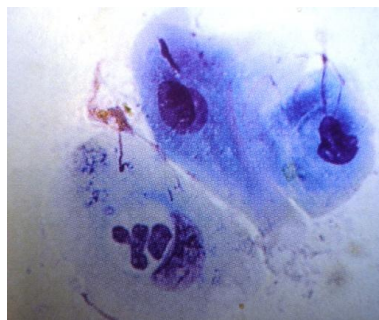
Figure 9 : Photos d'une cellule superficielle au grossissement x1000, d'après Canine and Feline Theriogenology.

A : Noyau peu apparent par désintégration de la chromatine en granules. - B : Condensation et contraction du noyau.



- **Cellules metœstrales (Figure 10) :** elles correspondent à des cellules intermédiaires avec un à plusieurs neutrophiles dans leur cytoplasme.

Figure 10 : Photo d'une cellule metœstrale au grossissement x 1000, d'après Canine and Feline Theriogenology



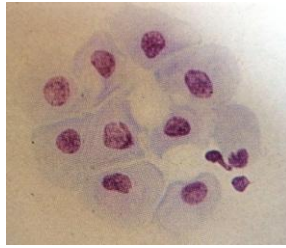
2.2.2.2. Evolution du frottis au cours du cycle

L'évolution de la cytologie vaginale au cours du cycle est résumée par le Tableau 1.

- **Lors de l'anœstrus :**

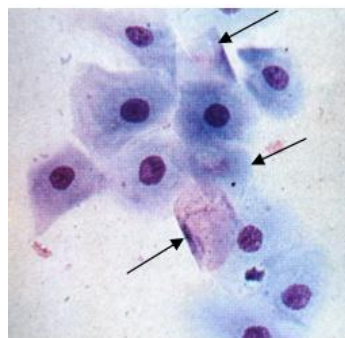
La paroi vaginale est très fine, seules les cellules parabasales et les petites intermédiaires sont présentes (Figure 11). Des neutrophiles et des bactéries peuvent être retrouvés. Les érythrocytes sont absents.

Figure 11 : Frottis d'anœstrus, au grossissement x400, d'après Canine and Feline Theriogenology



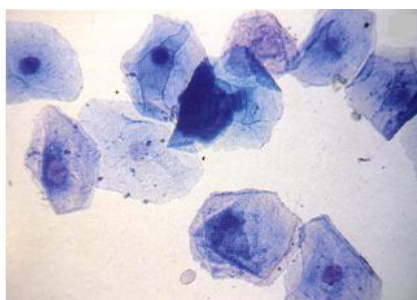
- **Pendant le pro-œstrus**, sous l'effet des œstrogènes, un épaissement de la paroi vaginale se produit, les cellules de la paroi vaginale se multiplient. Les cellules les plus proches de la lumière sont donc à distance des vaisseaux et des nutriments apportés par voie sanguine et vont progressivement se kératiniser.
- **En début de pro-œstrus**, on retrouve des cellules parabasales et des cellules intermédiaires, des neutrophiles et des érythrocytes. Les cellules intermédiaires représentent 60 à 80 % de la population cellulaire, les cellules parabasales sont présentes en grande quantité, et les cellules superficielles sont minoritaires. Le fond du frottis a un aspect « sale » (sécrétions, mucus, et débris cellulaires).
- **En milieu de pro-œstrus**, une augmentation du nombre de cellules superficielles a lieu. Les cellules superficielles représentent 40 à 60% de la population cellulaire, les cellules intermédiaires sont nombreuses, et les cellules parabasales sont minoritaires (Figure 12). Les neutrophiles ne sont plus présents.
- **En fin de pro-œstrus**, on retrouve 60 à 80% de cellules superficielles. Les cellules intermédiaires sont peu nombreuses, et on ne visualise plus de cellules parabasales. Des érythrocytes peuvent être observés, et il n'y a pas de neutrophiles. L'aspect du frottis est « clair ».

Figure 12 : Frottis de pro-œstrus, au grossissement x400, d'après Canine and Feline Theriogenology
De nombreuses cellules intermédiaires sont visualisées, ainsi que trois cellules superficielles (flèches)



- **Pendant l'œstrus**, les cellules superficielles sont majoritaires et correspondant à plus de 80% de la population cellulaire observée. Les cellules intermédiaires sont présentes en faible quantité. Les cellules parabasales ne sont pas retrouvées (Figure 13). On retrouve parfois des érythrocytes, mais pas de neutrophiles. Le fond du frottis est clair.

Figure 13 : Frottis d'œstrus, au grossissement x400, d'après Canine and Feline Theriogenology



- **Pendant le diœstrus**, du fait de la diminution de la concentration en œstrogènes et de l'augmentation parallèle de la concentration de la progestérone, l'épithélium subit une desquamation.

La quantité de cellules superficielles diminue de manière importante, et représente 20% de la population cellulaire. La quantité de cellules parabasales et intermédiaires augmente, elles deviennent majoritaires (Figure 14), et des cellules metœstrales peuvent être retrouvées.

Des neutrophiles sont à nouveau présents en grand nombre, du fait de la desquamation de l'épithélium, dont l'épaisseur ne s'oppose plus à leur migration à la surface.

Le fond du frottis est sale (débris cellulaires).

Figure 14 : Frottis de diœstrus, au grossissement x400, d'après Canine and Feline Theriogenology

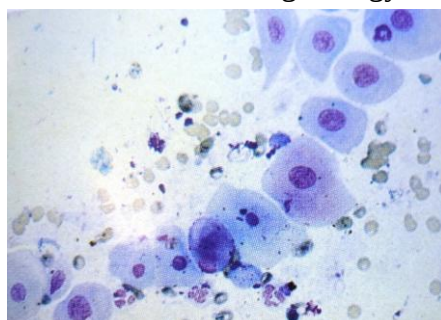


Tableau 1 : Evolution du frottis au cours du cycle

Stade	Cellularité	Aspect du frottis	Erythrocytes	Neutrophiles	Bactéries	Cellules épithéliales
Début de pro-œstrus	Elevée	« Sale » Débris cellulaires, mucus	++	++	+	Parabasales +++ Intermédiaires : 40 à 60%

						Superficielles +
Milieu de pro-œstrus	Elevée	« Sale »	++	+	+	Parabasales + Intermédiaires ++ Superficielles : 40 à 60%
Fin de pro-œstrus	Elevée	Clair	++	+ ou -	+	Intermédiaires + Superficielles : 60 à 80 %
œstrus	Elevée	Clair	- à +	-	+	> 80-90% de superficielles
Diœstrus	Intermédiaire	« Sale » Débris cellulaires, mucus	-	++	-	Parabasales Intermédiaires + Cellules metœstrales
Anœstrus	Faible	« Sale » Débris cellulaires	-	+/-	+/-	Parabasales ++ Intermédiaires +

2.2.3. Frottis, période fertile et ovulation

- D'après England *et al.* (England *et al.*, 2002), le moment où il y a plus de 80 % de cellules superficielles coïncide avec la période fertile.

Le frottis vaginal permet d'identifier la fin de l'« œstrus vaginal » ou le début du « diœstrus vaginal » (par la présence de cellules parabasales et intermédiaires en majorité, par diminution du nombre de cellules superficielles, et par réapparition des neutrophiles), et de manière rétrospective, de savoir si l'insémination a été réalisée au bon moment.

- ⇒ En effet l'insémination doit être effectuée 2 à 4 jours avant la fin de l'« œstrus vaginal ».
- D'après Bouchard *et al.* (Bouchard *et al.*, 1991), l'ovulation a lieu 6,9 jours en moyenne après que 80% des cellules observées sur le frottis soit des cellules superficielles.

2.2.4. Avantages et inconvénients du frottis

- **Avantages :**
 - Rapide
 - Non invasif
 - Peu coûteux, ne nécessite que peu de matériel.
 - Suivi relativement précis
 - Permet de différencier les stades du cycle sexuel.
- **Inconvénients :**
 - Pas de détermination avec précision du moment de l'ovulation.

BILAN : Frottis vaginal

- Détection de l'œstrus :
 - >80% des cellules kératinisées
 - Forte cellularité
 - Fond du frottis clair
 - Peu d'érythrocytes
- Méthode facile, rapide, et peu coûteuse
- Mais pas assez précise

2.3. Suivi de la progestérone

2.3.1. Evolution de la concentration en progestérone

- Pendant l'anœstrus et le début du pro-œstrus, la concentration en progestérone est basale, autour de 1 ng/mL.
 - Du fait de la lutéinisation pré-ovulatoire des follicules, la concentration en progestérone augmente pour atteindre environ 2 ng/mL (England *et al.*, 2002), (Guérin *et al.*, 1997) au moment où a lieu le pic de LH.
 - La concentration en progestérone continue d'augmenter, et atteint, au moment de l'ovulation, la valeur de 5-6 ng/mL, selon les études (Tableau 2).
 - Après l'ovulation, la concentration augmente avant d'atteindre un plateau.
- ⇒ Les différentes valeurs de la progestérone au moment de l'ovulation selon les études est présentée dans le Tableau 2.

Tableau 2: Valeur de la progestérone au moment de l'ovulation selon différentes études

Etudes	Méthode de mesure de la progestérone	Valeur de la progestérone au moment de l'ovulation (ng/mL)
(Lévy et Fontbonne, 2007)	Chimiluminescence	6,25
(Wright, 1991)	Radioimmunologie	5,4
(Bouchard <i>et al.</i> , 1991)	ELISA	4,9
(Domosławska <i>et al.</i> , 2014)	Chimiluminescence	6,78

2.3.2. Méthodes de mesure

- **Il existe plusieurs méthodes pour mesurer le taux de progestérone :**
 - Radio-immunologie : quantitatif
 - Tests ELISA : qualitatifs ou semi-quantitatifs.
 - Immuno-chimiluminescence : quantitatif

- **Choix d'une référence :**

- La concentration de 2 ng/mL correspond au pic de LH.
- La concentration de 6 ng/mL correspond à l'ovulation.

- **Choix d'une méthode :**

- Les tests ELISA sont souvent réalisés en clinique, ils sont rapides (15 minutes environ) et relativement faciles à mettre en place. Cependant, étant qualitatifs ou semi-quantitatifs, ils sont moins précis.
- Les tests quantitatifs (chimiluminescence ou radio-immunologie) sont quant à eux beaucoup plus précis. Ils sont cependant plus coûteux.
- Chapwanya *et al.* (Chapwanya *et al.*, 2008) , ont comparé la radio-immunologie et de la chimiluminescence, et mettent en évidence l'absence de différence dans les résultats obtenus avec ces deux méthodes, et que les deux méthodes sont aussi précises l'une que l'autre.

⇒ La concentration en progestérone augmentant au moment du pic de LH et de l'ovulation, des mesures régulières permettent de déterminer de manière précise la période fécondante.

BILAN : Dosage de la progestérone

- **Suivi de la concentration en progestérone : méthode de choix**

- La concentration de 2 ng/mL correspond au pic de LH, 6 ng/mL correspond à l'ovulation.
- Tests ELISA : rapides et peu coûteux, mais moins précis
- Méthodes quantitatives plus précises

⇒ **Détermination de la période fécondante de manière précise par des dosages**

2.4. Echographie ovarienne

Il est possible de visualiser l'évolution des follicules au sein de l'ovaire et de détecter le moment de l'ovulation.

2.4.1 Matériel et méthodes (Lévy et Fontbonne, 2007)

- Sonde linéaire ou curvi-linéaire à haute fréquence (7,5 Hz à 10 Hz)
- La chienne est placée en décubitus dorsal ou dorso-latéral. La tonte n'est pas obligatoire, l'utilisation d'alcool ou d'eau associée à une grande quantité de gel échographique est suffisante. Pour les races à poils longs, il est possible de couper une partie des poils sans les tondre.
- La recherche des ovaires se fait caudalement et latéralement au rein, en regard de L3-L4. Les ovaires sont superficiels. L'ovaire droit est plus crânial que le gauche.

2.4.2. Principe (England *et al.*, 2002), (Lévy et Fontbonne, 2007)

- Les follicules sont anéchogènes, et leur taille augmente au cours du cycle. L'échographie des ovaires doit être réalisée tous les jours.
 - En début de pro-œstrus, les follicules sont circulaires, de petite taille, de 2 à 3 mm de diamètre, et sont entourés d'une paroi fine de moins d'1 mm.
 - A la fin du pro-œstrus, les follicules atteignent 5 mm de diamètre, et leur paroi s'épaissit et est supérieure à 1mm.
 - Entre le pic de LH et l'ovulation, leur taille est maximale, et approche les 7 à 10 mm de diamètre.

Ils sont volumineux et anéchogènes, avec une paroi hyperéchogène.

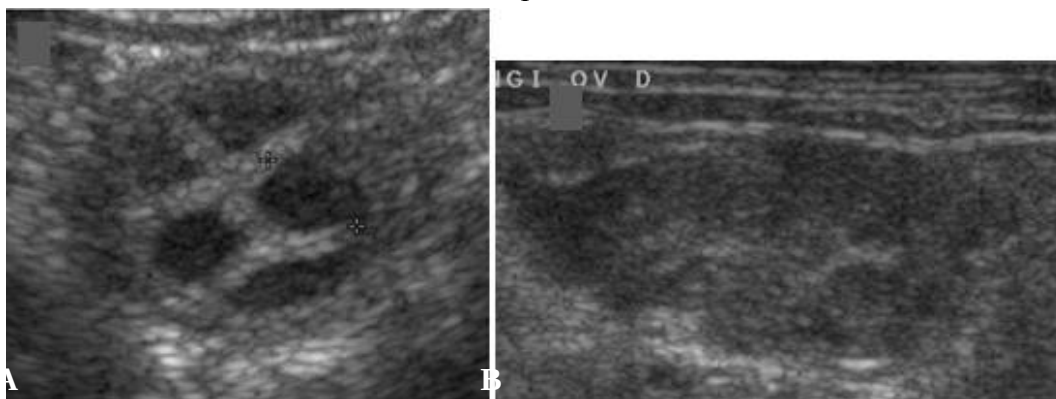
- Pour détecter l'ovulation, on recherche la disparition des cavités folliculaires ou la diminution du nombre de follicules : c'est le « collapsus folliculaire » d'après Lévy et Fontbonne (Lévy et Fontbonne, 2007), (Figure 15).

Cette diminution du nombre de follicules est la conséquence de l'augmentation d'échogénicité ou de la diminution de la taille des follicules. Elle persiste pendant 1 à 3 jours après l'ovulation.

- Du liquide peut être retrouvé entre l'ovaire et la bourse ovarique au moment de l'ovulation. Il correspond au liquide contenu dans le follicule, qui est libéré au moment de l'ovulation.
- Ensuite des structures volumineuses et anéchogènes réapparaissent, ce sont des corps jaunes contenant du sang, qui persistent 1 à 2 semaines.

Ils ne doivent pas être confondus avec des follicules n'ayant pas encore ovulé. La réalisation d'échographies journalières permet cette différenciation.

Figure 15 : Echographie ovarienne A : aspect de l'ovaire un jour avant l'ovulation, B : collapsus folliculaire, d'après A.Fontbonne



2.4.3. Résultats

- D'après Lévy et Fontbonne (Lévy et Fontbonne, 2007), la disparition des cavités folliculaires anéchogènes ne se visualise que dans 37,8 % des cas. Domosławska et al (Domosławska *et al.*, 2014) parviennent à des résultats similaires : ils visualisent un « collapsus folliculaire » dans 28 % des cas.

Lévy et Fontbonne (Lévy et Fontbonne, 2007) ont noté une persistance de structures hypoéchogènes dans 50 % des cas, cependant ces structures sont d'aspect différent : elles sont de plus petite taille et sont irrégulières.

De plus, des follicules n'ayant pas ovulé ont été observés dans 49,5 % des cas. En effet tous les follicules n'ovulent pas.

- D'après Lévy et Fontbonne (Lévy et Fontbonne, 2007), l'utilisation de l'échographie ovarienne en plus du dosage de progestérone permet d'augmenter la précision de la détection du moment de l'ovulation de 10,1 %.

Mais la réalisation d'échographie ovarienne deux fois par jour n'a pas amélioré la détection du moment de l'ovulation, une fois par jour suffit.

- Domoslawska *et al.* (Domosławska *et al.*, 2014), ont défini deux groupes de chiennes: un où le collapsus folliculaire a lieu rapidement, et un où le collapsus folliculaire a lieu progressivement. Il n'y a pas de différence significative du taux de progestérone entre les deux groupes au moment de l'ovulation (6,68 +/-0,92 ng/mL et 6,81 +/- 0,57 ng/mL respectivement). Ainsi, quelle que soit la vitesse d'apparition du « collapsus folliculaire », le taux de progestérone est stable au moment de l'ovulation.

2.4.4. Avantages et inconvénients

- **Avantages :**
 - Méthode précise, visualisation de l'ovulation
- **Inconvénients :**
 - Examens fréquents : un par jour
 - Formation/expérience nécessaire pour la réalisation de l'échographie

2.4.5. Difficultés rencontrées

Plusieurs paramètres peuvent rendre plus difficile la visualisation du collapsus folliculaire :

- Chienne obèse ou de grande taille
- Petite taille des follicules
- Grand nombre de follicules

BILAN : Echographie ovarienne

- Les follicules sont des structures anéchogènes, avec une paroi hyperéchogène, qui augmentent de taille pendant le pro-œstrus
- **Ovulation = Visualisation d'un « collapsus folliculaire »** : disparition ou diminution du nombre de follicules
- A réaliser une fois par jour
- L'utilisation de l'échographie ovarienne en plus des dosages de progestérone augmente de 10 % la sensibilité de détection de l'ovulation.

2.5. Résultats de différentes études sur les méthodes de détermination du moment de l'ovulation

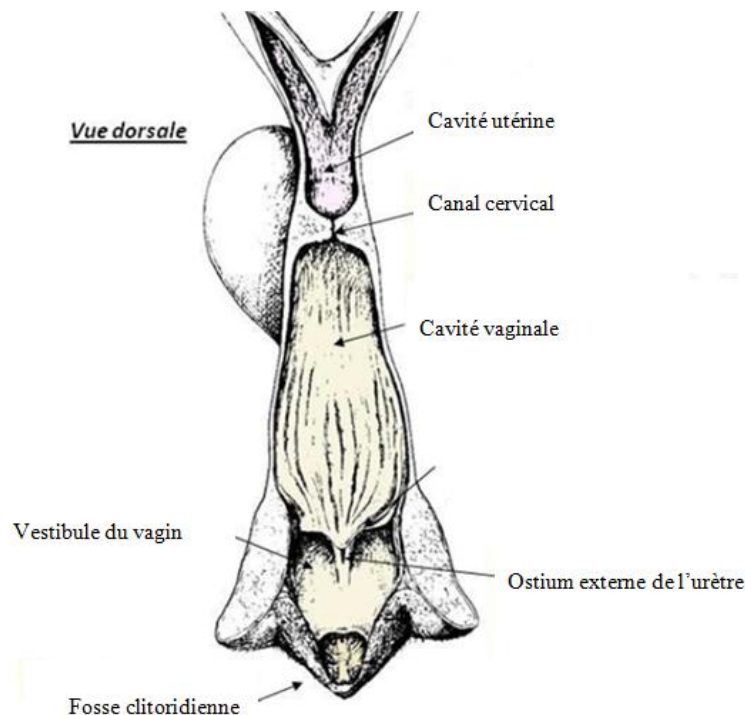
- D'après Thomassen *et al.* (Thomassen *et al.*, 2006), la réalisation d'une insémination artificielle au moment optimal (c'est-à-dire deux jours après l'ovulation), déterminé par la réalisation de frottis et de mesures de progestérone, permet d'obtenir un taux de gestation plus élevé et un nombre de chiots par portée plus élevé par rapport à des inséminations réalisées tardivement.
- L'utilisation de l'échographie ovarienne conjointement à une mesure de la concentration de la progestérone permet un suivi précis du cycle sexuel.
- Domosławska *et al.* (Domosławska *et al.*, 2014) parviennent à un taux de gestation de 94,5 %, en utilisant l'échographie ovarienne une fois par jour, à partir du 4^{ème} jour du pro-œstrus, jusqu'à la détection du moment de l'ovulation et la visualisation des corps jaunes. Le dosage du taux de progestérone a été utilisé pour confirmer le moment de l'ovulation, et la cytologie vaginale et la vaginoscopie ont permis de vérifier l'avancée dans les différentes phases du cycle.

3. Les techniques d'insémination artificielle (Root Kustritz, 2003)

3.1. Rappels anatomiques (Romagnoli et Lopate, 2014)

- Le vagin (Figure 16) :
 - Le vagin de la chienne est long (de 10 à 30 cm environ, variable entre les espèces), et le vestibule du vagin est long (6 cm environ).
La forme du vagin est dite « en bouteille », car son diamètre diminue dans le sens caudo-crânial.
 - Le vestibule du vagin possède une orientation crânio-dorsale (orienté vers le haut lorsqu'on va crânialement), alors que le vagin est horizontal. Crânialement au pli dorso-médial, le diamètre vaginal est légèrement plus important, et le col de l'utérus est visible.
 - La muqueuse vaginale forme de nombreux plis ; le pli dorso-médial provient de la muqueuse du plafond vaginal, et s'étend crânialement jusqu'au col.

Figure 16 : Vue dorsale de la conformation interne de l'appareil génital de la chienne, d'après Barone



- L'utérus :
 - Chez la chienne, le col de l'utérus est court (2 cm), et se divise rapidement entre 2 longues cornes (12-15 cm). Les cornes utérines sont en position abdominale.
 - Le col présente un pli dorso-médial, qui provient de la muqueuse du plafond vaginal, ce pli est parfois confondu avec le col.

3.2. Insémination intravaginale

3.2.1. Matériel

- Une seringue, reliée à :
 - Une canule : sonde d'insémination en plastique
 - Ou une pipette rigide
 - Ou une sonde OSIRIS : tube en plastique souple, extrémité entourée d'un ballonnet gonflable qui empêche les reflux de semence hors des voies génitales, et stimule les contractions vaginales. La sonde est introduite le plus profondément possible, le ballonnet est ensuite gonflé. L'arrivée d'air est fermée, et la semence est déposée au fond du vagin. L'avantage de la sonde OSIRIS est qu'elle limite le reflux de semence hors des voies génitales femelles.

3.2.2. Principe

- La chienne est debout ou en décubitus dorsal.
- La vulve peut être nettoyée avant d'effectuer l'insémination.
- La sonde ou la pipette est introduite par la commissure vulvaire dorsale dans le vagin. Lorsqu'elle est dans le vagin, l'extrémité de la pipette est soulevée vers le haut. La pipette progresse dans le vagin en suivant la paroi dorsale. La seringue est ensuite reliée à la pipette, et la semence est injectée lentement via la seringue. La seringue est ensuite retirée.
- Si de la semence reste dans la pipette, il est possible de reculer celle-ci d'un ou deux millimètre, jusqu'à ce que la semence s'évacue. Une petite quantité d'air peut être injectée dans la pipette de façon à évacuer la semence restante.
- Ensuite, l'arrière de l'animal est soulevé, et la seringue ou la canule est retirée. L'animal est maintenu sur les membres antérieurs pendant 5 à 10 minutes, voire 1 minute seulement selon les auteurs (Pinto *et al.*, 1998).
- Une stimulation du plafond vaginal peut être réalisée à l'aide d'un doigt. En effet, cela favorise les contractions vaginales, qui permettent la remontée des spermatozoïdes dans les voies génitales.

3.2.3. Avantages et inconvénients

- **Avantages :**
 - Facile
 - Peu coûteux
 - Peu invasif
- **Inconvénients :**
 - Mauvais résultats avec de la semence congelée

3.3. Insémination intra-utérine

Trois techniques peuvent être utilisées : l'insémination chirurgicale par laparotomie, l'insémination trans-cervicale par endoscopie, et l'insémination utilisant un cathéter Scandinave ou Norvégien.

3.3.1. Technique chirurgicale par laparotomie ou laparoscopie

Cette technique est réalisée sous anesthésie générale, la chienne est placée en décubitus dorsal.

- **Laparotomie :**
 - Une incision ombilico-pubienne de la peau est réalisée, le tissu conjonctif sous-cutané est dilacéré jusqu'à visualisation de la ligne blanche. La ligne blanche est ponctionnée puis incisée, et l'utérus est identifié et extériorisé.

- Pendant ce temps, une autre personne décongèle et prépare la semence, qui est au final aspirée par le chirurgien à l'aide d'une seringue stérile. Une aiguille stérile est placée sur la seringue.
- Une petite quantité de semence est ensuite injectée à travers la paroi ventrale de l'utérus, dans la lumière, afin de vérifier le remplissage de l'utérus. Après confirmation, le reste de la semence est injectée.
- L'utérus est replacé dans la cavité abdominale. La paroi musculaire est refermée, ainsi que le tissu sous-cutané et la peau.
- L'arrière-train de la chienne peut être surélevé pendant l'intervention, de manière à éviter les reflux.

- **Laparoscopie :**

Une insémination sous laparoscopie peut aussi être réalisée. Elle ne nécessitera qu'une incision d'environ 1 cm sur la ligne blanche, caudalement à l'ombilic. De l'air est insufflé dans la cavité abdominale. L'endoscope est introduit dans la cavité abdominale par cette incision.

Une autre incision est réalisée, de 0,5 cm de longueur, à 2-3 cm de latéralement à la chaîne mammaire.

L'insémination par laparotomie est réalisée le plus souvent une seule fois, afin de ne pas multiplier les anesthésies.

- **Avantages et inconvénients :**

- **Avantages :**
 - ➔ Bonne alternative en cas d'échec de la méthode par cathétérisme ou de mauvaise qualité de la semence
- **Inconvénients :**
 - ➔ Méthode invasive
 - ➔ Coûteux
 - ➔ Risque anesthésique
 - ➔ Une seule IA possible

3.3.2. Insémination trans-cervicale par méthode Scandinave ou Norvégienne

- **Matériel :**

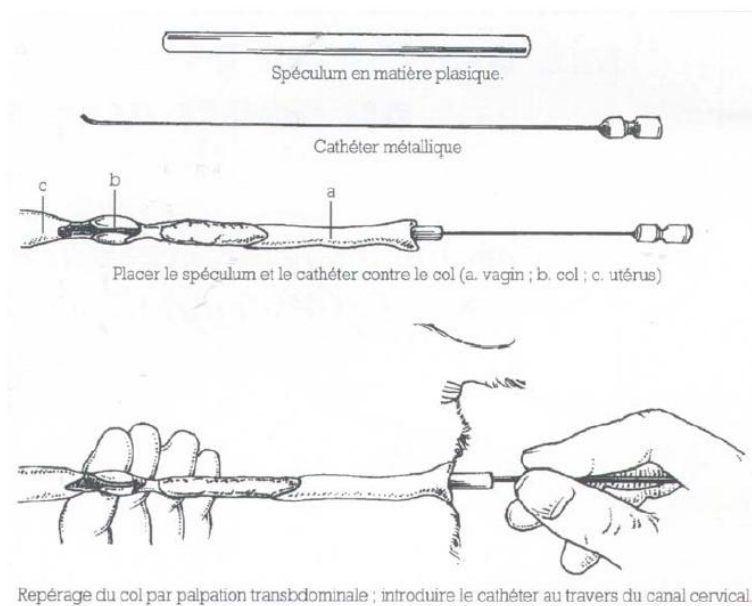
- Mandrin en plastique
- Cathéter Scandinave ou Norvégien : il s'insère dans le mandrin, et possède une extrémité mousse
- Relié à une seringue contenant la semence

- **Principe (Figure 17) :**

- La chienne est debout sur une table.
- D'une main, l'opérateur insère le mandrin dans le vagin, qui est avancé progressivement, le plus loin possible, jusqu'à ce qu'il bute contre le col.

- De l'autre main, l'opérateur va palper le col par voie trans-abdominale, en le recherchant crânialement au bord antérieur du pubis, et l'immobiliser.
- Le cathéter est introduit dans le mandrin, puis passé dans le canal cervical.
- La semence est ensuite déposée dans l'utérus, en l'injectant doucement après avoir relié la seringue à l'embout distal du cathéter.

Figure 17 : Méthode norvégienne de cathéterisme utérin, d'après Fontbonne A.



- **Avantages et inconvénients :**

- **Avantages :**
 - ➔ Matériel peu coûteux
 - ➔ Méthode peu invasive
- **Inconvénients :**
 - ➔ Nécessite un opérateur expérimenté
 - ➔ Difficultés à palper le col (chiennes de plus de 50kg...)

3.3.3. Insémination trans-cervicale par endoscopie

Cette méthode est plus coûteuse mais plus facile à maîtriser que la précédente.

- **Matériel :**

- Cytoscope ou endoscope, ayant un mandrin avec une lumière pour passer un cathéter, et une source de lumière
- Cathéter
- Seringue
- Ecran

- **Principe :**

- L'endoscope et le cathéter sont introduits dans la lumière du mandrin. La source de lumière est en marche.
- L'ensemble est inséré par la vulve dans le vagin antérieur. L'endoscope doit être dorsal afin d'éviter l'urètre. Une fois que les plis vaginaux sont visualisés, l'endoscope est poussé crânialement, jusqu'à ce que le pli post-cervical médian dorsal soit visualisé dorsalement.
- Le pli vaginal médian dorsal est semi-cylindrique, régulier, et orienté longitudinalement dans la partie dorsale du vagin antérieur. Il est suivi sur sa partie antérieure à l'aide de l'endoscope, jusqu'à visualisation du col, qui est situé dorsalement par rapport au pli.
- Il est possible d'insuffler de l'air pour avoir une meilleure visualisation des structures.
- Si le col est difficile à visualiser, il est possible de soulever dorsalement l'extrémité de l'endoscope.
- Une fois le col identifié, le cathéter est passé dans l'ouverture du col, et des mouvements rotatoires peuvent être exercés sur le cathéter pour en faciliter l'entrée dans le col. La semence est ensuite injectée via le cathéter.

⇒ L'insémination intra-utérine augmente de 20 % le taux de gestation pour la semence congelée.

- **Avantages et inconvénients :**

- **Avantages :**
 - ➔ Permet de visualiser le col
 - ➔ Bons résultats
 - ➔ Limite les traumatismes sur le col
- **Inconvénients :**
 - ➔ Coûteux
 - ➔ Nécessite un opérateur expérimenté

3.4. Comparaison des différentes techniques d'insémination artificielle en semence congelée

- **Résultats généraux :** (Root Kustritz, 2003)

Les résultats dépendent du nombre d'inséminations réalisées et la concentration en spermatozoïdes de la semence.

- Lors d'insémination intravaginale, le taux de gestation est d'environ 50 à 60%, et peut être de 100 % lorsque des inséminations sont réalisées tous les jours pendant l'œstrus. Un taux élevé de gestation peut être obtenu avec une insémination intra-vaginale en semence congelée : 87,5 %, (Nöthling *et al.*, 1995) mais il requiert un nombre élevé d'inséminations par cycle (5,6 inséminations en moyenne), peu réalisable en pratique.
- Lors d'insémination transcervicale par la méthode norvégienne, le taux de gestation varie entre 67 % et 84 %.

- Lors d'insémination transcervicale par endoscopie, le taux de gestation varie entre 57 % et 100 %. Pretzer *et al.* (Pretzer *et al.*, 2006) obtiennent un taux de gestation de 89,4 %, en réalisant une seule insémination en semence congelée par cycle, par cathétérisme trans-cervical à l'aide d'un endoscope, sur 137 chiennes lévriers.
- Lors d'insémination chirurgicale par laparotomie, le taux de gestation varie entre 60 et 90 %.

- **Comparaison laparotomie/cathétérisation transcervicale (Tableau 3) :**

- Mason et Rous (Mason et Rous, 2014) ont comparé le taux de gestation lors d'utilisation de semence congelée déposée soit par laparotomie (40 IA), soit par cathétérisation trans-cervicale à l'aide de l'endoscopie (78 IA). Les résultats montrent un meilleur taux de gestation en utilisant la cathétérisation transcervicale avec endoscopie (65 %) qu'avec laparotomie (45 %), sachant qu'il n'y a pas de différence significative concernant la dose inséminée entre les deux groupes ($115,3 \times 10^6$ spermatozoïdes en moyenne). De plus le taux de gestation est meilleur, quelle que soit la méthode, lorsque la dose inséminée est supérieure à 100×10^6 spermatozoïdes.
- Ceci est en accord avec les résultats du CERCA entre 2001-2006, où le taux de gestation par laparotomie est plus faible que par cathétérisation trans-cervicale (Tableau 3).

- **Comparaison cathétérisation trans-cervicale/insémination intra-vaginale (Tableau 3) :**

- Une étude (Linde-Forsberg *et al.*, 1999), portant sur 208 IA, a mis en évidence un taux de mise-bas plus élevé lorsque la semence congelée est déposée par cathétérisation trans-cervicale (84,4 %) par rapport à une insémination intra-vaginale (58,9 %).
- En accord avec l'étude précédente, Thomassen *et al.* (Thomassen *et al.*, 2006) mettent en évidence un taux de gestation après une insémination utérine de 75 %, beaucoup plus élevé que lors d'insémination intravaginale (10 %).

⇒ La forte différence du taux de gestation entre ces deux études ((Linde-Forsberg *et al.*, 1999) et (Thomassen *et al.*, 2006)), notamment lors d'insémination intra-vaginale, peut être expliquée par le nombre moyen d'inséminations artificielles réalisé par cycle, qui est d'environ 2,1 pour l'étude ((Linde-Forsberg *et al.*, 1999)) où le taux de gestation était plus élevé, et de 1,6 pour la deuxième ((Thomassen *et al.*, 2006)).

Tableau 3 : Taux de gestation obtenu en fonction de la méthode d'IAC utilisée selon les études

Etude	CERCA 2001-2006 (Benechet, 2007)	(Linde-Forsberg <i>et al.</i> , 1999)	(Thomassen <i>et al.</i> , 2006)	(Mason et Rous, 2014)
Méthode				
Intra-utérine endoscopie	75 %	57,9 %	NR	65 %

Intra-utérine Norvégienne	53,7 %	84,4 %	75 %	NR
Intra-utérine laparotomie	12,5 %	NR	NR	45 %
Intra-vaginale	0 %	58,9 %	10 %	NR

3.5. Résultats en fonction du nombre d'inséminations réalisées

- Deux études (Linde-Forsberg *et al.*, 1999), (Mason et Rous, 2014) montrent que le taux de gestation ne présente pas de différence significative qu'il y ait une ou deux IAC réalisées (Tableau 4).
- D'après Thomassen *et al.*, lorsque deux inséminations sont pratiquées au lieu d'une, le taux de gestation est significativement meilleur (78,1 % contre 70,5 %), et la taille de la portée plus importante (6,0 chiots en moyenne pour 2 IA contre 5,1 lors d'une IA).
Cette différence n'est pas retrouvée lorsque l'insémination est réalisée au moment optimal de l'œstrus, c'est-à-dire lorsque l'IA est réalisée deux ou trois jours après l'ovulation (estimée par la valeur de la progestérone).

Tableau 4 : Taux de gestation de différentes études en fonction du nombre d'inséminations réalisées

Etude Nombre d'IAC	(Linde-Forsberg <i>et al.</i> , 1999)	(Thomassen <i>et al.</i> , 2006)	(Mason et Rous, 2014)
1 IA	84,3 %	70,5 %	69 %
2 IA	82,8 %	78,1 %	64 %
3 IA	91,3 %	NR	NR

BILAN : Techniques d'insémination artificielle

- Insémination intravaginale :
 - Taux de gestation : 50-60 % : mauvais résultats
 - Facile, peu coûteux
 - ⇒ À éviter en semence congelée
- Insémination intra-utérine par laparotomie :
 - Taux de gestation : 60-90 %
 - Invasif, une seule IA possible
 - ⇒ À envisager lors de semence de mauvaise qualité ou d'échec des autres techniques
- Insémination trans-cervicale par méthode Scandinave ou Norvégienne :
 - Taux de gestation : 67-84 %
 - Peu coûteux et peu invasif
 - Parfois difficile (chiennes grasses ou de grand format)
- Insémination trans-cervicale par endoscopie :
 - Taux de gestation : 57 % et 100 %.
 - Matériel coûteux
 - Bons résultats
 - ⇒ L'insémination trans-cervicale est à favoriser. L'utilisation de l'endoscopie donne de meilleurs résultats que la méthode Norvégienne mais nécessite un matériel plus coûteux.

4. Conclusion

L'insémination en semence congelée en espèce canine permet une amélioration génétique et une sélection au sein des élevages.

Les évolutions des techniques et des connaissances ont été très importantes au cours des dernières années, et ont permis, malgré les altérations dues à la congélation de la semence, d'améliorer la réussite de l'insémination.

De nombreux paramètres ont une influence sur son succès : le protocole de congélation, les étapes de décongélation, les méthodes d'insémination, le nombre d'inséminations, la qualité de la semence...

1. Méthodes utilisées au CERCA

1.1. Objectifs de l'étude

Les objectifs de cette étude étaient :

- Donner les résultats du CERCA en matière d'insémination artificielle en semence congelée, dont le nombre a considérablement augmenté ces dernières années, afin de voir si les résultats du CERCA sont analogues à ceux d'autres centres de référence dans ce domaine.
- D'évaluer l'évolution des résultats par rapport à 2001 et 2006 (Benechet, 2007), et de la mettre en relation avec l'évolution des techniques employées.
- De déterminer les facteurs influençant les résultats, et de distinguer ceux qui peuvent les améliorer.

1.2. Protocole de suivi de chaleur

- Le suivi de chaleur était effectué idéalement par la réalisation de :

- Dosages de progestérone
- Echographies ovariennes
- Frottis vaginaux

En fonction de la demande du propriétaire et de l'avancée du cycle de la chienne, tout n'était pas forcément réalisé.

- Les écueils sur le suivi étaient le plus souvent dus aux propriétaires :
 - La chienne était parfois amenée trop tard : la progestérone est élevée et l'échographie révélait que la chienne a déjà ovulée.
 - Parfois le propriétaire souhaitait que seuls les dosages de progestérone soient réalisés.

1.3. Protocole de congélation de la semence

- Pour les semences provenant du CERCA, le protocole de congélation est présenté en Annexe 1 et Annexe 2.
- Pour les autres semences, le protocole de congélation n'était pas connu.

1.4. Méthodes d'insémination

- En fonction de la qualité de la semence, les méthodes utilisées étaient :
 - Le cathétérisme transcervical norvégien
 - L'insémination artificielle par endoscopie
 - L'insémination artificielle par laparotomie.

2. Matériel et méthodes

2.1. Recueil et enregistrement des données

Les données concernant les dossiers des chiennes inséminées et des mâles utilisés ont été recueillies via les dossiers informatiques (CLOVIS) et manuellement dans les dossiers papiers conservés au CERCA.

Lorsque certaines informations étaient manquantes, notamment le nombre de chiots nés, des appels aux propriétaires ont été réalisés.

La totalité des informations a été collectée dans un tableau EXCEL, en prenant comme référence l'IA.

2.2. Animaux

- Les chiennes incluses dans l'étude étaient celles qui ont été inséminées en semence congelée au CERCA entre janvier 2007 et décembre 2015, ce qui correspondait à 172 IAC (inséminations en semence congelée).
- Il y a 9 chiennes qui ont été inséminées 2 fois entre 2007 et 2015, et une chienne qui a été inséminée 4 fois, soit 160 chiennes différentes inséminées entre 2007 et 2015.

2.3. Critères d'exclusion

Les chiennes dont le statut gravis ou non gravis n'était pas connu, et les chiennes ayant ensuite fait un pyomètre (et ayant donc reçu une injection d'ALIZINE®) n'ont pas été incluses dans les résultats.

2.4. Analyse statistique

- Pour le taux de gestation : le test du khi-deux d'indépendance a été utilisé. La différence est considérée comme significative lorsque $p < 0,05$, c'est-à-dire lorsque le χ^2 calculé est supérieur au χ^2 théorique (avec χ^2 théorique = 3,84).
Lors de petits effectifs (<5), le test du khi-deux avec la correction de Yates a été utilisé.
- Pour la prolificité : un test bilatéral de la somme des rangs de Mann-Whitney-Wilcoxon a été utilisé.

2.5. Suivi de chaleurs

- Le suivi de chaleurs réalisé était variable en fonction de l'avancée de la chienne dans son cycle (parfois la progestérone est déjà très élevée à l'arrivée du CERCA).
- La qualité du suivi de chaleur a donc été notifiée par l'utilisation d'un indice :
 - A : Suivi très précis avec frottis, dosages de progestérone, échographie ovarienne, et frottis vaginaux réalisés de manière régulière, permettant une détermination très précise de la date d'ovulation.
 - B : Suivi utilisant frottis et dosages de progestérone, sans échographie ovarienne.

- C : Suivi utilisant des dosages de progestérone réalisés de manière irrégulière, ou chienne arrivant au CERCA avec un dosage de progestérone déjà très élevé, ne permettant pas une évaluation précise de la date d'ovulation.
- La technique de dosage de la progestérone « tait la chimiluminescence (ELECSYS 2010, Roche diagnostics, Allemagne).

2.6. Qualité de la semence

Trois types de qualité de semence ont été définis :

- A : semence avec >60% de spermatozoïdes mobiles et dose inséminante > 200 millions de spermatozoïdes totaux
- B : semence avec 50 à 60% de spermatozoïdes mobiles et dose inséminante > 200 millions de spermatozoïdes totaux
- C : semence avec <50% de spermatozoïdes mobiles et dose inséminante > 200 millions de spermatozoïdes totaux

3. Résultats

3.1. Paramètres concernant la femelle

3.1.1. Taux de gestation

Le taux de gestation a été défini comme le pourcentage de chiennes dont l'échographie de gestation était positive (visualisation d'ampoule(s), résorbée(s) ou non) et/ou ayant mis bas.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Calcul du taux de gestation

Nombre de chiennes gestantes	92	Total chiennes incluses = 149
Nombre de chiennes non gestantes	57	
Nombre de chiennes où l'information n'est pas connue	20	Total chiennes exclues = 23
Nombre de chiennes ayant fait un pyomètre	3	

⇒ **Le taux de gestation était donc de 61,7 % (92/149).**

3.1.2. Calcul d'un taux de gestation corrigé

Un taux de gestation corrigé a pu être calculé (Tableau 6) en excluant :

- Les chiennes dont le suivi de chaleur n'avait pas été réalisé de manière rigoureuse (noté qualité de chaleur B ou C lors de la récolte des données). C'est-à-dire que seules les femelles avec un suivi de chaleurs A ont été comptabilisées.
- Les chiennes ayant été inséminées par de la semence de mauvaise qualité : semence dont la mobilité spermatique après décongélation était inférieure strictement à 50%.

Tableau 6 : Calcul du taux de gestation corrigé

Nombre de chiennes gravides avec un suivi A et inséminées avec une semence dont la mobilité spermatique après décongélation est supérieure à 50%	40	Total chiennes incluses = 54
Nombre de chiennes non gravides avec un suivi A et inséminées avec une semence dont la mobilité spermatique après décongélation est supérieure à 50%	14	
Nombre de chiennes dont le suivi de chaleur n'est pas A et inséminée avec une semence dont la mobilité spermatique après décongélation est inférieure à 50%	92	Total chiennes exclues = 119
Nombre de chiennes où l'information n'est pas connue	27	

⇒ **Le taux de gestation corrigé était de 74 % (40/54).**

3.1.3. Durée de gestation

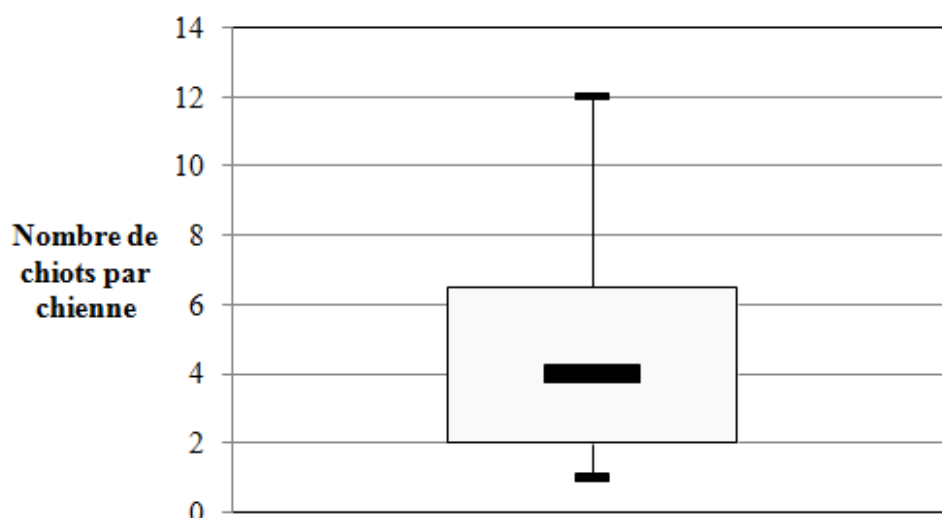
La durée de la gestation était connue chez 24 chiennes, et correspondait en moyenne à :

- 60,2 +/- 2,5 jours, par rapport à la date de la première insémination artificielle.
- 59,7 +/- 1,7 jours, par rapport à la date de la deuxième insémination artificielle.

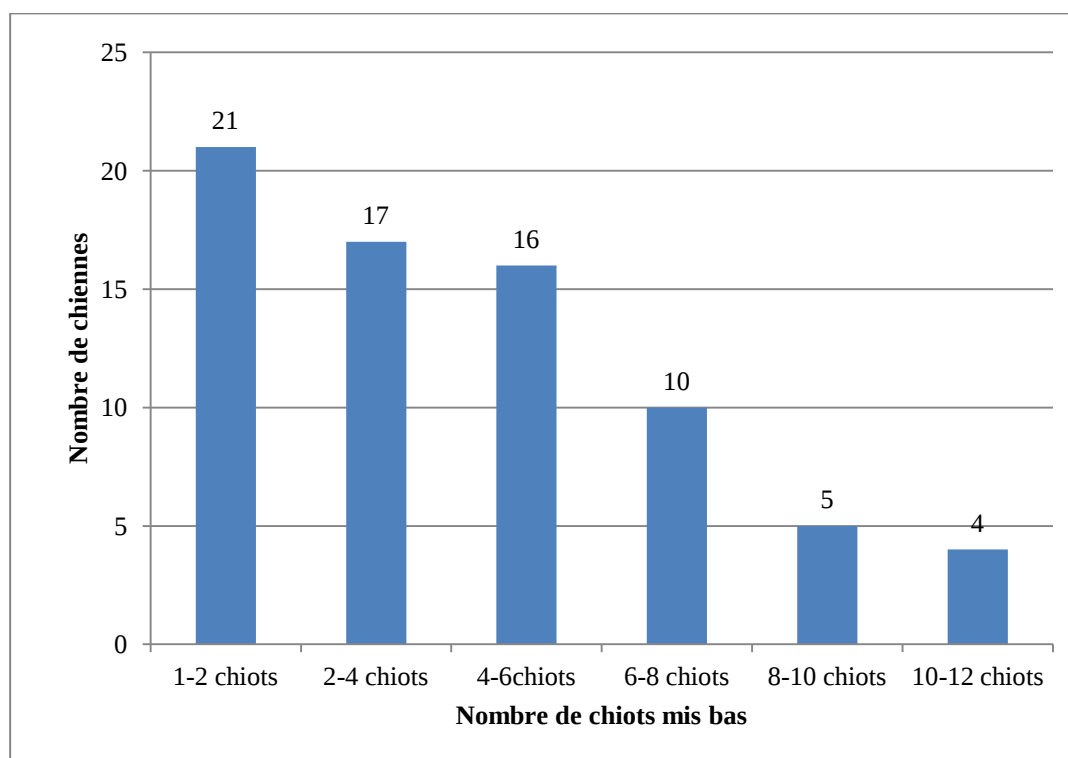
3.1.4. Prolificité

La prolificité moyenne était de 4,6 +/- 3,0 chiots par chienne (Graphique 1 et Graphique 2).
Les valeurs allaient de 1 à 12 chiots.

Graphique 1 : Diagramme en boîte représentant la prolificité



Graphique 2 : Répartition du nombre de chiennes en fonction du nombre de chiots mis bas



3.1.5. Pourcentage de mâles, de femelles et sex-ratio

Le nombre de chiots mâles et chiots femelles par portée était connu chez 34 chiennes.

- Le nombre moyen de mâles par portée était de $2,1 \pm 2,0$, le nombre moyen de femelles par portée était de $2,3 \pm 1,9$.
- Le pourcentage moyen de mâles par portée était de $45,8 \pm 29,7 \%$, le pourcentage moyen de femelles par portée était de $54,2 \pm 29,7 \%$.

- Le sex-ratio était de 1,17 +/- 1,4.

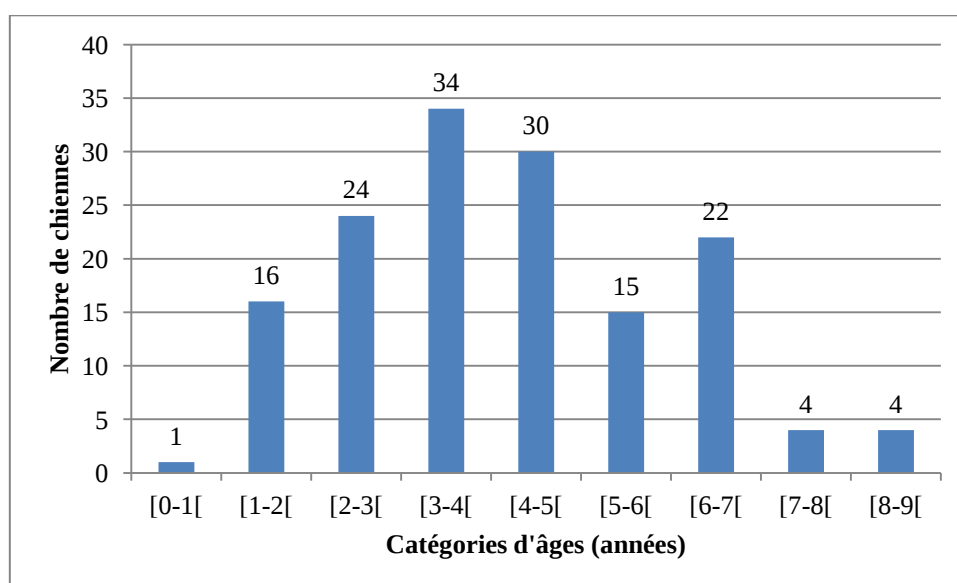
3.1.6. Age moyen

3.1.6.1. Nombre de chiennes inséminées en fonction de l'âge

L'âge moyen des chiennes inséminées était de 4,3 +/-1,9 ans. L'âge minimum était de 6 mois, l'âge maximum était de 8 ans et 7 mois.

Les résultats sont présentés sur le Graphique 3.

Graphique 3 : Répartition du nombre de chiennes inséminées en fonction de l'âge



3.1.6.2. Taux de gestation en fonction de l'âge

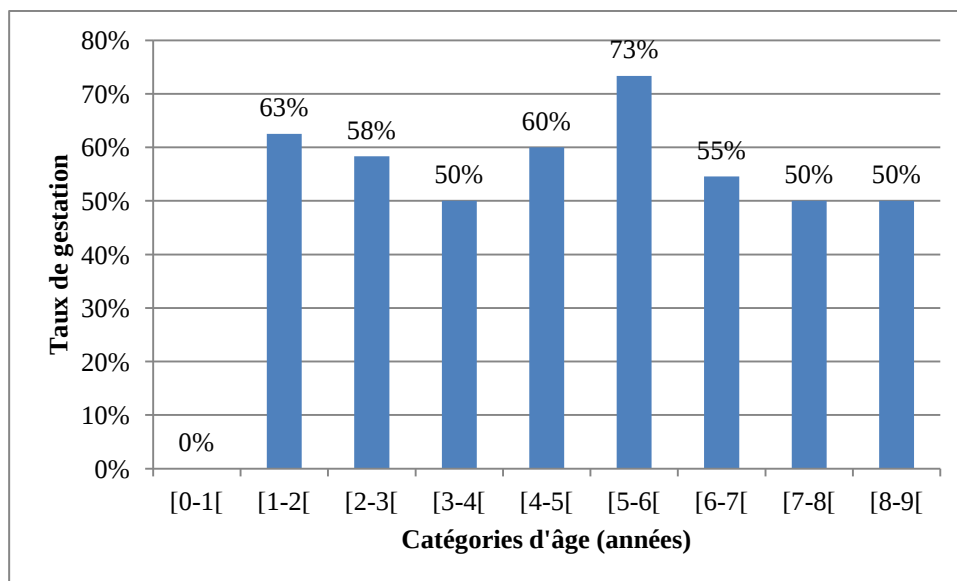
Sur le

Graphique 4, il n'apparaît pas de modification majeure du taux de gestation, même lorsque les chiennes étaient plus âgées.

En effet, le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) :

- Entre les chiennes de plus de 3 ans (58,5 %, $n = 41$) et celles de moins de 3 ans (56,9 %, $n = 109$)
- Entre les chiennes de plus de 6 ans (58,3 %, $n = 120$) et celles de moins de 6 ans (53,3 %, $n = 30$)

Graphique 4 : Taux de gestation en fonction de l'âge de la chienne



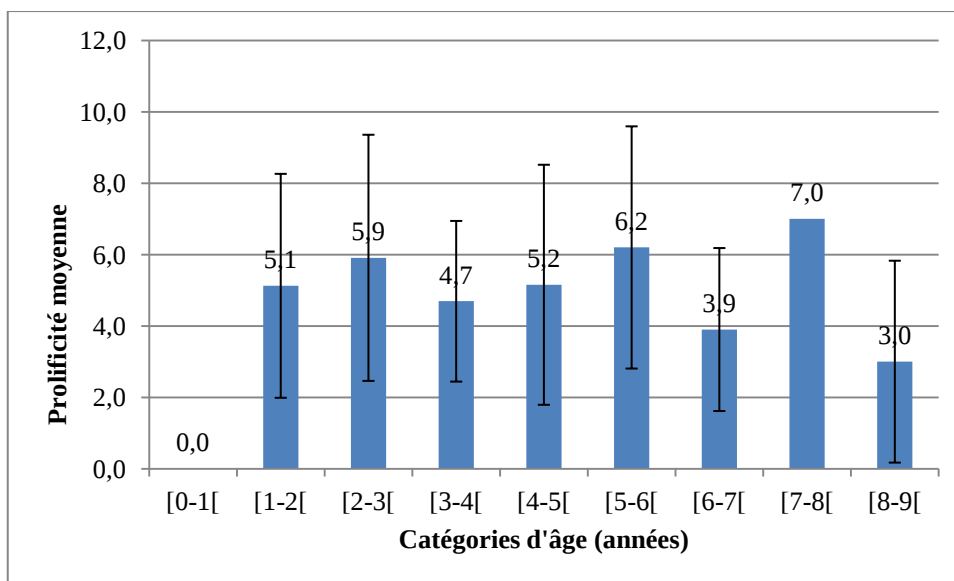
Le meilleur taux de gestation était atteint pour les chiennes de 5 ans ; et était de 73%.

3.1.6.3. Proliféricité en fonction de l'âge de la chienne

Les résultats sont présentés sur le

Graphique 5. Le nombre de chiots par portée était relativement constant en fonction de l'âge.

Graphique 5 : Proliféricité moyenne et écart-type en fonction de l'âge



3.1.7. Groupe cynophile

3.1.7.1. Répartition des chiennes selon le groupe cynophile

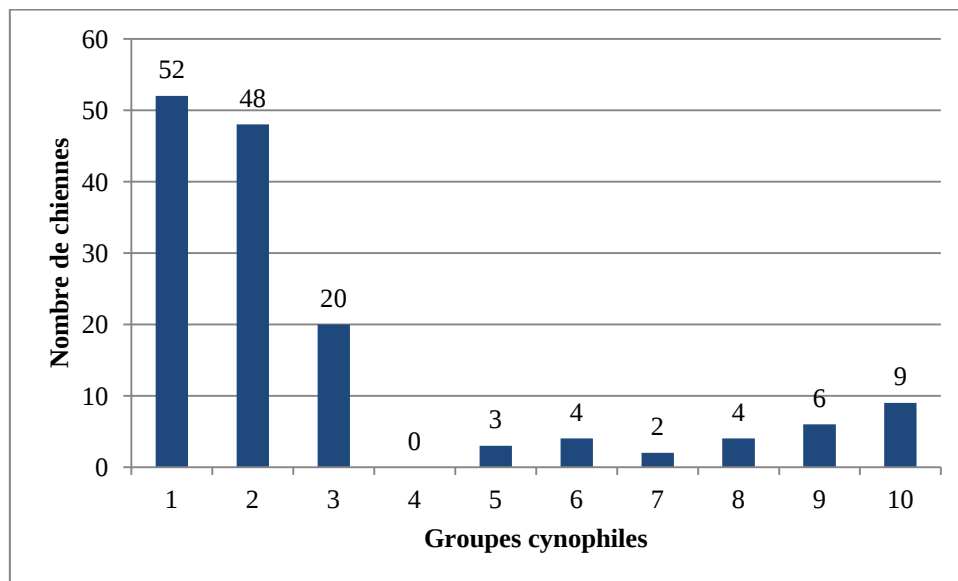
Les groupes cynophiles, selon la classification de la Fédération Cynologique Internationale, correspondent à des regroupements des races ayant des similarités génétiques et morphologiques.

- Groupe 1 : Chiens de berger et de bouvier (sauf chiens de bouvier suisses).
- Groupe 2 : Chiens de type Pinscher et Schnauzer, molossoïdes, chiens de montagne et de bouvier suisses et autres races.
- Groupe 3 : Terriers.
- Groupe 4 : Teckels.
- Groupe 5 : Chiens de type Spitz et de type primitif.
- Groupe 6 : Chiens courants, chiens de recherche au sang et races apparentées.
- Groupe 7 : Chiens d'arrêt.
- Groupe 8 : Chiens rapporteurs de gibier, chiens leveurs de gibier, chiens d'eau.
- Groupe 9 : Chiens d'agrément et de compagnie.
- Groupe 10 : Lévrier.

Les groupes 1 et 2 étaient majoritaires dans cette étude, et représentaient respectivement 35,1 % et 29,8 % de l'effectif total des chiennes inséminées (

Graphique 6).

Graphique 6 : Répartition du nombre de chiennes inséminées en IAC fonction du groupe cynophile



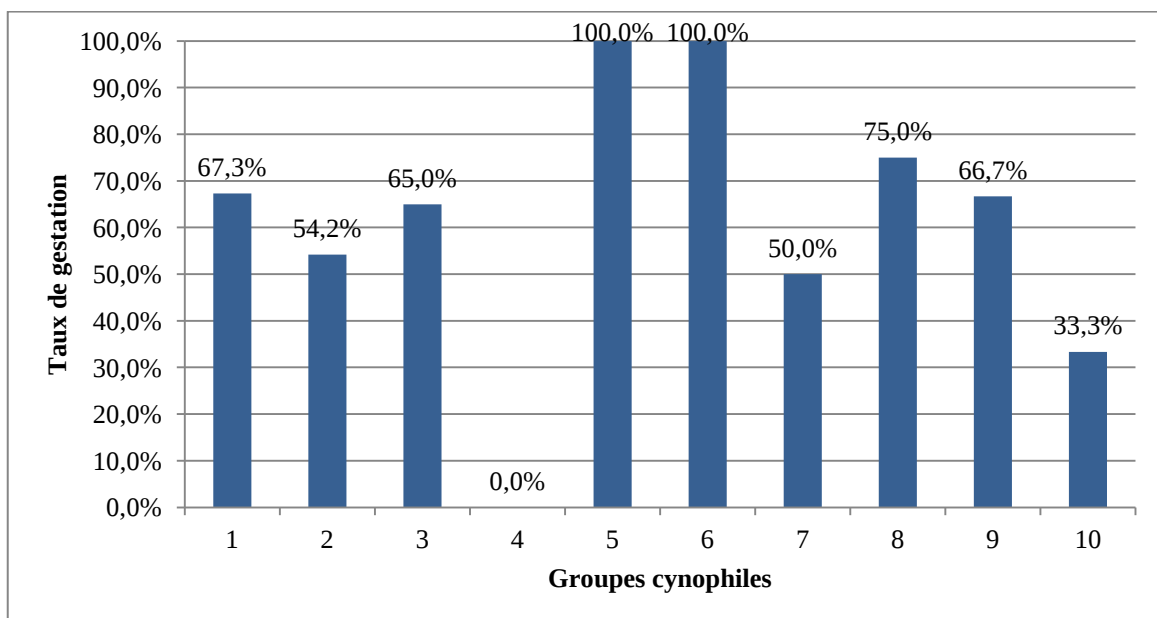
3.1.7.2. Taux de gestation en fonction du groupe cynophile

Les résultats sont présentés sur le

Graphique 7.

Le taux de gestation était variable en fonction du groupe cynophile.

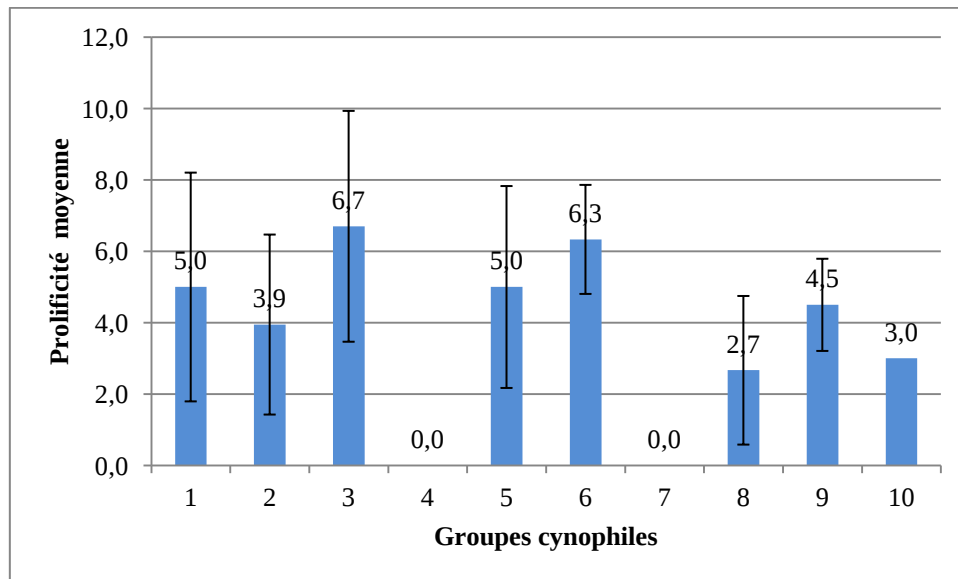
Graphique 7 : Taux de gestation en fonction du groupe cynophile



3.1.7.3. Proliféricité en fonction du groupe cynophile

Le groupe 3 et le groupe 6 présentaient une prolificité moyenne importante : $6,7 \pm 3,2$ et $6,3 \pm 3,5$ chiots par portée respectivement (Graphique 8).

Graphique 8 : Prolificité moyenne et écart-type en fonction du groupe cynophile



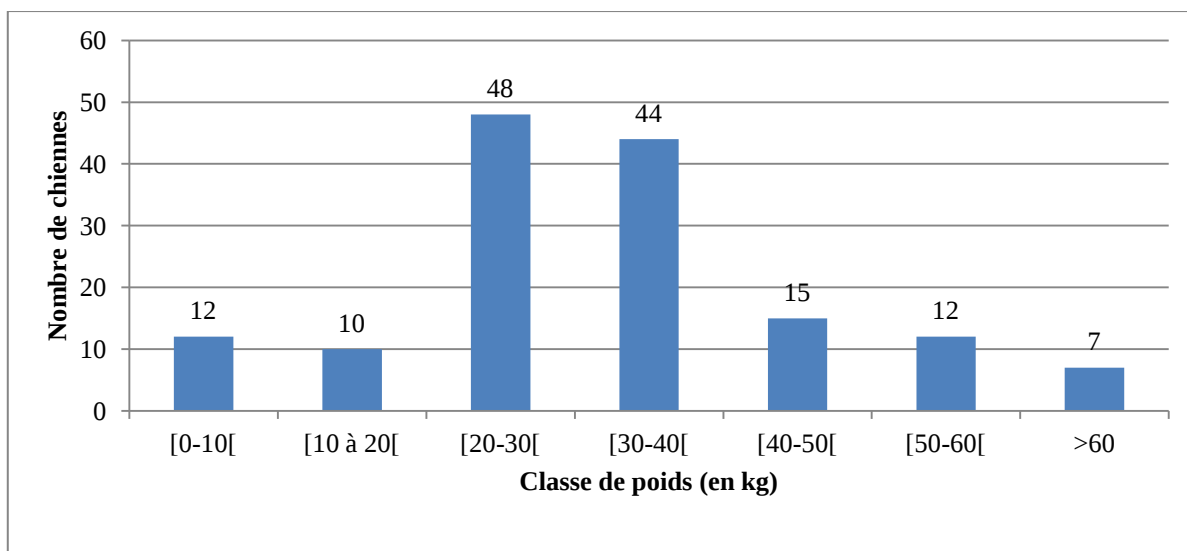
3.1.8. Poids

3.1.8.1. Répartition des chiennes en fonction du poids

Les résultats sont présentés sur le .

Graphique 9 .

Graphique 9 : Répartition du nombre de chiennes en fonction du poids



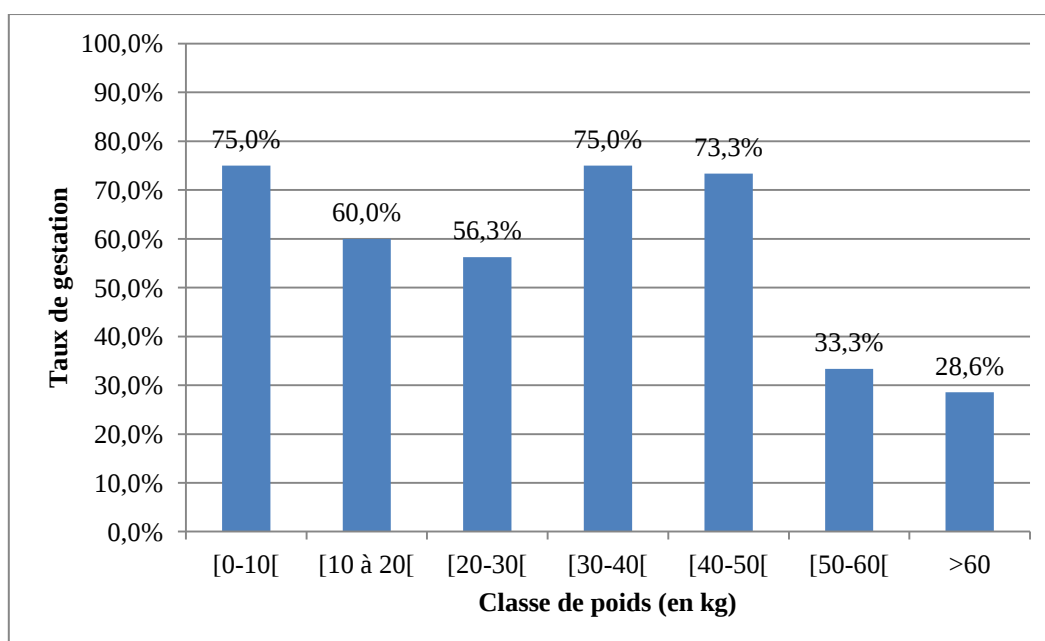
3.1.8.2. Taux de gestation en fonction du poids

Les résultats sont présentés sur le .

Graphique 10.

Le taux de gestation était significativement supérieur pour les chiennes de moins de 50 kg que celles de plus de 50 kg (67,9 % et 31,0 % respectivement, $p < 0,01$).

Graphique 10 : Taux de gestation en fonction du poids



3.1.8.3. Proliféricité en fonction du poids

Les résultats de proliféricité sont présentés sur le Graphique 11, et les valeurs maximales et minimales pour chaque catégorie de poids sont présentées dans le Tableau 7.

- La prolificité minimale était obtenue pour les chiennes de 50 à 60 kg : 2,0 +/- 1,4 chiots en moyenne.
- La prolificité maximale était obtenue pour les chiennes de 30 à 40 kg : 6,3 +/- 3,5 chiots en moyenne.

⇒ La prolificité était significativement différente ($p < 0,01$) entre les chiennes de 30-40 kg (6,3 +/- 3,5 chiots en moyenne) et les chiennes appartenant aux autres catégories de poids (3,77 +/- 2,2 chiots en moyenne).

Graphique 11 : Prolificité moyenne et écart-type en fonction du poids

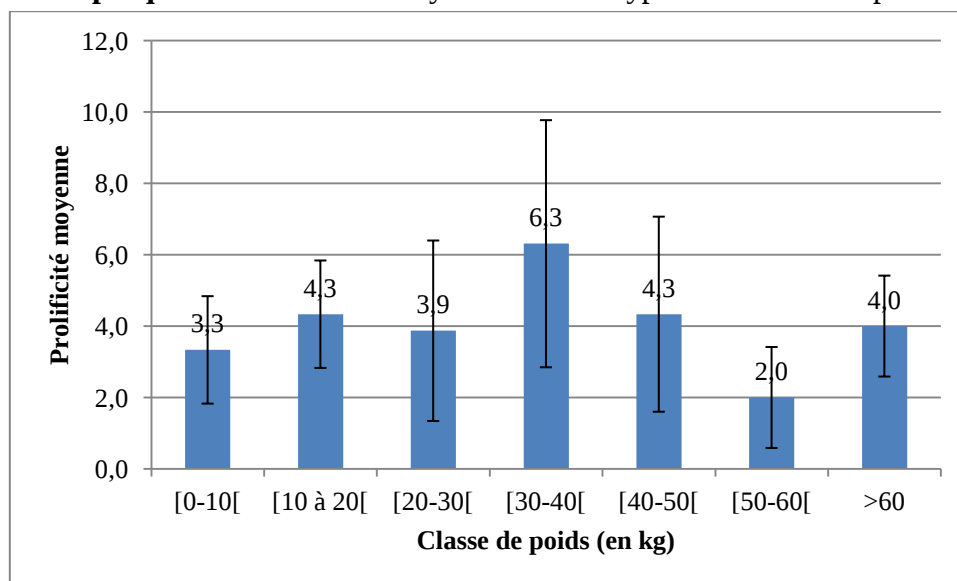


Tableau 7 : Prolificité minimale et maximale en fonction du poids

Classe de poids (en kg)	Prolificité minimale	Prolificité maximale
[0-10[	1	5
[10-20[	2	6
[20-30[	1	8
[30-40[	1	12
[40-50[	1	8
[50-60[	1	4
> 60	3	5

3.1.9. Antécédents d'infertilité

- Les chiennes infertiles étaient celles pour lesquelles le propriétaire rapportait un échec (chienne non gestante) lors d'une mise à la reproduction précédente : 6 chiennes au total.

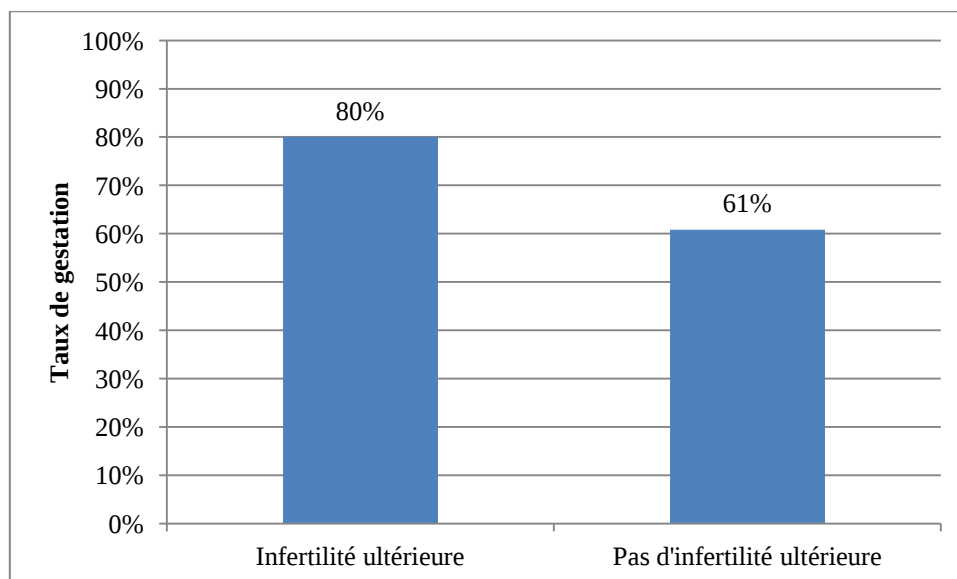
- Les chiennes fertiles correspondaient à toutes celles qui ont eu des portées précédemment, sans antécédents d'échec : 97 chiennes.
- Les chiennes où aucune donnée n'était rapportée (que ce soit sur les antécédents d'infertilité ou la fertilité actuelle) ont été exclues : 70 chiennes.

Les résultats sont présentés sur le

Graphique 12.

- ⇒ Le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) entre les chiennes ayant présenté des antécédents d'infertilité (80 %, $n = 6$) et celles n'en ayant pas présenté (61 %, $n = 97$).

Graphique 12 : Taux de gestation en fonction des épisodes d'infertilité ultérieurs



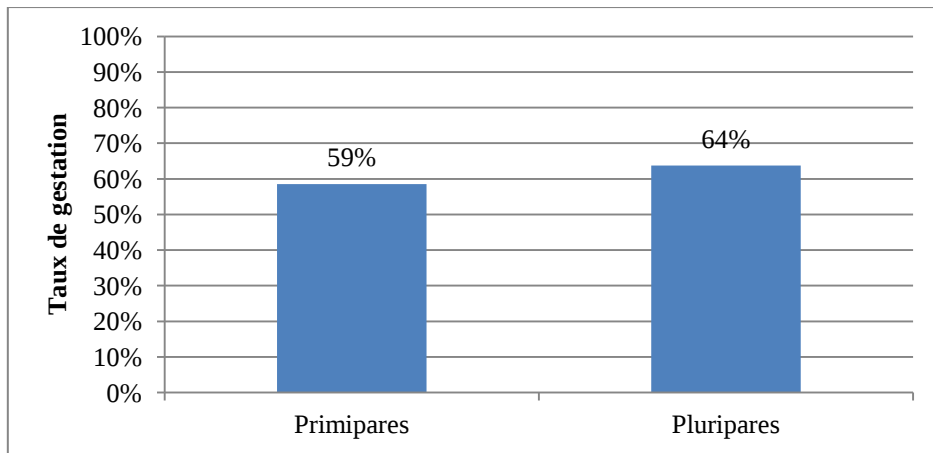
3.1.10. Rang de portée

3.1.10.1. Taux de gestation en fonction du rang de portée

Les résultats sont présentés sur le Graphique 13.

Le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) entre les primipares (59 %, 24/41) et les pluripares (64 %, 44/69).

Graphique 13 : Taux de gestation en fonction de la parité

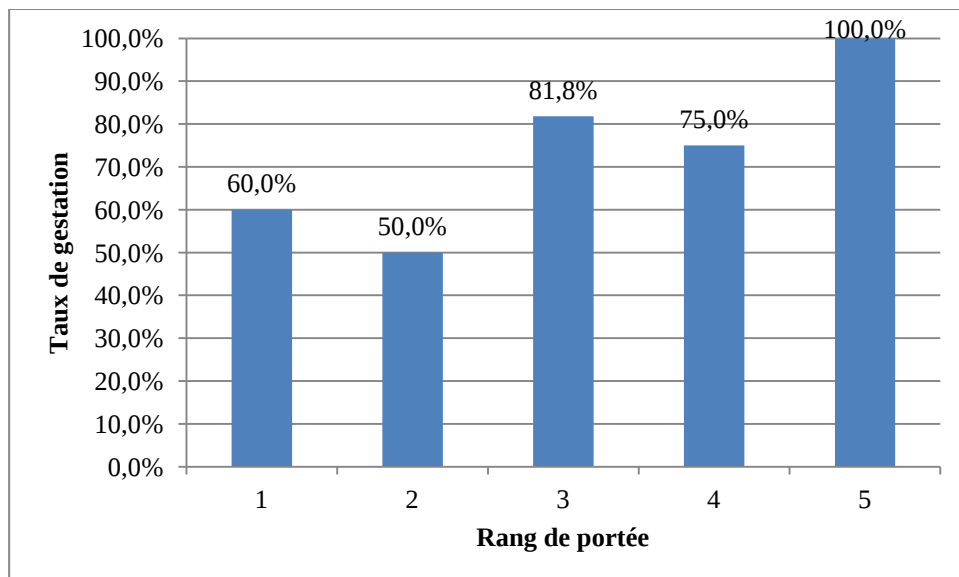


- Le taux de gestation était de (Graphique 14):

- 60% chez les primipares (24/40).
- 50% chez les chiennes ayant déjà fait une portée (11/22).
- 81,8% chez les chiennes ayant déjà fait deux portées (9/11).
- 75% chez les chiennes ayant déjà fait trois portées (3/4).
- 100% chez les chiennes ayant déjà fait quatre portées (2/2).

⇒ Le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) quel que soit le rang de portée.

Graphique 14 : Taux de gestation en fonction du rang de portée



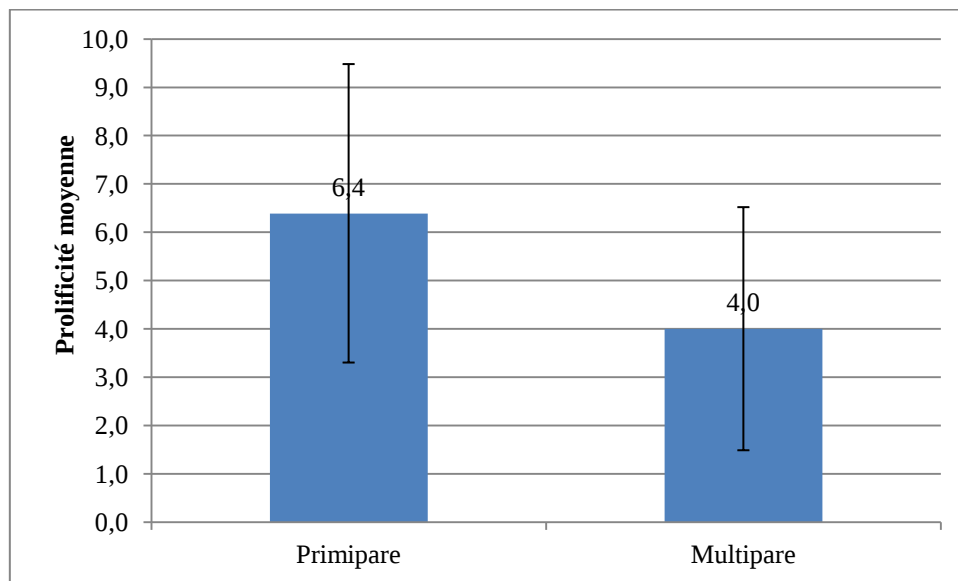
3.1.10.2. Prolificité moyenne en fonction du rang de portée

Les résultats sont présentés sur le

Graphique 15 :

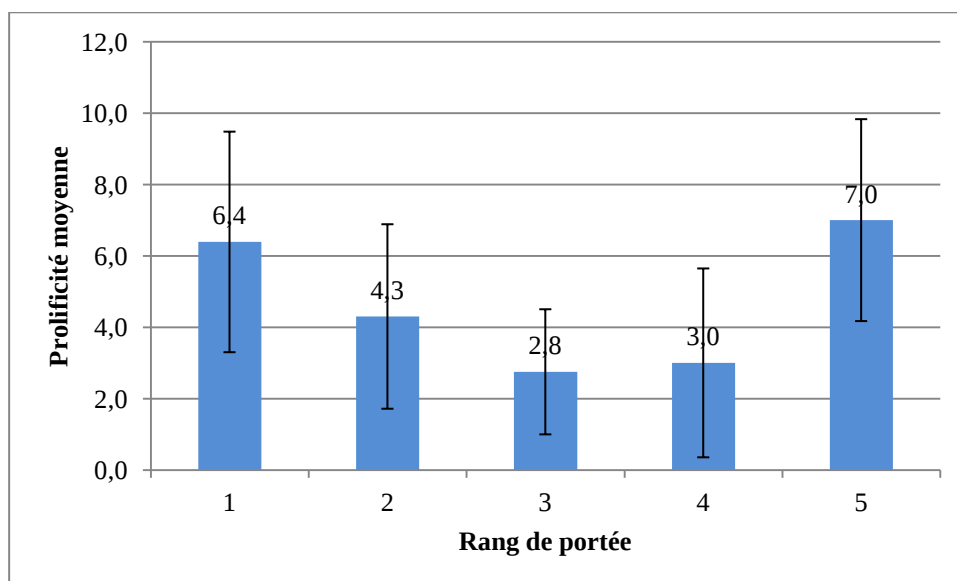
- Pour les primipares, la prolificité moyenne était de 6,4 +/- 3,1 par portée.
- Pour les multipares, la prolificité moyenne était de 4,0 +/- 2,5 par portée.

Graphique 15 : Prolificité moyenne et écart-type en fonction de la parité



La prolificité moyenne en fonction du rang de portée est présentée sur le Graphique 16.

Graphique 16 : Prolificité moyenne et écart-type en fonction du rang de portée



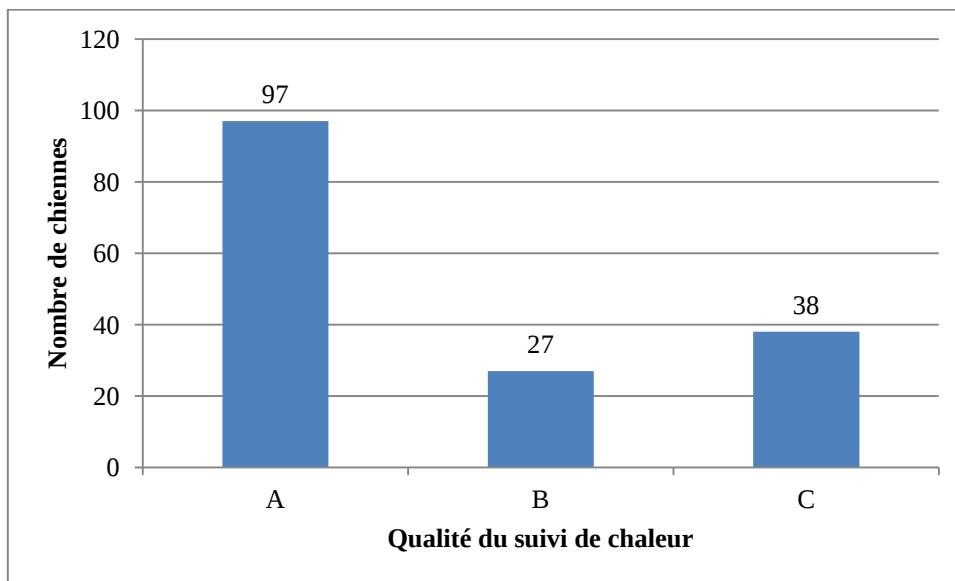
3.1.11. Qualité du suivi de chaleurs

3.1.11.1. Répartition du nombre de chiennes en fonction de la qualité du suivi de chaleur

Les résultats sont présentés sur le Graphique 17 .

Pour la plupart des chiennes, le suivi était de bonne qualité (suivi A : 97/162).

Graphique 17 : Répartition du nombre de chiennes en fonction de la qualité du suivi de chaleur

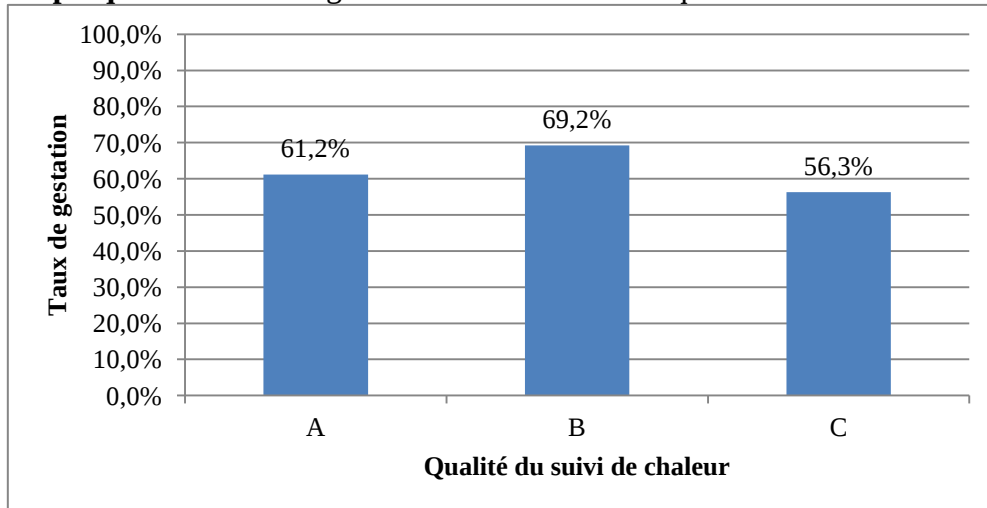


3.1.11.2. Taux de gestation en fonction de la qualité du suivi de chaleur

Les résultats sont présentés sur le Graphique 18.

⇒ Le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,1$) quel que soit le suivi de chaleurs (A, B ou C).

Graphique 18 : Taux de gestation en fonction de la qualité du suivi de chaleur



3.1.12. Taux de progestérone le jour de l'insémination artificielle

3.1.12.1. Taux de progestérone moyen

Le taux de progestérone le jour de la première IAC a été mesuré chez 98 chiennes.

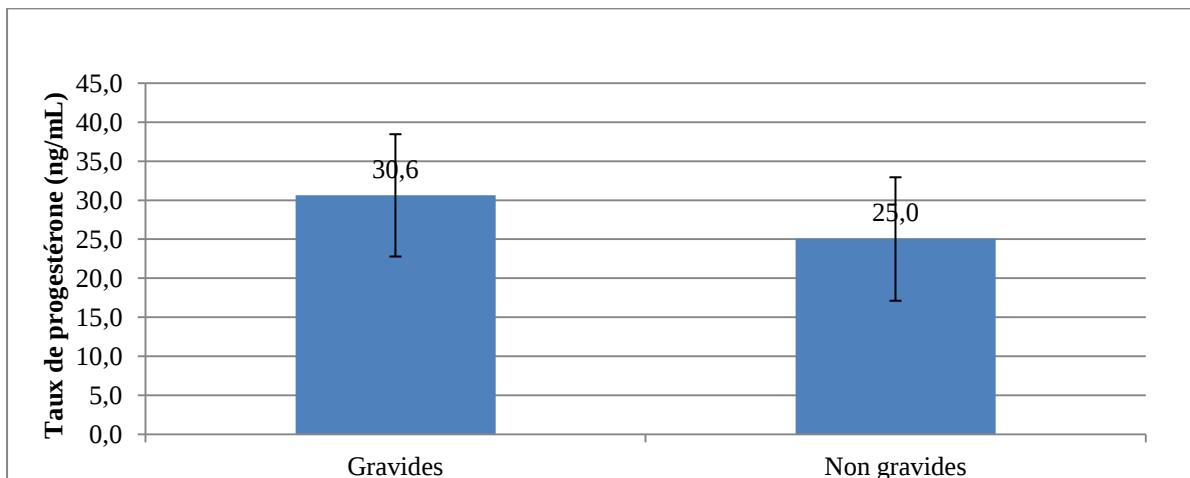
Le taux moyen de progestérone le jour de la première IAC était de 29,0 ng/mL +/- 8,3 ng/mL.

3.1.12.2. Taux de progestérone en fonction de la réussite de l'IAC

Les résultats sont présentés sont le Graphique 19.

⇒ Le taux de progestérone le jour de la première IAC était significativement différent ($p < 0,05$) lorsque l'IAC a conduit à une gestation (30,6 +/- 7,8 ng/mL) de celui où l'IAC n'a pas réussi (25,0 +/- 7,9 ng/mL).

Graphique 19 : Taux de progestérone et écart-type le jour de la 1ère IAC en fonction de la réussite de l'IAC



3.1.13. Diagnostic de gestation

- Un diagnostic de gestation a été réalisé chez 53,8% des chiennes (91 chiennes sur 169), par échographie ou radiographie.
- Ce diagnostic de gestation est important à réaliser, car il permet de détecter si des résorptions embryonnaires précoces ont lieu.
Ainsi, lorsque le diagnostic de gestation n'est pas réalisé, et que la chienne n'est pas gravide, il n'est pas possible de savoir si c'est l'insémination qui n'a pas réussi ou si c'est lié à des résorptions embryonnaires.
- Un taux de résorption a été calculé et est de 29,6 %.

3.2. Paramètres concernant l'insémination artificielle

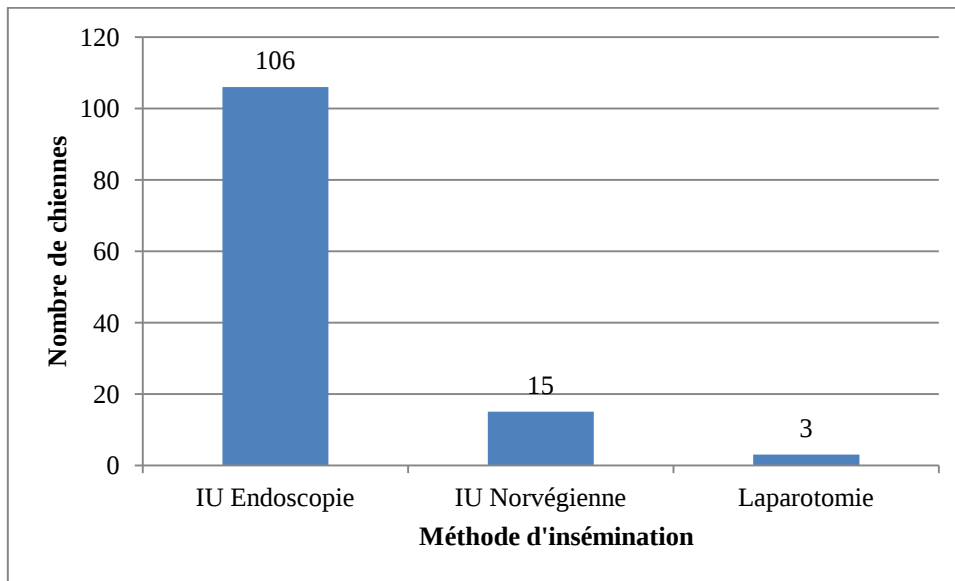
3.2.1. Méthode d'insémination

3.2.1.1. Nombre de chiennes en fonction de la méthode d'insémination

La méthode d'insémination utilisée était principalement l'insémination intra-utérine par endoscopie (Graphique 20).

- L'insémination intra-utérine par endoscopie concernait 85,5 % des chiennes (106/124).
- L'insémination intra-utérine par méthode Norvégienne concernait 12,1 % des chiennes (15/124).
- L'insémination par laparotomie concernait 2,4 % des chiennes (3/124).

Graphique 20 : Répartition du nombre de chiennes en fonction de la méthode d'insémination



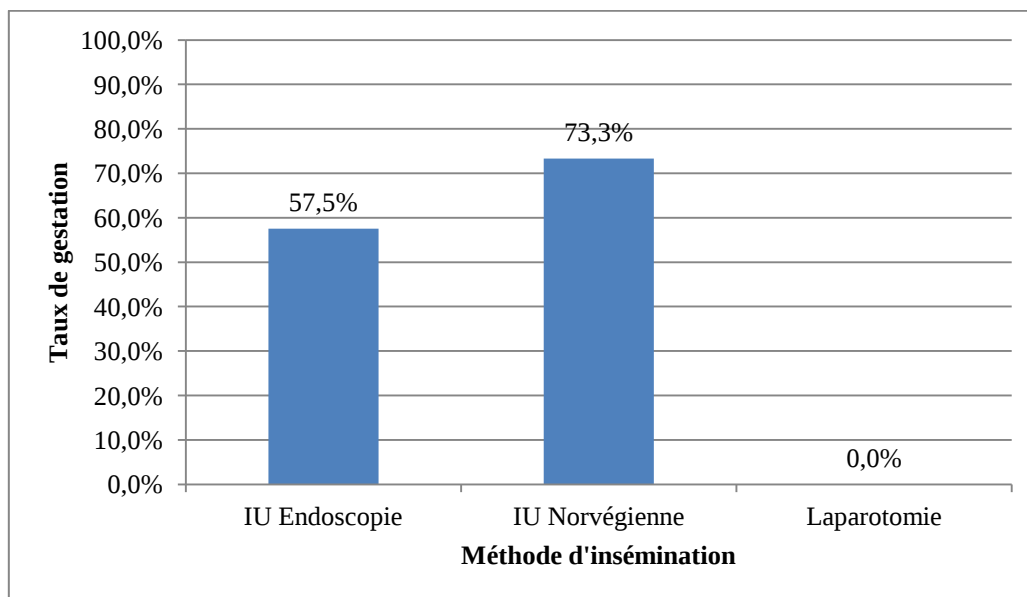
3.2.1.2. Taux de gestation en fonction de la méthode d'insémination

Les résultats sont présentés sur le Graphique 21.

- L'insémination intra-utérine par endoscopie donnait un taux de gestation de 57,5 % (61/106).
- L'insémination intra-utérine par méthode Norvégienne donnait un taux de gestation de 73,3 % (11/15).
- L'insémination par laparotomie donnait un taux de gestation de 0 %.

⇒ Cependant, le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) que l'IAC soit réalisée par endoscopie ou par la méthode Norvégienne.

Graphique 21 : Taux de gestation en fonction de la méthode d'insémination utilisée

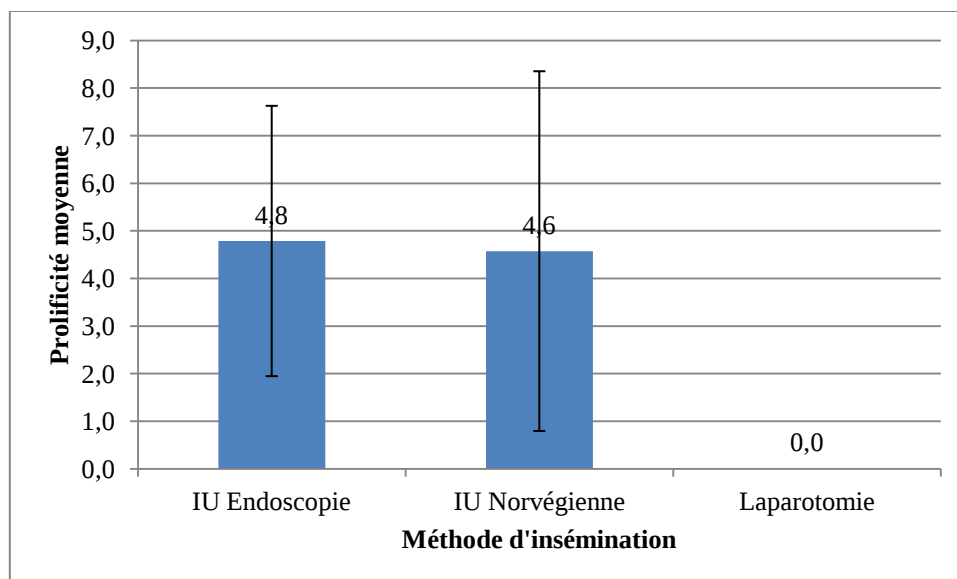


3.2.1.3. Prolifécité en fonction de la méthode d'insémination

Les résultats sont présentés sur le Graphique 22.

- La prolifécité moyenne était de 4,8 +/- 2,8 chiots par portée lors d'insémination intra-utérine par endoscopie
- La prolifécité moyenne était de 4,6 +/- 3,8 chiots par portée lors d'insémination intra-utérine par méthode Norvégienne.

Graphique 22 : Prolifécité moyenne et écart-type en fonction de la méthode d'insémination



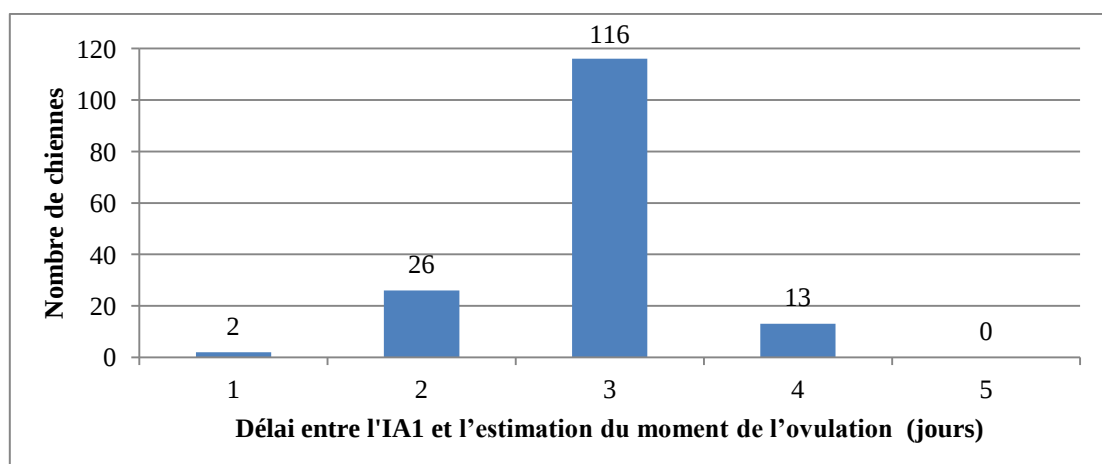
3.2.2. Date de l'insémination

3.2.2.1. Répartition des chiennes en fonction de la date d'insémination

Les résultats sont présentés sur le Graphique 23 et le Graphique 24.

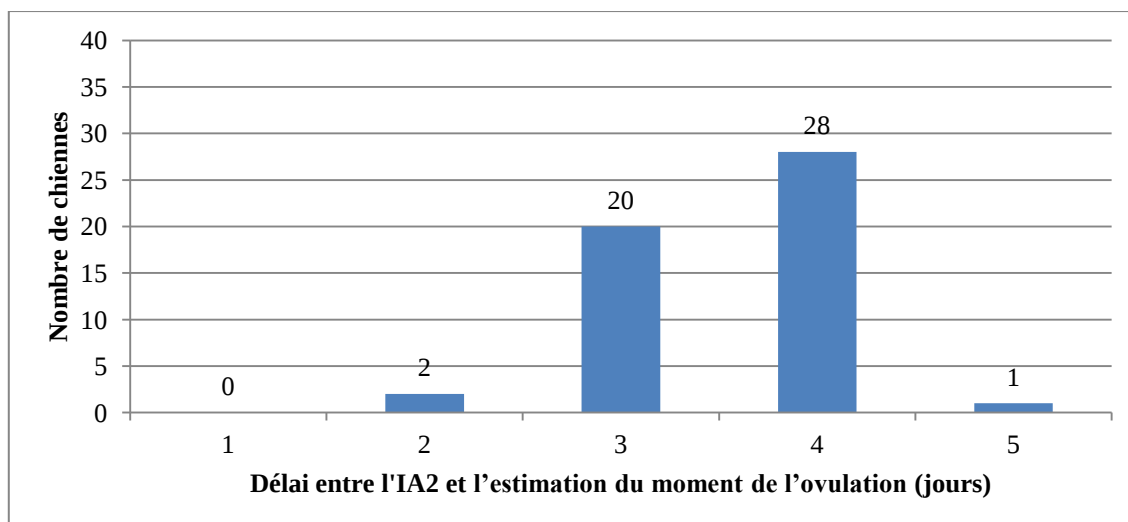
- En moyenne, la première insémination était réalisée $2,9 \pm 0,6$ jours après l'estimation du moment de l'ovulation ($n = 158$).
- En moyenne, lorsque deux inséminations ont été faites, la deuxième était réalisée $3,5 \pm 0,6$ jours après l'estimation du moment de l'ovulation ($n = 51$).
- La majorité des chiennes, pour leur première IA, ont été inséminées 3 jours après l'estimation du moment de l'ovulation (74 %, 116/157).

Graphique 23: Répartition du nombre de chiennes en fonction du délai entre l'IA1 et l'estimation du moment de l'ovulation



- La majorité des chiennes, pour leur deuxième IA, ont été inséminées 4 jours après l'estimation du moment de l'ovulation (55 %, 28/51).

Graphique 24 : Répartition du nombre de chiennes en fonction du délai entre l'IA2 et l'estimation du moment de l'ovulation

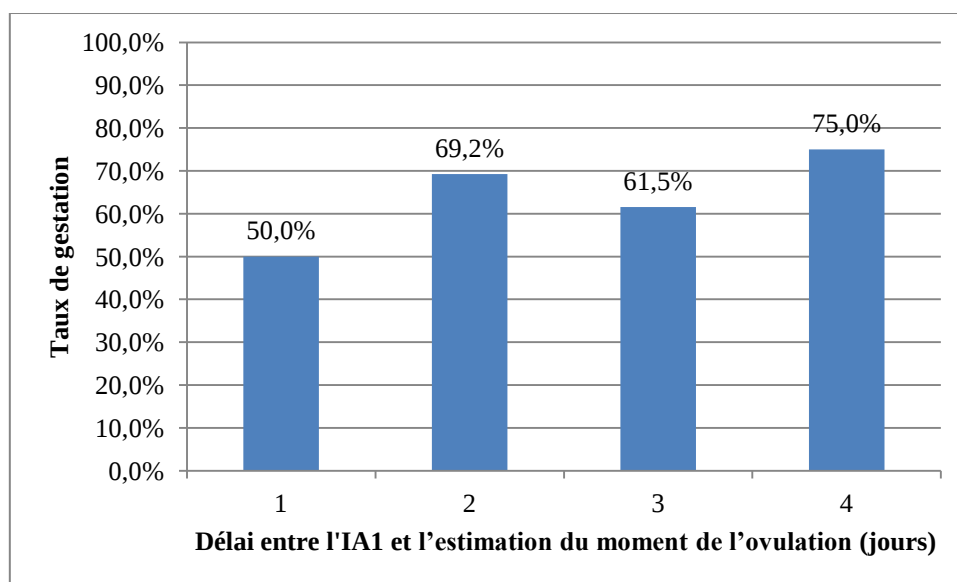


3.2.2.2. Taux de gestation en fonction de la date d'insémination

Les résultats sont présentés sur le Graphique 25.

⇒ Le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) quel que soit le délai entre l'IA1 et l'estimation du moment de l'ovulation.

Graphique 25 : Taux de gestation en fonction du délai entre l'IA1 et l'estimation du moment de l'ovulation



3.2.3. Nombre d'inséminations artificielles

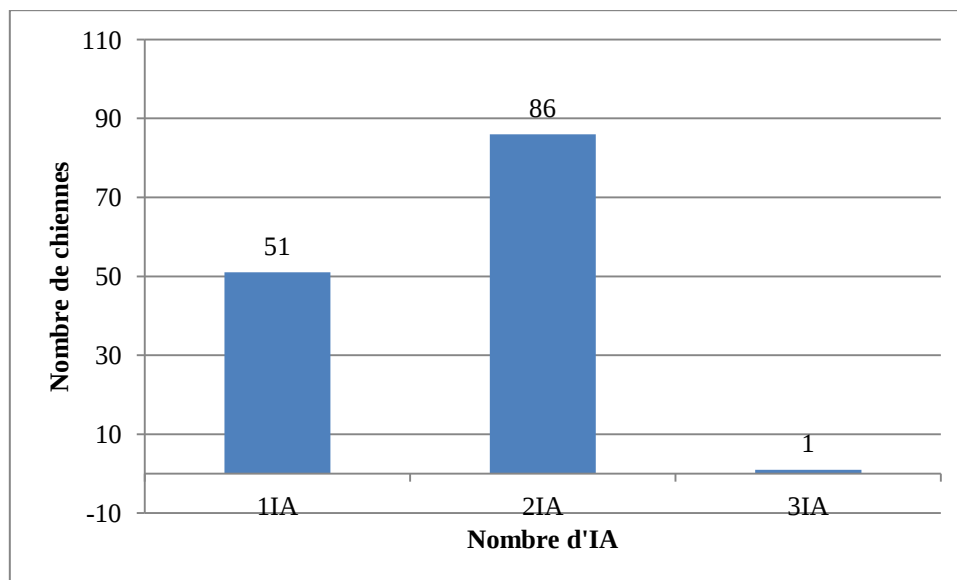
3.2.3.1. Répartition des chiennes en fonction du nombre d'insémination

Les résultats sont présentés sur le Graphique 26.

- 37,0 % des chiennes ont eu une seule insémination (51/138).

- 62,3 % des chiennes ont eu deux inséminations (86/138).
- Une chienne a eu trois inséminations.

Graphique 26 : Répartition du nombre de chiennes en fonction du nombre d'IAC réalisées



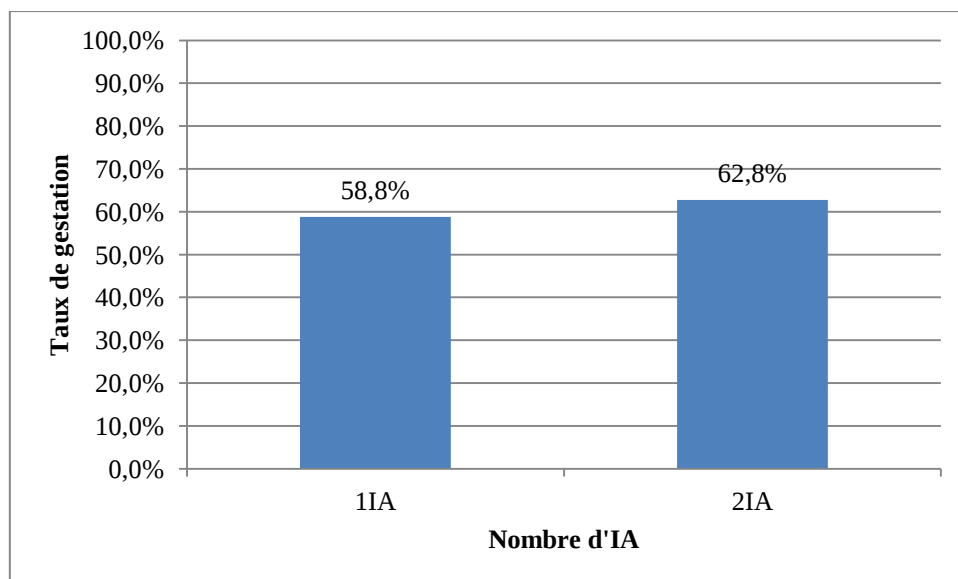
3.2.3.2. Taux de gestation en fonction du nombre d'insémination

Les résultats sont présentés sur le Graphique 27.

- Lorsqu'une insémination était réalisée, le taux de gestation était de 58,8 % (30/51).
- Lorsque deux inséminations étaient réalisées, le taux de gestation était de 62,8 % (54/86).
- Trois inséminations ont été réalisées sur une seule chienne, et ont permis une gestation. Ce résultat n'a pas été représenté car il s'agit d'un effectif trop faible.

⇒ Le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) qu'il y ait une ou deux inséminations réalisées.

Graphique 27 : Taux de gestation en fonction du nombre d'IAC réalisées

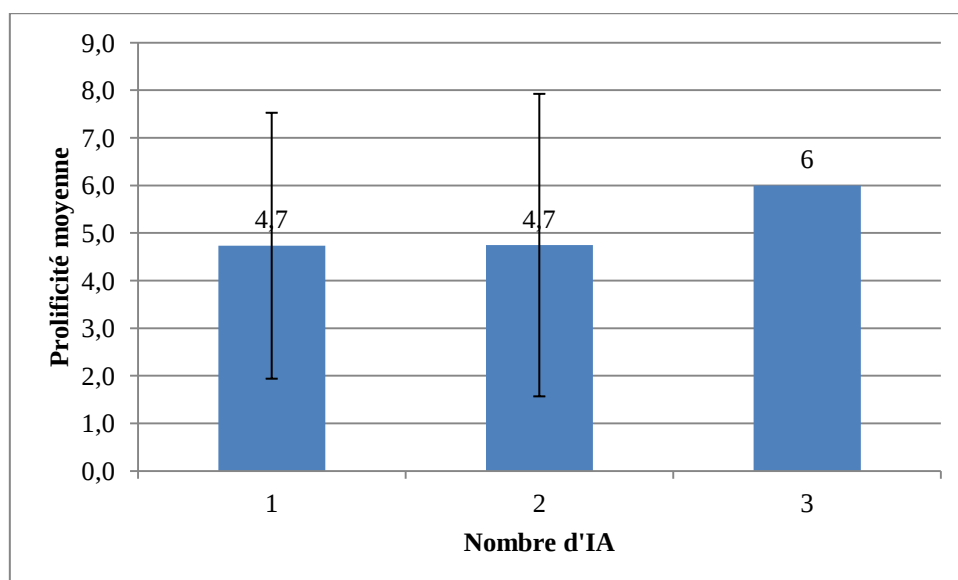


3.2.3.3. Proliférite en fonction du nombre d'insémination artificielle

Les résultats sont présentés sur le Graphique 28.

- Le nombre moyen de chiots était de :
 - 4,7 +/- 2,8 chiots par portée lorsqu'une IA était réalisée.
 - 4,7 +/- 3,2 chiots par portée lorsque deux IA étaient réalisées.
 - 6 chiots par portée lorsque 3 IA étaient réalisées (une chienne).

Graphique 28 : Proliférite moyenne et écart-type en fonction du nombre d'IAC réalisées

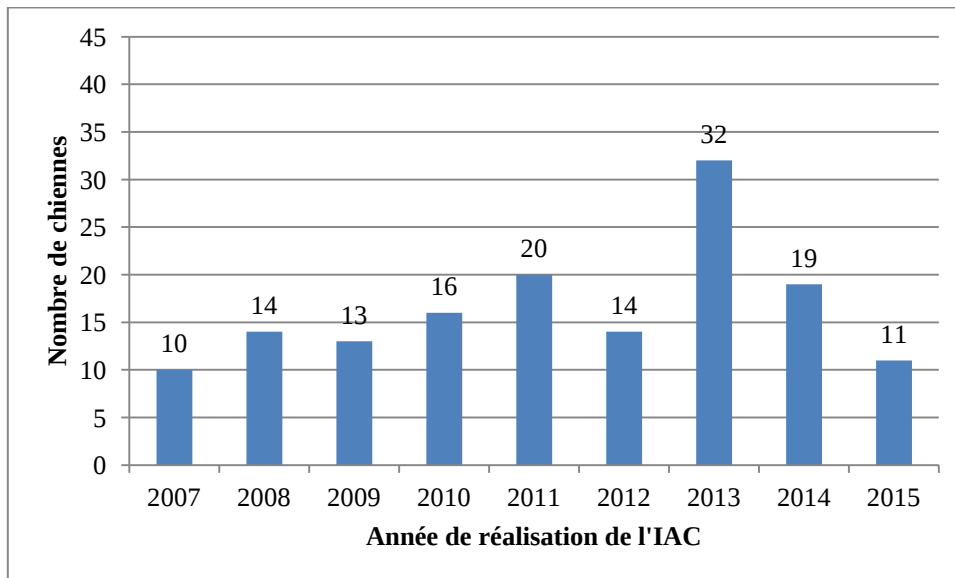


3.2.4. Année de réalisation de l'IAC

3.2.4.1. Répartition des chiennes en fonction de l'année de réalisation de l'IAC

L'année où le plus grand nombre d'inséminations artificielles en semence congelée a été réalisé est l'année 2013 : 34 IAC soit 20,1% sur le nombre total d'IAC (Graphique 29).

Graphique 29 : Répartition du nombre de chiennes en fonction de l'année de l'IAC



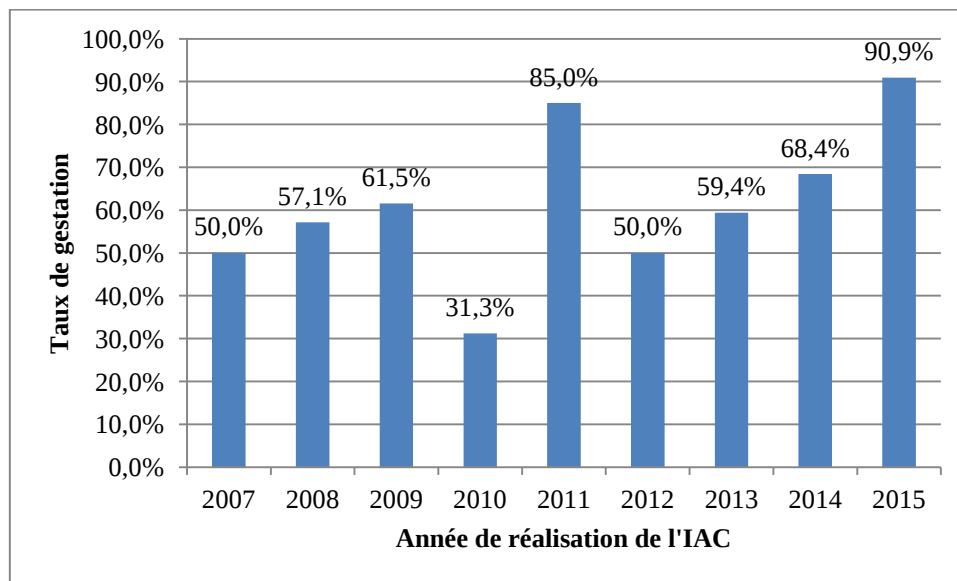
3.2.4.2. Taux de gestation en fonction de l'année de réalisation de l'IAC

Les résultats sont présentés sur le Graphique 30.

Un taux de gestation élevé a été noté pour les années 2011 et 2015.

⇒ Le taux de gestation était significativement différent ($p < 0,05$) entre les années 2007-2010 (49,1 %, 26/53) et 2011-2015 (68,8 %, 66/96).

Graphique 30 : Taux de gestation en fonction de l'année de réalisation de l'IAC

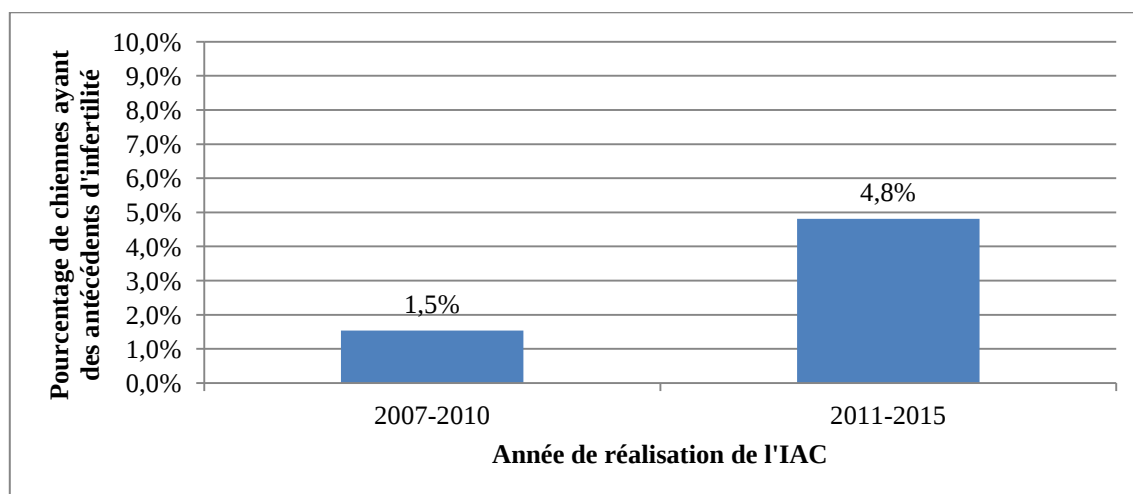


Nous avons ensuite étudié les différents paramètres pouvant influencer cette différence du taux de gestation en fonction de l'année.

3.2.4.2.1. Episodes antérieurs d'infertilité en fonction de l'année

- Le pourcentage de chiennes ayant des antécédents d'infertilité n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) entre 2007-2010 (1,5 %, 1/65) et 2011-2015 (4,8 %, 5/104) (
- Graphique 31).

Graphique 31 : Pourcentage de chiennes ayant des antécédents d'infertilité en fonction de l'année



⇒ Ainsi, les antécédents d'infertilité n'intervenaient pas dans la différence observée concernant le taux de gestation entre 2007-2010 et 2011-2015.

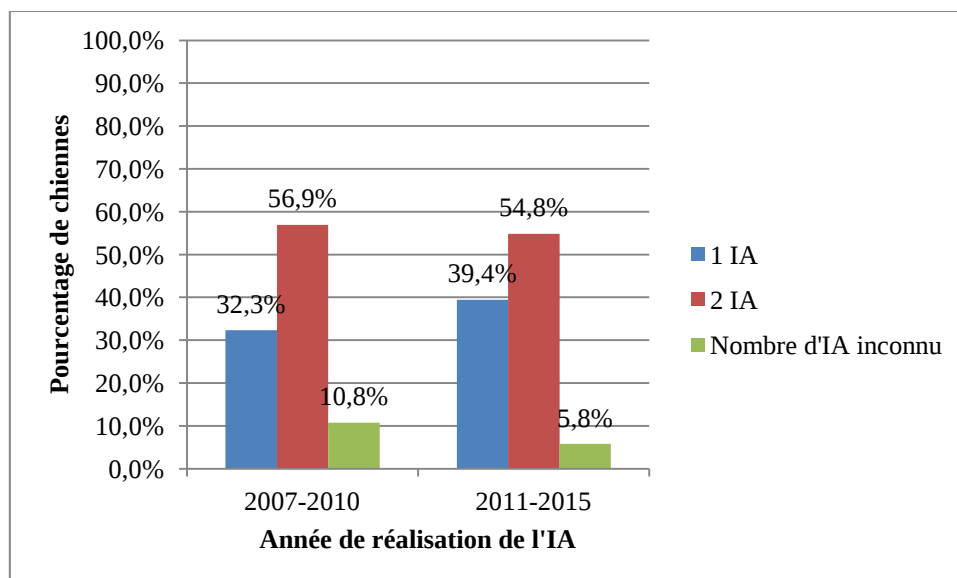
3.2.4.2.2. Nombre d'inséminations réalisées

Comme présenté sur le Graphique 32 :

- Le pourcentage de chiennes ayant eu une IAC était de 32,3 % (21/65) entre 2007-2010, et 39,4 % (41/104) entre 2011-2015
- Le pourcentage de chiennes ayant eu deux IAC était de 56,9 % (37/65) entre 2007-2010, et 54,8 % (57/104) entre 2011-2015
- Le pourcentage de chiennes dont le nombre d'IAC était inconnu était de 10,8 % (7/65) entre 2007-2010, et 5,8 % (6/104) entre 2011-2015

⇒ Le pourcentage de chiennes ayant eu une ou deux IAC n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) entre 2007-2010 et 2011-2015

Graphique 32 : Pourcentage de chiennes ayant eu 1 ou 2 IA en fonction de l'année



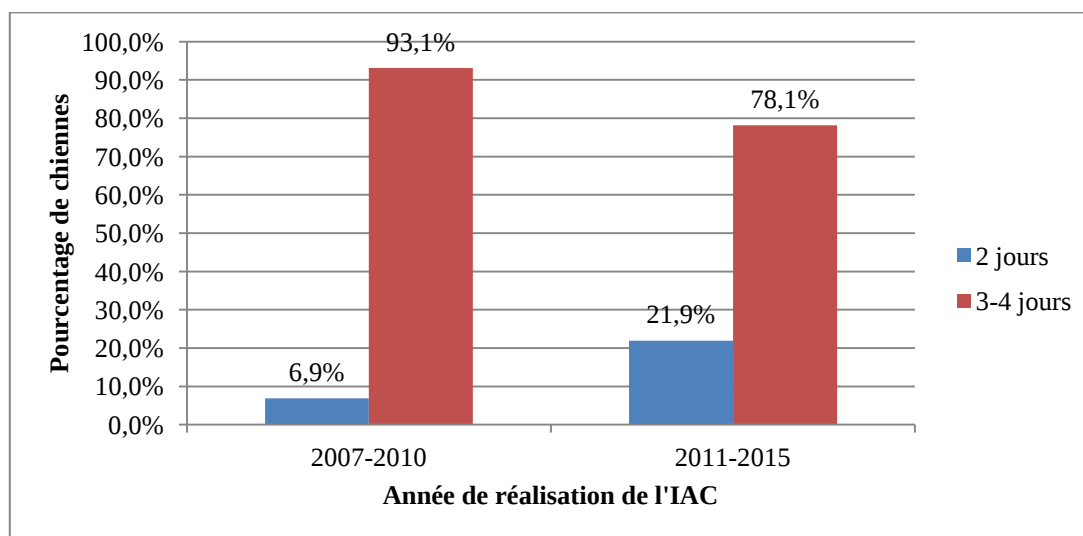
3.2.4.2.3. Délai entre insémination et ovulation

D'après le Graphique 33 :

- Le pourcentage de chiennes inséminées à 2 jours après l'ovulation était de 6,9 % (4/58) entre 2007-2010, et 21,9 % (21/96) entre 2011-2015.
- Le pourcentage de chiennes inséminées à 3 ou 4 jours après l'ovulation était de 93,1 % (54/58) entre 2007-2010, et 78,1 % (75/96) entre 2011-2015.

⇒ Entre 2007-2010, le pourcentage de chiennes inséminées à 3 ou 4 jours après l'estimation du moment de l'ovulation était significativement différent ($p < 0,05$) de celui des chiennes inséminées à 2 jours par rapport à 2011-2015.

Graphique 33 : Pourcentage de chiennes inséminées à 2 ou 3-4 jours après ovulation en fonction de l'année

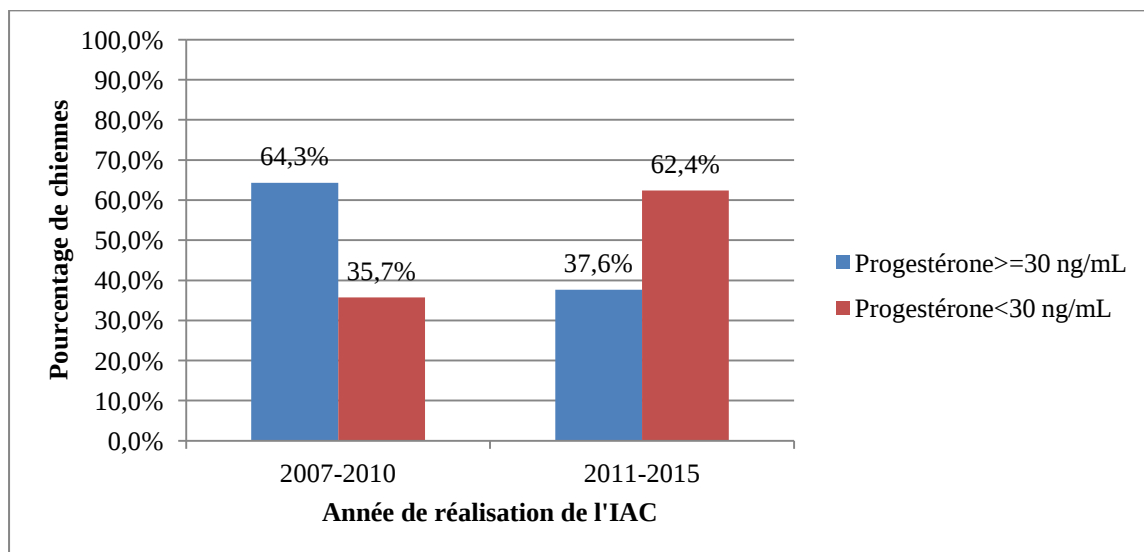


3.2.4.2.4. Taux de progestérone au moment de l'insémination

D'après le Graphique 34 :

- Le pourcentage de chiennes ayant un taux de progestérone supérieur ou égal à 30 ng/mL au moment de la première IA était de 64,3 % (9/14) entre 2007-2010, et 37,6 % (32/85) entre 2011-2015
 - Le pourcentage de chiennes ayant un taux de progestérone inférieur à 30 ng/mL au moment de la première IA était de 35,7 % (5/14) entre 2007-2010, et 62,4 % (53/85) entre 2011-2015
- ⇒ Le pourcentage de chiennes ayant un taux de progestérone supérieur ou inférieur à 30 ng/mL n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) entre 2007-2010 et 2011-2015.

Graphique 34 : Pourcentage de chiennes ayant un taux de progestérone >30 ng/mL ou <30 ng/mL en fonction de l'année



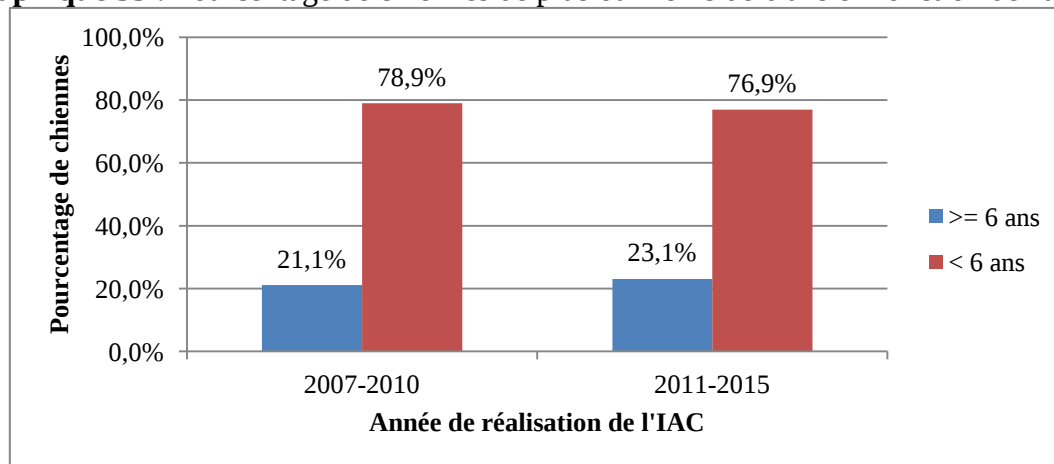
3.2.4.2.5. Age des chiennes

D'après le

Graphique 35 :

- Le pourcentage de chiennes de moins de 6 ans était de 78,9 % (45/57) entre 2007-2010, et 76,9 % (80/104) entre 2011-2015
 - Le pourcentage de chiennes de 6 ans et plus était de 21,1 % (12/57) entre 2007-2010, et 23,1 % (24/104) entre 2011-2015
- ⇒ Le pourcentage de chiennes ayant plus de 6 ans ou moins de 6 ans n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) entre 2007-2010 et 2011-2015.

Graphique 35 : Pourcentage de chiennes de plus ou moins de 6 ans en fonction de l'année



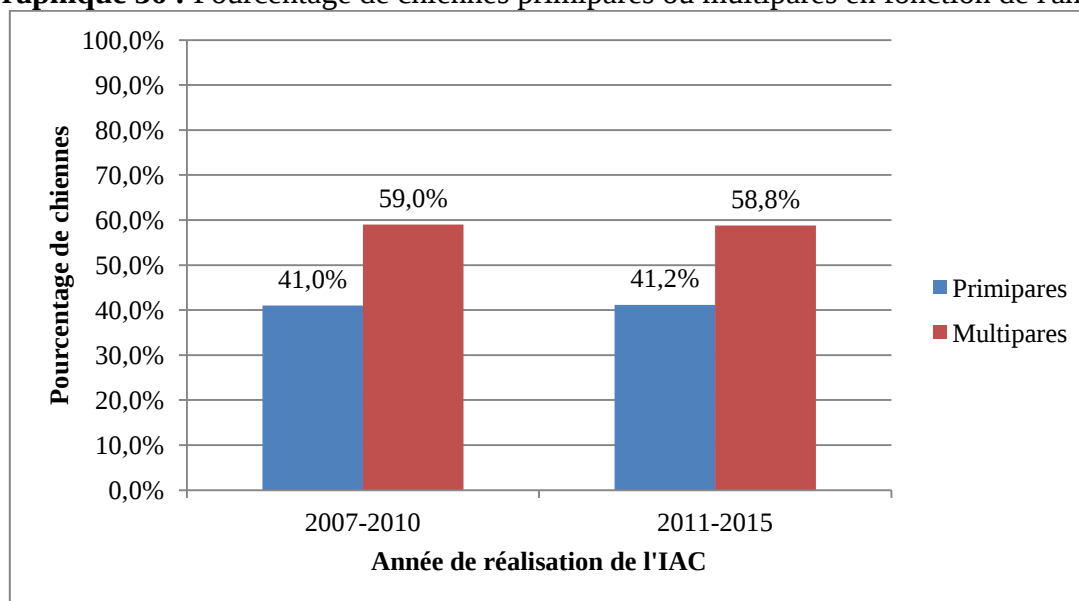
3.2.4.2.6. Rang de portée

D'après le Le pourcentage de chiennes primipares ou multipares n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) entre 2007-2010 et 2011-2015.

Graphique 36 :

- Le pourcentage de chiennes primipares était de 41,0 % (16/39) entre 2007-2010, 41,2 % (28/68) entre 2011-2015.
 - Le pourcentage de chiennes multipares était de 59,0 % (23/39) entre 2007-2010, 58,8 % (40/68) entre 2011-2015.
- ⇒ Le pourcentage de chiennes primipares ou multipares n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) entre 2007-2010 et 2011-2015.

Graphique 36 : Pourcentage de chiennes primipares ou multipares en fonction de l'année



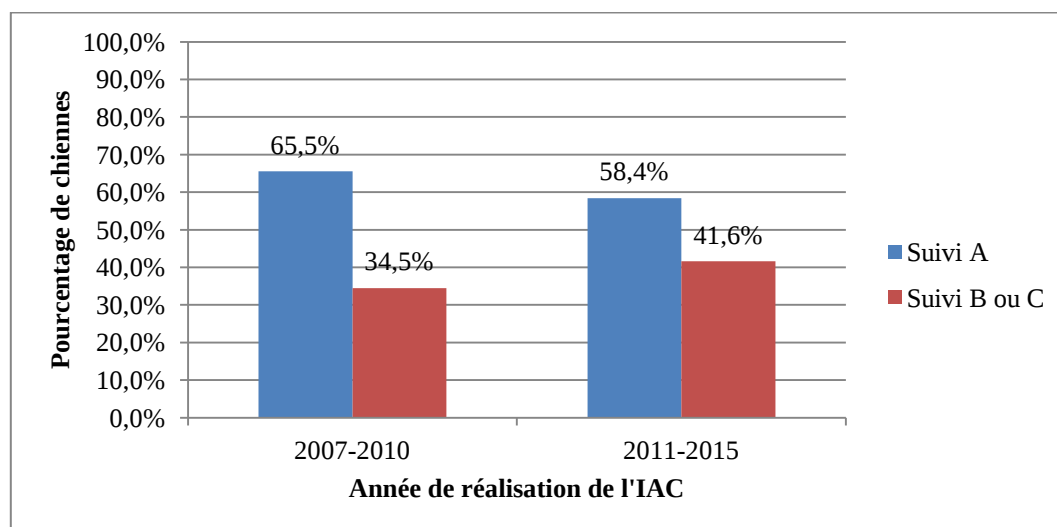
3.2.4.2.7. Qualité du suivi de chaleurs

D'après le Graphique 37 :

- Le pourcentage de chiennes ayant eu un suivi de chaleurs A était de 65,5 % (38/58) entre 2007-2010, et 58,4 % (59/101) entre 2011-2015
- Le pourcentage de chiennes ayant eu un suivi de chaleurs B ou C était de 34,5 % (20/58) entre 2007-2010, et 41,6 % (42/101) entre 2011-2015

⇒ Le pourcentage de chiennes ayant eu un suivi de chaleurs A ou un suivi de chaleurs B/C n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) entre 2007-2010 et 2011-2015.

Graphique 37 : Pourcentage de chiennes ayant eu un suivi de chaleurs A ou B/C en fonction de l'année



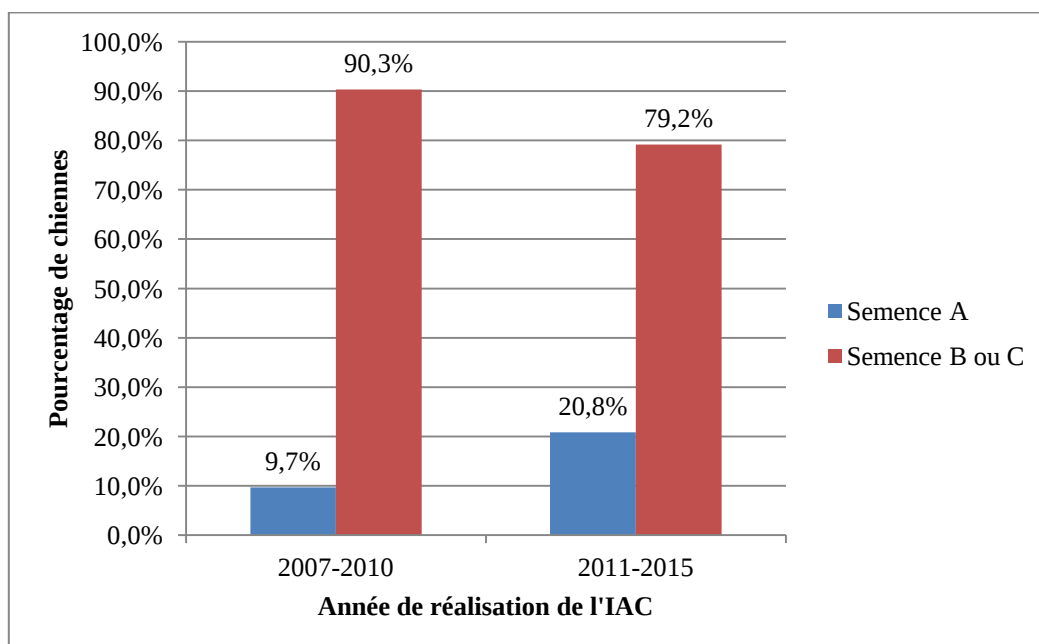
3.2.4.2.8. Qualité de la semence

D'après le Graphique 38 :

- Le pourcentage de chiennes inséminées avec de la semence de qualité A était de 9,7 % (3/31) entre 2007-2010, et 20,8 % (10/48) entre 2011-2015
- Le pourcentage de chiennes inséminées avec de la semence de qualité B ou C était de 90,3 % (28/31) entre 2007-2010, et 79,2 % (38/48) entre 2011-2015

⇒ Le pourcentage de chiennes inséminées avec de la semence de qualité A ou de la semence de qualité B/C n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) entre 2007-2010 et 2011-2015.

Graphique 38 : Pourcentage de chiennes inséminées avec une semence A ou B/C en fonction de l'année



Cependant, comme vu précédemment, il y a peu de données concernant la dose inséminante.

Ainsi, nous allons ensuite prendre en compte uniquement la mobilité.

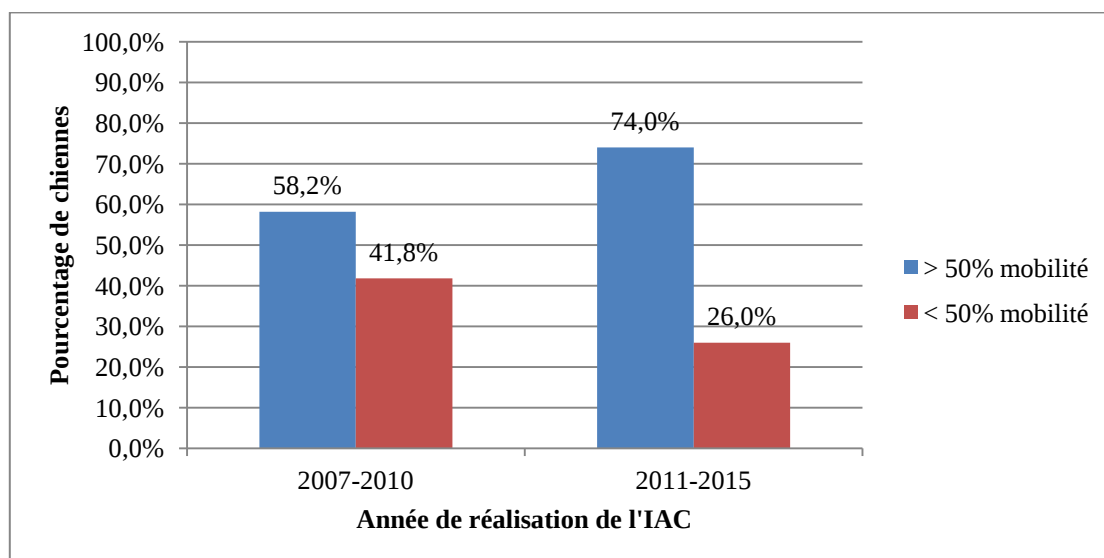
3.2.4.2.9. Mobilité des spermatozoïdes

D'après le Graphique 39 :

- Le pourcentage de chiennes inséminées avec une semence de plus de 50% de mobilité spermatique après décongélation était de 58,2 % (32/55) entre 2007-2010, et 74,0 % (74/100) entre 2011-2015
- Le pourcentage de chiennes inséminées avec une semence de moins de 50% de mobilité spermatique après décongélation était de 41,8 % (23/55) entre 2007-2010, et 26,0 % (26/100) entre 2011-2015

⇒ Entre 2007-2010, le pourcentage de chiennes inséminées avec de la semence avec plus de 50 % de mobilité spermatique après décongélation était significativement différent ($p < 0,05$) de celui des chiennes inséminées avec de la semence avec moins de 50 % de mobilité spermatique par rapport à 2011-2015.

Graphique 39 : Pourcentage de chiennes inséminées avec une semence >50% ou <50% de mobilité en fonction de l'année



3.4.2.10. Bilan

Les deux paramètres variant significativement entre 2007-2010 et 2011-2015 étaient :

- **Le délai entre ovulation et insémination** : entre 2011-2015, il y avait plus de chiennes inséminées à 2 jours après l'ovulation qu'à 3 ou 4 jours par rapport à 2007-2010.
- **La mobilité des spermatozoïdes dans la semence utilisée** : la semence utilisée entre 2011-2015 avait une meilleure mobilité (>50%) que la semence utilisée entre 2007-2010.

3.4.3. Difficultés rencontrées lors de l'insémination

- Des difficultés ont été rencontrées lors de l'insémination (col difficilement visualisable ou palpable, vagin étroit...) chez 7 chiennes sur 169, soit 4,1%.
- Sur ces 7 chiennes, 5 ont été gestantes, 1 ne l'a pas été, et pour la dernière la réussite de l'insémination n'était pas connue.
- Ces effectifs étant faibles, les résultats sont peu significatifs. Cependant, comme 5 chiennes étaient gestantes sur 7, les difficultés rencontrées ne semblent pas être à l'origine d'une moins bonne réussite de l'insémination.

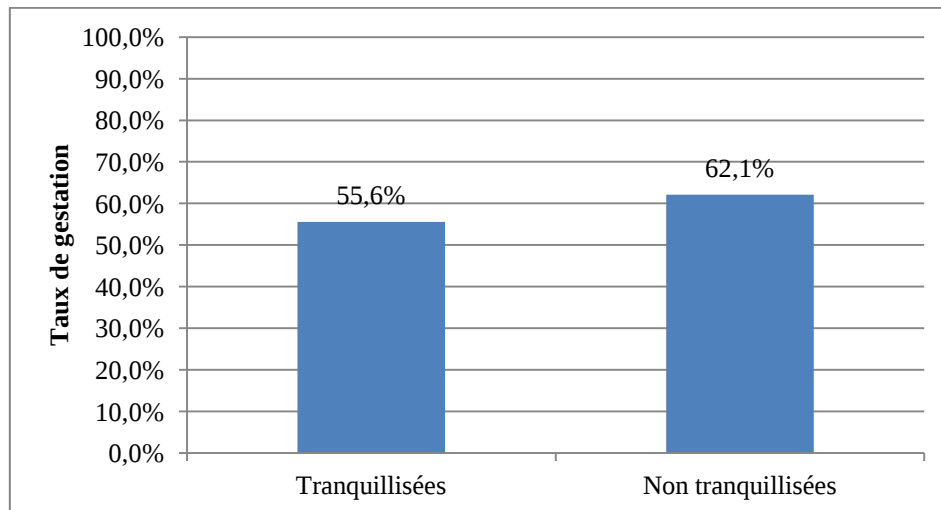
3.4.4. Tranquillisation

Une tranquillisation (xylazine) a été réalisée sur 12 chiennes sur 169, soit 7,1 %.

Les résultats concernant le taux de gestation sont présentés sur le Graphique 40.

⇒ Le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) qu'il y ait eu tranquillisation ou pas (55,6 % et 62,1 % respectivement).

Graphique 40 : Taux de gestation en fonction de la réalisation ou non d'une tranquillisation



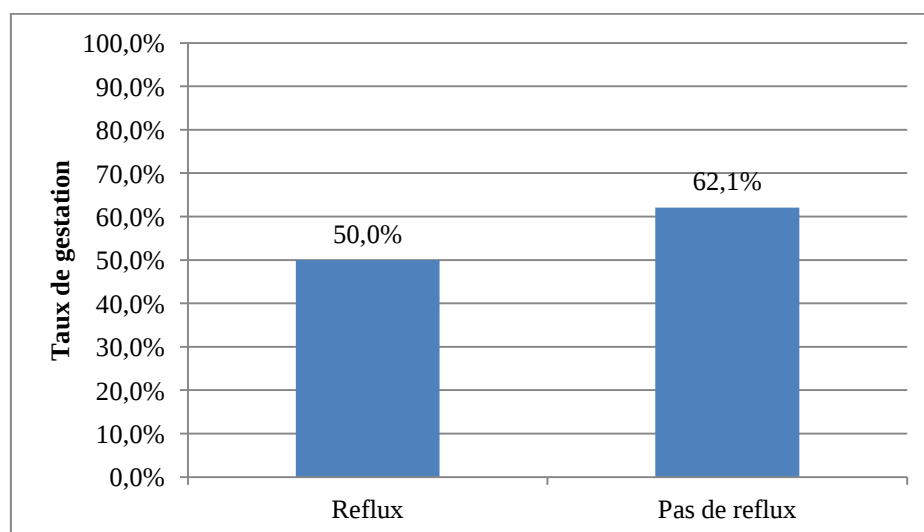
3.4.5. Reflux

Quatre chiennes sur 169 ont présenté un reflux de semence hors du vagin, après l'insémination, soit 2,4 %.

Les résultats concernant le taux de gestation sont présentés sur le Graphique 41.

⇒ Le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) entre les chiennes ayant présenté un reflux (50 %, 2/4) et celles n'en ayant pas présenté (62,1 %, 90/165).

Graphique 41 : Taux de gestation en fonction de la visualisation d'un reflux ou non

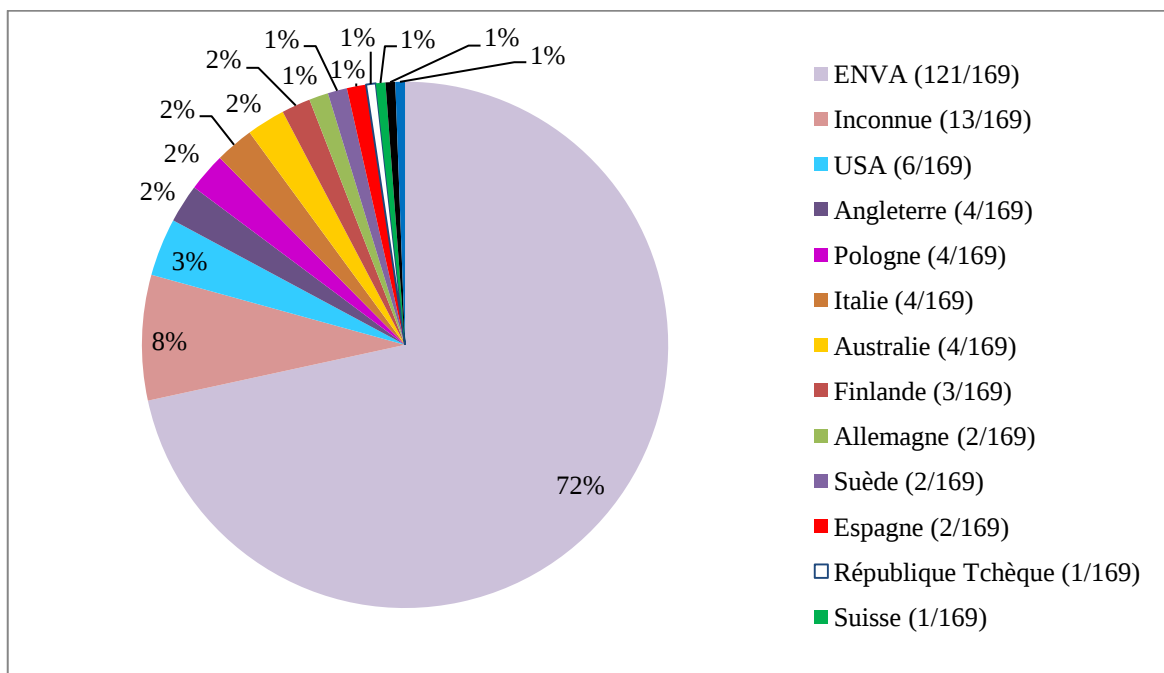


3.5. Paramètres concernant la semence

3.5.2. Provenance de la semence

La semence a été congelée dans 72 % des cas au CERCA (Graphique 42).

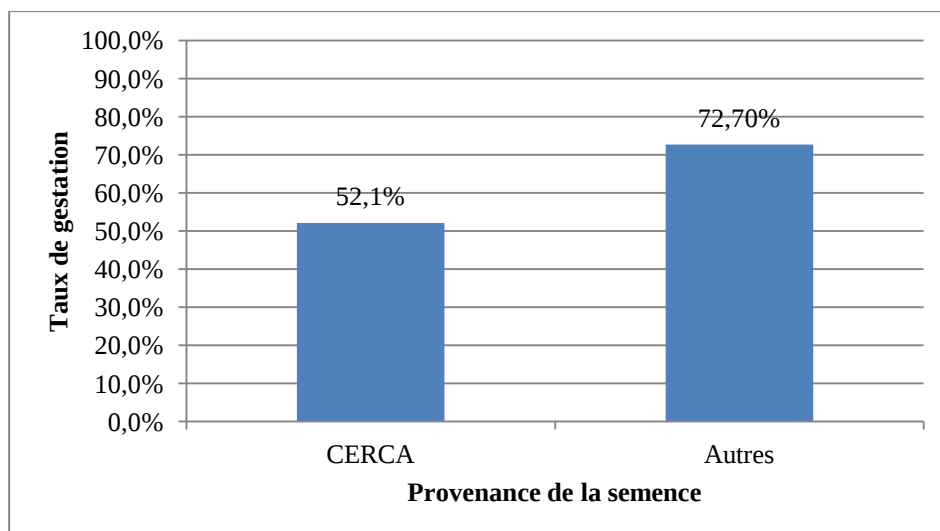
Graphique 42 : Provenance de la semence



Les résultats concernant le taux de gestation sont présentés sur le Graphique 43.

⇒ Le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) que les semences proviennent du CERCA (52,1 %) ou d'autres centres de congélation (72,7 %).

Graphique 43: Taux de gestation en fonction de la provenance de la semence



3.5.3. Conditionnement de la semence

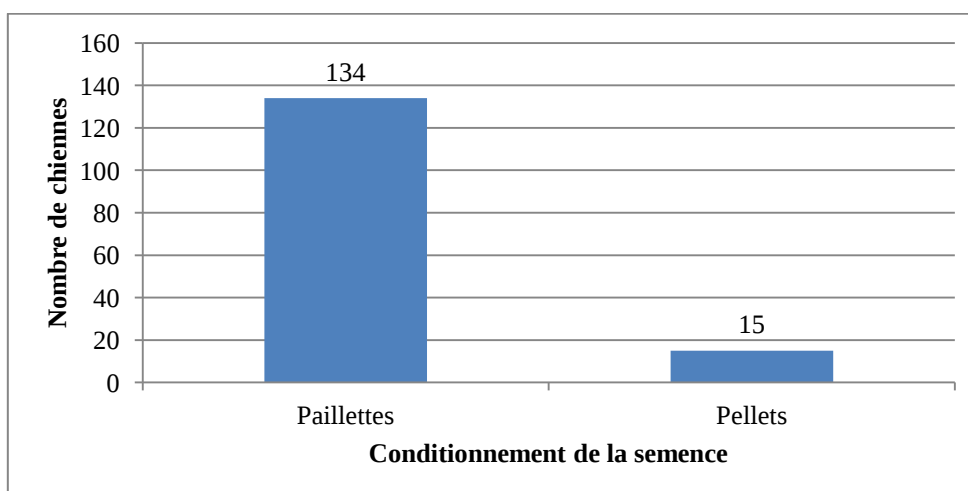
3.5.3.10. Répartition des chiennes en fonction du conditionnement de la semence

La semence peut être conditionnée en paillettes ou en pellets.

Les résultats sont présentés sur le Graphique 44 :

- 89,9 % (134/149) de la semence utilisée a été conditionnée en paillettes.
- 10,1 % (15/149) de la semence utilisée a été conditionnée en pellets.

Graphique 44 : Répartition du nombre de chiennes en fonction du conditionnement de la semence

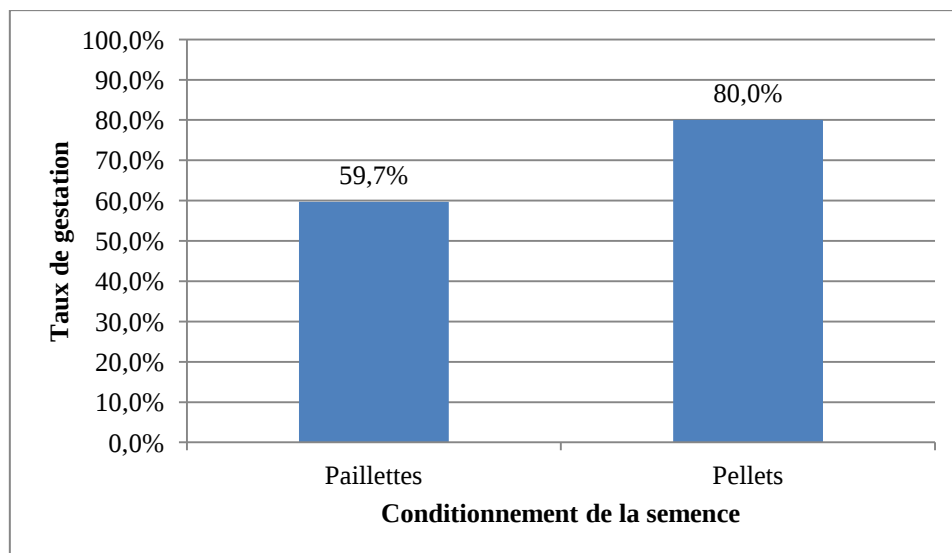


3.5.3.11. Taux de gestation en fonction du conditionnement de la semence

Les résultats sont présentés sur le Graphique 45.

- ⇒ Le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) que la semence ait été conditionnée en paillettes (59,7 %, 80/134) ou en pellets (80 %, 12/15).

Graphique 45 : Taux de gestation en fonction du conditionnement de la semence

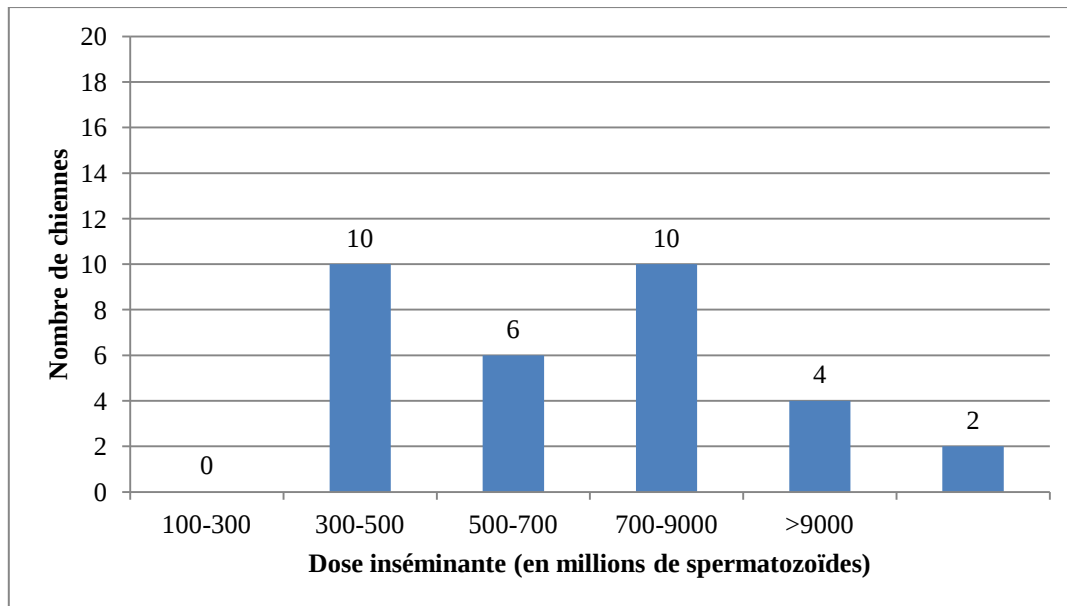


3.5.4. Dose inséminante

3.5.4.10. Répartition du nombre de chiennes en fonction de la dose inséminante

Les résultats sont présentés sur le Graphique 46.

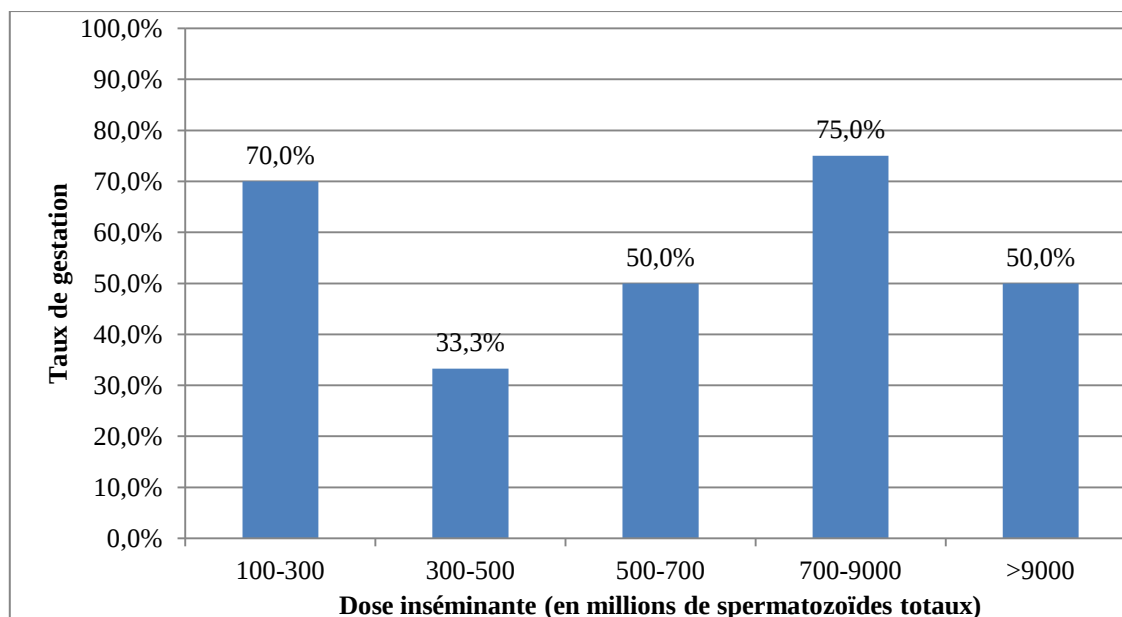
Graphique 46 : Répartition du nombre de chiennes en fonction de la dose inséminante



3.5.4.11. Taux de gestation en fonction de la dose inséminante

- Le taux de gestation le plus élevé (75 %, 3/4) était obtenu pour une dose de 700 à 900 millions de spermatozoïdes totaux (Graphique 47).
- ⇒ Le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) entre :
- Les intervalles < 300 millions et > 300 millions de spermatozoïdes totaux : 70 % (7/10) et 50 % (11/22) respectivement.
 - Les intervalles < 500 millions et > 500 millions de spermatozoïdes totaux : 56,3 % pour les deux intervalles (9/16 pour les deux intervalles).

Graphique 47 : Taux de gestation en fonction de la dose inséminante



3.5.4.12. Prolificité en fonction de la dose inséminante

Les résultats sont présentés sur le Pour les doses inséminantes < 100 et > 900 millions de spermatozoïdes, il n'y avait aucune chienne où le nombre de chiots était connu.

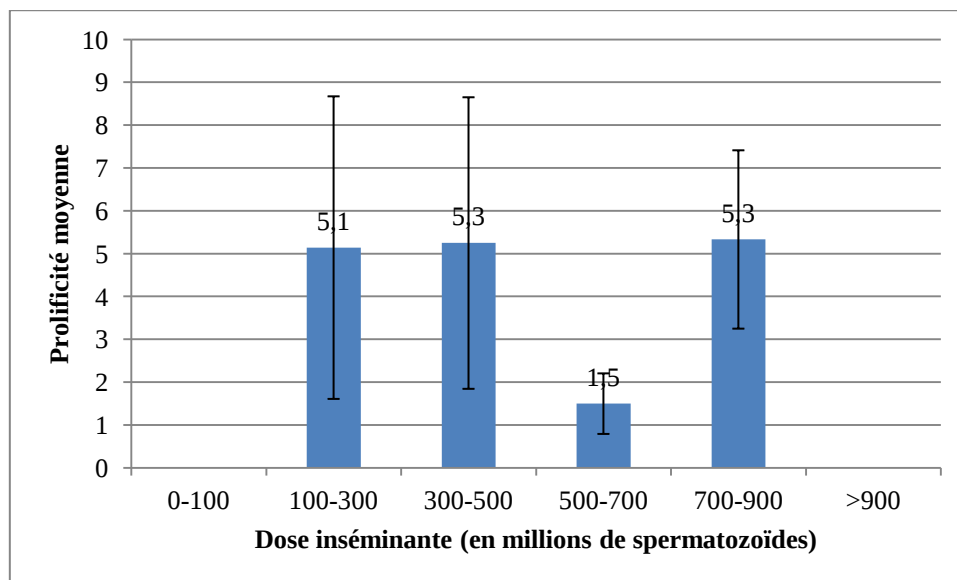
- Pour une dose inséminante de 100 à 300 millions de spermatozoïdes, la prolificité moyenne était de 5,1 +/- 3,5 chiots par portée.
 - Pour une dose inséminante de 300 à 500 millions de spermatozoïdes, la prolificité moyenne était de 5,3 +/- 3,4 chiots par portée.
 - Pour une dose inséminante de 500 à 700 millions de spermatozoïdes, la prolificité moyenne était de 1,5 +/- 0,7 chiots par portée (2 chiennes).
 - Pour une dose inséminante de 700 à 900 millions de spermatozoïdes, la prolificité moyenne e était de 5,3 +/- 2,1 chiots par portée.
- ⇒ A part pour la dose inséminante de 500 à 700 millions de spermatozoïdes (effectif très faible), la prolificité était semblable quelle que soit la dose inséminante.

Graphique 48.

- Pour les doses inséminantes < 100 et > 900 millions de spermatozoïdes, il n'y avait aucune chienne où le nombre de chiots était connu.
- Pour une dose inséminante de 100 à 300 millions de spermatozoïdes, la prolificité moyenne était de 5,1 +/- 3,5 chiots par portée.
- Pour une dose inséminante de 300 à 500 millions de spermatozoïdes, la prolificité moyenne était de 5,3 +/- 3,4 chiots par portée.
- Pour une dose inséminante de 500 à 700 millions de spermatozoïdes, la prolificité moyenne était de 1,5 +/- 0,7 chiots par portée (2 chiennes).
- Pour une dose inséminante de 700 à 900 millions de spermatozoïdes, la prolificité moyenne e était de 5,3 +/- 2,1 chiots par portée.

⇒ A part pour la dose inséminante de 500 à 700 millions de spermatozoïdes (effectif très faible), la prolificité était semblable quelle que soit la dose inséminante.

Graphique 48 : Prolificité moyenne et écart-type en fonction de la dose inséminante



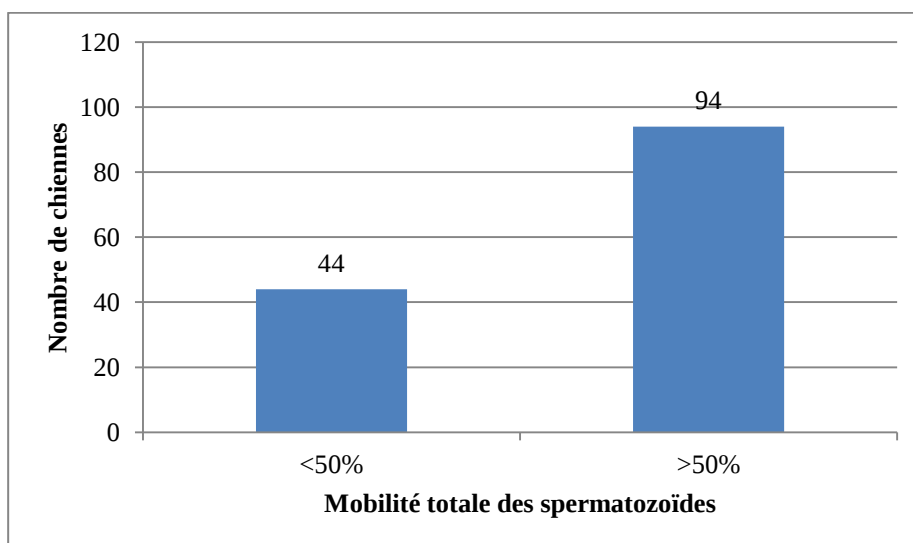
3.5.5. Mobilité totale des spermatozoïdes

3.5.5.10. Répartition des chiennes en fonction de la mobilité totale

D'après le Graphique 49 :

- 31,6 % (49/155) des chiennes ont été inséminées avec une semence de moins de 50% de mobilité totale.
- 68,4 % (106/155) des chiennes ont été inséminées avec une semence de plus de 50% de mobilité totale.

Graphique 49 : Répartition des chiennes en fonction de la mobilité totale des spermatozoïdes

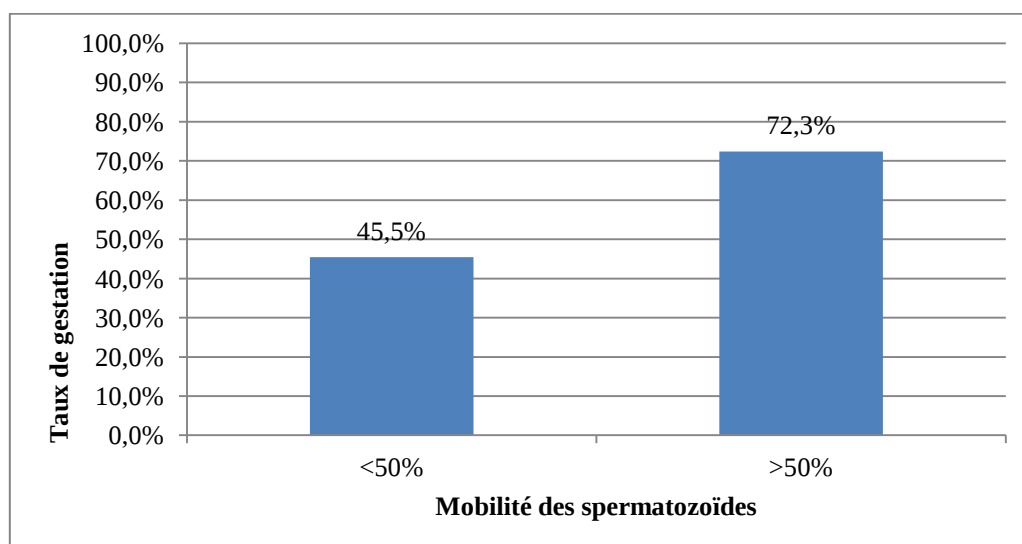


3.5.5.11. Taux de gestation en fonction de la mobilité totale des spermatozoïdes :

Les résultats sont présentés sur le Graphique 50.

⇒ Le taux de gestation était significativement différent ($p < 0,01$) lorsque la semence inséminée avait une mobilité totale supérieure à 50 % (72,3 %, 68/94) par rapport à celle dont la mobilité totale était inférieure à 50 % (45,5 %, 20/44).

Graphique 50 : Taux de gestation en fonction de la mobilité totale des spermatozoïdes

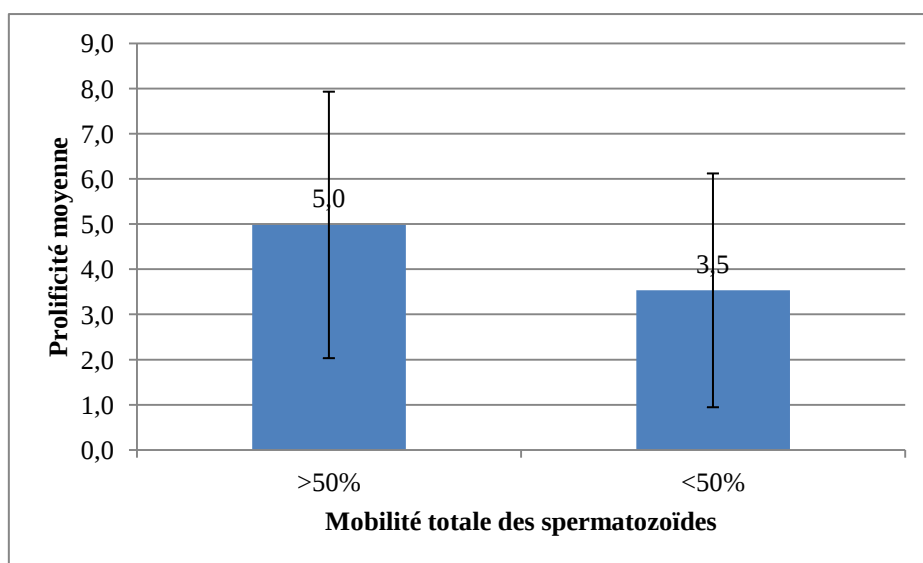


3.5.5.12. Prolificité en fonction de la mobilité totale des spermatozoïdes

D'après le Graphique 51, la prolificité était de :

- 5,0 +/- 2,9 chiots pour les chiennes inséminées avec de la semence de mobilité totale supérieure à 50 %.
 - 3,5 +/- 2,6 chiots pour les chiennes inséminées avec de la semence de mobilité totale inférieure à 50 %.
- ⇒ Cette différence n'était pas significative ($p > 0,05$).

Graphique 51: Prolificité moyenne et écart-type en fonction de la mobilité totale des spermatozoïdes de la semence inséminée



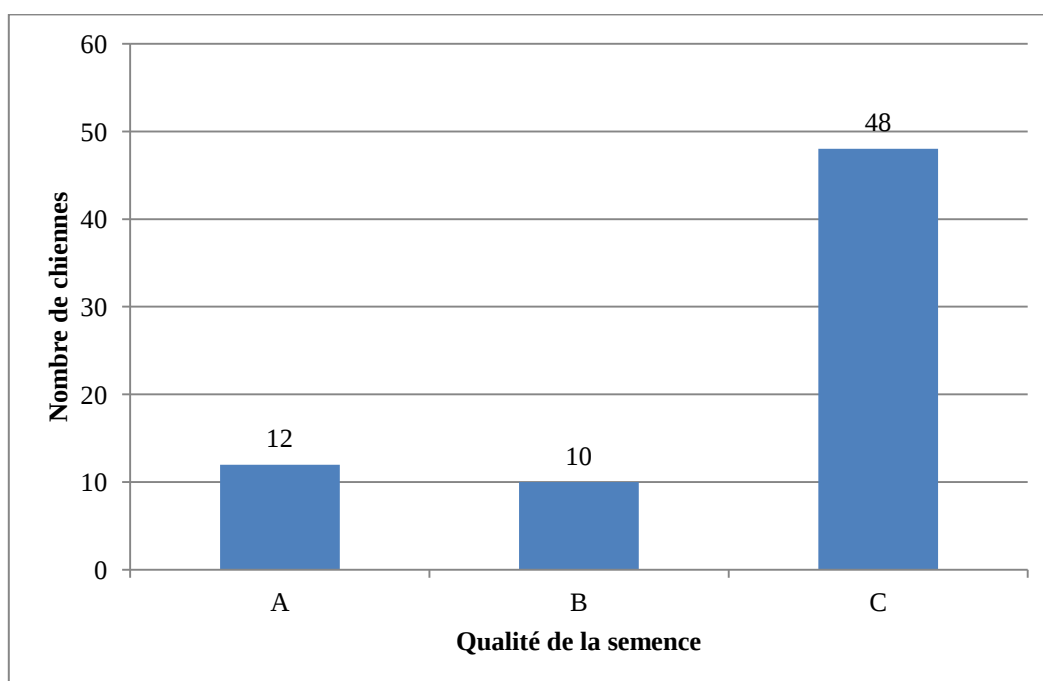
3.5.6. Qualité de la semence

3.5.6.10. Répartition des chiennes en fonction de la qualité de la semence inséminée

Les résultats sont présentés sur le

Graphique 52.

Graphique 52 : Répartition des chiennes en fonction de la mobilité des spermatozoïdes

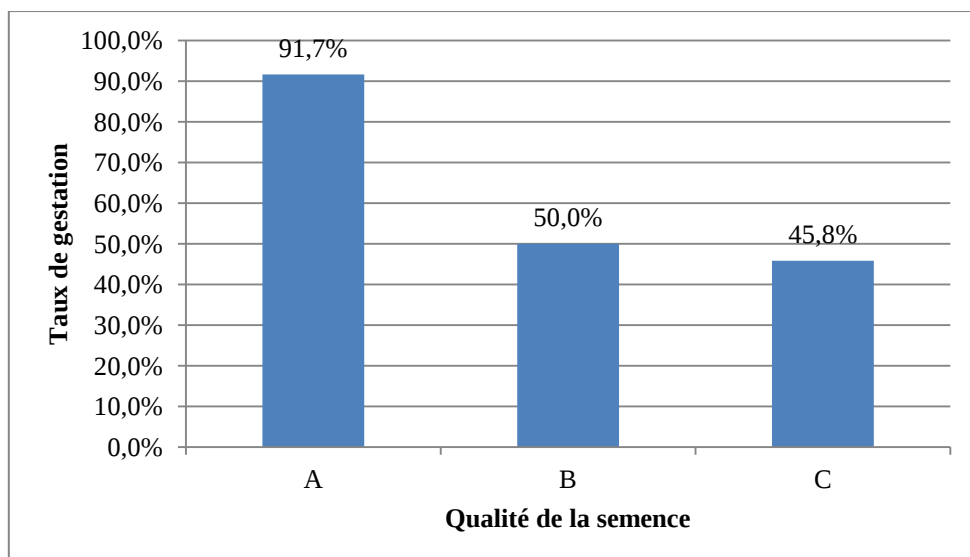


3.5.6.11. Taux de gestation en fonction de la qualité de la semence inséminée

Les résultats sont présentés sur le Graphique 53.

Le taux de gestation variait significativement ($p < 0,01$) avec la qualité de la semence : c'était avec la semence de qualité A qu'il était le plus élevé (91,7 % contre 50,0 % pour la semence de qualité B, et 45,8 % pour la semence de qualité C).

Graphique 53 : Taux de gestation en fonction de la qualité de la semence inséminée



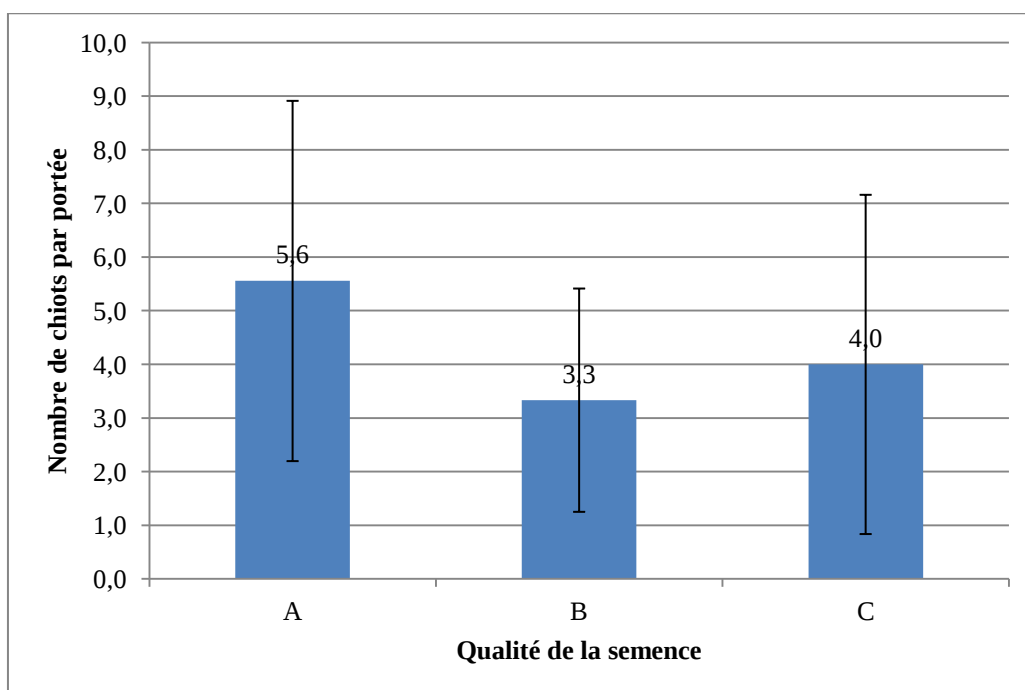
⇒ En éliminant les semences de qualité C, on obtient un taux de gestation corrigé de 72,7%.

3.5.6.12. Prolificité et écart-type en fonction de la qualité de la semence inséminée

La prolificité moyenne était de (Graphique 54) :

- 5,6 +/- 3,4 chiots par portée pour les chiennes inséminées avec de la semence A
- 3,3 +/- 2,1 chiots par portée pour les chiennes inséminées avec de la semence B
- 4,0 +/- 3,2 chiots par portée pour les chiennes inséminées avec de la semence C

Graphique 54 : Prolificité moyenne et écart-type en fonction de la qualité de la semence



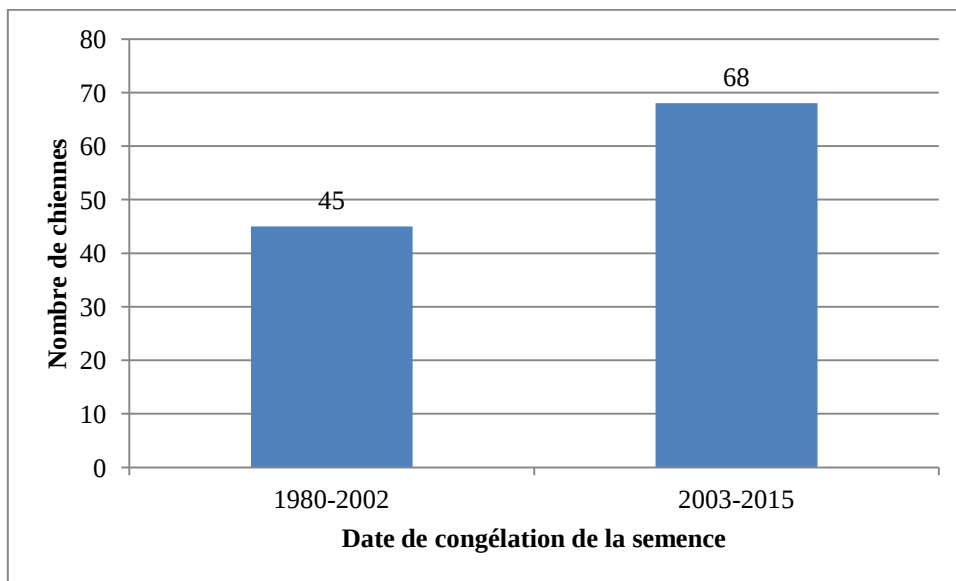
3.5.7. Date de congélation de la semence

3.5.7.10. Date de congélation de la semence

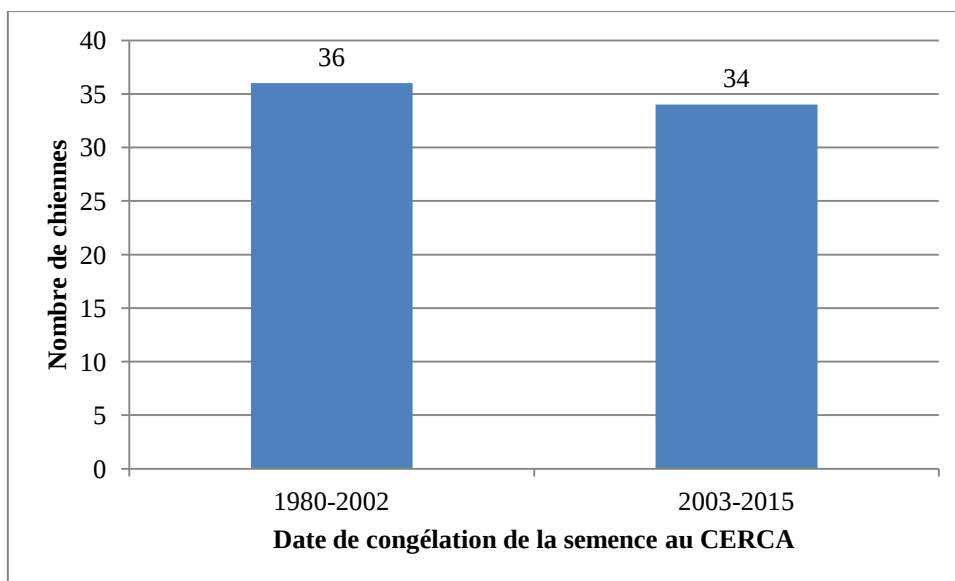
Le protocole de congélation ayant été changé au CERCA en 2003, deux intervalles ont été choisis : 1980-2002 et 2003-2015.

La répartition des chiennes en fonction de la date de congélation de la semence pour toutes les semences et pour les semences ayant été congelées au CERCA est présentée sur les Graphique 55 et Graphique 56.

Graphique 55: Nombre de chiennes en fonction de la date de congélation de la semence



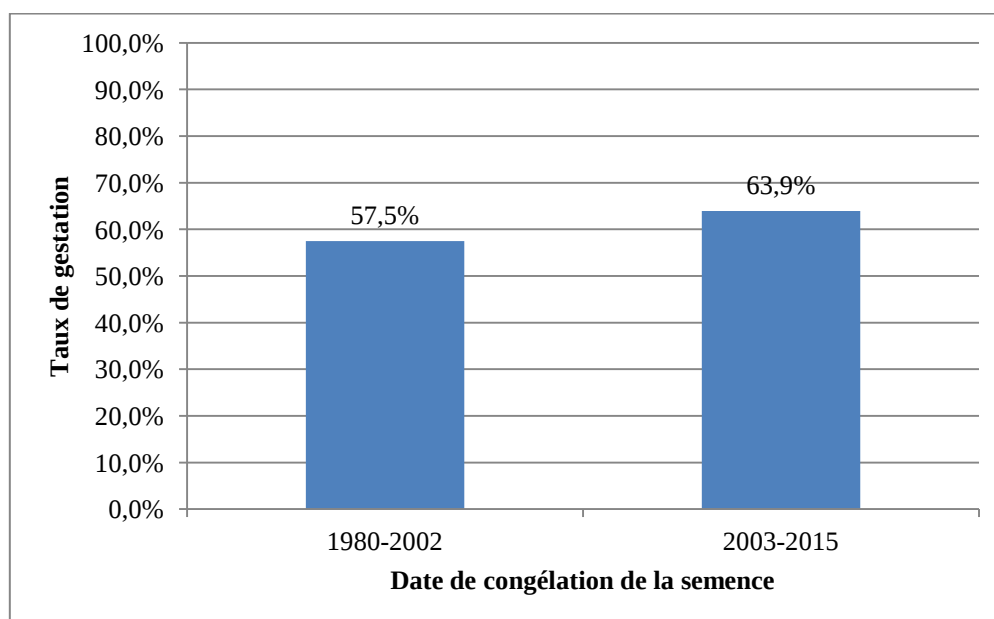
Graphique 56 : Nombre de chiennes en fonction de la date de congélation de la semence au CERCA



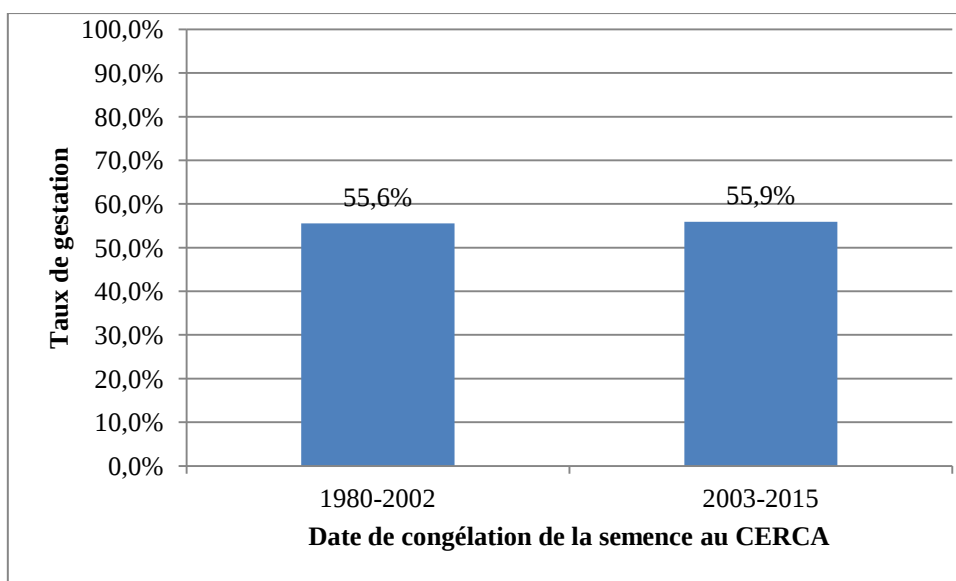
Le taux de gestation en fonction de la date de congélation de la semence, pour toutes les semences, et pour les semences ayant été congelées au CERCA est présenté sur les Graphique 57 et Graphique 58.

⇒ Le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) quelle que soit la date de congélation, et quel que soit le lieu de congélation de la semence.

Graphique 57 : Taux de gestation en fonction de la date de congélation de la semence



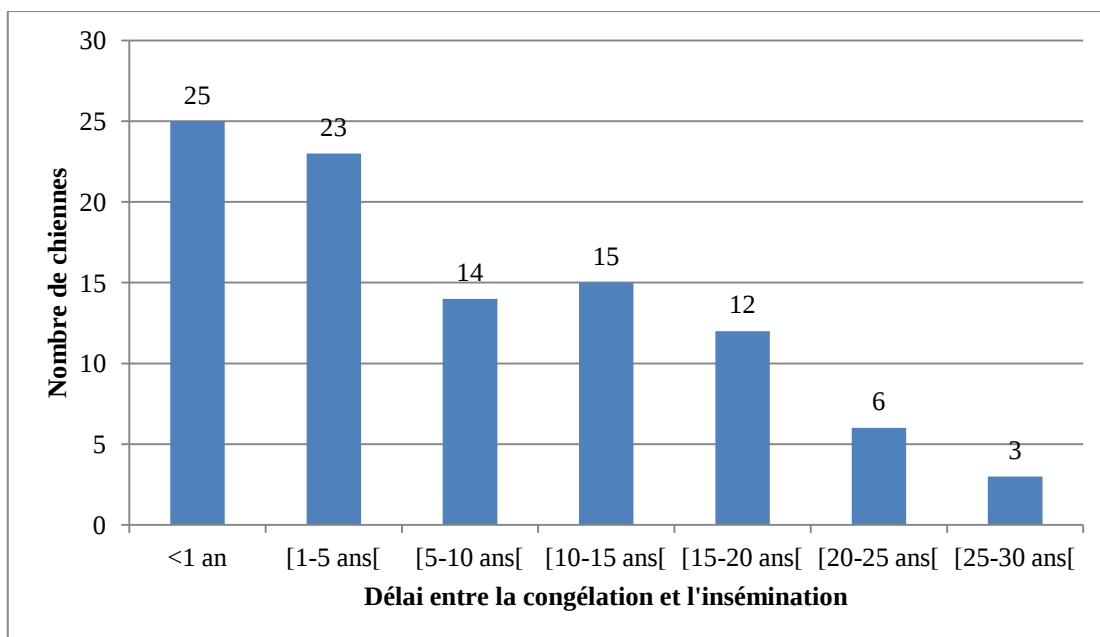
Graphique 58 : Taux de gestation en fonction de la date de congélation de la semence au CERCA



3.5.7.11. Délai entre la date de congélation et la date d'insémination

La répartition du nombre de chiennes en fonction du délai entre la congélation de la semence et l'insémination est présentée sur le Graphique 59.

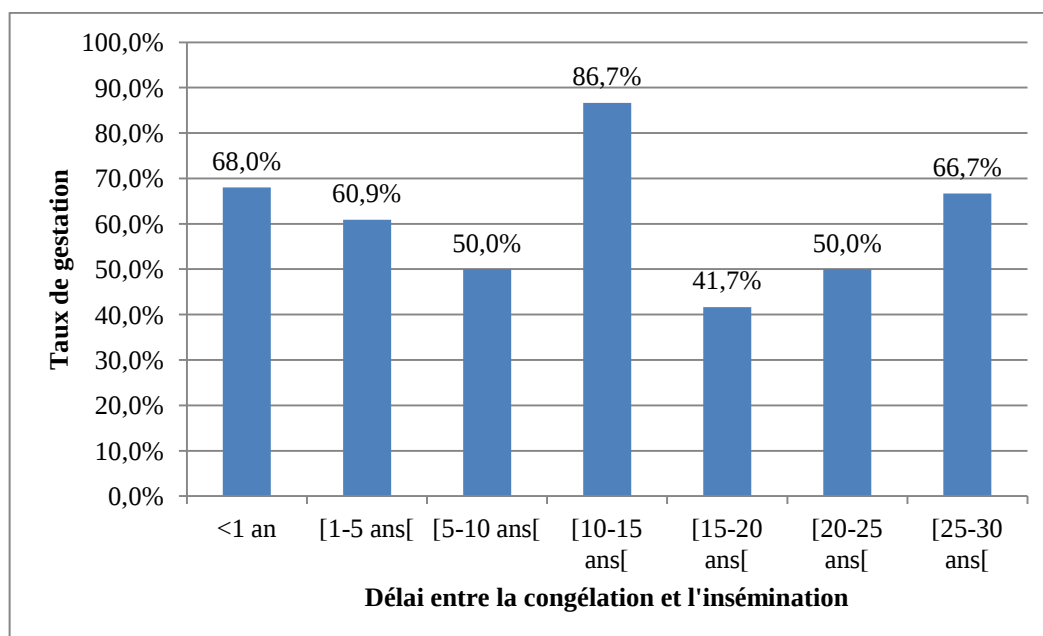
Graphique 59 : Répartition du nombre de chiennes en fonction du délai entre la congélation de la semence et l'insémination



Le taux de gestation en fonction du délai entre la congélation de la semence et l'insémination est présenté sur le Graphique 60.

⇒ Le taux de gestation n'était pas significativement différent ($p > 0,05$) lorsque le délai entre la congélation et l'insémination était de 1-15 ans ou de 15-30 ans.

Graphique 60 : Taux de gestation en fonction du délai entre la congélation de la semence et l'insémination



4. Bilan :

- Les paramètres ayant une influence sur le taux de gestation étaient :
 - La qualité de la semence
 - Notamment la mobilité totale des spermatozoïdes
 - Le taux de progestérone au moment de l'ovulation
 - Le poids de la chienne
- Les paramètres ayant une influence sur la prolificité étaient :
 - Le poids de la chienne

Partie 3 : Discussion

1. Recueil des données :

- Les données ont été recueillies via les dossiers papiers et les dossiers informatiques, qui sont remplis lors de chaque insémination.
- Cependant, les dossiers ne sont pas toujours complets, et certaines informations sont manquantes. De plus, des erreurs de remplissage et/ou de retranscription sont possibles.
- Des appels aux propriétaires ont parfois été nécessaires pour compléter les informations, afin par exemple de savoir si la chienne avait mis bas, ainsi que le nombre de chiots et le nombre de mâles et de femelles. Ces données ne sont pas forcément précises ou exactes, puisqu'elles font appel à la mémoire du propriétaire.

2. Echantillon d'étude :

- La taille des échantillons est variable en fonction du paramètre étudié, car, comme mentionné ci-dessus, certains paramètres sont manquants.
- Les informations manquantes sont le plus souvent :
 - La dose inséminante moyenne (40/169 connues)
 - La date de la mise-bas (24/169 connues)
 - Le sex-ratio (34/169 connus)
 Ainsi, ces paramètres seront plus difficiles à interpréter.

3. Paramètres de reproduction concernant la femelle :

3.1. Taux de gestation :

3.1.1. Rappel des résultats obtenus :

Les résultats du CERCA sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8: Résultats du CERCA de 2007 à 2015

Méthode	Nombre de chiennes	Taux de gestation
Non corrigé	149	61,7 %
Corrigé		
Suivi de chaleur A Semence avec mobilité totale >50%	54	74 %
Suivi de chaleur A Semence A	7	85,7 %
Suivi de chaleur A ou B Semence A ou B	14	78,6 %

3.1.2. Comparaison des résultats

- Une étude (Mason et Rous, 2014) a obtenu un taux de gestation comparable à celui du CERCA (65%), et deux autres études ((Linde-Forsberg *et al.*, 1999),(Thomassen *et al.*, 2006)) ont obtenu un résultat plus élevé (respectivement 81,7 % et 75 %).
- Cependant, la technique principale d'insémination utilisée par Linde- Forsberg *et al.*(Linde-Forsberg *et al.*, 1999) était la méthode norvégienne (167 chiennes, contre 19 par endoscopie), alors que la technique principalement utilisée au CERCA était l'insémination par endoscopie (106 chiennes, contre 17 par méthode norvégienne).
Si l'on prend en compte uniquement les inséminations réalisées par endoscopie, le taux de gestation était de 57,9 % dans l'étude de Linde-Forsberg *et al.*, et de 57,5% pour le CERCA, ce qui est comparable.
- Thomassen *et al.* utilisaient essentiellement de la semence de bonne qualité (dans 85,9 % des cas). Si on compare le taux de gestation obtenu par Thomassen *et al.* et par le CERCA lorsque la semence était de bonne qualité (mobilité > 50 %), on obtenait 77% et 72,3% respectivement, ce qui là aussi est comparable.

⇒ **Ces résultats montrent l'importance du choix d'une semence de bonne qualité.**

3.2. Durée de la gestation

- La durée de la gestation correspondait en moyenne à 60,2 +/- 2,5 jours et 59,7 +/- 1,7 jours, par rapport respectivement à la date de la première et de la deuxième IAC.
En 2007-2015, les inséminations ont donc été réalisées plus tardivement par rapport à 2001-2006 (61,5 +/- 1,8 jours, 60,6 +/- 1,9 jours).
D'un point de vue physiologique, Reynaud *et al.* (Reynaud *et al.*, 2005) ont mis en évidence que la fécondation de l'oocyte avait lieu la plupart du temps 90 heures (soit environ 3,75 jours) après l'ovulation.
- ⇒ **Cela confirme l'importance d'inséminer plus tardivement, en attendant que les oocytes soient matures, pour optimiser le taux de gestation et la prolificité.**

- La durée de la gestation obtenue est comparable à celle de Thomassen *et al.* (60,6 +/- 0,1 jours), (Thomassen *et al.*, 2006).

3.3. Prolificité

- On note donc une amélioration de la prolificité obtenue au CERCA depuis 2001 : 4,0 +/- 3,0 chiots entre 2001-2006 (Benechet, 2007), et 4,6 +/- 3,0 chiots par chienne entre 2007-2015.

Cette amélioration peut être expliquée par plusieurs paramètres :

- L'insémination est réalisée plus tardivement (3 jours en moyenne après la date estimée de l'ovulation pour la première IAC actuellement contre 2 jours en moyenne auparavant).
- Concernant le poids de la chienne, entre 2001-2006, il y avait peu de chiennes de plus de 30 kg par rapport à 2007-2015, or la prolificité est plus importante lorsque le poids de la chienne est supérieur à 30 kg.
- Cependant, **la prolificité est moindre que celle obtenue dans différentes études** ((Linde-Forsberg *et al.*, 1999), (Thomassen *et al.*, 2006), (Farstad, 1984), (Cremonesi *et al.*, 2005)). Dans cette étude, le poids de la chienne est le paramètre influençant significativement la prolificité. Or, les chiennes faisant 30-40 kg, ayant une forte prolificité, sont bien représentées, ce qui est paradoxal et n'explique pas la différence observée avec les autres études.

⇒ **Plusieurs paramètres pourraient être à l'origine de ce résultat :**

- L'IAC pourrait être réalisée au mauvais moment, cependant, la durée de gestation est, comme décrit précédemment, en accord avec les données physiologiques, donc ce paramètre ne semble pas intervenir.
- **La technique d'insémination** utilisée majoritairement (l'endoscopie) pourrait entraîner une inflammation de l'endomètre, ce qui altérerait la nidation ou le développement des embryons.
- **La technique de congélation au CERCA** peut potentiellement entraîner des altérations des spermatozoïdes (membrane plasmique, acrosome, ADN), ce qui entraînerait une résorption embryonnaire plus importante. => calculer différence semence congelée au CERCA et dans d'autres centres
- **La qualité de la semence** pourrait avoir une influence importante sur la prolificité, notamment la mobilité.

3.4. Sex ratio

Le sex-ratio était de 1,17, il est plus faible que celui obtenu de 2001 à 2006 (1,28, Nathalie Benechet, 2007), et que celui obtenu par Linde-Forsberg *et al.* (1,25, (Linde-Forsberg *et al.*, 1999).

⇒ **Il est possible que des inséminations plus tardives influencent le sex-ratio.**

3.5. Age

- L'âge ne semblait pas avoir d'influence sur le taux de gestation et la prolificité, ce qui est contradiction avec les résultats obtenus au CERCA entre 2001-2006 (Benechet, 2007), cependant, peu de chiennes âgées ont été inséminées à cette époque (seulement 8 chiennes de plus de 7 ans), ce qui rend les résultats difficilement comparables.
Ceci est aussi en contradiction avec les résultats obtenus par Thomassen *et al.* (Thomassen *et al.*, 2006) où le taux de gestation était plus faible lorsque les chiennes avaient plus de 6 ans.
 - Dans ces deux études ((Benechet, 2007), (Thomassen *et al.*, 2006)), c'est la technique Norvégienne qui est principalement utilisée pour l'insémination
- ⇒ **On peut supposer que l'endoscopie, utilisée majoritairement dans notre étude, favorise la visualisation et la détection d'anomalies anatomiques de l'appareil génital, ce qui expliquerait les résultats.**

3.6. Groupe cynophile

- Le taux de gestation et la prolificité des groupes 5 et 6 étaient élevés, cependant, il s'agit de groupes peu représentés (respectivement 4 et 5 chiennes, la différence du taux de gestation par rapport aux autres groupes était en effet non significative ($p > 0,05$)).
- De plus, les chiens du Groupe 5 sont des chiens peu sélectionnés par l'homme, et le Groupe 6 correspond à des chiens de chasse, qui ont été sélectionnées sur leurs capacités reproductrices essentiellement. Ceci pourrait expliquer la différence observée.
- Il existe un biais influençant les résultats : chaque groupe cynophile comprend des populations très hétérogènes (format, poids et morphologies très variés dans certains groupes). Ceci nous a conduit à étudier le poids de la chienne.

3.7. Poids de la chienne

- Le poids influençait significativement **le taux de gestation et la prolificité, qui sont plus faibles pour les chiennes de plus de 50 kg.**
Ce résultat est **paradoxal**, car les grandes races et les races géantes présentent normalement une prolificité plus forte (Chastant-Maillard *et al.*, 2016), (Thomassen *et al.*, 2006).
- Plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats :
 - **Le moment de l'insémination** peut être mal déterminé, du fait de la réalisation de l'échographie ovarienne qui est plus difficile à réaliser sur les chiennes de grand format.
 - Sachant que le nombre d'oocytes à féconder et plus important, **la dose inséminante** n'est peut-être pas suffisante, et est possiblement à adapter en fonction du poids de la chienne.

- L'appareil génital étant plus volumineux chez ces chiennes de grand format, et la congélation altérant la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes, il pourrait être judicieux de **déposer la semence directement au niveau des cornes utérines**.

3.8. Antécédents d'infertilité

- Le taux de gestation était plus élevé chez des chiennes ayant déjà présenté des antécédents d'infertilité : 80 % contre 61 %.
- Ces résultats paraissent peu cohérents, mais cette différence n'était pas significative, et l'effectif des chiennes ayant eu des problèmes d'infertilité était faible : 5 chiennes.
- Lorsque les propriétaires rapportaient un échec, il n'y a pas eu forcément de suivi de chaleur au moment de la mise à la reproduction ; et donc la chienne a pu être mise à la reproduction au mauvais moment, ce qui ne correspond pas à de l'infertilité.
- Concernant les chiennes sans antécédents, le propriétaire pouvait ne pas avoir mentionné des épisodes d'infertilité ultérieurs, ou le clinicien ne l'a pas précisé dans le dossier.

3.9. Rang de portée

- Classiquement en cynophilie, il est déconseillé d'inséminer une primipare, car le propriétaire ne sait pas si elle a potentiellement des troubles de la fertilité, et il ne possède pas de référence quand à la prolificité.
- **Le rang de portée n'influait pas significativement le taux de gestation** (59 % pour les primipares contre 64% pour les pluripares), ce qui est en accord avec Mason (Mason, 2016), **contrairement à ce qui est classiquement dit en cynophilie**.
- De plus la prolificité était plus élevée chez les primipares, ce qui est probablement lié à l'âge.

3.10. Qualité du suivi de chaleurs

- On observait un taux de gestation plus élevé pour un suivi B que pour un suivi A (69,2 % contre 61,2 %). Ces résultats sont comparable à ceux obtenus entre 2001-2006 (51 % pour un suivi A, 61 % pour un suivi B, (Benechet, 2007)).
- ⇒ **Lorsque le suivi de chaleurs est de bonne qualité, l'échographie ovarienne n'améliore pas le taux de gestation.**
- L'échographie ovarienne a été mise en avant depuis plusieurs années au CERCA. On peut supposer que l'échographie ovarienne est utile lorsque la chienne arrive au CERCA avec un taux de progestérone déjà très élevé, afin de visualiser si la chienne a déjà ovulé ou non (suivi C).
- ⇒ **Cependant, d'après Fontbonne (Fontbonne, 1995), l'échographie ovarienne n'améliore la précision de la détection du moment de l'ovulation que de 15,3 % par rapport à la progestérone, ce qui expliquerait ces résultats.**

3.11. Taux de progestérone en fonction de la réussite de l'IAC

- Le taux de progestérone le jour de la première IAC était significativement différent lorsque l'IAC conduisait à une gestation (30,6 +/- 7,8 ng/mL) de celui où l'IAC n'avait pas réussi (25,0 +/- 7,9 ng/mL).
- Ce n'était pas le cas entre 2001-2006, et ce n'est pas lié à la méthode de dosage de la progestérone, qui n'a pas changé. **Mais cela s'explique notamment car l'insémination est réalisée plus tardivement par rapport à l'estimation du moment de l'ovulation.**

3.12. Diagnostic de gestation

- Le diagnostic de gestation permet de détecter des éventuelles résorptions embryonnaires. Le taux de résorption était relativement élevé (29,6 %).
- En effet, il y a de nombreuses résorptions en IAC, car la congélation entraîne des altérations de l'ADN, à l'origine de l'expression de gènes létaux après la fécondation.
- Cependant, il existe **plusieurs biais influençant ce taux de résorption** :
 - Le clinicien est plus ou moins expérimenté dans la détection des résorptions embryonnaires
 - Parfois aucun diagnostic de gestation n'est fait.
 - Le diagnostic de gestation peut être réalisé mais les résorptions ont eu lieu avant ou après. Ceci montre l'importance de faire plusieurs échographies au cours de la gestation.

4. Paramètres de reproduction concernant l'IAC

4.1. Méthode d'insémination

- Le taux de gestation obtenu par méthode endoscopique est comparable à celui obtenu par Linde-Forsberg et al. (Linde-Forsberg *et al.*, 1999). Il est plus faible que celui obtenu dans deux autres études ((Mason et Rous, 2014), (Cremonesi *et al.*, 2005), mais ces auteurs ont utilisé de la semence de bonne qualité.
 - Le taux de gestation obtenu par méthode norvégienne est comparable à celui obtenu par Thomassen et al. (Thomassen *et al.*, 2006)).
- ⇒ De plus, il n'y a pas de différence significative entre l'insémination par endoscopie et par méthode Norvégienne, **mais le taux de gestation était plus élevé par la méthode Norvégienne** (73,3 % contre 57,5 %).
- Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Linde-Forsberg *et al.* (57,9 % par endoscopie contre 84,4 % par méthode norvégienne (Linde-Forsberg *et al.*, 1999)), mais contrastent avec ceux obtenus au CERCA entre 2001-2006, où le taux de gestation était plus élevé lors d'IAC par endoscopie. Cependant entre 2001-2006, seulement 4 IAC ont été réalisées par endoscopie, ce qui rend les résultats difficilement comparables.
 - Deux explications sont envisageables :
 - **L'endoscopie**, par insufflation d'air, peut être à l'origine **d'une inflammation endométriale plus importante**, et pourrait être à l'origine d'une baisse du taux de gestation.
 - Si la visualisation du col par endoscopie est difficile (ce qui dépend du format de la chienne et de l'opérateur), le **délai entre la décongélation de la semence et**

l'insémination peut être augmenté, ce qui pourrait entraîner des altérations de la semence avant qu'elle soit introduite dans l'utérus.

⇒ Cependant, commercialement, il existe une volonté du propriétaire de pouvoir visualiser l'insémination et d'avoir ainsi la certitude que la semence est déposée dans l'utérus. Ainsi, il paraît difficile de revenir à la technique Norvégienne.

4.2. Date de réalisation de l'insémination

Comme évoqué précédemment, au CERCA, entre 2007 et 2015, les inséminations ont été réalisées plus tardivement qu'entre 2001-2006, ce qui, du point de vue physiologique, est plus adapté, car d'après Reynaud *et al.* (Reynaud *et al.*, 2005), la fécondation a majoritairement lieu 90 heures (soit 3,75 jours) après l'ovulation.

Il existe un **biais concernant l'estimation de la date d'ovulation**, qui impacte donc le moment de l'insémination, et qui est lié :

- À l'opérateur ayant réalisé le suivi de chaleurs : l'opérateur est plus ou moins expérimenté pour la réalisation et l'interprétation des échographies ovariennes, et pour l'interprétation des frottis vaginaux.
- Au format de la chienne : l'échographie abdominale est plus difficilement réalisable chez les chiennes de grand format ou en surpoids.

4.3. Nombre d'inséminations

- **Le taux de gestation ne présentait pas de différence significative qu'il y ait une ou deux inséminations réalisées** (58,8 % pour une IAC, contre 62,8 % pour deux IAC), ce qui est en accord avec différentes études ((Linde-Forsberg *et al.*, 1999), (Mason et Rous, 2014))
- Cela est aussi retrouvé par Thomassen *et al.* lorsque l'insémination est réalisée au moment optimal ((Thomassen *et al.*, 2006)).
- Mason (Mason, 2016) obtient un taux de gestation comparable à celui de notre étude en réalisant une seule insémination par cycle par méthode endoscopique.

⇒ Ainsi, **les publications récentes et notre étude confirment qu'une seule IAC serait suffisante**. Ceci a un impact important du point de vue économique et zootechnique.

⇒ Dans le cas où le protocole d'insémination serait modifié pour ne réaliser qu'une seule IAC, plusieurs paramètres peuvent être importants à prendre en compte afin d'optimiser le taux de gestation :

- Pour limiter les reflux, le volume inséminé ne doit pas être trop important, et le dépôt de la semence dans l'utérus doit être lent (15-20 minutes dans le protocole de Mason (Mason, 2016)).
- La semence doit être inséminée rapidement après la décongélation, ce qui limiterait ainsi les altérations (dans les deux minutes dans le protocole de Mason (Mason, 2016)).
- La qualité de la semence est un paramètre important à prendre en compte (mobilité, dose inséminante).

4.4. Année de réalisation de l'IAC

Le taux de gestation entre 2011-2015 était significativement meilleur qu'entre 2007-2010. Plusieurs paramètres étaient susceptibles de varier en fonction de l'année :

- Les épisodes antérieurs d'infertilité
- Le nombre d'inséminations réalisées
- Le délai entre l'ovulation et l'insémination
- Le taux de progestérone au moment de l'insémination
- L'âge des chiennes au moment de l'insémination
- Le rang de portée des chiennes
- La qualité du suivi de chaleurs
- La qualité de la semence

Or les deux **paramètres variant significativement entre 2007-2010 et 2011-2015** étaient :

- Le **délai entre ovulation et insémination** : entre 2011-2015, il y a plus de chiennes inséminées à 2 jours après l'ovulation qu'à 3 ou 4 jours par rapport à 2007-2010.
- La **mobilité des spermatozoïdes** dans la semence utilisée : la semence utilisée entre 2011-2015 a une meilleure mobilité (> 50%) que la semence utilisée entre 2007-2010.

- ⇒ La mobilité de la semence ayant une influence significative sur le taux de gestation, on peut supposer que l'utilisation d'une semence ayant une meilleure mobilité entre 2011-2015 est à l'origine de ces résultats.
- ⇒ **Cela montre une fois encore la nécessité d'utiliser de la semence ayant une mobilité totale > 50 %.**

4.5. Difficultés rencontrées lors de l'insémination

- Les effectifs étant faibles, les résultats sont peu significatifs et peu interprétables. Cependant, comme 5 chiennes étaient gestantes sur 7, les difficultés rencontrées ne semblent pas être à l'origine d'une moins bonne réussite de l'insémination.
- Il existe un biais dans l'interprétation de ces résultats, car l'opérateur ne mentionne pas toujours si une difficulté est rencontrée, et de plus, il ne précise pas forcément la nature de la difficulté (chienne agitée, difficultés à visualiser le col ou à passer le col...)

4.6. Reflux

- Le taux de gestation n'était pas significativement différent qu'il y ait un reflux ou non, cependant, le taux de gestation était meilleur lorsqu'il n'y a pas de reflux (62,1 % contre 50,0 %), ce qui est en accord avec les résultats obtenus au CERCA entre 2001-2006 (Benechet, 2007).
- Ces résultats sont difficilement interprétables, car l'effectif est faible pour les chiennes présentant un reflux (n=4).
- Cela pourrait être lié à un trop grand volume inséminé (cette valeur n'est cependant connue que chez 1 chienne sur les 4) ou à une insémination réalisée trop rapidement.
- Il existe là encore un biais car l'opérateur ne mentionne pas forcément le reflux observé dans le dossier, et la chienne peut avoir un reflux une fois partie du CERCA, cela ne sera donc pas visualisé.

5. Paramètres concernant la semence

5.1. Provenance de la semence

- Le taux de gestation n'était pas significativement différent quel que soit le lieu de congélation de la semence. Cependant le taux de gestation était moins élevé lorsque la semence a été congelée au CERCA (52,1 % contre 72,7 %).
- Ces résultats sont par ailleurs comparables à ceux obtenus entre 2001-2006 (47,7 % contre 66,7 % (Benechet, 2007)).
- Plusieurs explications sont possibles : soit la semence congelée au CERCA est conservée alors qu'elle est de mauvaise qualité, soit la dose inséminante est trop faible, soit le protocole de congélation entraîne des altérations de la semence.
- **Le protocole de congélation au CERCA est potentiellement à réévaluer, car le moment de l'insémination semble adapté.**

Il avait été changé en 2003, mais cela n'avait pas eu d'effet sur le taux de gestation entre 2007-2015.

On peut remettre en cause soit les dilueurs utilisés, soit la méthode de congélation.

- Concernant les dilueurs : il pourrait être intéressant de tester de nouveaux dilueurs en comparant leurs effets sur les caractéristiques de la semence (concentration, mobilité, morphologie) après décongélation.
 - Concernant la méthode de congélation :
Par exemple :
 - ➔ La centrifugation entraîne la libération de facteurs oxydatifs, est potentiellement à remettre en cause.
 - ➔ Le taux de dilution pourrait être augmenté : en effet, un taux de dilution élevé augmente la longévité post-décongélation et conserve l'intégrité de la membrane plasmique (Peña et Linde-Forsberg, 2000b). Cependant, le taux de dilution doit être augmenté avec modération car il est toutefois à l'origine d'une diminution de la mobilité progressive (Peña et Linde-Forsberg, 2000b).
 - ➔ La congélation pourrait être faite avec plus de paliers de refroidissement, afin de préserver l'intégrité de la membrane plasmique et de l'acrosome des spermatozoïdes ((Szász *et al.*, 2000),(Rota *et al.*, 1998)) ; car actuellement, les paillettes sont simplement déposées à 4 cm des vapeurs d'azote liquide, ce qui correspond à un seul palier de refroidissement.
- ⇒ Ainsi, des études mesurant la libération de facteurs oxydatifs, l'intégrité de la chromatine, de la membrane plasmique pourrait être réalisées pour objectiver l'influence de ces paramètres.

5.2. Conditionnement de la semence

- **Le taux de gestation était plus élevé lorsque la semence était conditionnée en pellets** (80 % contre 59,7 % avec des paillettes), mais cette différence n'était pas significative.
- La mobilité des spermatozoïdes dans les pellets et les paillettes était semblable (66,7 %, et 68,6 % respectivement), ce n'est donc pas ce paramètre qui intervient.
- Les pellets provenaient essentiellement de l'étranger (Pologne, Australie, USA...). Or, comme vu précédemment, le taux de gestation était plus élevé pour les semences provenant d'autres centres que le CERCA. On peut supposer là encore que c'est le **protocole de congélation** qui serait principalement à l'origine de cette différence.

5.3. Dose inséminante

- La dose inséminante n'influait pas le taux de gestation, ce qui est en accord avec Linde-Forsberg *et al.* (Linde-Forsberg *et al.*, 1999). Ce paramètre n'était connu chez 32 chiennes seulement, ce qui rend les résultats moins facilement interprétables.
- Si la dose inséminante est importante, mais que la progression des spermatozoïdes, c'est-à-dire la mobilité, jusqu'aux oocytes est limitée, la fécondation est compromise.
- Dans le cas de semences faiblement concentrées au moment du prélèvement du mâle, le volume inséminé est plus important, même si la dose inséminante utilisée est satisfaisante. Cela augmente le risque de reflux et pourrait impacter le taux de gestation. Il serait intéressant d'étudier la dose inséminante en relation avec le volume inséminé. Cela n'a pas pu être réalisé ici du fait du manque de données.

5.4. Mobilité totale des spermatozoïdes

- **Le taux de gestation était significativement influencé par la mobilité totale spermatique, lorsque celle-ci était supérieure à 50%** (72,3 % contre 45,5 %), mais pas la prolificité.
- Ceci est en accord avec les résultats obtenus par le CERCA entre 2001-2006 (64,7% contre 40 %, (Benechet, 2007)) mais en désaccord avec les résultats de Linde-Forsberg *et al.* (Linde-Forsberg *et al.*, 1999), qui ne mettent pas en évidence de différence significative.
Cependant, Linde-Forsberg *et al.* précisent que cela est dû à des effectifs trop petits (3 semences avec moins de 40% de mobilité après décongélation) ; les résultats sont donc difficilement interprétables.
- Il existe par ailleurs un biais : au CERCA, il n'y a pas de système CASA (Computer-Aided Semen Analysis), un système d'analyse de la semence assistée par ordinateur, qui permet d'évaluer précisément la mobilité progressive.
Ainsi, c'est principalement la mobilité totale qui est mesurée, la mesure de la mobilité progressive est plus subjective.
- Mason (Mason, 2016) obtient un meilleur taux de gestation lorsque l'insémination est faite avec plus de 150 millions de spermatozoïdes normaux progressifs.
- Le CERCA a acquis un système CASA depuis mars 2016, ce qui permettrait de par l'évaluation de la mobilité progressive, de calculer une dose inséminante plus adaptée.

⇒ **Ainsi, la mobilité totale des spermatozoïdes est un facteur essentiel à prendre en compte pour l'insémination. Il est donc nécessaire de congeler une semence avec une mobilité totale suffisante, et de vérifier après décongélation qu'elle soit supérieure à 50%.**

5.5. Qualité de la semence

- Le taux de gestation variait significativement ($p < 0,01$) avec la qualité de la semence, et c'est avec la semence de qualité A qu'il était le plus élevé.
- Ceci est en accord avec les résultats du CERCA entre 2001-2006 (Benechet, 2007) et ceux de Thomassen *et al.* (Thomassen *et al.*, 2006).
- ⇒ Le choix d'une semence de très bonne qualité (ici mobilité > 60 % et dose inséminante > 200 millions de spermatozoïdes) permettait d'obtenir un taux de gestation très élevé (91,7 %).
- ⇒ **Cela rejoint ce que nous avons vu précédemment : c'est bien la mobilité et la dose inséminante qui sont à améliorer au CERCA et à adapter au poids et à la race de la chienne.**

5.6. Date de congélation de la semence

- Quelle que soit la date de congélation, le taux de gestation n'était pas significativement différent ; que la semence ait été congelée au CERCA ou non.
- ⇒ **Le CERCA a changé son protocole de congélation en 2003, pour autant, ceci n'a pas permis d'amélioration du taux de gestation depuis.**
- ⇒ Ceci peut être dû à plusieurs paramètres évoqués précédemment : la qualité de la semence ou la dose inséminante sont insuffisantes, ou le protocole de congélation n'est pas adapté malgré les changements effectués.
- De plus, même lorsque les semences sont congelées et conservées pendant plusieurs dizaines d'années, cela n'affecte pas la qualité de la semence, car le taux de gestation ne varie pas significativement.

CONCLUSION

L'insémination artificielle en semence congelée a de nombreux avantages, et permet notamment une amélioration génétique dans les élevages, avec l'obtention de descendants de haute qualité.

Les objectifs de l'étude étaient de donner les résultats du CERCA en matière d'insémination artificielle en semence congelée, afin de voir si les résultats du CERCA étaient analogues à ceux d'autres centres de référence dans ce domaine ; d'évaluer l'évolution des résultats par rapport à 2001 et 2006 (Benechet, 2007), et de la mettre en relation avec l'évolution des techniques employées ; de déterminer les facteurs influençant les résultats, et de distinguer ceux qui pouvaient les améliorer.

Les paramètres essentiels à maîtriser pour obtenir un taux de gestation optimal sont : **le moment de l'insémination, la qualité de la semence, et notamment la mobilité des spermatozoïdes**. Le **poids de la chienne** avait une influence sur le taux de gestation et la prolificité.

Le nombre d'IAC n'avait pas d'influence sur le taux de gestation, ce qui est en accord avec plusieurs études récentes. Le protocole du CERCA pourrait être modifié afin de n'inclure qu'une seule IAC.

Au CERCA de 2007 à 2015, le taux de gestation en IAC était de 61,7% (92/149).

Un premier **taux de gestation corrigé de 78,6% (11/14)** a été calculé, prenant en compte uniquement les chiennes dont le suivi de chaleurs a été rigoureux, et inséminée avec de la semence dont la dose inséminante et la mobilité spermatique totale sont optimales (dose inséminante supérieure à 200 millions de spermatozoïdes et mobilité spermatique totale supérieure à 50 %).

Un deuxième **taux de gestation corrigé de 74% (40/54)** a été calculé de la même manière, mais sans tenir compte de la dose inséminante, du fait du manque de données.

Ces résultats confirment l'importance d'utiliser de la semence de bonne qualité.

La prolificité moyenne était de 4,6 +/-3,0 chiots par portée, la taille des portées variant entre 1 et 12 chiots.

Le taux de gestation était meilleur en 2007-2015 que de 2001 à 2006 (Benechet, 2007), mais de manière non significative, ce qui pourrait être dû à une meilleure qualité de semence utilisée, ou au moment de l'insémination, qui était réalisée plus tardivement. Le taux de gestation était significativement meilleur depuis 2011 : 68,8% contre 49,1%. Or entre 2011 et 2015, la semence utilisée présentait une meilleure mobilité.

Le taux de gestation était moins élevé que celui de plusieurs études mondiales, mais des résultats similaires étaient obtenus lorsqu'une semence de qualité est utilisée.

Le taux de gestation était par ailleurs plus faible lorsque la semence a été congelée au CERCA, ce qui pourrait être dû au protocole de congélation, ou à la qualité de la semence congelée. Le protocole de congélation est donc à réadapter, et il serait judicieux de réaliser des études contrôlant l'intégrité des spermatozoïdes pour déterminer les méthodes à utiliser.

Le taux de gestation et la prolificité étaient faibles pour les chiennes de plus de 50 kg, ce qui contraste avec les résultats classiquement obtenus dans les études. L'utilisation d'une dose inséminante plus importante et le dépôt de la semence dans les cornes pourraient améliorer ces résultats.

La méthode norvégienne permettait d'obtenir un meilleur taux de gestation (non significatif) que l'endoscopie. Ceci pourrait être dû à l'inflammation de l'endomètre liée à l'insufflation d'air. Cependant, au vu de la demande des propriétaires, qui préfèrent visualiser l'insémination, il paraît difficile de changer de méthode.

Le taux de gestation n'était pas différent que le suivi de chaleurs utilisait l'échographie ovarienne ou non. Ainsi, le protocole de suivi de chaleurs pourrait n'utiliser que les frottis et les dosages de progestérone, et l'échographie pourrait être réservée au cas où les chiennes arrivent au CERCA à un moment déjà avancé du cycle.

La durée moyenne de la gestation était de 60,2 jours +/- 2,5 jours par rapport à la première IAC et de 59,7 +/- 1,7 jours, par rapport à la deuxième IAC. Les inséminations ont donc été réalisées plus tardivement qu'entre 2001 et 2006 (où la durée de la gestation était de 61,5 +/- 1,8 jours par rapport à la première IAC, et 60,6 +/- 1,9 jours par rapport à la deuxième). Le moment d'insémination au CERCA est donc actuellement adapté sur le plan physiologique, car Reynaud *et al.* (Reynaud *et al.*, 2005) ont mis en évidence que la fécondation de l'oocyte avait lieu la plupart du temps 90 heures (soit environ 3,75 jours) après l'ovulation. Le moment de l'insémination choisi par le CERCA par rapport à la date estimée de l'ovulation est adapté et à conserver.

BIBLIOGRAPHIE

- Benechet Insémination artificielle en semence congelée chez la chienne : analyse des dossiers des chiennes suivies au Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (CERCA) de janvier 2001 à décembre 2006. 2007,.
- BOUCHARD GF., SOLORZANO N., CONCANNON PW., YOUNGQUIST RS., BIRSCHWAL CJ. Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone. *Theriogenology*. 1991, **35**, 603-611.
- CHAPWANYA A., CLEGG T., STANLEY P., VAUGHAN L. Comparison of the Immulite and RIA assay methods for measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches. *Theriogenology*. 2008, **70**, 795-799.
- Chastant-Maillard, Guillemot, Feugier, Mariani, Grellet, Mila Reproductive performance and pre-weaning mortality: preliminary analysis of 27 221 purebred female dogs and 204 537 puppies in France. *Soumis pour publication*. 2016,.
- CORTES CJ., CODELIA VA., MANOSALVA I., DE LANGE J., DE LOS REYES M., MORENO RD. Proacrosin/acrosin quantification as an indicator of acrosomal integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*. 2006, **93**, 165-175.
- CREMONESI F., SALAMON L., GROPPETTI D., PECILE A. Results of a single transcervical endoscopic insemination using frozen semen in the bitch. *Vet. Res. Commun.*. 2005, **29 Suppl 2**, 187-189.
- DOMOSŁAWSKA A., JURCZAK A., JANOWSKI T. Progesterone level does not distinguish the different course of canine ovulation determined by ultrasonography. *Pol. J. Vet. Sci.*. 2014, **17**, 293-297.
- ENGLAND G., MILLAR K. The Ethics and Role of AI with Fresh and Frozen Semen in Dogs. *Reprod. Domest. Anim.*. 2008, **43**, 165-171.
- England, Concannon, Verstegen, Linde-Forsberg Determination of the optimal breeding time in the bitch : Basic considerations. *Int. Vet. Inf. Serv.*. 2002,.
- FARSTAD W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J. Small Anim. Pract.*. 1984, **25**, 561-565.
- Feldman, Nelson Section 7 : Canine Female Reproduction, Chapter 19 : Ovarian Cycle and Vaginal Cytology, in: *Canine and Feline - Endocrinology and Reproduction*. 2004,.
- Fontbonne Pathologie de la reproduction : Insémination artificielle dans l'espèce canine, in: *Encyclopédie Vétérinaire*. 1995,.
- GUÉRIN C., MAUREL MC., LAUNAI M., DELÉTANG F., BADINAND F. Use of an immunoenzymatic assay to detect the luteinizing hormone peak in bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*. 1997, **51**, 277-281.
- Johnston, Root Kustritz, Olson *Canine and Feline Theriogenology*. 2001,.
- Lévy, Fontbonne Determining of the optimal time of mating in bitches : particularities. *Rev Bras Reprod Anim*. 2007, **31**, 128-134.
- LINDE-FORSBERG C., STRÖM HOLST B., GOVETTE G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*. 1999, **52**, 11-23.
- Mason A retrospective clinical study of endoscopic-assisted transcervical insemination in the bitch with frozen-thawed dog semen.. *Soumis pour publication*. 2016,.
- MASON SJ., ROUS NR. Comparison of endoscopic-assisted transcervical and laparotomy insemination with frozen-thawed dog semen: a retrospective clinical study. *Theriogenology*. 2014, **82**, 844-850.

- MICKELSEN WD., MEMON MA., ANDERSON PB., FREEMAN DA. The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. *Theriogenology*. 1993, **39**, 553-560.
- NÖTHLING JO., GERSTENBERG C., VOLKMANN DH. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen--a retrospective study. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 1995, **66**, 49-55.
- Nöthling, Gerstenberg, Volkmann Semen quality after thawing : correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 1997, **51**, 109-116.
- OKANO T., MURASE T., ASANO M., TSUBOTA T. Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 2004, **66**, 1359-1364.
- PEÑA A., LINDE-FORSBERG C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 2000a, **54**, 859-875.
- PEÑA A., LINDE-FORSBERG CB. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 2000b, **54**, 703-718.
- PEÑA FJ., NÚÑEZ-MARTÍNEZ I., MORÁN JM. Semen technologies in dog breeding: an update. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* 2006, **41 Suppl 2**, 21-29.
- PINTO CRF., EILTS BE., PACCAMONTI DL. The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. *Theriogenology*. 1998, **50**, 301-305.
- PRETZER SD., LILLICH RK., ALTHOUSE GC. Single, transcervical insemination using frozen-thawed semen in the Greyhound: a case series study. *Theriogenology*. 2006, **65**, 1029-1036.
- Prinosilova, Rybar, Zajicova, Hlavicova DNA integrity in fresh, chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Veterinarni Medicina*. 2012, **57**, 133-142.
- REYNAUD K., FONTBONNE A., MARSELOO N., THOUMIRE S., CHEBROUT M., DE LESEGNO CV., et al. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reprod. Camb. Engl.* 2005, **130**, 193-201.
- ROMAGNOLI S., LOPATE C. Transcervical artificial insemination in dogs and cats: review of the technique and practical aspects. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* 2014, **49 Suppl 4**, 56-63.
- Root Kustritz *Small Animal Theriogenology, The Practical Veterinarian*. 2003,.
- ROTA A., ROTA A., MARTINI M., MILANI C., ROMAGNOLI S. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod. Nutr. Dev.* 2005, **45**, 29-37.
- Rota, Linde-Forsberg, Vannozzi, Romagnoli, Rodriguez-Martinez Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. *Reprod. Domest. Anim.* 1998, **33**, 355-361.
- SCHÄFER-SOMI S., KLUGER S., KNAPP E., KLEIN D., AURICH C. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*. 2006, **66**, 173-182.
- SILVA AR., CARDOSO RCS., UCHOA DC., SILVA LDM. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*. 2003, **59**, 821-829.
- Simpson, England, Harvey *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*, British Small Animal Veterinary Association. ed. 1998,.
- SZÁSZ F., GÁBOR G., SOLTÍ L. Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. *Acta Vet. Hung.* 2000, **48**, 325-333.
- THOMASSEN R., SANSON G., KROGENÆS A., FOUGNER JA., BERG KA., FARSTAD W. Artificial insemination with frozen semen in dogs: A retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology, Basic and Applied Research on Domestic, Exotic*

and Endangered Carnivores *Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction* 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. 2006, **66**, 1645-1650.

VARESI S., VERNOCCHI V., MORSELLI MG., LUVONI GC. DNA integrity of fresh and frozen canine epididymal spermatozoa. *Reprod. Biol.* 2014, **14**, 257-261.

WRIGHT PJ. Practical aspects of the estimation of the time of ovulation and of insemination in the bitch. *Aust. Vet. J.* 1991, **68**, 10-13.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Protocole de congélation de la semence réalisé au CERCA	104
Annexe 2 : Composition des dilueurs UPSALA 1 et UPSALA 2 utilisés au CERCA.....	105

Annexe 1 : Protocole de congélation de la semence réalisé au CERCA

- Après vérification de la qualité de la semence, en fonction de la concentration de la semence récoltée, deux étapes de dilution sont réalisées, puis les paillettes sont identifiées et congelées. Les dilueurs utilisés sont l'UPSALA 1 et l'UPSALA 2 (
-
- Annexe 2).
- **Préparation des dilueurs :**
 - Les dilueurs sont sortis du congélateur et réchauffés au bain-marie.
 - 1 mL de jaune d'œuf est ajouté à 4 mL de chaque dilueur en dehors du bain-marie.
 - Puis le tout est remis au bain-marie.
- **Contrôle de la semence et préparation :**
 - Un spermogramme est réalisé pour vérifier si la semence est congelable :
 - ➔ Concentration : >250 millions de spermatozoïdes
 - ➔ Mobilité : >70 %
 - ➔ Morphologie : <30 % de spermatozoïdes anormaux anormales
 - La deuxième phase de l'éjaculat (phase épидидymaire) récupérée est centrifugée à 1500 tours/min pendant 10 minutes.
- **Première dilution :**
 - Après centrifugation, seul le culot est récupéré.
 - Le volume de dilueur à ajouter est calculé selon la formule suivante :
 - ➔
$$V \text{ (mL)} = \frac{[(\text{Nombre de spz dans la semence}/200) - \text{Volume après centrifugation (mL)}]}{2}$$
 - Le volume de dilueur 1 (UPSALA 1) est prélevé à l'aide d'une pipette, ajouté à la semence, et le mélange est ensuite homogénéisé.
 - Le mélange semence-dilueur 1 est placé à 4°C au réfrigérateur pendant au minimum 1h30.
 - Les paillettes sont préalablement identifiées avec : le nom du chien, le code de la race, la date de prélèvement et AM/PM (selon si le prélèvement a été fait le matin ou l'après-midi), et le numéro de dossier ou le numéro de tatouage.
 - Les paillettes et le dilueur 2 sont préalablement placés au réfrigérateur à 4°C.
- **Deuxième dilution :**
 - Après au minimum 1h30, un volume de dilueur 2 identique à celui du dilueur 1 est ajouté au mélange.
 - Le mélange est ensuite aspiré dans les paillettes, dans lesquelles un peu d'air est introduit.
 - Le côté ouvert de la paillette est mis dans de la poudre, et mis dans de l'eau, de façon à créer un bouchon.
 - Les paillettes sont ensuite placées au dessus du container d'azote liquide, à 4 cm au dessus des vapeurs, pendant 20 minutes.
 - Puis elles sont ensuite plongées dans le container d'azote liquide.

- L'emplacement des paillettes est noté dans un registre et dans le dossier de l'animal.

Annexe 2 : Composition des dilueurs UPSALA 1 et UPSALA 2 utilisés au CERCA

Constituants	UPSALA 1	UPSALA 2
Tris	3,025 grammes	3,025 grammes
Acide citrique	1,7 grammes	1,7 grammes
Glucose	1,25 grammes	1,25 grammes
Amicacine	0,02 grammes	0,02 grammes
Glycérol	3 mL	7 mL
Equex STM Paste	Non	1 mL
Eau distillée	77 mL	77 mL
Jaune d'œuf	20 mL	20 mL

**INSEMINATION ARTIFICIELLE EN SEMENCE CONGELEE CHEZ LA CHIENNE :
ANALYSE DES DOSSIERS DES CHIENNES SUIVIES AU CENTRE D'ETUDE EN
REPRODUCTION DES CARNIVORS DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE
D'ALFORT (CERCA) DE JANVIER 2007 A DECEMBRE 2015**

NOM et Prénom : MARINGUE Célia

Résumé:

Cette thèse présente, dans une première partie basée sur les éléments de bibliographie, les indications de l'insémination artificielle en semence congelée en espèce canine, puis expose les méthodes permettant de déterminer le moment de l'ovulation, et par conséquent, la période optimale pour inséminer ; et développe ensuite les principes et les techniques d'insémination.

Dans une seconde partie, basée sur un travail d'analyse personnelle, les résultats obtenus en insémination artificielle en semence congelée au CERCA (Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores de l'école nationale vétérinaire d'Alfort) de 2007 à 2015 sont étudiés, et exprimés en fonction de différents paramètres concernant la femelle, la semence, et l'insémination. Cette partie permet de déterminer les paramètres essentiels à maîtriser pour obtenir un taux de gestation optimal.

Le taux de gestation suite à des inséminations en semence congelée du CERCA était de 61,7 % (92/149).

Un premier taux de gestation corrigé de 78,6 % (11/14) a été calculé, prenant en compte uniquement les chiennes dont le suivi de chaleurs a été rigoureux, et qui ont été inséminées avec de la semence dont la dose inséminante et la mobilité spermatique étaient considérées comme optimale.

Un deuxième taux de gestation corrigé de 74 % (40/54) a été calculé de la même manière, mais sans tenir compte de la dose inséminante, du fait du manque de données.

La prolificité moyenne était de 4,6 +/- 3,0 chiots par portée.

La durée de la gestation moyenne était de 60,2 jours +/- 2,5 jours par rapport à la première insémination artificielle et de 59,7 +/- 1,7 jours, par rapport à la deuxième insémination artificielle.

L'interprétation des résultats montre l'importance de la maîtrise de plusieurs paramètres afin d'obtenir une fertilité et une prolificité optimales. En effet, la qualité de la semence, notamment la mobilité des spermatozoïdes, et le taux de progestérone lors de l'insémination sont les éléments clés à maîtriser pour augmenter le taux de gestation. Le poids de la chienne a une influence sur le taux de gestation et la prolificité.

Mots-clés : INSEMINATION ARTIFICIELLE, SEMENCE CONGELEE, SPERME, REPRODUCTION CANINE, CERCA, PAILLETES, PROGESTERONE

Jury :

Président : Pr. PISSARD Serge

Directeur : Pr. FONTBONNE Alain

Assesseur : Pr. CONSTANT Fabienne

**ARTIFICIAL INSEMINATION WITH FROZEN SEMEN IN DOGS: ANALYSIS OF FILES
OF FEMALE DOGS FOLLOWED AT THE CENTER FOR STUDY IN CANINE
REPRODUCTION AT THE FRENCH NATIONAL VETERINARY SCHOOL OF
MAISONS-ALFORT (CERCA) FROM JANUARY 2007 TO DECEMBER 2015**

NAME and Surname : MARINGUE Célia

Summary :

In a first part based on bibliography, this thesis presents indications of artificial insemination with frozen semen in canine species, then exposes methods of determination of ovulation time, and consequently, optimal insemination time ; and develops insemination principles and techniques. In a second part based on personal analysis work, CERCA (Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores de l'école nationale vétérinaire d'Alfort) results of insemination with frozen semen are studied, and are expressed related to various parameters concerning the bitch, the semen, and the insemination. This part permits to identify the essential parameters to control in order to obtain an optimal pregnancy rate.

The CERCA's pregnancy rate of artificial insemination with frozen semen from 2007 to 2015 was 61.7% (92/149).

A first corrected pregnancy rate of 78.6% (11/14) was calculated, considering only bitches with precise ovulation time determination and who has been inseminated with semen which spermatic mobility and insemination dose are considered as optimal.

A second corrected success rate of 74% (40/54) was calculated similarly, but without considering the inseminated dose, because of a lack of data.

The average prolificity was 4.6 +/- 3.0 puppies per litter.

The average length of gestation was 60.2 +/- 2.5 days in relation to the first insemination, and 59.7 +/- 1.7 days in relation to the second insemination.

The results interpretation highlights the importance to control several parameters in order to improve the fertility and the prolificity. Indeed, progesterone rate at the insemination time, and semen quality, in particular spermatozoa mobility, are key factors to manage for increasing the pregnancy rate. The bitch body weight influences the pregnancy rate and the prolificity.

Keywords : ARTIFICIAL INSEMINATION, FROZEN SEMEN, SPERM, CANINE REPRODUCTION, CERCA, STRAWS, PROGESTERONE

Jury :

President : Pr. PISSARD Serge

Director : Pr. FONTBONNE Alain

Assessor : Pr. CONSTANT Fabienne