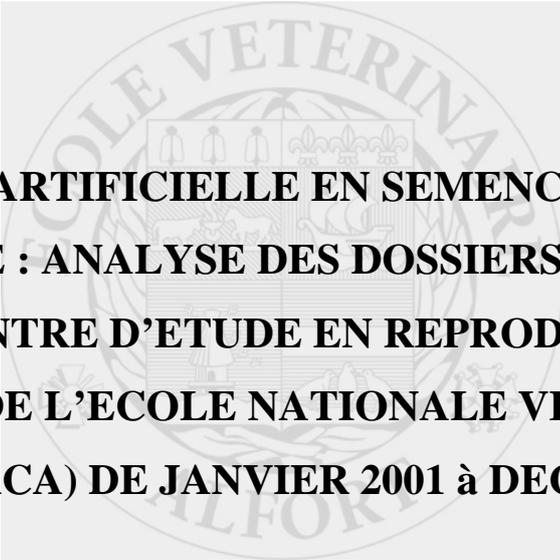


Année 2007



**INSEMINATION ARTIFICIELLE EN SEMENCE CONGÉLÉE  
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 2001 à DÉCEMBRE 2006**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRETEIL

le.....

par

**Nathalie, Louise, Marcelle, Jeanne BENECHET**

Née le 19 juin 1984 à Senlis (Oise)

JURY

**Président : M.**

**Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL**

**Membres**

**Directeur : M Alain FONTBONNE**

**Maître de conférences à l'E.N.V.A.**

**Assesseur : M. Pascal ARNE**

**Maître de conférences à l'E.N.V.A.**

## LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur COTARD Jean-Pierre

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires: MM. BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques

### DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

**Chef du département : M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur - Adjoint : M. DEGUEURCE Christophe, Professeur**

<p><b>-UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES</b> Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur* Mlle ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henri, Maître de conférences</p> <p><b>-UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE</b> Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur</p> <p><b>-UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE</b> M. BRUGERE Henri, Professeur Mme COMBRISON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences</p> <p><b>-UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE</b> Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * M. TISSIER Renaud, Maître de conférences M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p><b>-UNITE DE BIOCHIMIE</b> M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences M. BELLIER Sylvain , Maître de conférences</p>	<p><b>- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE</b> M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences</p> <p><b>- UNITE DE VIROLOGIE</b> M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences</p> <p><b>-DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES</b> M. MOUTHON Gilbert, Professeur</p> <p><b>-UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET CLINIQUE</b> M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Melle ABITBOL Marie, Maître de conférences</p> <p><b>-DISCIPLINE : ETHOLOGIE</b> M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p> <p><b>-DISCIPLINE : ANGLAIS</b> Mme CONAN Muriel, Ingénieur Professeur agrégé certifié</p>
---	--

### DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

**Chef du département : M. FAYOLLE Pascal, Professeur - Adjoint : M. POUCHOLON Jean-Louis , Professeur**

<p><b>- UNITE DE MEDECINE</b> M. POUCHOLON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE</b> M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme GIRAUDET Aude, Professeur contractuel Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel M. PICCOT-CREZOLLET Cyrille, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>-UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE</b> Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Melle CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Melle LEDOUX Dorothée, Maître de conférences Contractuel (rattachée au DPASP)</p>	<p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE</b> M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mlle RAVARY Béangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE RADIOLOGIE</b> Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>-UNITE D'OPHTALMOLOGIE</b> M. CLERC Bernard, Professeur* Melle CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES</b> M. CHERMETTE René, Professeur M. POLACK Bruno, Maître de conférences* M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel</p> <p><b>-UNITE DE NUTRITION-ALIMENTATION</b> M. PARAGON Bernard, Professeur * M. GRANDJEAN Dominique, Professeur</p>
--	---

### DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

**Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences**

<p><b>-UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES</b> M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOUR Barbara, Maître de conférences</p> <p><b>-UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE</b> M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> <p><b>- DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES</b> M. SANAA Moez, Maître de conférences</p>	<p><b>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE</b> M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences*</p> <p><b>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR</b> M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences</p>
--	--

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

\* Responsable de l'Unité

AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel

# Remerciements

## **A Monsieur le Professeur**

De la Faculté de Médecine de Créteil,

Qui nous a fait l'honneur de présider le jury de thèse.

*Hommage respectueux.*

## **A Monsieur le Docteur Alain Fontbonne, de l'ENVA,**

Pour m'avoir guidé dans ce travail et donné l'envie d'approfondir mes connaissances en reproduction animale. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Votre courtoisie, votre respect et votre attention m'ont beaucoup touchée.

*Sincères remerciements.*

## **A Monsieur le Docteur Pascal Arné, de l'ENVA,**

Qui a accepté de participer au jury de cette thèse.

*Sincères remerciements.*

**A mes parents,**

Pour m'avoir si bien soutenue durant mes études. Vos conseils, votre patience et votre bienveillance m'ont permis d'être aujourd'hui heureuse et épanouie. Merci de m'avoir si bien guidée dans ma vie.

**A mes frères,** pour tous nos moments de complicité passés et futurs.

**A Olivier,** pour ta présence et ton soutien, pour toutes les aventures que nous avons vécues ensemble à Alfort et celles qui sont à venir.

**A mes amis,**

Avec qui j'ai passé des moments inoubliables à Alfort.

Audrey, Buffy, Capucine, Caroline, Despé, Elodie, Frenz, Jack's, Jean, Johanna, Laurence, Ln, Maud, Tigrou,  
Sara ma mère de clinique,  
Lucile, ma fille de clinique.

**Au Docteur Mimouni,**

Pour ton aide lors de mes recherches bibliographiques. Nos discussions sur ce sujet ont été très enrichissantes. Je garde d'excellents souvenirs des moments passés dans ta clinique. Je te remercie de tout ce que tu m'as enseigné en reproduction.

**A toute l'équipe du CERCA,**

Pour son aide et sa bonne humeur.

**INSEMINATION ARTIFICIELLE EN SEMENCE CONGEELEE  
CHEZ LA CHIENNE : ANALYSE DES DOSSIERS DES CHIENNES  
SUIVIES AU CENTRE D'ETUDE EN REPRODUCTION DES  
CARNIVORES DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE  
D'ALFORT (CERCA) DE JANVIER 2001 à DECEMBRE 2006**

NOM et Prénom : BENECHET Nathalie

**RESUME :**

Dans un premier temps, l'auteur rappelle les principales indications de l'insémination artificielle en semence congelée (IAC), puis décrit la technique et les principes de sa réalisation. Il dresse ensuite un bilan des résultats obtenus au CERCA (centre d'étude en reproduction des carnivores de l'école vétérinaire d'Alfort) sur une période de 5 ans de 2001 à 2006 en fonction des paramètres pouvant avoir une influence sur la réussite des IAC. L'analyse de ces résultats, dans le but de proposer des améliorations possibles de la technique utilisée, montre la nécessité d'une méthode rigoureuse afin d'obtenir un maximum de succès, c'est-à-dire d'augmenter la fertilité et la prolificité. Un suivi de chaleur le plus précis possible, l'utilisation d'une semence de très bonne qualité et la sélection d'une femelle ayant de bonnes performances de reproduction sont nécessaires.

**MOTS CLES:** Insémination artificielle, semence congelée, sperme, reproduction canine, CERCA.

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. Alain Fontbonne

Assesseur : Dr. Pascal Arné

Adresse de l'auteur :

BENECHET Nathalie, 18 impasse Souchier, 60500 Chantilly

**ARTIFICIAL INSEMINATION WITH FROZEN SEMEN IN DOGS:  
ANALYSIS OF FILES OF FEMALE DOGS FOLLOWED AT THE  
CENTRE FOR STUDY IN CANINE REPRODUCTION AT THE  
FRENCH NATIONAL VETERINARY SCHOOL OF MAISONS-  
ALFORT(CERCA)  
FROM JANUARY 2001 TO DECEMBER 2006**

**NAME and Surname: BENECHET Nathalie**

**SUMMARY:**

In a first part, the author points out the main indications for artificial insemination with frozen semen, then she describes the technique and the principles of its achievement. She subsequently draws up an assessment of the results obtained at the CERCA (Centre for Reproduction at the French Veterinary School of Maisons-Alfort) over a 5 year period (2001 to 2006) in respect with the parameters which may have had an influence on the results of the insemination. The analysis of these results, with the aim to propose possible improvements to the technique, shows the need for a rigorous method in order to obtain a maximum success rate, i.e. to increase fertility and prolificity. A follow-up of the bitches heats as precisely as possible, the use of very good quality semen and the selection of a female having a good track-record of reproduction performances appear necessary.

**KEYWORDS:** Artificial insemination, frozen semen, sperm, canine reproduction, CERCA.

Jury :

President : Pr.

Director : Dr. Alain Fontbonne

Assessor : Dr. Pascal Arné

Author address :

BENECHET Nathalie, 18 impasse Souchier, 60500 Chantilly

# Table des matières

<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>7</b>
<b>INDEX DES FIGURES .....</b>	<b>8</b>
Introduction. ....	11
<b>Première partie: étude bibliographique.....</b>	<b>12</b>
<b>1 L'insémination artificielle en semence congelée (IAC) chez le chien : Principes généraux .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Historique .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Indications .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Conservation du patrimoine génétique .....	12
1.2.2 Etalon indisponible.....	12
1.2.3 Sauvegarde des races à petit effectif.....	12
1.2.4 Conservation des lignées.....	12
1.2.5 “Retrempe” .....	12
1.2.6 Echanges internationaux .....	13
1.2.7 Conclusion.....	13
<b>1.3 Congélation de la semence .....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Principes généraux et effet de la congélation sur les spermatozoïdes ...	13
1.3.2 Centrifugation.....	14
1.3.3 Dilution.....	14
1.3.4 Conditionnement .....	15
1.3.5 Stockage et transport .....	16
1.3.6 Concentration finale optimale.....	16
1.3.7 Conclusion.....	16
<b>1.4 Décongélation .....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Température et temps de décongélation .....	17
1.4.2 Dilution après décongélation .....	17
1.4.3 Mise en œuvre de la décongélation lors d'une IAC.....	17
1.4.4 Les effets de la fraction prostatique.....	17

1.4.5	Conclusion.....	18
1.5	Contrôle du sperme .....	18
<b>2</b>	<b>Détermination du moment optimal de l'insémination artificielle en semence congelée chez la femelle .....</b>	<b>19</b>
2.1	Rappels sur la physiologie du cycle sexuel de la chienne.....	19
2.1.1	Les différentes phases du cycle .....	19
2.1.1.1	Le præstrus .....	19
2.1.1.2	L'oestrus.....	19
2.1.1.3	La phase lutéale : metœstrus et diœstrus .....	19
2.1.1.4	L'anœstrus .....	19
2.1.2	Les hormones du cycle œstral .....	19
2.1.2.1	Les oestrogènes .....	20
2.1.2.2	La progestérone .....	20
2.1.2.3	Schémas récapitulatifs des variations hormonales au cours du cycle œstral de la chienne.....	20
2.2	Méthode de détermination de la date d'ovulation.....	21
2.2.1	Les signes extérieurs de chaleurs .....	21
2.2.2	Observation des signes comportementaux.....	22
2.2.2.1	Acceptation du mâle par la femelle .....	22
2.2.2.2	Acceptation de la femelle par le mâle.....	22
2.2.3	Frottis vaginaux et cytologie vaginale .....	22
2.2.3.1	Réalisation du frottis vaginal .....	22
2.2.3.2	Lecture du frottis vaginal .....	23
➤	Les différents types de cellules observées sur frottis vaginal .....	23
➤	Modification de la cytologie vaginale au cours du cycle sexuel.....	24
2.2.4	Intérêts et limites des frottis vaginaux.....	26
2.2.5	Taux hormonaux .....	26
2.2.5.1	Evolution de la progestéronémie au cours du cycle sexuel.....	26
2.2.5.2	Méthodes de dosage.....	28
➤	Méthode semi-quantitative par seuil .....	28
➤	Méthode quantitative .....	28
2.2.6	Résistivité du mucus vaginal .....	28
2.2.7	Relation avec le pic de LH (Luteinising Hormone).....	28

2.2.8	L'échographie ovarienne .....	28
2.2.9	Endoscopie vaginale .....	31
2.2.10	Conclusion.....	32
<b>3</b>	<b>Mise en place de la semence lors d'insémination artificielle en semence congelée .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Choix du moment de l'insémination artificielle .....</b>	<b>33</b>
3.1.1	Rappel sur la physiologie des gamètes.....	33
3.1.2	Période optimale de fertilité .....	33
<b>3.2</b>	<b>Technique d'insémination.....</b>	<b>34</b>
3.2.1	Anatomie du tractus génital femelle .....	34
3.2.1.1	Le vagin .....	35
3.2.1.2	L'utérus .....	35
3.2.2	Méthode par cathétérisme ou technique norvégienne d'Andersen .....	36
3.2.2.1	Contention de la chienne.....	36
3.2.2.2	Cathétérisme du col utérin .....	36
3.2.2.3	Mise en place de la semence .....	37
3.2.2.4	Echec du cathétérisme cervical .....	37
3.2.2.5	Avantages et inconvénients de la technique par cathétérisme .....	38
3.2.3	Méthode par laparotomie .....	38
3.2.4	Méthode par endoscopie vaginale.....	38
3.2.5	Tranquillisation .....	39
3.2.6	Conclusion.....	39
<b>3.3</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>39</b>
3.3.1	Fertilité .....	39
3.3.2	Prolificité.....	39
<b>3.4</b>	<b>Réglementation de l'insémination artificielle .....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>40</b>
<b>Deuxième partie : Analyse des dossiers du CERCA.....</b>		<b>41</b>
<b>1</b>	<b>Le Cerca .....</b>	<b>41</b>
<b>1.1</b>	<b>Présentation.....</b>	<b>41</b>
1.1.1	Historique.....	41
1.1.2	Rôle de la banque de la semence .....	41

1.2	Protocole de suivi des chaleurs.....	41
1.3	Protocole de congélation de la semence.....	41
1.4	Protocole d'insémination artificielle en semence congelée.....	42
2	Materiel et methodes.....	42
2.1	Objectifs.....	42
2.2	Matériel et méthodes .....	42
2.2.1	Recueil des données.....	42
2.2.2	Critères de choix des animaux et description de l'échantillon.....	42
2.2.3	Saisie des données.....	43
3	Résultats .....	43
3.1	Paramètres de l'échantillon .....	43
3.2	Paramètres de reproduction concernant la femelle .....	43
3.2.1	Fertilité .....	43
3.2.2	Prolificité .....	43
3.2.3	Durée de gestation .....	44
3.2.4	Sex ratio.....	44
3.2.5	Age lors de l'insémination artificielle en semence congelée (IAC) .....	44
3.2.6	Influence du groupe cynophile .....	46
3.2.7	Format de la chienne.....	48
3.2.8	Infertilité antérieure.....	50
3.2.9	Rang de portée .....	50
3.2.10	Qualité du suivi effectué .....	51
3.2.11	Taux de progestérone à l'insémination .....	52
3.2.12	Réalisation d'un diagnostic de gestation .....	53
3.3	Paramètres concernant l'IAC .....	54
3.3.1	Type d'insémination.....	54
3.3.2	Moment de l'insémination .....	54
3.3.3	Nombre d'IAC .....	55
3.3.4	Année de réalisation de l'insémination.....	56
3.3.5	Difficultés .....	57
3.3.5.1	Tranquillisation .....	57
3.3.5.2	Reflux.....	57

<b>3.4 Paramètre concernant la semence .....</b>	<b>57</b>
3.4.1 Provenance de la semence.....	57
3.4.2 Type de conditionnement de la semence : paillettes / pellets.....	58
3.4.3 Qualité de la semence .....	59
3.4.3.1 Le nombre de spermatozoïdes totaux.....	61
3.4.3.2 Nombre de spermatozoïdes mobiles .....	63
3.4.3.3 Mobilité des spermatozoïdes .....	63
3.4.4 Année de congélation .....	65
<b>3.5 Conclusion :.....</b>	<b>67</b>
<b>Troisième partie : Discussion .....</b>	<b>68</b>
<b>1 Echantillon d'étude.....</b>	<b>68</b>
<b>2 Résultats.....</b>	<b>68</b>
<b>2.1 Paramètres de reproduction concernant la femelle .....</b>	<b>68</b>
2.1.1 Fertilité .....	68
2.1.2 Prolificité .....	74
2.1.3 Sex ratio.....	75
2.1.4 Age lors de l'insémination artificielle en semence congelée (IAC) .....	76
2.1.5 Influence du groupe cynophile .....	76
2.1.6 Format de la chienne.....	76
2.1.7 Infertilité antérieure.....	77
2.1.8 Qualité du suivi effectué .....	77
2.1.9 Taux de progestérone à l'insémination .....	77
2.1.10 Durée de gestation .....	77
2.1.11 Réalisation d'un diagnostic de gestation .....	78
<b>2.2 Paramètre concernant l'IAC.....</b>	<b>78</b>
2.2.1 Type d'insémination.....	78
2.2.2 Moment de l'insémination .....	79
2.2.3 Nombre d'IAC .....	79
2.2.4 Année de réalisation de l'insémination.....	80
2.2.5 Difficultés .....	80
2.2.6 Reflux.....	80
2.2.7 Tranquillisation .....	80

<b>2.3 Paramètre concernant la semence .....</b>	<b>80</b>
<b>2.3.1 Provenance de la semence.....</b>	<b>80</b>
<b>2.3.2 Type de conditionnement de la semence : paillettes / pellets.....</b>	<b>81</b>
<b>2.3.3 Qualité de la semence .....</b>	<b>81</b>
<b>2.3.3.1 Le nombre de spermatozoïdes.....</b>	<b>81</b>
<b>2.3.3.2 Mobilité des spermatozoïdes .....</b>	<b>82</b>
<b>2.4 La communication autour de l'IAC.....</b>	<b>82</b>
Conclusion.....	83
Bibliographie.....	84
Annexes.....	88

## Liste des tableaux

<b>Tableau I : Mobilité des spermatozoïdes de chiens conservés a 4°C après congélation ou en semence fraîche.....</b>	<b>14</b>
<b>Tableau II : Composition quantitative du diluant UPPSALA EQUEX EXTENDER-1, utilisé au CERCA. ....</b>	<b>15</b>
<b>Tableau III : Composition quantitative du diluant UPPSALA EQUEX EXTENDER-1, utilisé au CERCA. ....</b>	<b>15</b>
<b>Tableau IV : Résultats de reproduction en fonction du type d'insémination (2001-2006)....</b>	<b>54</b>
<b>Tableau V : Influence du nombre d'IAC/cycle sur les résultats de reproduction. ....</b>	<b>55</b>
<b>Tableau VI : Taux de réussite en fonction de la méthode d'insémination utilisée.....</b>	<b>69</b>
<b>Tableau VII : Taux de réussite en fonction du nombre d'IAC pratiquées.....</b>	<b>69</b>
<b>Tableau VIII : Importance de la technique d'insémination.....</b>	<b>78</b>

## **Index des figures**

<b>Figure 1 : Conservation des paillettes dans un conteneur à azote liquide.</b> .....	16
<b>Figure 2 : Décongélation de la semence.</b> .....	16
<b>Figure 3 : Schémas récapitulatifs des variations hormonales au cours du cycle œstral de la chienne.</b> .....	20
<b>Figure 4 : Intensité des saignements vulvaires du début à la fin des chaleurs,détectée indirectement grâce à l'aspect du coton des écouvillons, ayant servi à réaliser les frottis vaginaux.</b> .....	21
<b>Figure 5 : Réalisation d'un écouvillon vaginal.</b> .....	22
<b>Figure 6 : Frottis de cellules parabasales.</b> .....	23
<b>Figure 7: Frottis de cellules intermédiaires.</b> .....	24
<b>Figure 8 : Frottis de cellules superficielles.</b> .....	24
<b>Figure 9 : Epithélium vaginal lors de l' anœstrus.</b> .....	25
<b>Figure 10 : Epithélium vaginal lors du præstrus.</b> .....	25
<b>Figure 11 : Epithélium vaginal lors de oestrus.</b> .....	25
<b>Figure 12 : Epithélium vaginal lors du metoestrus.</b> .....	26
<b>Figure 13 : Conduite à tenir lors d'un suivi de chaleur.</b> .....	27
<b>Figure 14 : Technique d'échographie ovarienne.</b> .....	29
<b>Figure 15 : Ovaire en præstrus.</b> .....	29
<b>Figure 16 : Ovaire en période pré-ovulatoire.</b> .....	30
<b>Figure 17 : Ovaire post-ovulation : disparition des follicules.</b> .....	30
<b>Figure 18 : Appareil d'endoscopie vaginale.</b> .....	31
<b>Figure 19 : Muqueuse vaginale lors du præstrus vue par endoscopie.</b> .....	31
<b>Figure 20 : Muqueuse vaginale lors de l'œstrus vue par endoscopie.</b> .....	32
<b>Figure 21: Maturation des ovocytes par rapport à la date d'ovulation.</b> .....	34
<b>Figure 22 : Anatomie du tractus génital femelle.</b> .....	35
<b>Figure 23 : Matériel utilisé pour le cathétérisme utérin.</b> .....	36
<b>Figure 24 : Méthode de cathétérisme utérin.</b> .....	37

<b>Figure 25: Passage de la sonde urinaire dans l'ostium utérin (Fontbonne A. ©)</b> .....	39
<b>Figure 26 : Nombre de chiots par chiennes</b> .....	43
<b>Figure 27 : Age des chiennes lors de l'IAC</b> .....	44
<b>Figure 28 : Réussite de l'IAC en fonction de l'âge de la chienne</b> .....	45
<b>Figure 29 : Pourcentage de réussite en fonction de l'âge de la chienne</b> .....	45
<b>Figure 30 : Nombre de chiots en fonction de l'âge des chiennes lors de l'IAC</b> .....	46
<b>Figure 31 : Répartition des chiennes en fonction des groupes cynotechniques</b> .....	47
<b>Figure 32 : Pourcentage de réussite de l'IAC en fonction du groupe cynotechnique</b> .....	47
<b>Figure 33 : Nombre moyen de chiots en fonction du groupe cynotechnique d'appartenance de la chienne</b> .....	48
<b>Figure 34 : Format des chiennes ayant subi une IAC au CERCA de 2001 à 2006</b> .....	49
<b>Figure 35 : Réussite de l'IAC en fonction du format de la chienne</b> .....	49
<b>Figure 36 : Nombre de chiots en fonction du format de la chienne</b> .....	50
<b>Figure 37 : Nombre de chiots en fonction du rang de portée</b> .....	51
<b>Figure 38 : Suivis réalisés au CERCA</b> .....	51
<b>Figure 39 : Taux de progestérone lors de l'IAC</b> .....	52
<b>Figure 40 : Taux de progestérone lors de réussite de l'IAC</b> .....	53
<b>Figure 41 : Taux de progestérone lors d'échec de l'IAC</b> .....	53
<b>Figure 42 : Nombre d'IAC réalisées au CERCA de 2001 à 2006</b> .....	56
<b>Figure 43 : Pourcentage de réussite des IAC de 2001 à 2006</b> .....	56
<b>Figure 44 : Proportion des semences en provenance d'un autre centre d'IAC</b> .....	57
<b>Figure 45 : Semences en provenance de l'étranger</b> .....	58
<b>Figure 46 : Type de conditionnement de la semence utilisé lors des IAC</b> .....	58
<b>Figure 47 : Qualité des semences utilisées</b> .....	59
<b>Figure 48 : Pourcentage de réussite de l'IAC en fonction de la qualité de la semence</b> .....	59
<b>Figure 49 : Nombre de chiots en fonction de la qualité de la semence</b> .....	60
<b>Figure 50 : Dose de spermatozoïdes inséminée par chienne (sur la totalité des IAC du cycle)</b> .....	61
<b>Figure 51 : Pourcentage de réussite en fonction de la dose de spermatozoïdes inséminée</b> .....	62
<b>Figure 52 : Taille de portée en fonction de la dose de spermatozoïdes inséminée</b> .....	62
<b>Figure 53 : Mobilité post décongélation des semences utilisées</b> .....	63

<b>Figure 54 : Pourcentage de réussite en fonction de la mobilité des spermatozoïdes.....</b>	<b>64</b>
<b>Figure 55 : Nombre de chiots en fonction de la mobilité des spermatozoïdes post décongélation. ....</b>	<b>64</b>
<b>Figure 56 : Date de congélation des semences. ....</b>	<b>65</b>
<b>Figure 57 : Pourcentage de réussites des IAC en fonction de la date de congélation des paillettes utilisées.....</b>	<b>65</b>
<b>Figure 58 : Durée de conservation des paillettes avant l'insémination. ....</b>	<b>66</b>
<b>Figure 59 : Pourcentage de réussite en fonction de l'âge des paillettes utilisées.....</b>	<b>66</b>
<b>Figure 60 : Age des chiennes lors de l'insémination selon deux périodes : De 2001 à 2003 et de 2004 à 2006.....</b>	<b>70</b>
<b>Figure 61 : Rang de portée selon deux périodes : de 2001 à 2003 et de 2004 à 2006. ....</b>	<b>71</b>
<b>Figure 62 : Qualité des suivis de chaleur selon deux périodes : de 2001 à 2003 et de 2004 à 2006.....</b>	<b>71</b>
<b>Figure 63 : Qualité de la semence selon deux périodes : de 2001 à 2003 et de 2004 à 2006. ..</b>	<b>72</b>
<b>Figure 64 : Nombre d'IAC / chienne selon deux périodes : de 2001 à 2003 et de 2004 à 2006.....</b>	<b>73</b>
<b>Figure 65 : Pourcentage d'infertilité selon deux périodes : de 2001 à 2003 et de 2004 à 2006.....</b>	<b>73</b>
<b>Figure 66 : Nombre de chiots selon deux périodes : de 2001 à 2003 et de 2004 à 2006. ....</b>	<b>75</b>
<b>Figure 67 : Comparaison des qualités des semences selon leur provenance.....</b>	<b>81</b>

# Introduction

L'insémination artificielle en semence congelée est une technique pratiquée par des vétérinaires spécialisés. Elle est utilisée assez rarement chez le chien, dans des indications particulières et par une clientèle travaillant le plus souvent dans l'élevage.

Les produits issus de ces inséminations sont généralement de très bonne qualité génétique et acquièrent une grande valeur. L'insémination artificielle en semence congelée (IAC) permet ainsi une amélioration des races et des lignées très intéressante pour les éleveurs sélectionneurs. En effet, il est possible de croiser des chiens séparés géographiquement mais aussi dans le temps. Un éleveur, ayant un mâle dont les caractères génétiques et phénotypiques sont très positifs, aura ainsi la possibilité de conserver ses qualités de reproducteur en congelant sa semence. Plus tard, s'il obtient une femelle dont les aptitudes sont exceptionnelles, il pourra alors l'accoupler artificiellement avec ce mâle. L'IAC est donc un outil de sélection extraordinaire.

L'IAC est un procédé très délicat dont la réussite est encore trop souvent aléatoire. La volonté d'améliorer ces résultats a conduit à quelques études dont le but est de trouver une méthode fiable c'est-à-dire d'obtenir un taux de réussite optimal et une taille de portée convenable.

Le CERCA (Centre d'Etude en Reproduction des carnivores d'Alfort) est un des principaux centres de congélation de semence canine en France. L'étude des dossiers du CERCA permet ainsi d'accéder à des données concernant un nombre important d'IAC. Le but de ce travail est de présenter et d'analyser les résultats des IAC pratiquées en s'intéressant à tous les détails et caractéristiques qui pourraient améliorer ceux-ci et en les comparant avec ceux publiés dans la littérature mondiale.

Dans un premier temps, nous expliquerons les principes d'une insémination en semence congelée, la technique nécessaire, ses indications et ses limites. Puis nous présenterons les résultats du CERCA en fonction des paramètres pouvant avoir une influence sur la réussite des IAC. Enfin nous discuterons de ces résultats et proposerons des améliorations possibles de la technique utilisée.

## Première partie: étude bibliographique

### **1 L'INSEMINATION ARTIFICIELLE EN SEMENCE CONGEELEE (IAC) CHEZ LE CHIEN : PRINCIPES GENERAUX**

#### **1.1 Historique**

La **première insémination artificielle** dans l'espèce canine a été relatée en **1787**, d'après Badinand (3). Deux cent ans plus tard, en 1969, est pratiquée la première insémination artificielle en semence congelée aux U.S.A. (47). En **France**, la première tentative date de **1982**. (3)

Jusqu'en 1989, moins de 500 inséminations en semence congelée chez la chienne ont été réalisées dans le monde (24). **L'amélioration des techniques de congélation depuis 1970**, permettra à cette méthode de devenir de plus en plus courante dans le monde de l'élevage.

#### **1.2 Indications**

La semence congelée donnant de moins bons résultats que la semence fraîche (3), elle est **réservée à quelques cas précis**.

##### **1.2.1 Conservation du patrimoine génétique**

L'IAC permet de **conserver le patrimoine génétique** d'un chien après sa mort ou d'un chien subissant un traitement qui risque de le rendre infertile (médical ou chirurgical).

##### **1.2.2 Etalon indisponible**

Suite à une maladie, un accident, ou un décès.

##### **1.2.3 Sauvegarde des races à petit effectif**

Comme cela se pratique couramment chez les bovidés, porcins et les asins (16).

##### **1.2.4 Conservation des lignées**

L'IAC permet de maintenir la diversité génétique d'une race. Les pratiques d'élevages montrent que, parfois, l'engouement pour un étalon exceptionnel fait que presque tous les reproducteurs de la race font partie de sa descendance. Si un autre étalon le détrône ou plus gravement, si des maladies génétiques apparaissent, il est bon de pouvoir retrouver et développer rapidement d'autres lignées.

##### **1.2.5 "Retrempe"**

La possibilité d'utiliser sur une lice la semence de ses ascendants de deux ou trois générations est un atout pour les éleveurs voulant maintenir au plus haut la qualité de leurs produits.

### 1.2.6 Echanges internationaux

Les échanges internationaux permettent le rapprochement entre un mâle et une femelle éloignés géographiquement. De plus, dans les pays protégés par une barrière sanitaire rigoureuse, limitant de manière drastique l'introduction d'animaux sur leur territoire, l'IAC permet néanmoins de préserver une certaine variabilité génétique. C'est le cas par exemple de certains Départements et Territoires d'Outre-mer, du Royaume uni, des Pays nordiques et de l'Océanie (Australie, Nouvelle-Zélande).

### 1.2.7 Conclusion

L'insémination artificielle chez le chien **ne saurait supplanter l'accouplement**. La semence congelée ne peut être utilisée que dans des cas bien précis, déterminés par les éleveurs eux-mêmes. Les indications de cette méthode de reproduction sont limitées. Cependant **du point de vue de la sélection génétique, elle reste extrêmement intéressante**.

## 1.3 Congélation de la semence

Avant de réaliser l'IAC, la semence aura été congelée parfois de nombreuses années auparavant. Cette étape joue un rôle important dans la réussite de l'IAC en influant sur la qualité du sperme.

### 1.3.1 Principes généraux et effet de la congélation sur les spermatozoïdes (25)

La congélation nécessite une **qualité minimale du sperme** : celle-ci ne se fera que pour des semences ayant une **mobilité individuelle supérieure à 70 %** et un nombre d'anomalies inférieur à 30 %.

Un **choc thermique se produit entre +15°C et 5°C**. Celui-ci provoque un endommagement cellulaire qui a pour conséquences une diminution de la mobilité (Cf tableau 1), des lésions des acrosomes et une perméabilisation des membranes. On peut protéger les spermatozoïdes de ce choc en ajoutant des lipoprotéines (en pratique : du lait ou du jaune d'œuf).

Il peut aussi y avoir **formation de cristaux de glace** en raison du phénomène de surfusion à la température de cristallisation. Au niveau cellulaire, on observe une déshydratation de la cellule par osmolarité. Si la congélation de la cellule est trop rapide, des cristaux de glace se forment alors dans la cellule. Si la congélation est trop lente, il y a un effet « solution » (déshydratation).

La congélation est donc responsable, au niveau cellulaire, de lésions membranaires, acrosomiales, de l'ADN, des mitochondries et des microtubules. **La congélation est responsable d'un déclin de la mobilité, et d'une diminution de l'aptitude à féconder des spermatozoïdes.**

**Tableau I : Mobilité des spermatozoïdes de chiens conservés à 4°C après congélation ou à l'état de semence fraîche. (24).**

Temps (heures)	Mobilité	
	Semence congelée	Semence Fraîche
0	65	100
24	45	92
48	16	37
72	8	18
96	0	0

Ce tableau montre que la congélation entraîne une diminution de la mobilité du sperme : la mobilité, des spermatozoïdes ayant été congelés, est inférieure à celle des spermatozoïdes contenus dans de la semence fraîche.

### 1.3.2 Centrifugation

On cherche en effet à concentrer au maximum les spermatozoïdes car un reflux peut survenir lorsqu'un trop grand volume est inséminé. Pour cela on aura déjà lors du prélèvement séparé les différentes phases de l'éjaculat afin de ne garder que la seconde phase : la phase épидидymaire (25).

La centrifugation se fait à **600 à 700 g pendant 5 à 10 minutes**. On enlève le surnageant et on garde le culot de spermatozoïdes (0,2 à 0,4 mL). La centrifugation permet **d'éliminer l'excès de fluide prostatique**. Sirivaidyapong *et al.* (46) ont en effet montré qu'un excès de fluide prostatique a un rôle délétère sur les spermatozoïdes après décongélation. On aura donc tout intérêt à séparer les phases lors du prélèvement et à centrifuger systématiquement la semence avant de procéder à sa dilution avant congélation.

### 1.3.3 Dilution

Il faut diluer la **semence, puis procéder à l'équilibration à 4°C pendant au moins une heure**. L'équilibration consiste à laisser pendant un certain temps les spermatozoïdes et le dilueur en présence afin de favoriser la pénétration du glycérol dans les cellules et ainsi de les protéger. Celle-ci s'effectue à basse température pour diminuer les processus métaboliques préjudiciables à une longue survie des spermatozoïdes et afin de minimiser la toxicité du glycérol qui augmenterait avec la température. (14).

On utilise en général du **glycérol** (4 à 7 % selon les techniques). Celui-ci assure une protection mécanique (diminution de la température de cristallisation, cristaux de glace plus ronds) et une protection biochimique (moins d'effet de déshydratation cellulaire en se concentrant dans la cellule et protection des membranes). Cependant ce cryoprotecteur est un peu toxique pour les spermatozoïdes et entraîne une diminution de la qualité du sperme.

On utilise également d'autres substances : **TRIS** (tampon ionique), le citrate (tampon pH), le glucose et le fructose (substrats énergétiques), des antibiotiques, parfois l' **Equex STM Paste** (SDS) (utilisé au CERCA), des protecteurs de membrane (permettant d'allonger la survie des spermatozoïdes après décongélation)(25).

Au CERCA, le protocole actuel utilise **2 étapes de dilution (25)**.

A température ambiante (22°C), on utilise l' UPPSALA EQUEX EXTENDER-1, fabriqué au CERCA, dont voici la composition :

**Tableau II** : Composition quantitative du diluant UPPSALA EQUEX EXTENDER-1, utilisé au CERCA.

<b>INGREDIENT</b>	<b>QUANTITE</b>
<b>TRIS</b>	<b>3,025 g</b>
<b>Acide citrique</b>	<b>1,7g</b>
<b>Fructose</b>	<b>1,25 g</b>
<b>Streptomycine</b>	<b>0,1g</b>
<b>Benzyl p.c</b>	<b>0,6 g</b>
<b>Glycérol</b>	<b>3 mL</b>
<b>Equex</b>	<b>0</b>
<b>Jaune d'oeuf</b>	<b>20 mL</b>
<b>Eau distillée qsp</b>	<b>77 mL</b>

La seconde dilution (composition du diluant ci-dessous) à lieu au minimum après 1 heure d'équilibration à 4°C.

**Tableau III** : Composition quantitative du diluant UPPSALA EQUEX EXTENDER-2, utilisé au CERCA.

<b>INGREDIENT</b>	<b>QUANTITE</b>
<b>TRIS</b>	<b>3,025 g</b>
<b>Acide citrique</b>	<b>1,7g</b>
<b>Fructose</b>	<b>1,25 g</b>
<b>Streptomycine</b>	<b>0,1g</b>
<b>Benzyl p.c</b>	<b>0,6 g</b>
<b>Glycérol</b>	<b>7 mL</b>
<b>Equex</b>	<b>1 mL</b>
<b>Jaune d'oeuf</b>	<b>20 mL</b>
<b>Eau distillée qsp</b>	<b>72 mL</b>

L'utilisation d'une dilution semble intéressante lors de la congélation de la semence. En effet, Linde-Forsberg *et al.* (27), Pena *et al.* (37) obtiennent de meilleurs taux de réussite en utilisant une semence dont le procédé de congélation inclut une dilution.

### 1.3.4 Conditionnement

Le conditionnement peut varier : **paillettes** de 0,25 à 0,5 mL, ou **des pellets**.

On rajoute de l'air dans les paillettes avant de les fermer afin qu'elles ne puissent éclater lors de la congélation.

D'après Nöthling (35), l'utilisation de paillettes de 0,5 mL au lieu de 0,25 mL permet d'avoir 5,7 % de spermatozoïdes mobiles en plus, 60 min après décongélation, et 6,5 % d'anomalies acrosomiales en moins.

### 1.3.5 Stockage et transport

La conservation se fait dans de l'azote liquide à -196°C

**Figure 1** : Conservation des paillettes dans un conteneur d' azote liquide.



Fontbonne A. ©

### 1.3.6 Concentration finale optimale

La concentration finale est souvent de 100 à 200 millions de spermatozoïdes par mL soit **50 à 100 millions par paillettes de 0,5 mL (33)**. D'après Pena *et al.* (37), les meilleurs résultats après décongélation sont obtenus pour des concentrations de 200 millions de spermatozoïdes par millilitre.

### 1.3.7 Conclusion

La congélation de la semence est responsable d'une **diminution de son pouvoir fécondant**. Chaque étape (centrifugation, dilution, conditionnement, stockage) doit être menée le plus rigoureusement possible afin de minimiser cette diminution.

## 1.4 Décongélation

**Figure 2** : Décongélation de la semence.



Fontbonne A. ©

*La décongélation a lieu suivant les cas dans un bain marie à 70°C ou 37°C*

#### 1.4.1 Température et temps de décongélation

Si on se réfère aux conclusions de Nöthling et Schuttleworth (35), la température idéale de décongélation est de 70°C pendant 8 secondes (paillettes de 0,5 mL), puisque le pourcentage de spermatozoïdes mobiles à cette température, 60 min après décongélation, est plus élevé qu'avec une décongélation à 37°C pendant 2 min.

Cependant, en pratique, il est beaucoup plus facile de plonger les paillettes dans de l'eau à 37°C, dans laquelle elles peuvent rester éventuellement plus longtemps, alors qu'une température de 70°C est rapidement létale si on laisse trop longtemps les paillettes à cette température.

**Les pellets** sont plongés dans 0,5 mL de soluté physiologique de NaCl ou de citrate à 37°C d'après Platz et Seager, (36).

#### 1.4.2 Dilution après décongélation

Une dilution après décongélation n'est pas obligatoire et systématique. Seulement, celle-ci permet de **diminuer les effets toxiques du glycérol et du SDS** (éventuellement ajouté lors de la dilution). Pena *et al.* (37) ont ainsi obtenu de bons résultats en diluant leurs paillettes de 0,5 mL à 100 millions de spermatozoïdes dans un milieu de décongélation (tampon à base de TRIS) avec un rapport de un pour quatre.

#### 1.4.3 Mise en œuvre de la décongélation lors d'une IAC

Au CERCA, la décongélation de la semence ne **sera mise en route que lorsque le col utérin est cathétérisé** et la sonde mise en place ( pour éviter de décongeler des paillettes qu'on ne parviendra pas à mettre dans l'utérus). Cette intervention préalable peut durer plusieurs minutes.

Les paillettes de 0,5 mL conservées dans l'azote liquide sont plongées dans l'eau d'un bain-marie (par exemple) à 37°C pendant 30 secondes.

Elles sont ensuite essuyées avec une feuille de papier buvard et leurs extrémités sectionnées, de façon à récupérer le sperme décongelé. Ce dernier est déposé dans un tube à hémolyse, sec, propre, sans trace d'antiseptique ou de détergent, placé au préalable dans un portoir de façon à tremper dans l'eau du bain-marie à 37°C.

On conseille d'inséminer chaque fois avec **un minimum de 150 millions de spermatozoïdes mobiles**. Chaque paillette contient au total 50 à 100 millions de spermatozoïdes (morts ou vivants); le pourcentage de spermatozoïdes mobiles doit être connu ou estimé, afin de déterminer le nombre de paillettes utiliser.

Celui-ci varie selon les chiens et les éjaculats. Il doit être supérieur à 50%, sinon il vaut mieux recourir à l'I.A. intra-utérine à la faveur d'une laparotomie. En effet cette technique permet d'utiliser du sperme congelé de mauvaise qualité avec des résultats convenables (45).

#### 1.4.4 Les effets de la fraction prostatique

Les effets de la fraction prostatique sont encore peu clairs et controversés.

Nous avons vu que la fraction prostatique avait une action néfaste sur la longévité des spermatozoïdes. (Cf. 1.3.2.)

Hori *et al.* (23) ont **prélevé des spermatozoïdes directement dans la queue de l'épididyme** pour réaliser des inséminations intra-utérine en semence congelée (les spermatozoïdes n'ont alors pas eu de contact avec la phase prostatique). Ils ont ensuite comparé leurs résultats de fertilité après ajout de la phase prostatique ou non. Ils ont alors montré que la sensibilisation des spermatozoïdes avec la phase prostatique augmentait de façon significative le pouvoir fertilisant de la semence (Les taux de réussite étant de 20 % sans sensibilisation et 80 % avec sensibilisation.)

On remarque donc ici que la **sensibilisation des spermatozoïdes par les sécrétions prostatiques lors de l'éjaculation augmente leur pouvoir fertilisant.**

Nizanski (31) ont **rajouté un peu de phase prostatique avant d'inséminer des chiennes en semence congelée.** Les taux de gestation, et la taille des portées étaient diminués lors de l'ajout de la phase prostatique (l'insémination avait été réalisée avec un cathéter Osiris® en intra vaginal).

L'intérêt de **l'ajout de la phase prostatique après décongélation n'est donc pas recommandé pour ces auteurs.**

#### 1.4.5 Conclusion

La décongélation est réalisée en routine à 37°C au bain-marie. La dilution après décongélation est recommandée pour la protection de spermatozoïdes.

La décongélation est une technique délicate **où chaque erreur de manipulation peut être à l'origine de la dégradation d'une semence parfois précieuse.**

### 1.5 Contrôle du sperme

Après la décongélation du sperme, sa mobilité est vérifiée au microscope sur une platine chauffée à 37°C et est utilisé immédiatement pour l'insémination d'une chienne.

Un **contrôle préliminaire (test de décongélation), suite à la congélation et avant le stockage**, est nécessaire afin de vérifier que la semence a bien **supporté la congélation**. On décongèle donc une paillette parmi l'ensemble des paillettes congelées avec un éjaculat, et on vérifie la mobilité du sperme après décongélation. Si celle-ci est trop faible, le sperme ne pourra pas être utilisé pour une insémination et il est inutile de conserver plus longtemps les paillettes restantes.

En général, **les centres ne gardent la semence que si le test est supérieur ou égal à 50 % de mobilité** après décongélation.

On peut ainsi avoir une prévision sur le nombre de spermatozoïdes qui seront vivants après décongélation et connaître le nombre d'I.A. possibles. Pour une IA, il faut 150 millions de spermatozoïdes mobiles.

## **2 DETERMINATION DU MOMENT OPTIMAL DE L'INSEMINATION ARTIFICIELLE EN SEMENCE CONGELEE CHEZ LA FEMELLE**

La survie du sperme après décongélation est courte de l'ordre de **12 à 24 h.** (9) Pour avoir des chances raisonnables de gestation, il faut suivre la chienne dès la fin du proœstrus, de manière à **déterminer précisément le moment de l'ovulation et d'inséminer au moment optimum.**

### **2.1 Rappels sur la physiologie du cycle sexuel de la chienne**

#### **2.1.1 Les différentes phases du cycle**

Le cycle sexuel de la femelle est divisé en **4 phases. Le proœstrus, l'œstrus, le metœstrus, et l'anœstrus.**

##### **2.1.1.1 Le proœstrus**

Il dure de 3 à 20 jours, **10 jours en moyenne (15).** Celui-ci est caractérisé par des **signes extérieurs de chaleurs sans acceptation du mâle.** La chienne attire les mâles.

Au cours de cette période, il y a une diapédèse des globules rouges à travers la muqueuse utérine, responsable des **saignements vulvaires.** Les cellules de l'épithélium vaginal se différencient et se chargent en kératine (**épaississement de l'épithélium vaginal**).

##### **2.1.1.2 L'œstrus**

Il dure de 1 à 10 jours (**7 jours en moyenne**) (15) et est caractérisé par **l'acceptation du mâle.** L'ovulation se produit à environ 2 jours après le pic de LH. Chez la chienne, les **ovocytes au moment de l'ovulation n'ont pas terminé leur méiose** et reprennent leur **maturation pendant environ 2 ou 3 jours avant de devenir fécondables (39).**

##### **2.1.1.3 La phase lutéale : metœstrus et diœstrus**

Elle dure environ **2 mois** et est caractérisée par l'installation et la sécrétion de progestérone par les **corps jaunes (15).**

##### **2.1.1.4 L'anœstrus**

C'est une phase de repos sexuel apparent qui dure de **3 à 9 mois (15).**

#### **2.1.2 Les hormones du cycle œstral**

Le cycle sexuel est sous contrôle hormonal. Cette régulation fait intervenir le système nerveux central, l'antéhypophyse et les gonades.

### 2.1.2.1 Les oestrogènes

Ce sont des hormones stéroïdes sécrétées par les follicules ovariens durant l'œstrus. Les oestrogènes sont responsables de la **congestion et de l'œdème de la vulve et du vagin ainsi que de l'hyperplasie de l'utérus**. Ils augmentent la **contractilité utérine qui favorise l'ouverture du col**. Ils sont aussi responsables de la **croissance de l'épithélium vaginal** accompagnée d'une kératinisation et d'une desquamation des cellules de la couche épithéliale superficielle.

Les oestrogènes sont responsables des **manifestations comportementales des chaleurs**.

Les sécrétions d'oestrogènes sont très augmentées 24 h avant le pic de LH.

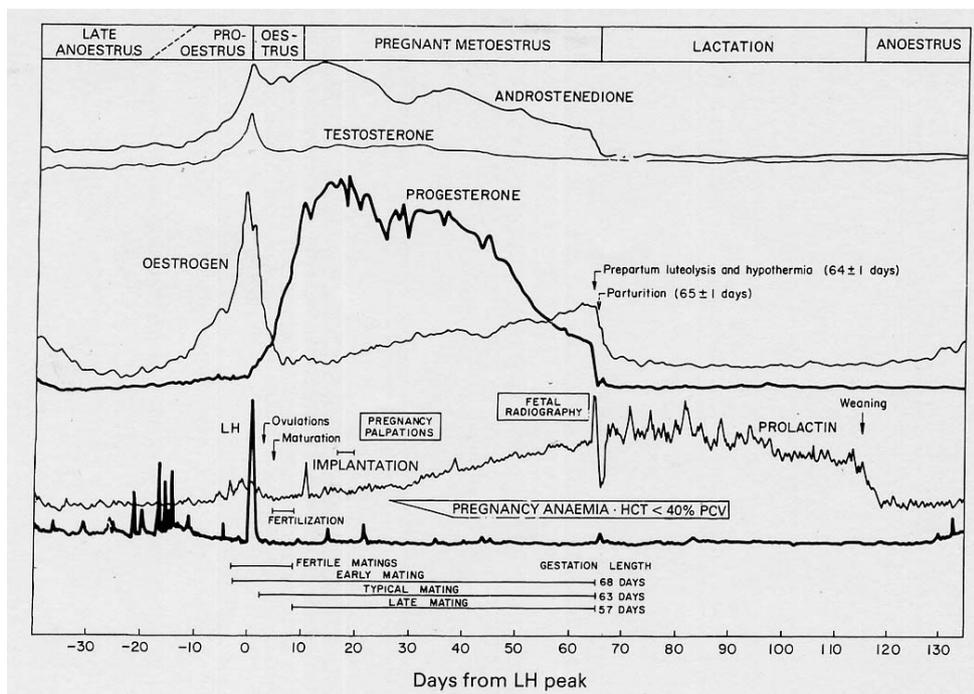
### 2.1.2.2 La progestérone

Elle est principalement **secrétée par les corps jaunes et plus faiblement par les follicules ovariens**.

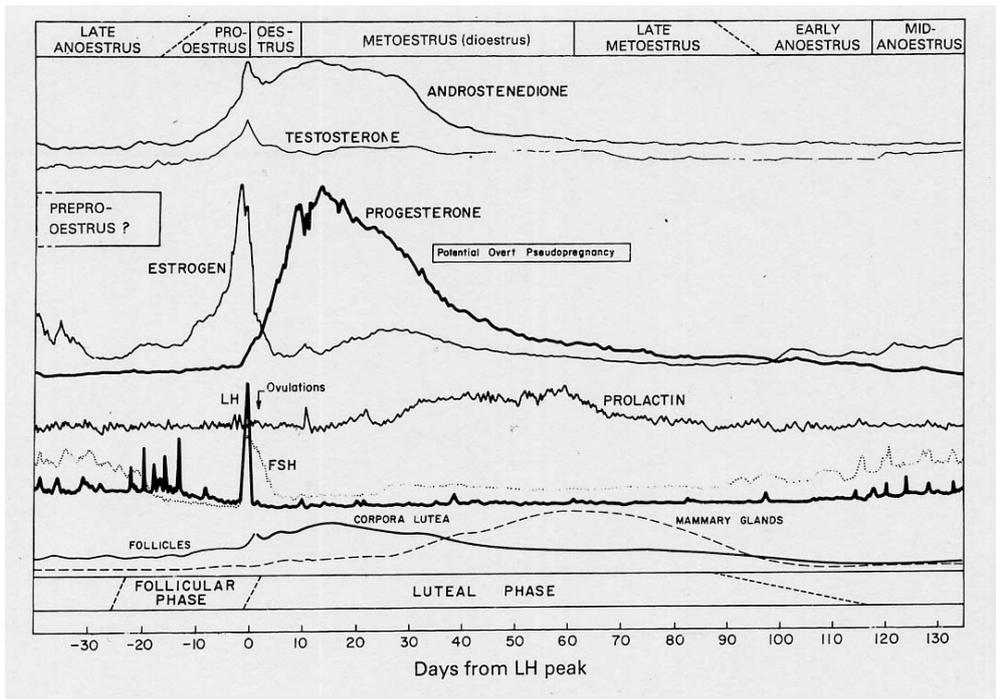
La **lutéinisation pré-ovulatoire** est une particularité propre à la chienne. La sécrétion de progestérone débute quelques jours avant l'ovulation. Puis au bout de 40 jours, la progestéronémie décline progressivement jusqu'à un taux basal avec une chute brutale 24 à 48 heures avant la mise bas.

### 2.1.2.3 Schémas récapitulatifs des variations hormonales au cours du cycle œstral de la chienne

**Figure 3** : Schémas récapitulatifs des variations hormonales au cours du cycle œstral de la chienne (15).



*Profils hormonaux d'une chienne gestante.*



*Profils hormonaux d'une chienne non gestante.*

*On remarque qu'il n'existe pas de différence significative du taux hormonal de progestérone d'une chienne gestante par rapport à une chienne non gestante.*

## 2.2 Méthode de détermination de la date d'ovulation

### 2.2.1 Les signes extérieurs de chaleurs

Pendant l'oestrus, en parallèle avec la diminution du taux d'œstrogènes, on observe un **ramollissement vulvaire**.

Les **saignements vulvaires** peuvent aussi donner quelques indices. En effet, pendant le proœstrus, les saignements sont généralement assez abondants puis diminuent au moment de l'oestrus. En fin de chaleurs, ils peuvent redevenir abondants.

**Figure 4** : Intensité des saignements vulvaires du début à la fin des chaleurs, détectée indirectement grâce à l'aspect du coton des écouvillons, ayant servi à réaliser les frottis vaginaux. Fontbonne A. ©



**L'aspect de l'écouvillon** peut apporter une indication rapide ; de gauche à droite :

- Ecouvillon **rose ou rouge** : la chienne est vraisemblablement en chaleur, probablement en **prœstrus**.
- Ecouvillon **marron "sale"** : la chienne entre probablement en **metœstrus**.
- Ecouvillon **très propre** : la chienne peut être en œstrus comme en **anœstrus**.

## 2.2.2 Observation des signes comportementaux

### 2.2.2.1 Acceptation du mâle par la femelle

C'est un **signe très fruste**. En effet, celle-ci peut se produire aussi précocement que 3 jours avant l'ovulation, aussi tardivement que 5 jours après l'ovulation (26). L'acceptation du mâle n'est donc pas un bon critère de détection du moment optimal d'insémination.

### 2.2.2.2 Acceptation de la femelle par le mâle

Certains mâles semblent pouvoir détecter les femelles qui sont dans leur période fertile. Cependant ce critère est très approximatif et non fiable.

## 2.2.3 Frottis vaginaux et cytologie vaginale

Au cours des chaleurs, **l'épithélium vaginal se modifie sous l'influence des sécrétions d'œstrogènes**.

### 2.2.3.1 Réalisation du frottis vaginal

- **Prélèvement.**

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

**Figure 5 : Réalisation d'un écouvillon vaginal.**



Fontbonne A. ©

- **Étalement**

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

- **Fixation et coloration**

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

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

### 2.2.3.2 Lecture du frottis vaginal

L'observation microscopique se réalise en deux temps.

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

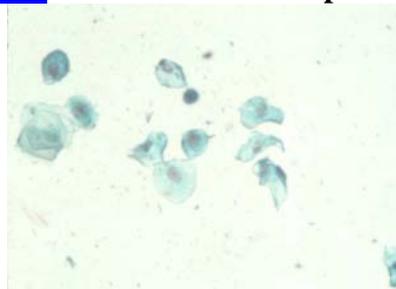
Au **grossissement**  $\times 400$ , on identifie les **cellules observées** (couleur, taille, forme, aspect du noyau).

- **Les différents types de cellules observées sur frottis vaginal**

- **Les cellules parabasales**

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

**Figure 6** : Frottis de cellules parabasales.

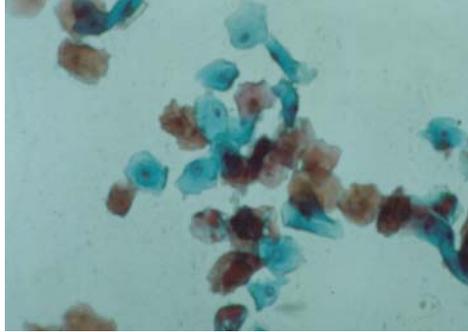


Fontbonne A. ©

- **Les cellules intermédiaires**

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

**Figure 7 : Frottis de cellules intermédiaires.**

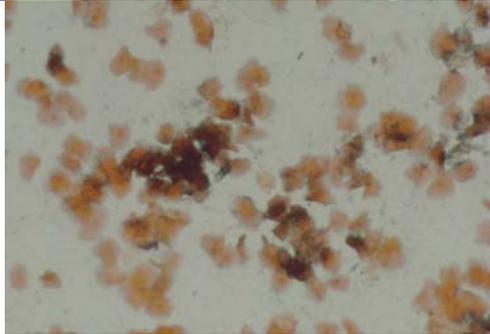


Fontbonne A. ©

○ **Les cellules superficielles**

De **contours irréguliers et de coloration acidophile**, ces cellules sont les plus grandes de l'épithélium vaginal. Le noyau n'est plus visible.

**Figure 8 : Frottis de cellules superficielles.**



Fontbonne A. ©

○ **Les hématies**

Elles sont visibles sur le frottis pendant les chaleurs. Leur quantité est plus importante au début des chaleurs

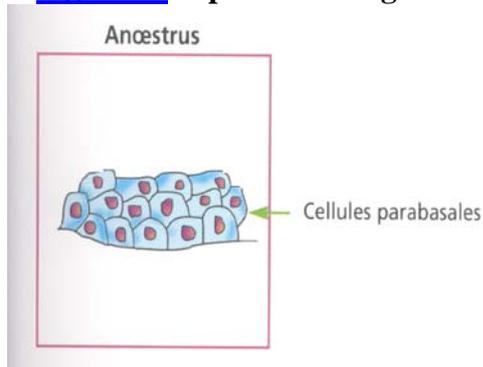
○ **Les leucocytes**

Ils sont visibles en début de métoestrus.

➤ **Modification de la cytologie vaginale au cours du cycle sexuel**

**Anœstrus** : *Cellules parabasales*. Les cellules sont **peu différenciées**, elles sont **peu nombreuses**.

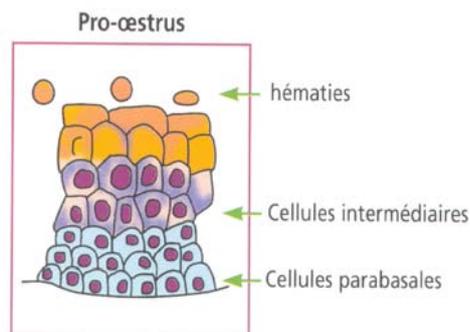
**Figure 9** : Epithélium vaginal lors de l' anœstrus.



Fontbonne A. ©

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

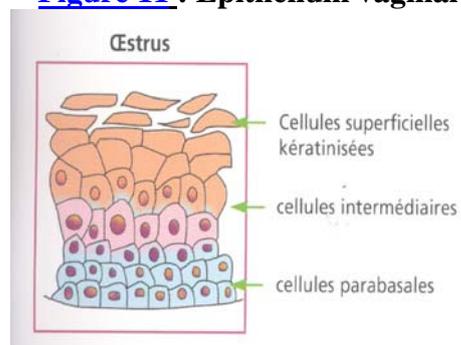
**Figure 10** : Epithélium vaginal lors du prœstrus.



Fontbonne A. ©

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

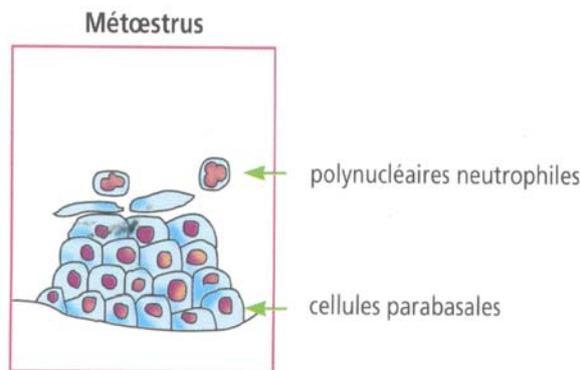
**Figure 11** : Epithélium vaginal lors de oestrus.



Fontbonne A. ©

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

**Figure 12 : Epithélium vaginal lors du métoestrus.**



Fontbonne A. ©

#### 2.2.4 Intérêts et limites des frottis vaginaux

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

#### 2.2.5 Taux hormonaux

##### 2.2.5.1 Evolution de la progestéronémie au cours du cycle sexuel

Le taux plasmatique de la progestérone en période pré-ovulatoire passe de moins 1 ng/mL à une valeur comprise entre 1 et 2,5 ng/mL (17). Cette **première augmentation correspondrait au pic pré-ovulatoire de LH**.

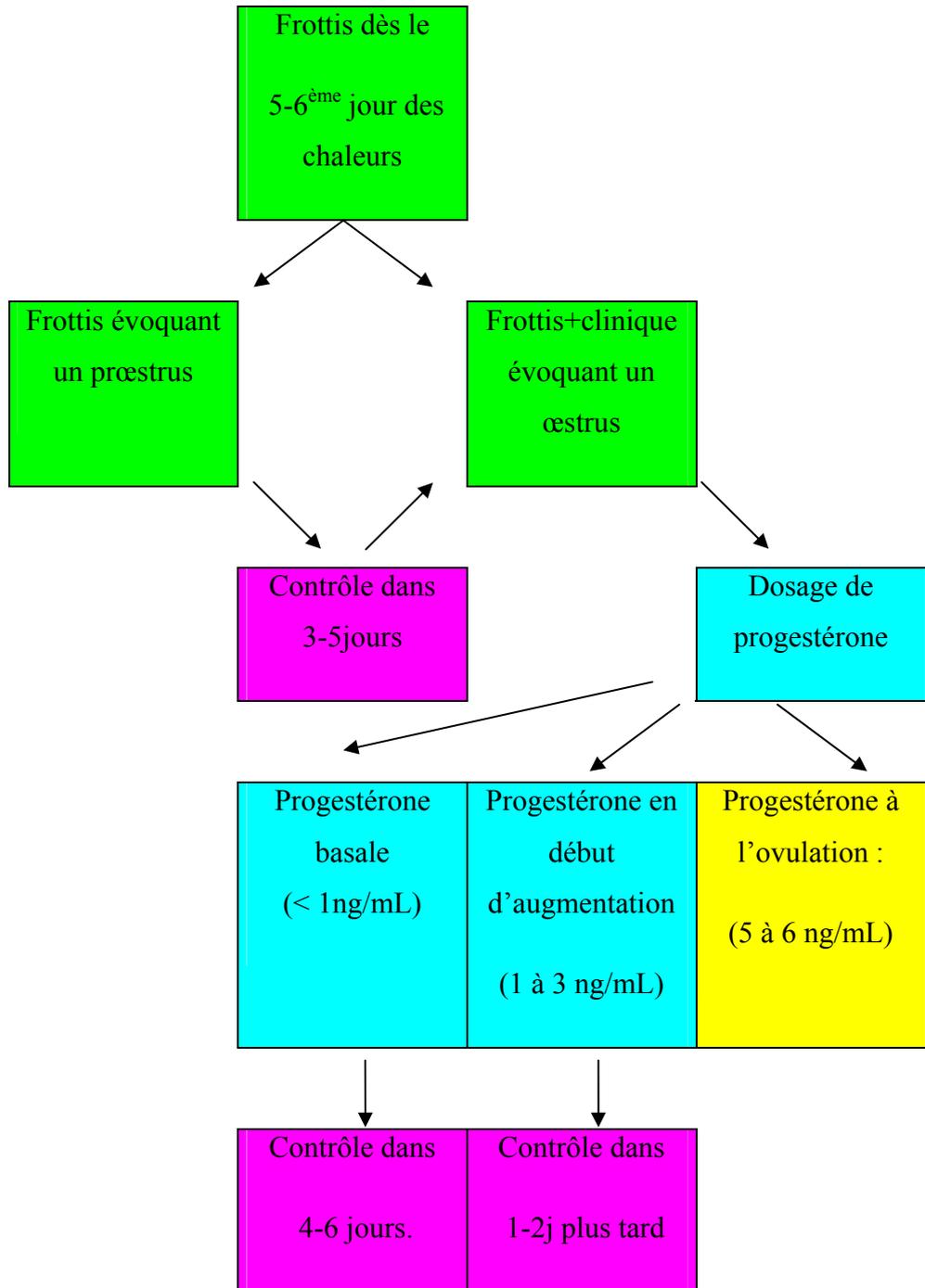
La progestéronémie atteint 2 ng/mL dans les 24 heures qui suivent le pic de LH. On sait que l'ovulation a lieu environ 48 h après le pic de LH mais cependant on ne peut pas arrêter les dosages à ce moment là car la progestéronémie n'est pas vraiment un moyen fiable pour détecter le pic de LH.

Dans l'état actuel des connaissances, il est impossible de dire qu'une chienne est fécondable pour un taux précis de progestérone. **Par contre la valeur de la progestéronémie à l'ovulation est assez constante** (autour de 5 à 6 ng/mL) (28). On se réfère donc au moment de l'ovulation et on attend un minimum de 48 heures pour inséminer.

Après ovulation le taux de progestérone continue d'augmenter. Une valeur de 15 nanogrammes par mL semble suffisante pour maintenir une gestation.

En pratique, il est donc intéressant de combiner les frottis vaginaux et les dosages de progestérone. On commence par contrôler la chienne par frottis vaginal dès le 5-6<sup>ème</sup> jour des chaleurs. (Cf. figure 13 ci-dessous).

**Figure 13** : Conduite à tenir lors d'un suivi de chaleur (15).



### 2.2.5.2 Méthodes de dosage

#### ➤ Méthode semi-quantitative par seuil

Cette méthode fait appel à **des kits ELISA** (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). On obtient le résultat en quelques dizaines de minutes. C'est la méthode souvent utilisée dans les cliniques vétérinaires. On obtient une information qualitative ou **semi quantitative**. Cependant ces tests ne permettent pas d'avoir une information précise sur le taux exact de progestérone.

#### ➤ Méthode quantitative

Cette méthode fait intervenir des tests radioimmunologiques. La valeur de la progestéronémie prise comme témoin de l'ovulation est estimée à 5,44 ng/mL (20). Cette méthode est plus **fiable** mais nécessite d'étalonner d'abord son laboratoire ou de posséder sa propre machine à progestérone (coûteuse). Pour étalonner son laboratoire, il faut envoyer en même temps les prises de sang au laboratoire de référence et au laboratoire à tester.

### 2.2.6 Résistivité du mucus vaginal

La conductance du mucus évolue au cours du cycle, seulement il existe des **variations importantes de la conductance lors de sa mesure**. L'idéal est de faire mesurer la conductance du mucus vaginal à la **même heure, au même endroit par le même manipulateur**. De plus l'utilisation de la même sonde pour toutes les chiennes favorise la **transmission des maladies**.

### 2.2.7 Relation avec le pic de LH (Luteinising Hormone)

Le **dosage de la concentration plasmatique de LH apparaît comme le meilleur indicateur de l'ovulation** selon Wright (55). **L'ovulation se situe en moyenne 48 heures après le pic de LH**.

Seulement cette **méthode est très astreignante** et nécessite un minimum de 2 prises de sang par jour très tôt dans le cycle. De plus ce dosage très spécifique est peu disponible et coûteux. C'est pourquoi le dosage de la progestérone émis est utilisé comme indicateur de l'ovulation.

Si on se base sur la survenue du pic de LH, la période optimale d'insémination se situe approximativement le 4<sup>ème</sup> jour après le pic d'après Shimasu *et al.* (44).

### 2.2.8 L'échographie ovarienne

L'échographie ovarienne nécessite l'utilisation d'échographes perfectionnés (avec des sondes de 7,5 à 12 MHz). Elle demande une **technicité importante** de la part de l'échographe et surtout, n'est réalisable que sous la forme **d'un suivi échographique et d'exams rapprochés**. Le jour de l'ovulation peut ainsi être déterminé de manière précise mais nécessite un suivi journalier par échographie (28). En effet l'aspect d'un follicule pré-ovulatoire est très proche d'un corps jaune en début d'évolution, d'où la nécessité d'échographier tous les jours.

**Figure 14** : Technique d'échographie ovarienne Fontbonne A. ©.



Les ovaires sont situés en position sous lombaire au niveau de la 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> apophyse transverse lombaire, en regard du pôle crânial du rein (l'ovaire droit étant plus crânial que le gauche) et en contact avec la paroi abdominale. Les ovaires sont donc très superficiels.

En **anœstrus** les ovaires sont **difficiles à observer**.

**Au début des chaleurs** apparaissent de **petits follicules de 2 à 3 mm (8)**. Cf. figure 15 ci-dessous).

**Figure 15** : Ovaire en præstrus. Fontbonne A. ©

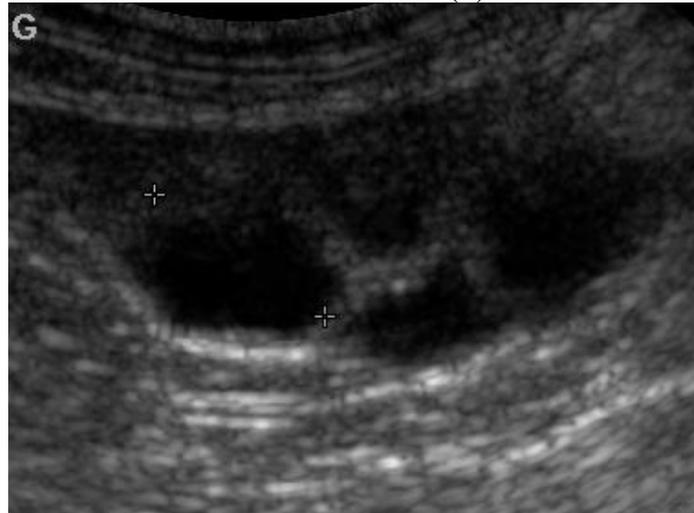
*Les structures folliculaires ne sont pas encore bien délimitées et ont un aspect flou.*



En **période pré-ovulatoire**, la paroi de l'ovaire est très fine et les follicules sont de grande taille environ 5 mm (8). (cf.figure 16 ci-dessous)

**Figure 16** : Ovaire en période pré-ovulatoire. *Fontbonne A. ©*

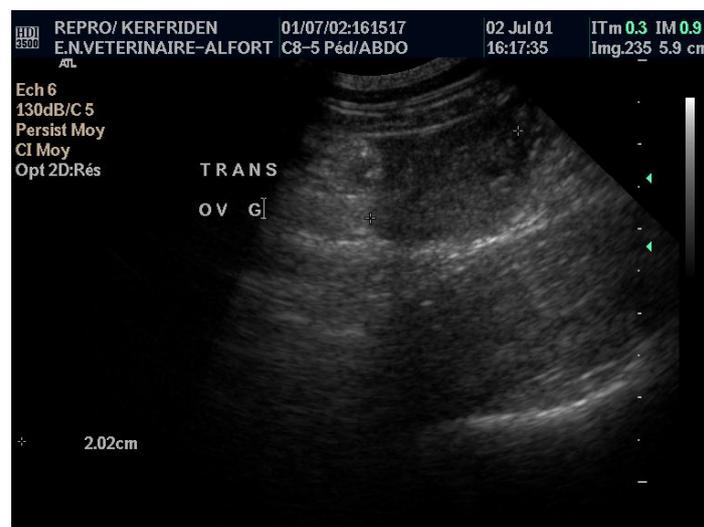
La paroi, très fine, donne une image à l'échographie appelée en « **nid d'abeille** » (en rapport à la ressemblance avec les alvéoles fabriquées dans la ruche, les follicules sont de grandes tailles : 6 à 9 mm (8).



Lorsque l'**ovulation a eu lieu**, on remarque la disparition de certaines cavités folliculaires. Le plus fréquemment, tous les follicules n'ovulent pas. Parfois on observe la **présence de liquide intra folliculaire entre l'ovaire et la bourse ovarique**. On est alors très proche de l'ovulation. (cf.figure 17 ci-dessous)

**Figure 17** : Ovaire post-ovulation : disparition des follicules. *Fontbonne A. ©*

*Les follicules ont libéré les ovocytes et ne sont donc plus visibles.*



**Après ovulation, les corps jaunes sont visibles** (paroi un peu plus épaisse).

L'échographie ovarienne est **très intéressante pour détecter avec précision la date d'ovulation** lors d'insémination en semence congelée (8).

### 2.2.9 Endoscopie vaginale

L'examen par endoscopie permet d'observer **l'aspect de la muqueuse vaginale au cours du cycle**.

**Figure 18** : Appareil d'endoscopie vaginale. *Fontbonne A.* ©



En effet les contours, les sécrétions présentes, et la couleur de la muqueuse sont modifiés au cours du cycle.

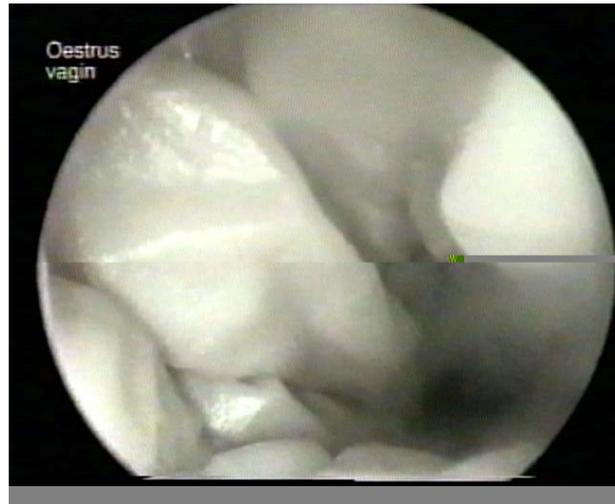
- **En anœstrus** cette méthode est déconseillée. En effet, la **muqueuse** est alors **fragile** et friable et facilement traumatisable par l'endoscope. Celle-ci est alors rose et lisse.
- **Lors du præstrus**, la muqueuse est **œdématisée, rose, recouverte de sérosité et de sang**. La lumière du vagin est réduite. (cf.figure 19 ci-dessous)

**Figure 19** : Muqueuse vaginale lors du præstrus vue par endoscopie. *Fontbonne A.* ©



- **œstrus** : La muqueuse est rosée, plissée (**plis profonds**) et la lumière vaginale est nette. (cf.figure 20 ci-dessous)

**Figure 20** : Muqueuse vaginale lors de l'œstrus vue par endoscopie. *Fontbonne A.* ©



- **Metœstrus** : la muqueuse est rose et peu plissée.

En reproduction, l'endoscopie vaginale est très **intéressante dans le suivi de chaleur et l'insémination**. Elle permet **l'observation des plis vaginaux et une insémination intra-utérine plus aisée**. En effet, elle permet de visualiser directement l'ostium lors de l'insémination et est une méthode plus facile à maîtriser.

En projetant l'image de l'endoscope sur un écran, le propriétaire peut vérifier par lui-même nos manipulations.

Cette technique permet de donner des indications sur le déroulement des chaleurs mais ne donne pas une évaluation précise du moment de l'ovulation.

### **2.2.10 Conclusion**

Lors d'insémination artificielle en semence congelée, la **détection très précise de la date d'ovulation est primordiale pour la réussite de l'IAC**. En effet, les spermatozoïdes congelés, ont une durée de vie dans les voies génitales femelles limitée (9): **la période optimale d'insémination est donc plus courte**. L'idéal est d'associer plusieurs techniques de détection de l'ovulation. **Le contrôle direct de l'ovulation par échographie associé à des dosages de progestérone est une méthode à préconiser lors d'insémination en semence congelée**.

### 3 MISE EN PLACE DE LA SEMENCE LORS D'INSEMINATION ARTIFICIELLE EN SEMENCE CONGEELEE

#### 3.1 Choix du moment de l'insémination artificielle

La conduite à tenir concernant ce point n'est pas encore très claire, et le moment d'insémination diffère selon les auteurs.

##### 3.1.1 Rappel sur la physiologie des gamètes

- **Le gamète mâle**

Une fois déposés dans les voies génitales femelles, les spermatozoïdes vont mettre 20 minutes pour atteindre l'oviducte, lieu de la fécondation. Ils vont alors subir une maturation (capacitation) qui nécessiterait environ 7 heures d'après Van Haaften (52). Cette maturation est nécessaire à la pénétration dans l'ovule.

**Lorsque la semence a été congelée, la durée de vie des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles est réduite entre 12 et 24 heures (9).**

- **Le gamète femelle**

Les ovocytes primaires, forme immature, sont expulsés de l'ovaire 24 à 48 heures après le pic de LH. **La maturation nécessaire à la fécondabilité, requiert un minimum de 36 à 48 heures.** Les ovocytes restent fécondables pendant 24 à 192 heures d'après Tsutsui (51).

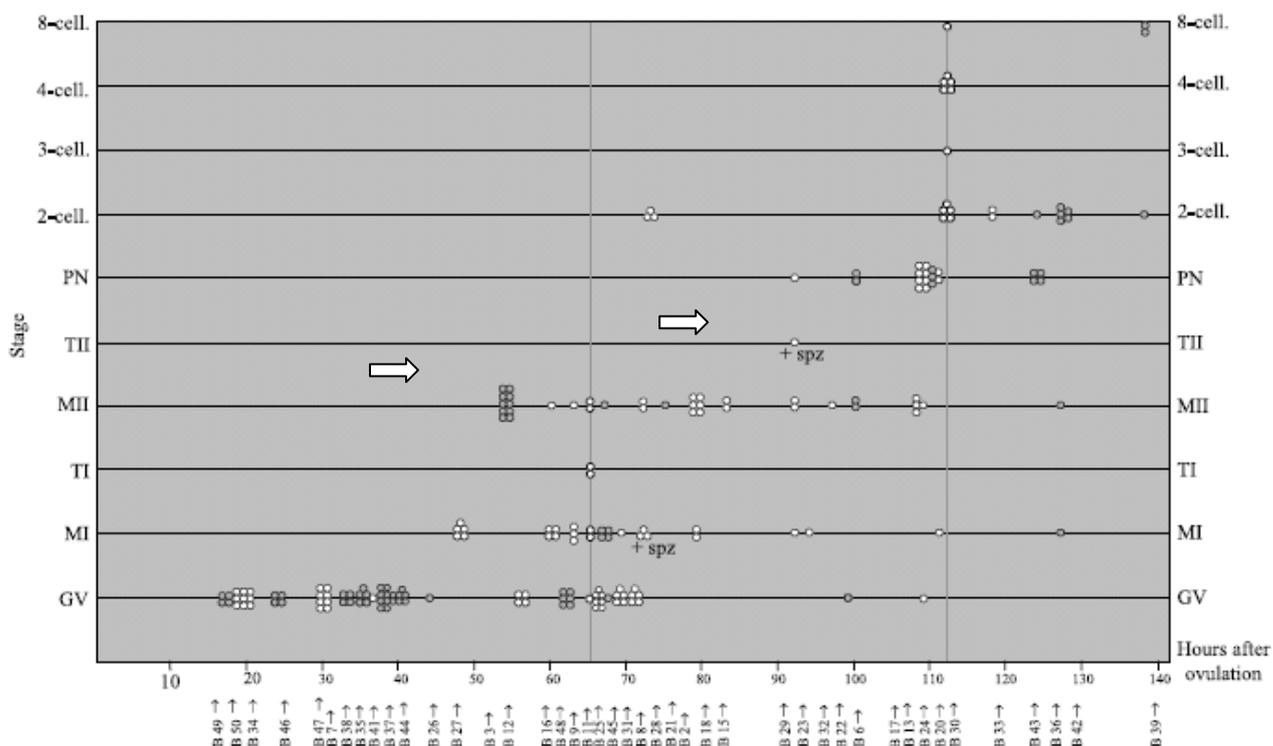
##### 3.1.2 Période optimale de fertilité

En sperme congelé, il faut inséminer lorsque les ovocytes sont fécondables c'est-à-dire au minimum **48 h après l'ovulation** et renouveler 24 h plus tard. Les interventions trop précoces ou trop tardives se soldent par des échecs ou la naissance d'une portée réduite (34).

D'après Concannon *et al.* (9), le pic de fertilité est obtenu lorsque les IAC sont réalisées 4 à 5 jours après le pic de LH, c'est-à-dire 2 à 3 jours après l'ovulation.

Reynaud *et al.* (39), grâce à des études de la maturation ovocytaire in vivo chez la chienne, observe sa première métaphase II 54 heures après ovulation et la première fécondation 90 h après ovulation (cf.figure 21 ci-dessous).

**Figure 21:** Maturation et fécondation des ovocytes *in vivo* par rapport à la date d'ovulation. (Réalisation d'ovariectomie sur des chiennes de 17 h à 138 h après ovulation, les ovocytes sont collectés et observés au microscope).



Dans cette étude récente, l'observation d'un ovocyte en métaphase II (fécondable) à lieu au plus tôt 54 heures après ovulation. (39). Cela semble indiquer que l'IAC devrait être réalisée bien au-delà de 48 h après l'ovulation.

De même, Tsumagari *et al.* (50), obtiennent de bon résultats lors d'inséminations 5 à 7 jours après le pic de LH (80% de réussite 16/20 chiennes).

### 3.2 Technique d'insémination

L'insémination **intra-utérine** est vivement recommandée (9,18).

Le site d'insémination est en effet très important. L'insémination en semence congelée dans le vagin donne de moins bons résultats. Fontbonne et Badinand (18) obtiennent une fertilité de 73,6 % et une taille de portée de 5,5 chiots en déposant la semence dans l'utérus contre 52,6% de fertilité et une taille de portée de 4,2 chiots en la déposant dans le vagin.

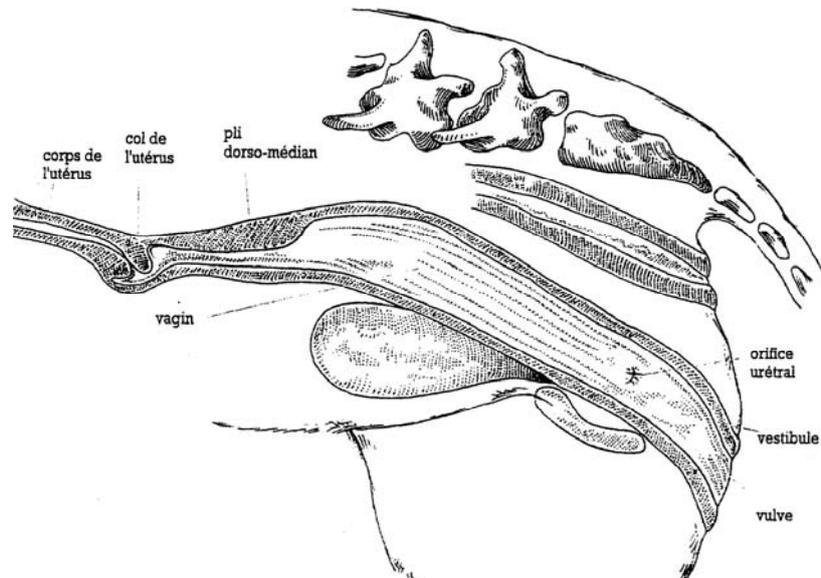
#### 3.2.1 Anatomie du tractus génital femelle

La chienne a un appareil génital localisé en région pelvienne, mais également très largement, dans la cavité abdominale puisque les ovaires ne se déplacent pas caudalement dans cette espèce et restent positionnés en regard du pôle caudal des reins. La disposition de cet appareil

génital présente quelques particularités anatomiques que le praticien devra connaître afin d'appréhender sans problème l'insémination artificielle intra-utérine en sperme congelé.

**Figure 22** : Anatomie de la partie terminale du tractus génital femelle. Guérin et al. (20).

©



### 3.2.1.1 Le vagin

Le **vagin** est très long dans cette espèce (12 à 15 cm chez des sujets de taille moyenne) et sa lumière se rétrécit vers le col de l'utérus. Il se caractérise par un **vestibule long** (5 à 6 cm) dont l'**orientation oblique vers le haut et vers l'avant**, tranche nettement avec le reste du vagin, beaucoup plus horizontal. Le dénivelé entre la commissure est en effet très nettement en dessous du niveau de la symphyse pelvienne, alors que le col est situé dorsalement à cette dernière. Cette dénivellation devra être prise en compte lors de la mise en place de la sonde d'insémination, mais en général, ce n'est pas un problème pour le praticien. La paroi du vagin est facilement mobilisable en raison de nombreux plis longitudinaux.

### 3.2.1.2 L'utérus

Chez la chienne, l'utérus est divisé en deux cornes longues et étroites. Chez un animal de taille moyenne, les cornes mesurent chacune environ 12 à 15 cm pour un peu moins d'un centimètre de large. Elles se positionnent totalement en région abdominale.

**Le col et le corps de l'utérus restent un obstacle majeur à franchir lors de l'insémination** intra-utérine en semence congelée. Le col est très court (environ 2 cm de long). Le col est situé en regard du détroit antérieur du bassin. L'ostium donnant accès au canal cervical est entouré de franges qui s'engrangent les unes aux autres, limitant l'accès au col. La disposition particulière du col implique donc au praticien désireux de cathétériser celui-ci de « repérer » l'ostium. Après avoir introduit la sonde jusqu'au cul de sac ventral du fornix, il faudra la

retirer de quelques millimètres, en prenant soin de la garder dans le plan médian et en appliquant une force verticale vers le haut afin de pénétrer l'orifice. Le canal cervical est ensuite facile à traverser et le corps est court, de sorte qu'il est simple d'atteindre la bifurcation des cornes utérines afin d'y déposer le sperme au niveau des cornes de l'utérus. La connaissance anatomique précise de cette région du col de l'utérus est indispensable afin de réaliser des inséminations artificielles dans de bonnes conditions chez la chienne.

### 3.2.2 Méthode par cathétérisme ou technique norvégienne d'Andersen

Cette technique nécessite un **matériel simple** (spéculum en plastique et sonde métallique pour cathétériser l'utérus). Cependant elle demande une **certaine dextérité**.

**Figure 23** : Matériel utilisé pour le cathétérisme utérin. Fontbonne A. ©



#### 3.2.2.1 Contention de la chienne

Le cathétérisme de la chienne nécessite une **contention du col par voie transabdominale** à l'aide d'une main et l'introduction de la sonde par les voies génitales avec l'autre main (Cf. figure 24).

Il faut donc intervenir sur une chienne debout sur une table étroite, accessible de tous côtés.

La tête est tenue (muselière si nécessaire) par le propriétaire de l'animal.

La chienne reçoit **si nécessaire 0,2 mg à 0,4 mg/kg de xylazine**. La sédation dure en moyenne, respectivement 24 à 35 minutes. La posologie la plus élevée est adoptée chez les animaux nerveux, inquiets ou excités. La xylazine serait cependant déconseillé selon certains auteurs puisqu'il a une **action sur les contractions vaginales**. (Buff, communications personnelles).

#### 3.2.2.2 Cathétérisme du col utérin

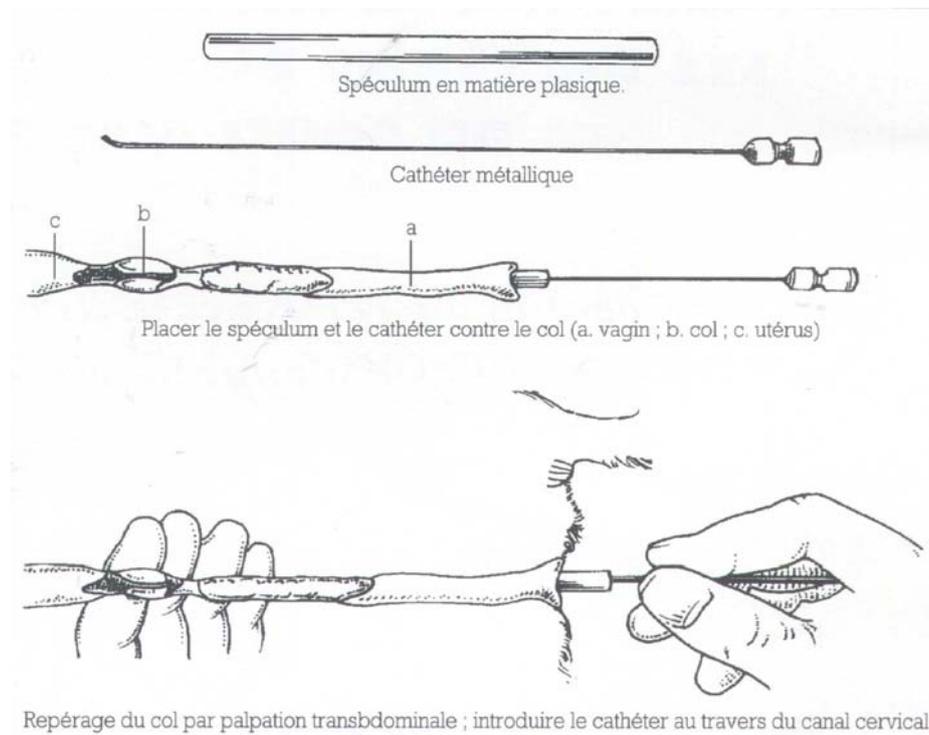
En quelques secondes, la paroi abdominale est relâchée et le col est palpable en avant du bord antérieur du pubis (éventuellement l'introduction par la vulve, jusqu'au fond du vagin, d'une grosse sonde en plastique à bout rond, permet de mieux localiser le col).

L'opérateur étant placé à gauche de la chienne, le col est saisi entre le pouce opposé aux autres doigts, paume de la main gauche au contact de la ligne blanche. On effectue une rotation du conduit de vertical à horizontal.

La contention du col d'une seule main par la voie transabdominale est impossible chez les chiennes de très grande taille (40-60 kg) ou à paroi abdominale très ferme comme certains

Bouledogues anglais. L'alternative est alors l'insémination intra-utérine à la faveur d'une laparotomie sous anesthésie.

**Figure 24 : Méthode de cathétérisme utérin.** Fontbonne A. ©



Dans la plupart des cas, l'insémination par voie cervicale est possible. L'opérateur se déplace en arrière de l'animal et choisit une sonde en fonction de la taille de l'animal. Le col est immobilisé avec les doigts de la main gauche.

Le guide en plastique à extrémité arrondie est introduit par la vulve de bas en haut, crânialement, puis horizontalement dès que l'extrémité arrive sur le bassin et le plus profondément possible jusqu'à ce qu'elle butte contre le col.

L'extrémité de la sonde est poussée vers le bas dans la portion ventrale du fornix, puis retirée doucement en exerçant une pression vers le bas avec la main droite de façon à ce que l'extrémité distale de la sonde frotte contre le col pour découvrir l'ostium. Le col est alors cathétérisé et l'extrémité de la sonde se retrouve dans le corps de l'utérus.

### 3.2.2.3 Mise en place de la semence

Le sperme est injecté doucement dans l'embout distal de la sonde d'insémination. Un millilitre d'air a été préalablement aspiré dans la seringue et sera ensuite poussé dans la sonde pour chasser tous les spermatozoïdes dans la lumière du corps de l'utérus.

### 3.2.2.4 Echec du cathétérisme cervical

Il est pratiquement impossible d'immobiliser le col par voie transabdominale chez les chiennes trop grasses, trop musclées ou appartenant aux races géantes.

L'orifice cervical est parfois trop petit pour être cathétérisé chez les femelles de races naines.

Dans ces cas, on pourra recourir à une insémination artificielle intra-utérine à la faveur d'une **laparotomie sous anesthésie générale**. Cette technique plus onéreuse **reste limitée aux cas d'infertilité liés à des mauvaises qualités de semence**. **L'insémination sous endoscopie peut aussi être une alternative.**

### 3.2.2.5 Avantages et inconvénients de la technique par cathétérisme

Cette méthode peut être **réalisée sans anesthésie**. Le coût pour le client est moindre. On peut se permettre de réaliser plusieurs inséminations. De **bons taux de réussite** ont été rapportés par Fontbonne et Badinand(18).

Cependant cette méthode demande une **certaine dextérité** de l'inséminateur et peut être potentiellement dangereuse pour la chienne car le cathéter mal positionné peut traumatiser le vagin.

### 3.2.3 Méthode par laparotomie

La méthode chirurgicale nécessite une anesthésie de 20 minutes environ. L'injection de barbituriques ou l'inhalation de gaz anesthésiant précédée d'une prémédication à l'atropine peut être utilisée. Une incision de 5 cm est réalisée à mi-chemin entre l'ombilic et la région inguinale. Quand le chirurgien commence l'incision, un assistant commence à décongeler la semence. L'utérus est extériorisé. La semence est aspirée à l'aide d'une seringue puis injectée dans l'utérus. On utilise un cathéter plutôt qu'une aiguille lors de l'injection : en effet, en poussant la partie plastique du cathéter on peut vérifier qu'on se trouve bien dans la lumière de l'utérus.

Celui-ci est ensuite réintroduit dans l'abdomen et la paroi suturée de manière classique.

Cependant la date d'ovulation doit être déterminée de manière très précise puisqu'il n'est pas possible de réaliser plusieurs inséminations. **Le coût est élevé et il existe un risque anesthésique pour la chienne**. Il se pose alors un problème éthique sur le bien fondé de cette technique. Cette méthode est d'ailleurs interdite en Grande Bretagne par exemple. Celle-ci est très utilisée aux Etats-Unis (lors de commande de semence dans ce pays, il faut d'ailleurs bien spécifier la dose de spermatozoïdes demandée). En effet par insémination chirurgicale, on utilise 50 à 80 millions de spermatozoïdes. Cette méthode permet donc d'inséminer plus de chiennes à partir d'un seul éjaculat ou bien **d'utiliser de la semence de mauvaise qualité**.

### 3.2.4 Méthode par endoscopie vaginale

Cette méthode permet la visualisation du vagin à l'aide d'un endoscope. On utilise un cathéter urinaire qui est introduit dans l'ostium. La sédation est parfois nécessaire ainsi que l'insufflation d'air dans le vagin. La chienne est debout et droite. On fait passer précautionneusement l'endoscope le long des parois du vagin. Le cathéter urinaire est alors passé à travers l'ostium en faisant tourner la sonde. Le cathéter est avancé aussi loin que possible sans forcer. Et la semence est alors déposée.

Cette technique est très intéressante. Elle ne se fait pas en aveugle, permet de **minimiser les traumatismes des voies génitales**, et plusieurs inséminations peuvent être réalisées dans le même cycle. Dans une étude de Wilson (54), 32 des 40 chiennes inséminées en semence congelée par cette technique étaient gestantes.

C'est une technique d'avenir. **Le propriétaire peut voir de lui-même le passage de la sonde dans l'utérus** (cf. figure 25). La sonde urétérale longue permet de déposer la semence très loin dans les cornes. Cependant le **coût du matériel est important**.

**Figure 25:** Passage de la sonde urinaire dans l'ostium utérin (Fontbonne A. ©)



### 3.2.5 Tranquillisation

L'utilisation de la xylazine pour tranquilliser la chienne à inséminer est une pratique qui pourrait influencer de façon négative le taux de gestation en diminuant les contractions vaginales et utérines (21). Dans les cas d'insémination intra-utérine, elle est **parfois indiquée** car le **dépôt de la semence par cathétérisme du col utérin nécessite une bonne immobilisation de la chienne inséminée.**

### 3.2.6 Conclusion

L'insémination artificielle en semence congelée chez la chienne s'avère être une technique délicate à mettre en œuvre, en raison notamment de la **nécessité de passer à travers le col de l'utérus.**

La connaissance de l'anatomie de cette région et la maîtrise du protocole expérimental permettent cependant d'obtenir de bons résultats.

## 3.3 Résultats

### 3.3.1 Fertilité

Les taux de fertilité en semence congelée sont inférieurs aux taux de réussite obtenus avec l'insémination artificielle en semence fraîche . **En effet, la semence a été altérée par la congélation**, les spermatozoïdes décongelés conservent leur pouvoir fécondant durant 24 heures au plus, contre 5 ou 6 jours pour le sperme frais. La définition du moment de l'insémination artificielle, doit correspondre exactement à celui où les ovocytes sont mûrs et fécondables.

Thomassen *et al.* (49) sur une étude rétrospective sur 526 chiennes entre 1994 et 2003 ont un taux de réussite de 73,1 %.

### 3.3.2 Prolificité

La différence des résultats entre les inséminations en sperme congelé et en sperme frais se manifeste également sur la prolificité. L'équipe suédoise, après comparaison race par race, indique **une baisse de 23 à 30 p.100 de la prolificité (27).**

### 3.4 Réglementation de l'insémination artificielle

L'insémination est régie par le Code Rural, dans le cadre de la loi sur l'élevage et la réglementation de la « monte publique », pour toutes les espèces.

En France, **la collecte de la semence, l'insémination artificielle en semence congelée** ou réfrigérée, doivent être réalisées par **des vétérinaires inséminateurs** ayant suivi un stage de formation organisé conjointement par les Ecoles Nationales vétérinaires, agréé par la Société Centrale Canine (16). En effet tout vétérinaire peut inséminer, mais seules les portées, issues d'insémination artificielle en semence congelée ou réfrigérées réalisées par les vétérinaires « inséminateurs canins » peuvent être inscrites au Livre des Origines Françaises. Le vétérinaire qui récolte la semence doit rédiger un certificat indiquant qu'il s'engage à avoir vérifié le numéro de tatouage et donc l'identité du chien dont il utilise ou expédie la semence. Il appose son tampon sur le certificat de saillie en mentionnant « insémination artificielle en semence congelée par mes soins » avec date et signature.

**La législation sur les échanges de semences au niveau international est mal définie et non harmonisée entre les pays.**

Dans certains pays, l'insémination artificielle est considérée comme illégale :

- Uniquement en semence congelée.
- Si le chien est décédé (Angleterre par exemple).
- IA chirurgicale est parfois interdite (Grande-Bretagne, Scandinavie).
- Restriction à l'importation pour raisons sanitaires ou pour les races dangereuses.

Pour importer de la semence, il faut au préalable se renseigner auprès du pays.

Il est généralement demandé une identification correcte de l'animal, un certificat sanitaire et un permis d'importer (contrôle des maladies génétiques, tests sérologiques).

Il est donc **nécessaire de prévoir les échanges de semences à l'avance et ne jamais les réaliser dans l'urgence**. Il faut donc conseiller aux propriétaires de programmer l'envoi de la semence avant que la chienne n'entre en chaleur.

## 4 CONCLUSION

L'insémination en semence congelée chez la chienne est un **outil de sélection en plein développement**.

La réussite de cette technique peut être améliorée et est à l'origine de nombreuses études en vue de son amélioration.

**Son succès dépend de nombreux paramètres** : qualité du sperme, date d'insémination, site de dépôt de la semence, précision du suivi de chaleur. De plus la collecte du sperme, l'addition du dilueur, la congélation, le stockage, le transport, la décongélation sont autant d'étapes qui influent sur la réussite de l'insémination.

# Deuxième partie : Analyse des dossiers du CERCA

## 1 LE CERCA

### 1.1 Présentation

#### 1.1.1 Historique

L'idée de la création d'un centre d'insémination artificielle canine en France est venue d'un comité de la Société Centrale Canine, à la fin des années 1970. Cette création avait pour objectif, entre autres, de contrecarrer les projets américains de centres privés en Europe d'après Lechef (26).

**En 1981, la Banque de Semence Canine voit officiellement le jour**, née d'une convention tripartite, unissant le Ministère de l'Agriculture, la Société Centrale Canine et l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Elle est alors la seule structure française habilitée à récolter et à conserver la semence des chiens de races.

Depuis cette date, des inséminations artificielles en semence congelée y sont pratiquées.

#### 1.1.2 Rôle de la banque de la semence

Les prestations de la banque au sens strict sont :

- la **constitution, l'entretien, et l'utilisation** d'un stock de semences congelées de géniteurs inscrits au livre généalogique tenu par la société centrale canine.

S'y ajoutent un certain nombre de tâches découlant de son activité de centre d'insémination :

- **Insémination** artificielle avec de la semence fraîche ou réfrigérée.
- **Suivi** du cycle sexuel des chiennes/ Détermination de la période optimale de saillie ou d'IA.
- **Examen de la fécondité** des chiens et des chiennes/ Consultations pour infécondité.
- **Recherche** sur l'amélioration des techniques d'insémination artificielle.
- **Formation** des vétérinaires et des étudiants vétérinaires.

### 1.2 Protocole de suivi des chaleurs

Les suivis de chaleurs sont réalisés à l'aide de **frottis vaginaux, de dosages de progestérone et parfois d'échographies ovariennes (dans le cas des chiennes infertiles ou devant être inséminées avec de la semence congelée ou réfrigérée)**.

### 1.3 Protocole de congélation de la semence

Le protocole actuel utilise **2 étapes de dilution (25)**, que nous avons déjà détaillées ci-dessus. On obtient au final une concentration de **100 à 200 spermatozoïdes (spz)/mL** (soit 50 à 100 millions par paillettes de 0,5mL)

Les paillettes sont identifiées avec :

- Le nom de l'animal
- La race
- Le numéro d'enregistrement
- La date de récolte
- Le lieu de récolte et congélation.

## 1.4 Protocole d'insémination artificielle en semence congelée

L'insémination en intra-utérine est obligatoire : Fontbonne et Badinand (18) a ainsi montré que le taux de gestation en IAC variait de 52,6 %(intra vaginale) à 73,6 % (intra-utérine). Trois méthodes d'insémination intra utérine sont utilisées au CERCA.

- **la méthode par cathétérisme norvégien.**
- **L'insémination artificielle sous vaginoscopie.**
- **L'I.A. sous laparotomie.**

## 2 MATERIEL ET METHODES

### 2.1 Objectifs

L'objectif de cette étude consiste à **analyser les dossiers du CERCA** en s'intéressant aux **inséminations artificielles en semence congelée**, dans le but de connaître les résultats, de les comparer à ce qui a été publié par d'autres équipes afin de dégager les **facteurs qui pourraient améliorer ces résultats**.

### 2.2 Matériel et méthodes

#### 2.2.1 Recueil des données

Le recueil des données a nécessité **l'examen manuel de l'ensemble des dossiers des chiennes ayant reçues une IAC au CERCA entre janvier 2001 et décembre 2006**, un par un. En effet aucune base de données informatisée n'existait pour retrouver les chiennes ayant subi une insémination en semence congelée.

Lorsque la réalisation d'une insémination en semence congelée était retrouvée dans un dossier, une **vingtaine de paramètres** étaient alors consignés (renseignement sur les portées antérieures, antécédents d'infertilité, traitements spécifiques, renseignement sur le mâle et la qualité de la semence utilisée, suivi de chaleur, date d'inséminations et de mise bas.....). Cf. Annexe 5.

Pour compléter les données, une centaine d'appels téléphoniques aux propriétaires ont été nécessaires.

#### 2.2.2 Critères de choix des animaux et description de l'échantillon

Les chiennes incluses dans l'étude ont été inséminées en semence congelée au CERCA de Janvier 2001 à Décembre 2006.

- L'étude compte **92 chiennes au total, avec 8 chiennes ayant été inséminées 2 fois et 1 chienne ayant été inséminée 3 fois, soit 102 IAC au total.**

### 2.2.3 Saisie des données

Une fois les données recueillies au CERCA, celles-ci ont été recopiées dans EXCEL 2003. L'ensemble des paramètres relevés pour chaque chienne est placé en annexe (Annexe n°5).

## 3 RESULTATS

### 3.1 Paramètres de l'échantillon

- Les dossiers des chiennes ne sont pas tous complets, on ne connaît par exemple:
  - La réussite de l'IAC que pour 97 IAC.
  - Le nombre de chiots obtenus de 39 / 49 IAC.
  - La qualité de la semence utilisée pour 81 IAC.
  - Le rang de portée pour 87 IAC.

### 3.2 Paramètres de reproduction concernant la femelle

#### 3.2.1 Fertilité

Le taux de réussite de toutes les inséminations artificielles en semence congelée pratiquées au CERCA de janvier 2001 à décembre 2006 est de **50,5 % (49/97 chiennes)**.

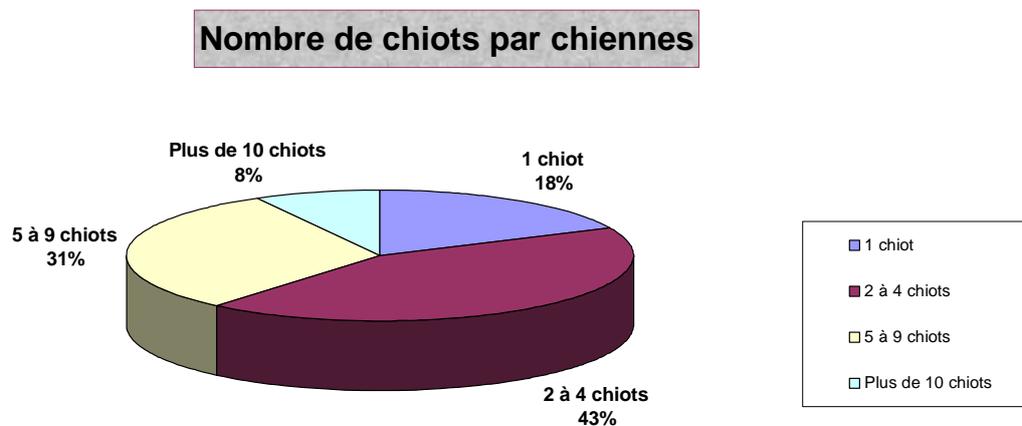
#### 3.2.2 Prolificité

Le nombre moyen de chiots lors d'une insémination artificielle est en moyenne de 4,0 chiots (+/- 3,03 chiots).

Les résultats sont compris entre 1 et 14 chiots par chienne. (cf.figure 26)

On remarque que 17% des chiennes ont 1 seul chiot (7/39 chiennes).

**Figure 26 :** Nombre de chiots par chiennes.



### 3.2.3 Durée de gestation

La durée de gestation est en moyenne de :

- 61,5 +/- 1,8 jours par rapport à la première IAC.
- 60,6 +/- 1,9 jours par rapport à la deuxième IAC

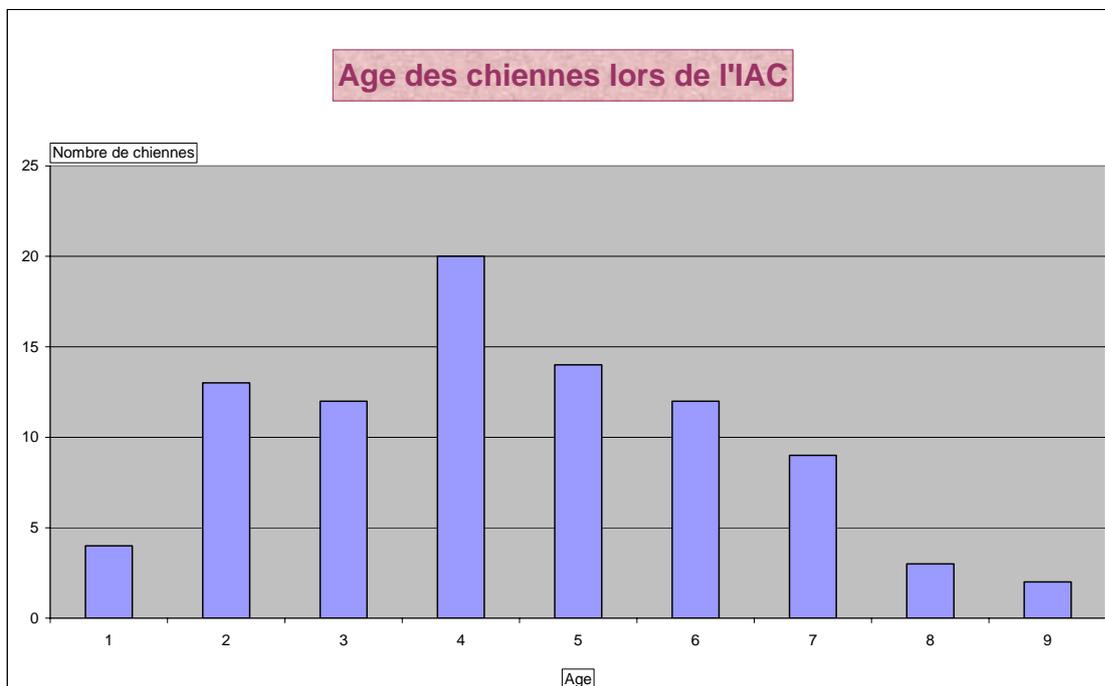
### 3.2.4 Sex ratio

Le sex ratio est de 1,28.

### 3.2.5 Age lors de l'insémination artificielle en semence congelée (IAC)

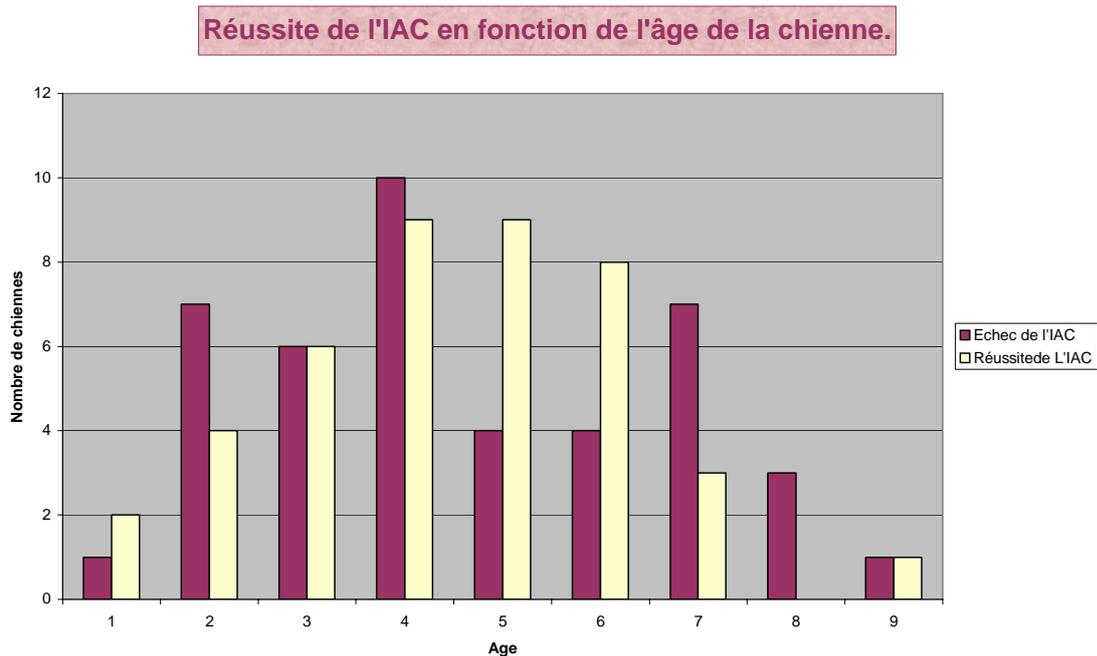
Les chiennes sont âgées entre 1 et 9 ans, en moyenne de 4,4 ans. (cf.figure 27)

**Figure 27 : Age des chiennes lors de l'IAC.**



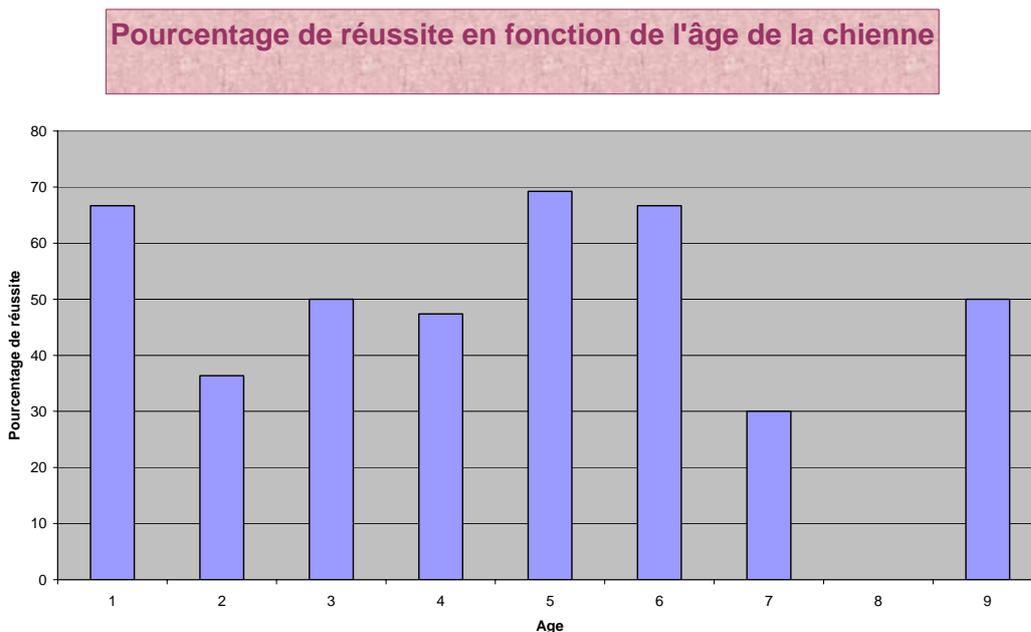
- 19,1% des chiennes ont entre 1 an et 2 ans.
- 65% des chiennes ont entre 3 ans et 6 ans.
- 15,9% des chiennes ont plus de 7 ans.

**Figure 28 :** Réussite de l'IAC en fonction de l'âge de la chienne.



Sur cette figure 28, nous pouvons comparer en fonction de l'âge de la chienne, la réussite ou l'échec de l'IAC. On remarque que **la réussite est significativement différente entre les chiennes de plus de 6 ans et celles âgées de 1 an à 6 ans** :  $\chi^2_{obs} = 3,95680751$ ,  $\chi^2_{théorique} = 3,84$  et  $p = 0,05$ . La différence est donc significative avec une probabilité de 95%. Nous confronterons le  $\chi^2_{observés}$  à cette valeur théorique pour l'ensemble de notre étude. (Cf. Annexe 5).

**Figure 29 :** Pourcentage de réussite en fonction de l'âge de la chienne.

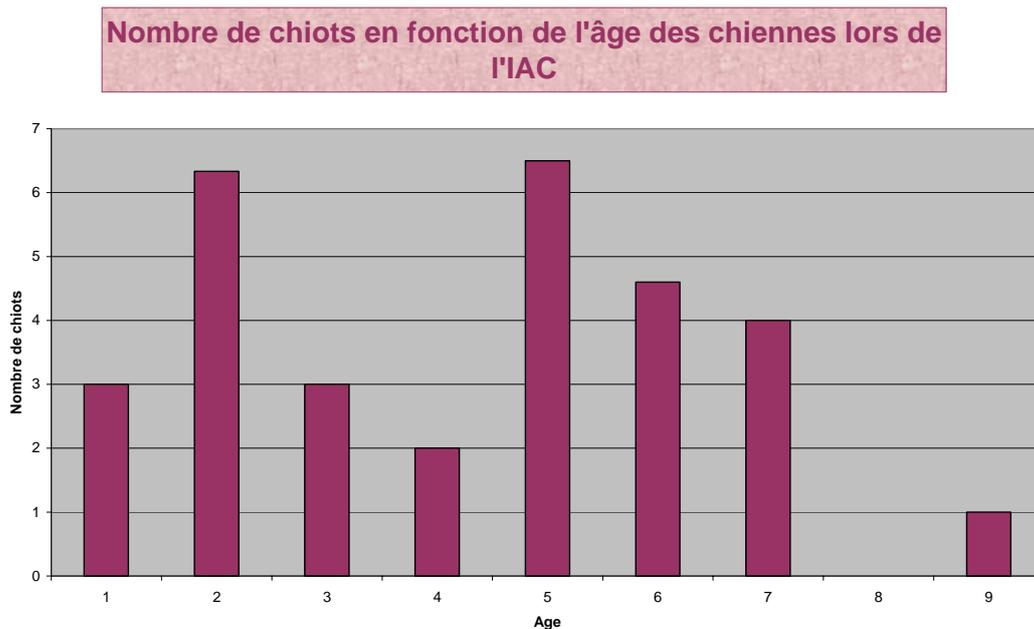


Les pourcentages de réussite intéressants sont :

- de 69% pour les chiennes de 5 ans (9/13 chiennes)
- de 67% pour les chiennes de 6 ans (8/12 chiennes)

La taille de portée est assez hétérogène en fonction de l'âge de la chienne lors de l'IAC (cf.figure 30).

**Figure 30** : Nombre de chiots en fonction de l'âge des chiennes lors de l'IAC.



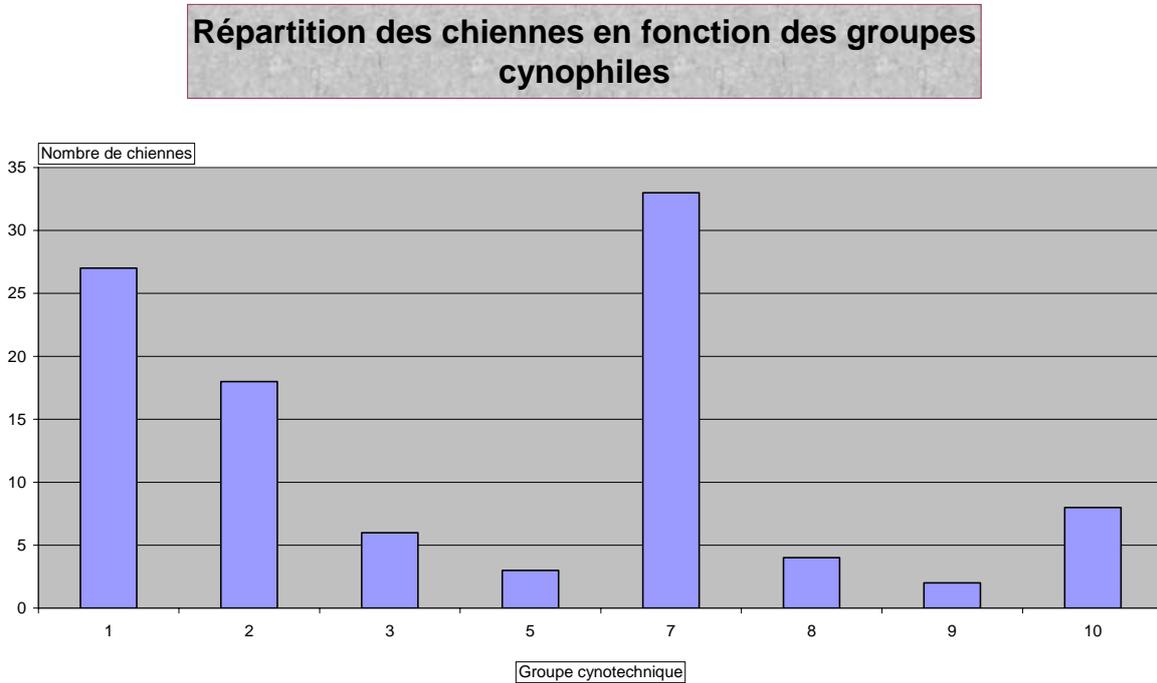
### 3.2.6 Influence du groupe cynophile

Les chiennes appartiennent à 63 races différentes. (cf.figure 31)

Ces différentes races peuvent être regroupées selon les groupes cynophiles selon la classification de la Fédération Cynologique Internationale (groupes regroupant des races ayant des similarités génétiques et morphologiques).

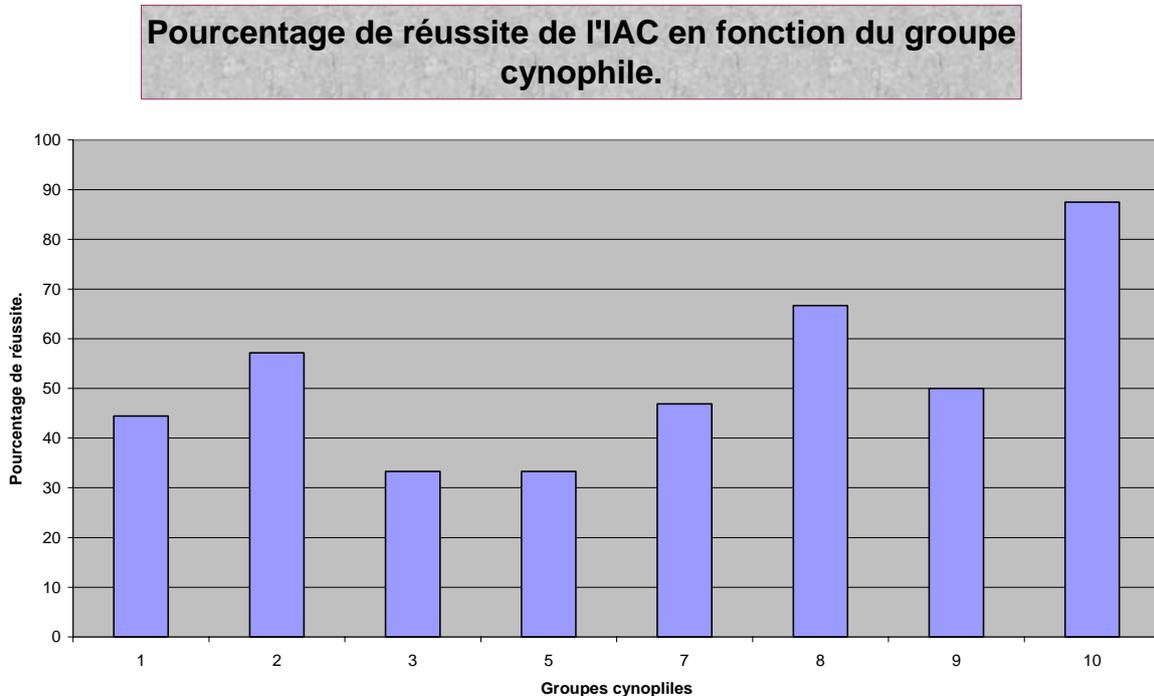
- Groupe 1 : Berger et Bouvier sauf les bouviers suisses.
- Groupe 2 : Pinscher, Schnauzer, Molossoïdes, Chiens de bouvier suisses.
- Groupe 3 : Terriers.
- Groupe 4 : Teckels.
- Groupe 5 : Spitz et chiens nordiques.
- Groupe 6 : Chiens courants.
- Groupe 7 : Chiens d'arrêts.
- Groupe 8 : Labrador et Retriever.
- Groupe 9 : Chiens d'ornement, Bichons, Caniches, chiens nus.
- Groupe 10 : Lévrier.

**Figure 31 :** Répartition des chiennes en fonction des groupes cynophiles.



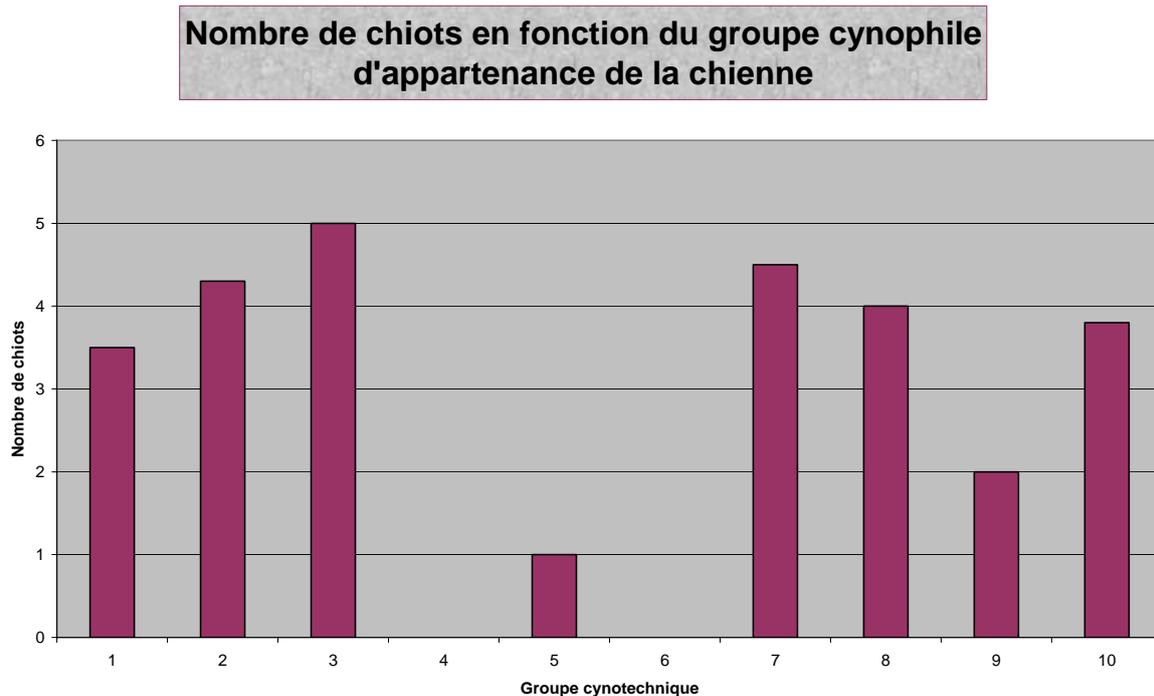
Le groupe 7 (chiens d'arrêt) est très largement représenté (33 % des chiennes), suivi du groupe 1 (Berger et Bouviers suisses) avec 27 %, et le groupe 2 (18 % des chiennes).

**Figure 32 :** Pourcentage de réussite de l'IAC en fonction du groupe cynophile.



Le taux de réussite est assez hétérogène en fonction des races. Cependant le groupe 10 (lévriers) affiche un taux de réussite remarquable (88 %, 7/8 chiennes). Le calcul du  $\chi^2$  (4,77 > 3,84) permet de conclure que cette différence par rapport aux autres groupes est significative ( $p < 0,05$ ).

**Figure 33 :** Nombre moyen de chiots en fonction du groupe cynophile d'appartenance de la chienne.



La taille de portée du groupe 5 semble assez faible (1 chiot) mais cela ne concerne que 3 chiennes.

### 3.2.7 Format de la chienne

On classe arbitrairement les chiennes en 4 groupes :

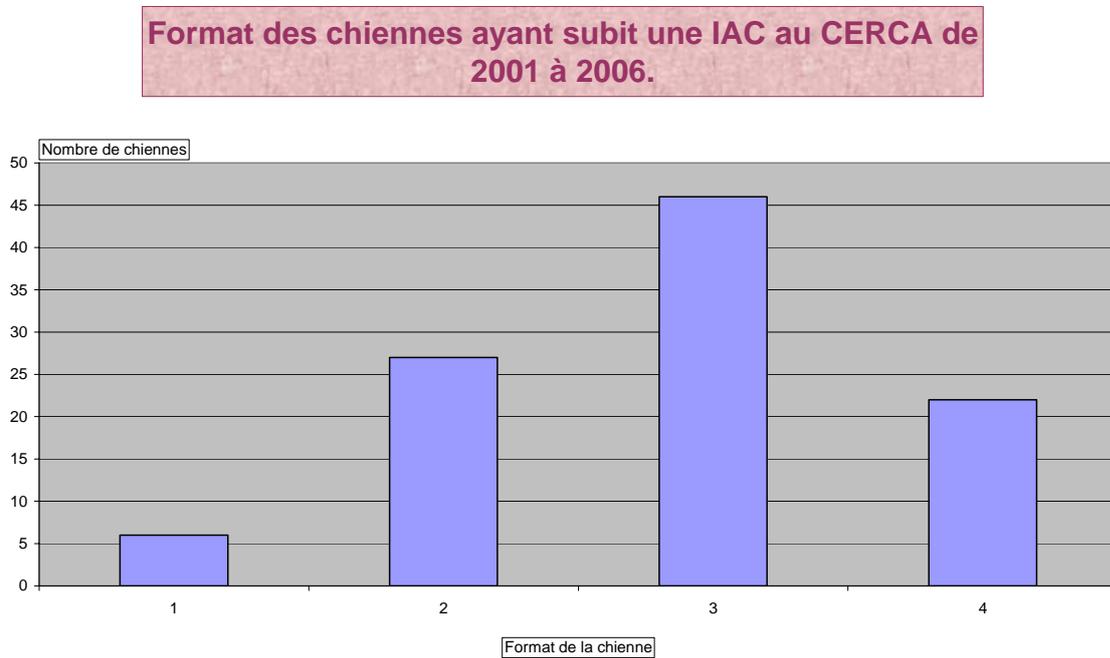
Groupe 1 :  $P < 10\text{kg}$ .

Groupe 2 :  $10\text{ kg} < P < 20\text{ kg}$ .

Groupe 3 :  $20\text{ kg} < P < 30\text{ kg}$ .

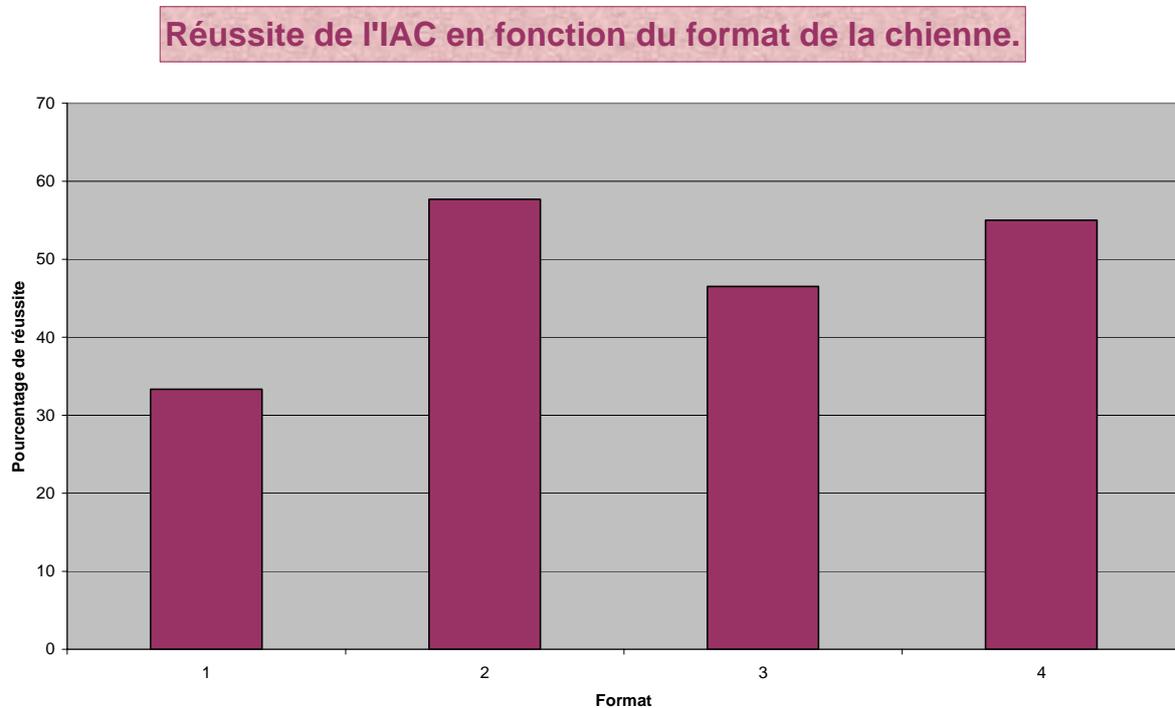
Groupe 4 :  $P > 30\text{ kg}$ .

**Figure 34 :** Format des chiennes ayant subi une IAC au CERCA de 2001 à 2006.



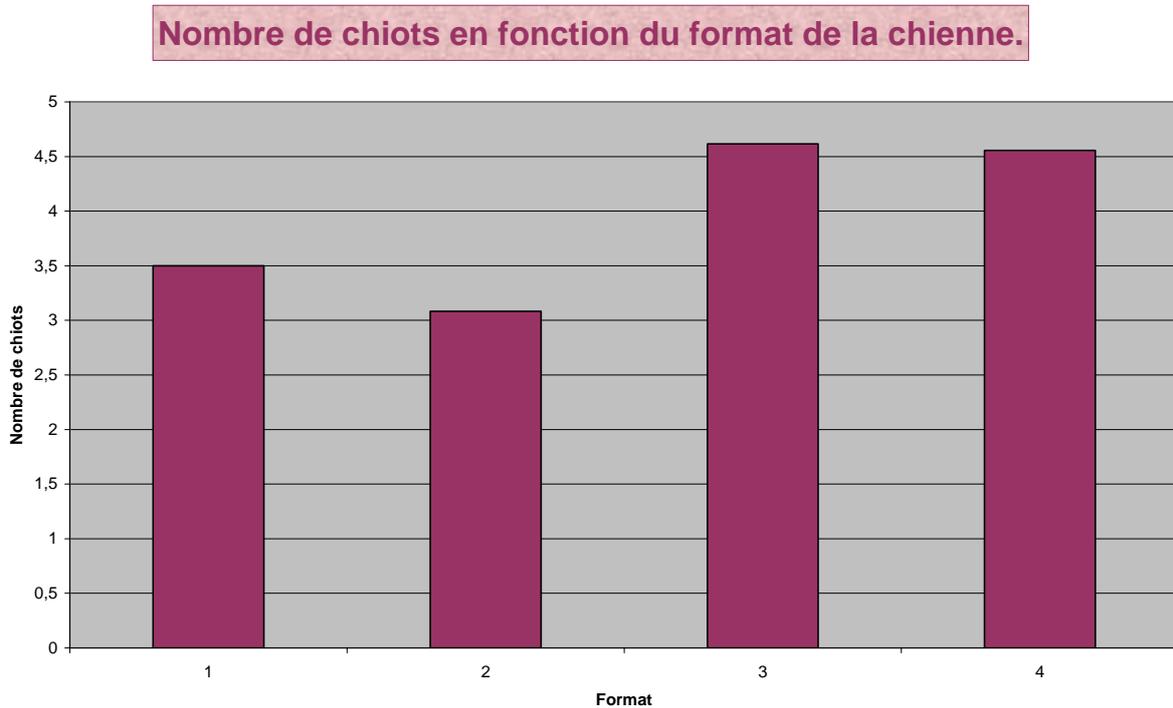
Le format des chiennes est majoritairement compris entre 20 et 30 kg. Cela correspond en effet au format des chiens du groupe 1 et 7 (groupes cynophiles très représentés).

**Figure 35 :** Réussite de l'IAC en fonction du format de la chienne.



La réussite de l'IAC est inférieure pour les races de petits formats (33 %). Cependant le calcul du  $\chi^2$  montre que cette différence n'est pas significative. ( $X^2= 0,75$ ).

**Figure 36 :** Nombre de chiots en fonction du format de la chienne.



Le nombre de chiots est plus important pour les races de grand format.

### 3.2.8 Infertilité antérieure

Si la chienne a connu des problèmes d'infertilité antérieure, le **taux de réussite de l'insémination est de 40 % (4 chiennes/10)** contre 52 % de réussite (47/91chiennes) si aucun antécédent d'infertilité n'était connu pour cette chienne.

Le calcul du  $\chi^2$  ne permet pas d'affirmer que cette différence est significative.

( $\chi^2=0,489 < 3,84$ ).

### 3.2.9 Rang de portée

Il existe une variation importante du taux de réussite de l'IAC si on sépare les primipares des multipares.

En effet le taux de réussite est de :

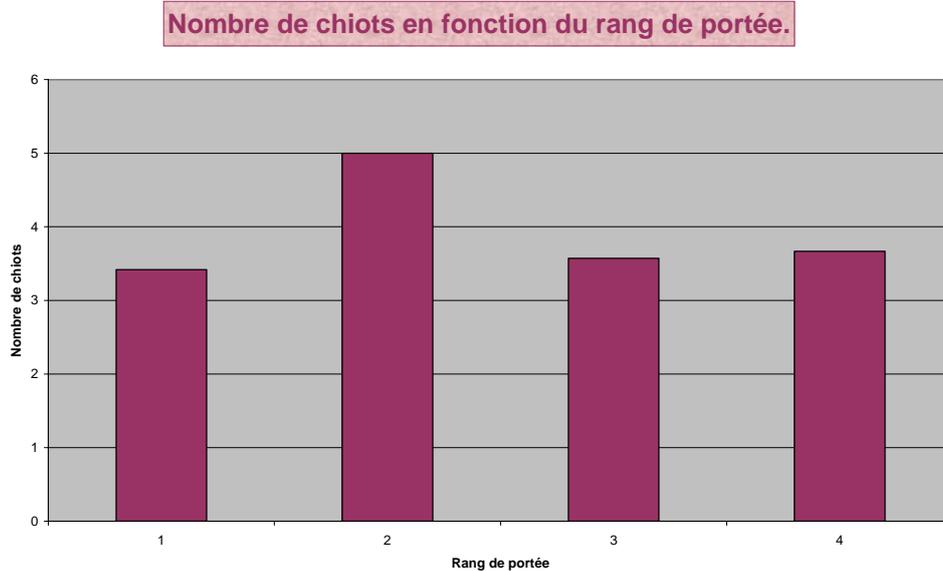
- **43 % pour les primipares (16/37 chiennes).**
- **63 % pour les multipares (27/50 chiennes).**

*Cette différence n'est cependant pas significative lors du calcul du  $\chi^2$  ( $\chi^2 = 0,98 < 3,84$ ).*

En outre on remarque que le **pourcentage de primipares** sur l'ensemble des chiennes présentées pour IAC est de **43 % (37/87 chiennes)**.

De plus **19 % des primipares (7/37chiennes)** présentées pour une IAC se sont ensuite révélées **infertiles**. Si on calcule le pourcentage de réussite sans tenir compte de ces 7 chiennes infertiles, le taux de réussite est alors de 53 % (16/30 chiennes).

**Figure 37 :** Nombre de chiots en fonction du rang de portée.

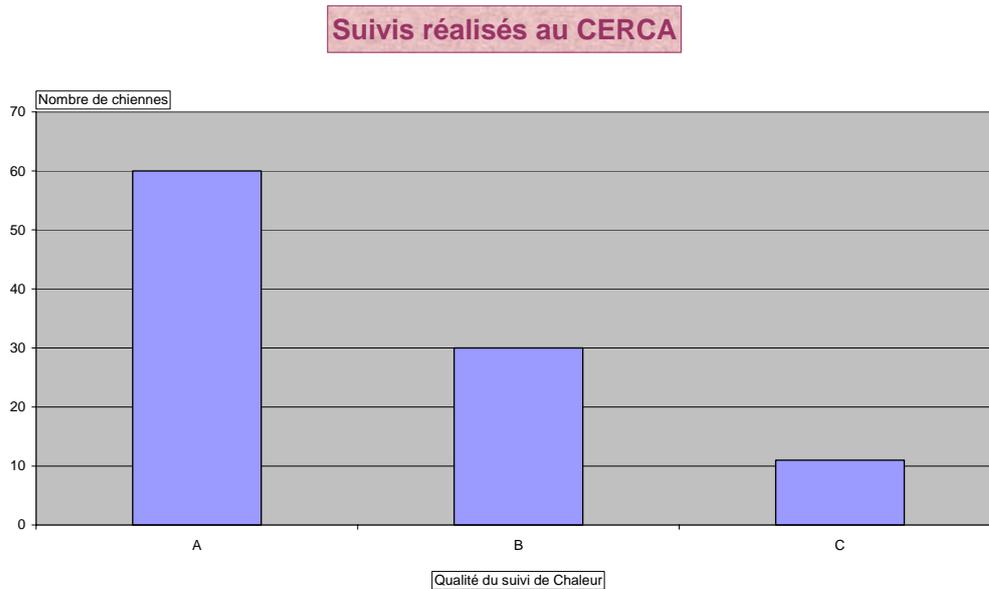


Le nombre de chiots par portée ne montre pas de variations significatives et ne semble pas moins élevé pour les primipares:

### 3.2.10 Qualité du suivi effectué

- **A** : Suivi très précis avec frottis, test quantitatif de progestérone, et échographie ovarienne.
- **B** : Suivi utilisant frottis et test quantitatif de progestérone.
- **C** : Suivi insuffisant utilisant test qualitatif de progestérone ou irrégulier ne permettant pas de déterminer le moment de l'ovulation.

**Figure 38 :** Suivis réalisés au CERCA.



- **Suivi A** : On obtient par cette méthode un **taux de réussite de 51 % (29/58 chiennes)**.
- **Suivi B** : On obtient par cette méthode un **taux de réussite de 61 % (18/29 chiennes)**.
- **Suivi C** : On obtient par cette méthode un **taux de réussite de 20 % (2/10 chiennes)**.

Généralement les suivis C correspondent à des chiennes pour lesquelles le suivi a été réalisé par un autre vétérinaire ou bien qui ont été amenées tardivement dans le cycle.

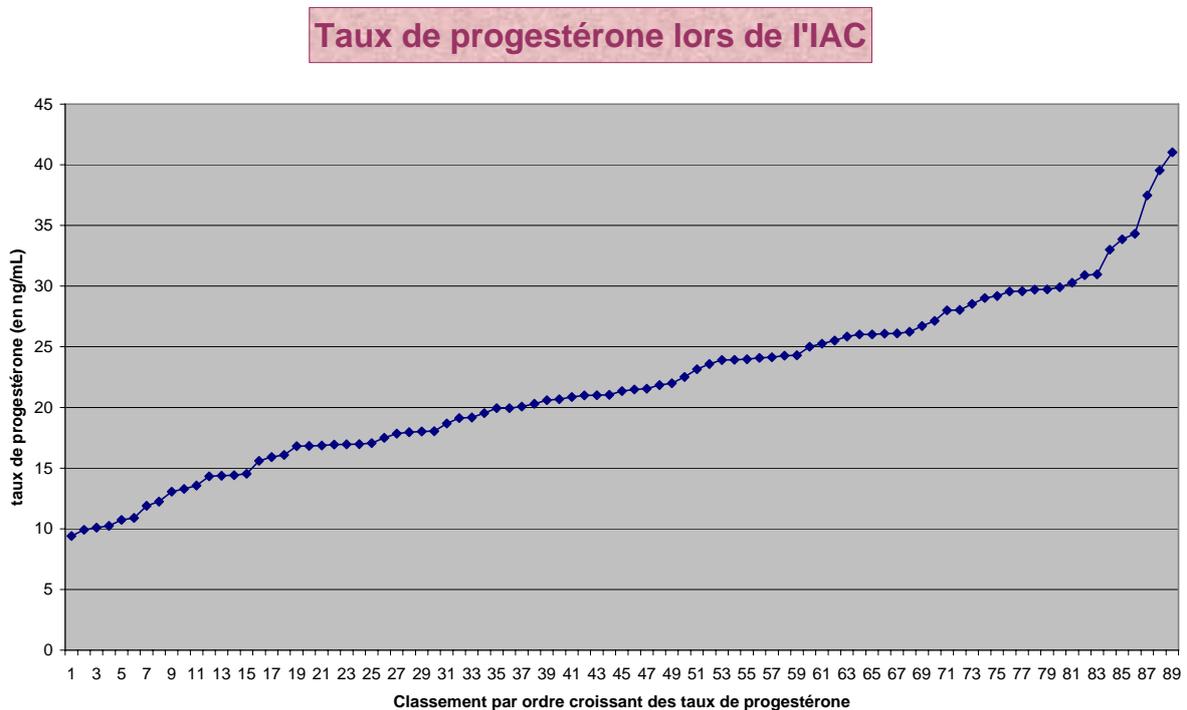
L'apport de l'échographie associée aux dosages de progestérone, n'est pas établi dans cette étude. Les résultats inférieurs de 10 % pour les suivis de qualité A utilisant l'échographie semble surprenante, mais la différence de réussite entre les suivis de qualité A et ceux de qualité B n'est pas significative ( $\chi^2=0,73$ ).

Cependant cette différence est significative entre les suivis de qualité B et de qualité C ( $\chi^2=4,88$ ).

### 3.2.11 Taux de progestérone à l'insémination

En moyenne le taux de progestérone à la première insémination est de **22,0 ng/mL (+/- 6,9 ng/mL)**.

**Figure 39 : Taux de progestérone lors de l'IAC.**

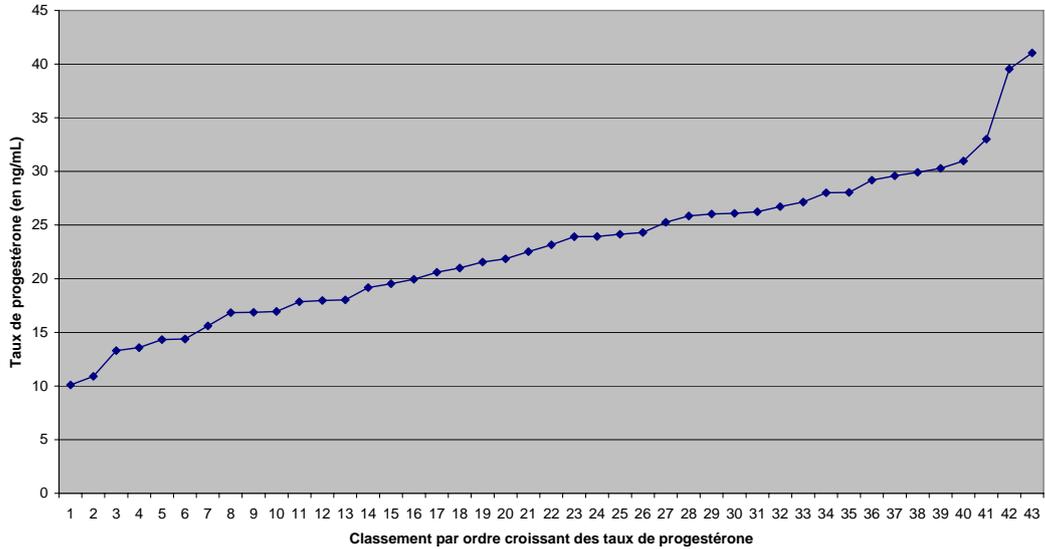


#### Si réussite de l'IAC :

- Le taux de progestérone moyen lors de la première insémination est de **22,9 ng/mL (+/- 6,9 ng/mL)**.

**Figure 40 :** Taux de progestérone lors de réussite de l'IAC.

**Taux de progestérone lors de réussite de l'IAC**

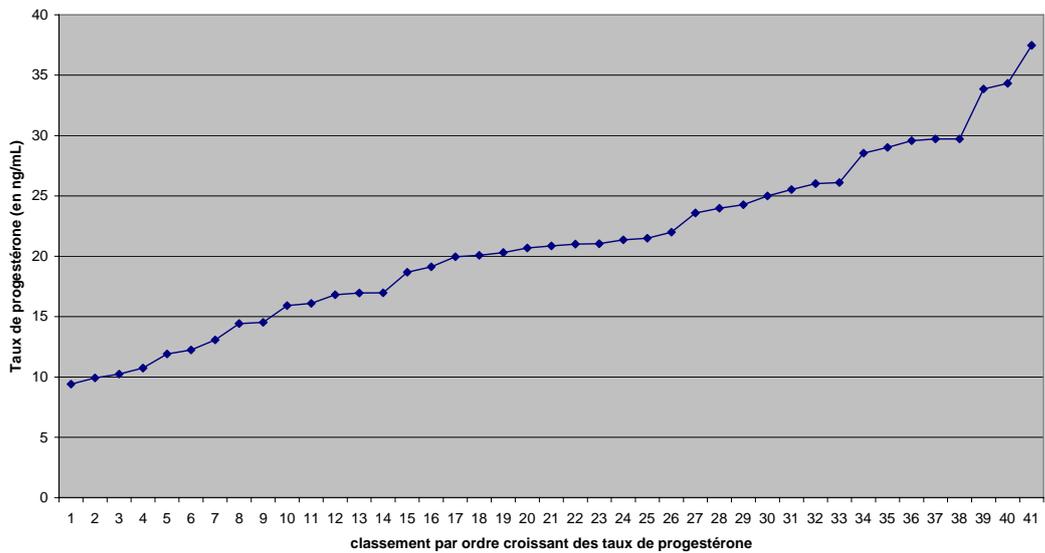


**Si échec de l'IAC :**

- Le taux de progestérone moyen est de **21,0 ng/mL** . (+/- **6,9 ng/mL**).

**Figure 41 :** Taux de progestérone lors d'échec de l'IAC.

**Taux de progestérone lors d'échec de l'IAC**



### 3.2.12 Réalisation d'un diagnostic de gestation

30,6 % des IAC seulement sont suivies d'un diagnostic de gestation par échographie.

### 3.3 Paramètres concernant l'IAC

#### 3.3.1 Type d'insémination

Les taux de réussite varient en fonction de l'insémination utilisée. (cf. Tableau IV))

- Insémination intra-utérine (méthode norvégienne).
- Insémination intra-utérine sous endoscopie.
- Insémination artificielle chirurgicale.
- Insémination artificielle vaginale.

**Tableau IV** : Résultats de reproduction en fonction du type d'insémination (2001-2006).

	Nombre d'IAC	Taux de réussite	Taille de portée	Sex ratio
Insémination Intra-utérine (méthode norvégienne)	87	53,7% (45/83) chiennes)	4,37 (+/- 3,5) chiots)	1,25
Insémination artificielle chirurgicale	8	12,5% (1/8) chiennes)	ND	ND
Insémination artificielle vaginale	1	0% (0/1) chiennes)	ND	ND
Insémination sous endoscopie	4	75% (3/4) chiennes)	4 (+/- 3,6) chiots)	1

*ND (non déterminé) : les résultats ne sont pas calculés par manque de données.*

#### 3.3.2 Moment de l'insémination

➤ **Insémination le 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jour après l'ovulation:**

Deux inséminations sont réalisées en général le **deuxième et le troisième jour après l'ovulation** (C'est le cas de 33 chiennes dans cette étude).

- Le taux de réussite lorsque l'insémination est réalisée de cette manière est de **70 % (23 chiennes/33)**.

➤ **Insémination le 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> jour après l'ovulation :**

Le taux de réussite est de **33 %** (2 chiennes/ 6)

La comparaison des résultats lors d'insémination à J1J2 et J2J3 post ovulation ne montre pas de différence significative ( $\chi^2=2,91$ ).

➤ **Insémination le 3<sup>ème</sup> jour après l'ovulation uniquement:**

Dans le cas où une seule insémination a été réalisée les résultats sont de **83 %** de réussite à **J3** (5 chiennes sur 6).

➤ **Insémination le 2<sup>ème</sup> jour après l'ovulation uniquement:**

Le taux de réussite est de **30 %** de réussite à **J2** (6 chiennes/20).

Statistiquement, le taux est significativement différent lorsque l'insémination est réalisée à J2 seulement ou à J3seulement. ( $\chi^2=5,37$ ).

### 3.3.3 Nombre d'IAC

**Tableau V : Influence du nombre d'IAC/cycle sur les résultats de reproduction.**

Nombre IAC/ Cycle	Nombre IAC	Intervalle 1 <sup>ère</sup> IA/mise bas	Intervalle 2 <sup>ème</sup> IA/ mise bas	Taux de réussite	Taille de portée	Sex ratio
1	33	61,2 (+/- 1,4)		36,7% (11/30)	2,9 (+/- 2 ,4)	1,14
2	57	61,3 (+/- 1,9)	60,3 (+/- 1,9)	57,4% (31/54)	4,5 (+/- 3,3)	1,46
3	11	62,6 (+/- 1,6)	61 ,8 (+/- 1,7)	60,0% (6/10)	3,6 (+/- 2,7)	0,70
TOTAL	101	61,4+/-1,8	60,6 (+/-1,9)	50,5% (49/97)	4,0 (+/-3,03)	1,28

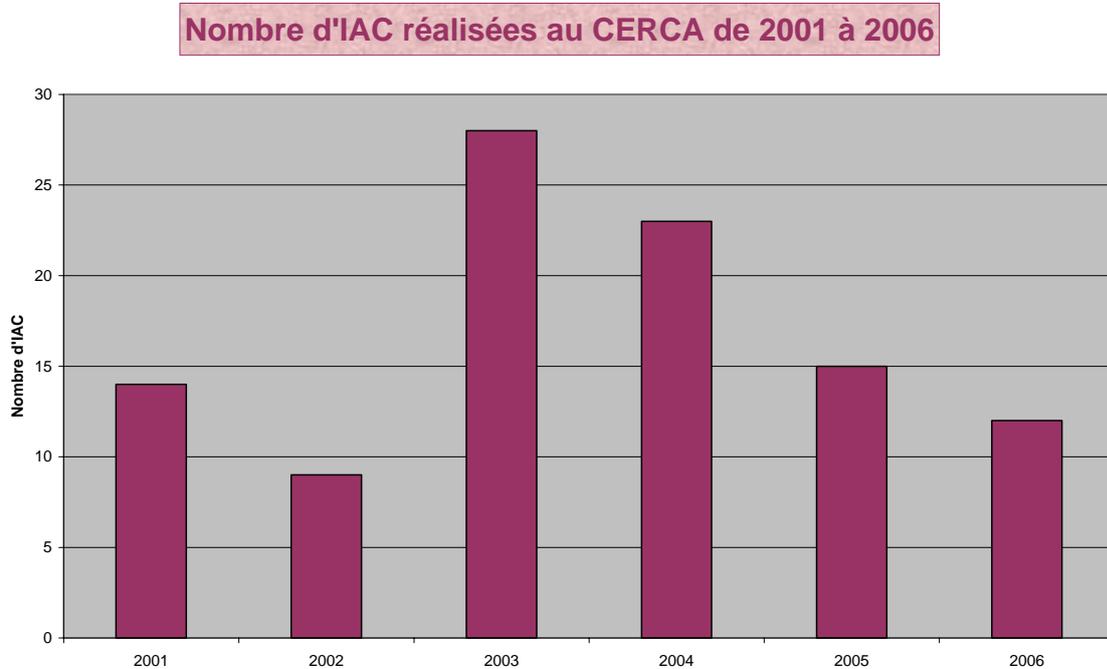
Statistiquement, le nombre d'IAC a une influence significative si on compare les protocoles à 1 ou 2 IAC ( $\chi^2_{obs}= 8,83$ ). Par contre cette différence n'est pas significative entre les protocoles à 2 ou 3 IAC ( $\chi^2_{obs}= 0,0235$ ).

- En moyenne, **1,7 IA/cycle** ont été réalisées.

### 3.3.4 Année de réalisation de l'insémination

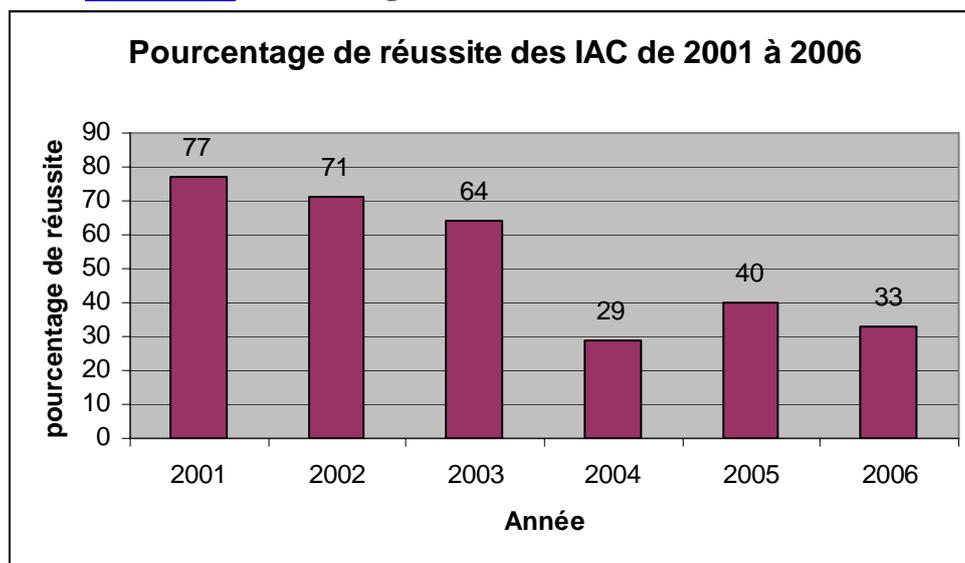
On remarque une diminution du nombre d'IAC pratiquées au CERCA de 2003 à 2006.(cf.figure 42)

**Figure 42 :** Nombre d'IAC réalisées au CERCA de 2001 à 2006.



Le pourcentage de réussite est très différent selon les années : 77% en 2001 contre 33% en 2006. De plus le calcul du  $\chi^2$  montre que cette différence est en effet significative ( $\chi^2=12,04$ ) (cf.figure 43).

**Figure 43 :** Pourcentage de réussite des IAC de 2001 à 2006.



### 3.3.5 Difficultés

Il y a eu pour 6,9% des chiennes des difficultés d'inséminations (7/101 chiennes). Le plus souvent, **le passage du col était difficile avec la sonde norvégienne.**

Les 7 chiennes, pour lesquelles une difficulté a été rencontrée lors de l'insémination, sont restées vides.

#### 3.3.5.1 Tranquillisation

Une tranquillisation à la xylazine a dû être utilisée pour l'insémination de **19 % des chiennes (19/101 chiennes).**

Le taux de réussite est de :

- 48 % sans tranquillisation (36/75 chiennes).
- **61,1% avec tranquillisation (11/18 chiennes).**

Cette différence n'est pas significative :  $\chi^2 = 0,99$ .

#### 3.3.5.2 Reflux

On a observé un reflux de semence après l'insémination dans **13 % des IAC.**

reflux	Réussite de l'IA		
	non	oui	Total
non	28	33	61
oui	5	8	13
Total	33	41	74

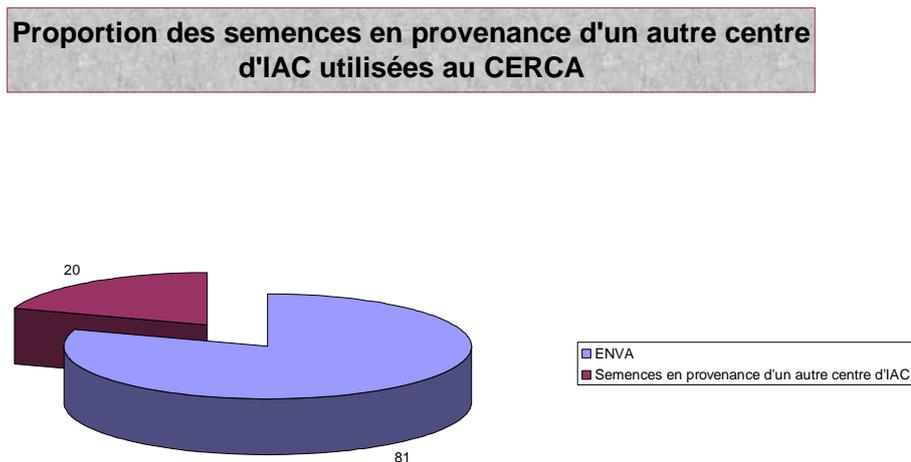
On obtient un taux de réussite de 61,5 % lors de l'existence d'un reflux et 54,1% sans reflux ( $\chi^2 = 0,24$ )

La survenue d'un reflux de semence **n'a pas d'influence sur la réussite de l'insémination.**

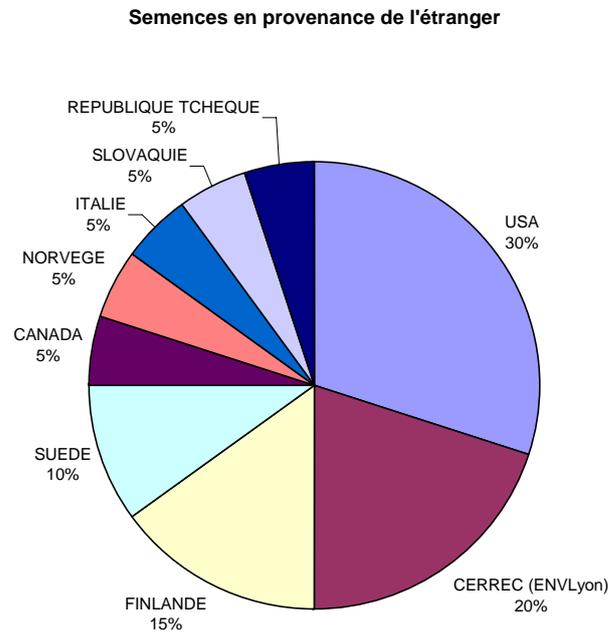
### 3.4 Paramètre concernant la semence

#### 3.4.1 Provenance de la semence

**Figure 44 :** Proportion des semences en provenance d'un autre centre d'IAC.



**Figure 45 :** Semences en provenance de l'étranger. (le pourcentage de chaque semence

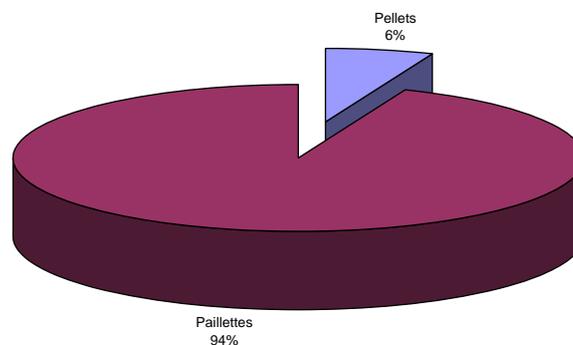


Le taux de réussite des inséminations réalisées avec de la semence en provenance de l'étranger est de 66,7 % (10/15 chiennes). Si on compare au pourcentage de réussite avec les semences congelées au CERCA (47,7 %), on remarque que la différence n'est pas significative ( $\chi^2=1,84$ ).

### 3.4.2 Type de conditionnement de la semence : paillettes / pellets

**Figure 46 :** Type de conditionnement de la semence utilisé lors des IAC.

**Type de conditionnement de la semence utilisé lors des IAC**



Le taux de réussite est de :

- 60,0 % lors de l'utilisation de pellets (3/5 chiennes).
- 48,8 % lors de l'utilisation de paillettes (44/90 chiennes).

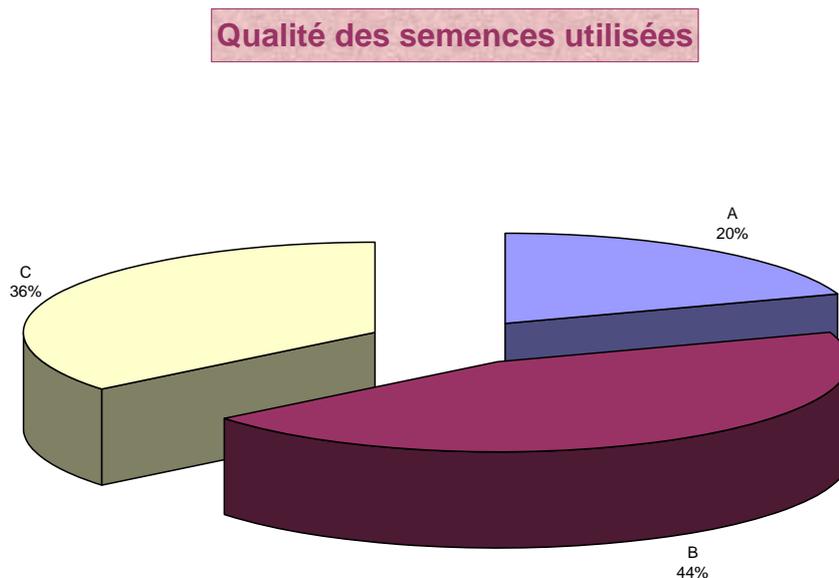
*Différence non significative :  $\chi^2=0,23$ .*

### 3.4.3 Qualité de la semence

On a classé les semences selon leur qualité en 3 catégories : **A, B, C**.

- **A** : *Très bonne semence* : > 60 % de mobilité après décongélation, nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés > 150 millions (60 millions si méthode chirurgicale).
- **B** : *Bonne semence* : > 50 % de mobilité après décongélation, dose > 150 millions de spermatozoïdes et conservation depuis moins de 10 ans.
- **C** : *Semence de mauvaise qualité* : < 50 % de mobilité, conservation depuis plus de 15 ans, ou dose inséminante inférieure à 150 millions de spermatozoïdes.

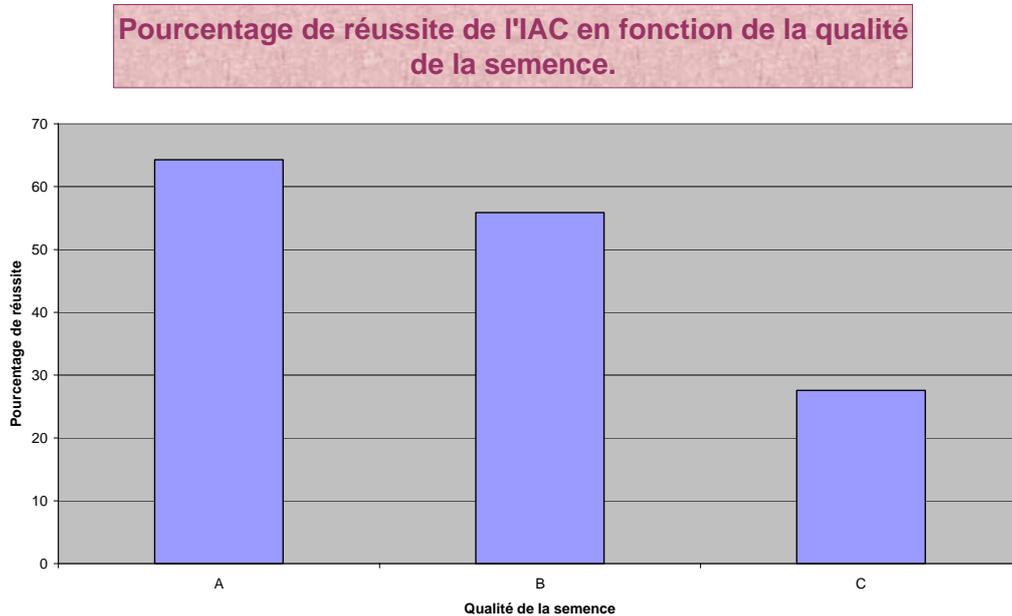
**Figure 47 : Qualité des semences utilisées.**



On remarque qu'un tiers des semences sont de qualité C, c'est-à-dire de mauvaise qualité.

On remarque une influence de la qualité de la semence sur la réussite de l'IAC. Avec une semence de mauvaise qualité, le taux de réussite est de 27,6 % (8/29 chiennes). Si la semence est de très bonne qualité, on obtient un taux de réussite de 64,3 % (9/14 chiennes). (cf.figure48)

**Figure 48 :** Pourcentage de réussite de l'IAC en fonction de la qualité de la semence.

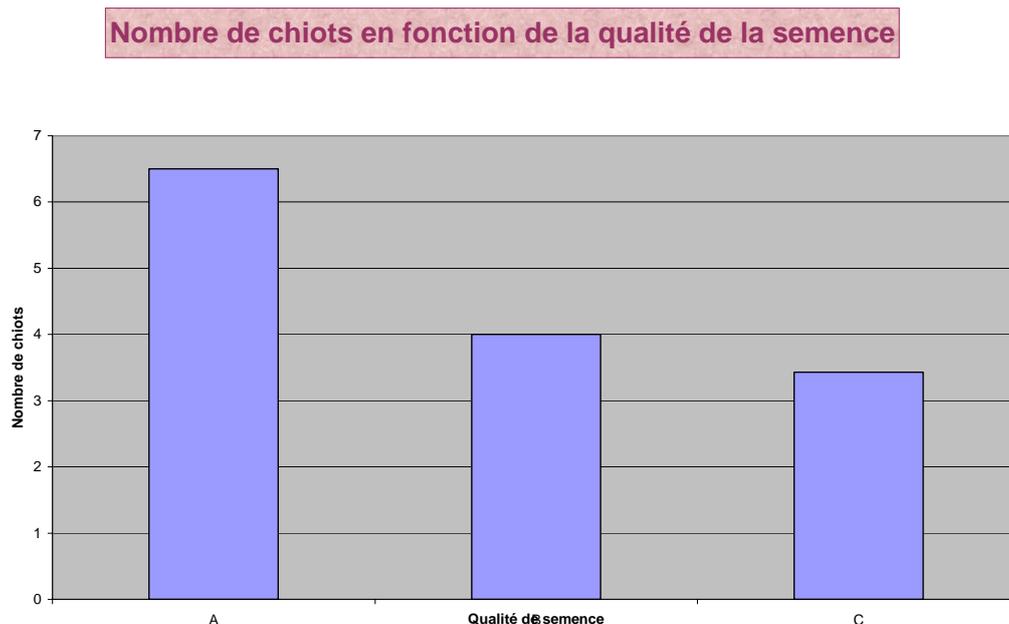


Les taux de réussite avec des semences de qualité A et B ne sont pas significativement différents ( $\chi^2=0,28$ ).

L'utilisation d'une semence de qualité C est responsable d'une diminution significative du taux de réussite, que ce soit vis-à-vis d'une semence de qualité A ( $\chi^2=5,31$ ), ou par rapport à une semence de qualité B ( $\chi^2=5,11$ ).

Si on ne tient pas compte des semences de mauvaise qualité (C), le taux de réussite est de 60% soit 29/49 chiennes sur cette étude

**Figure 49 :** Nombre de chiots en fonction de la qualité de la semence.



Selon la qualité de la semence, on obtient :

- 6,66 +/- 4,47 chiots avec de la semence A.
- 4,0 +/- 3,0 chiots avec de la semence B.
- 3,4 +/- 2,6 chiots avec de la semence C.

### 3.4.3.1 Le nombre de spermatozoïdes totaux

Le nombre de spermatozoïdes totaux correspond à l'ensemble des spermatozoïdes inséminés qu'ils soient vivants ou non

Le nombre de spermatozoïdes totaux par IA est :

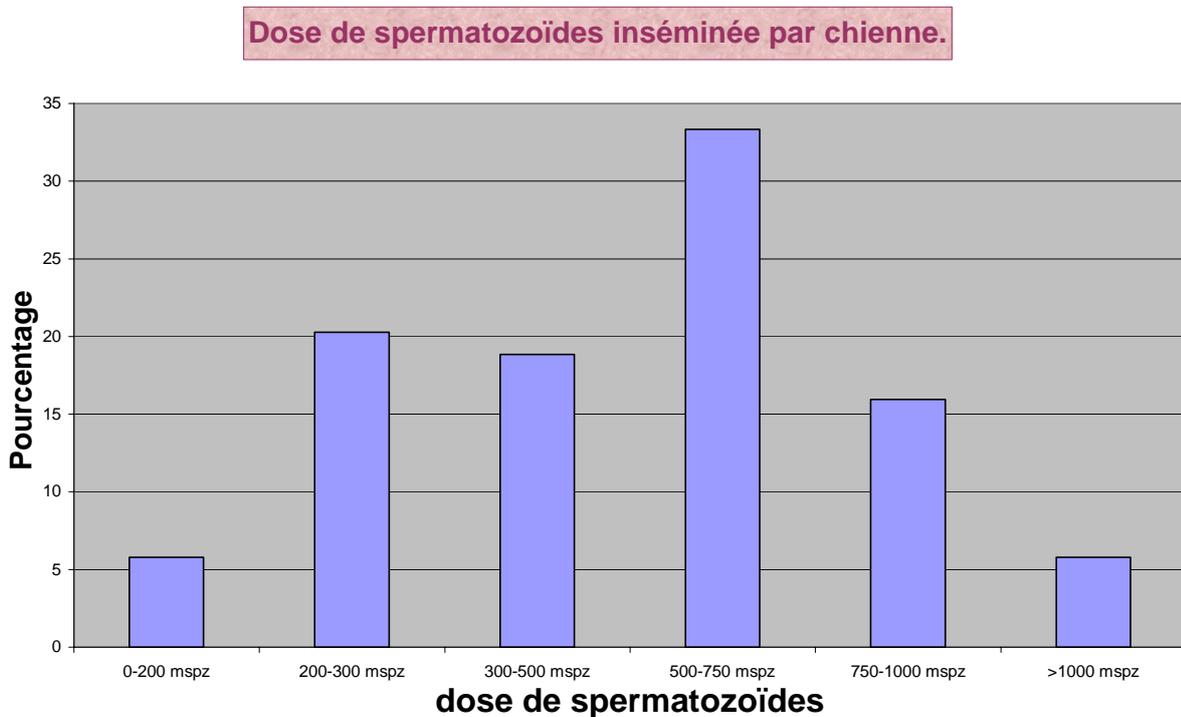
- 314 +/- 163 millions de spz.

Le nombre total de spermatozoïdes par cycle est de :

- 534 +/- 285 millions de spz

Les résultats suivants sont affichés en millions de spermatozoïdes.

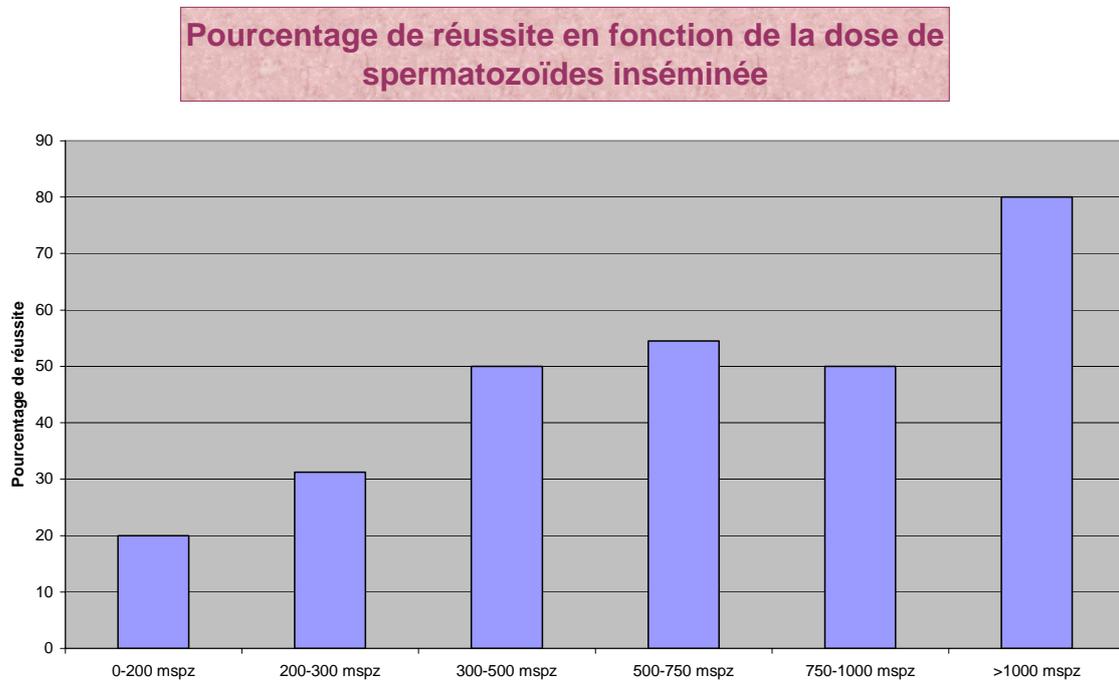
**Figure 50 : Dose de spermatozoïdes inséminée par chienne (sur la totalité des IAC du cycle).**



Les doses utilisées sont calculées avant l'insémination de manière à connaître le nombre de paillettes à utiliser pour obtenir au final un nombre de spermatozoïdes mobiles suffisants.

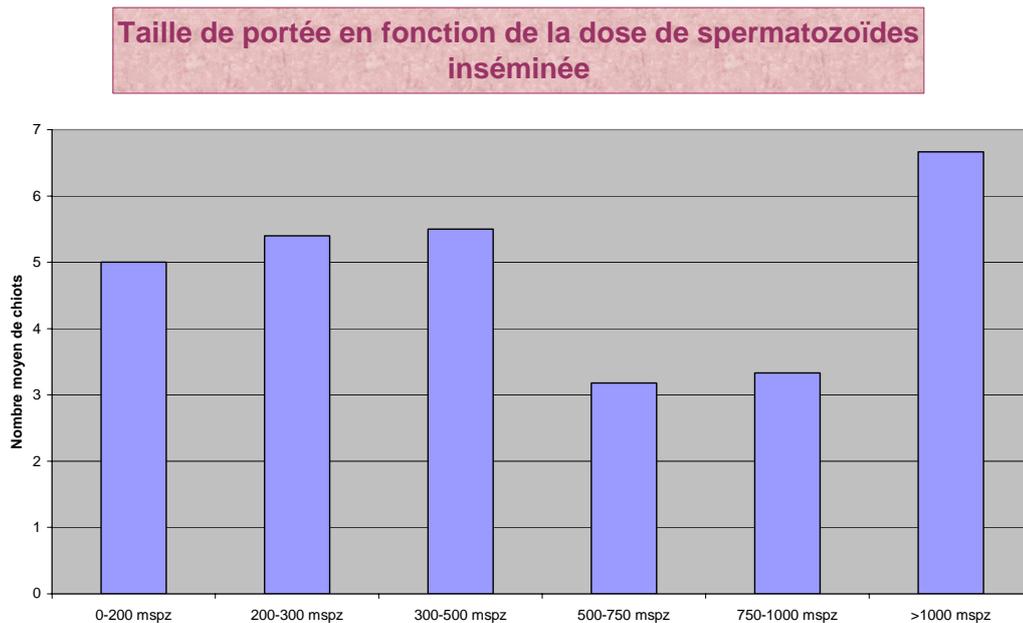
Le taux de réussite semble augmenter avec le nombre de spermatozoïdes inséminée. (cf.figure 51)

**Figure 51 :** Pourcentage de réussite en fonction de la dose de spermatozoïdes inséminée.



A l'inverse la taille de portée ne semble pas influencée par la dose de spermatozoïdes inséminée. (cf.figure 52)

**Figure 52 :** Taille de portée en fonction de la dose de spermatozoïdes inséminée.



### 3.4.3.2 Nombre de spermatozoïdes mobiles

Le nombre de spermatozoïdes mobiles fléchant par IA est :

- 171 +/- 97 millions de spz.

Le nombre total de spermatozoïdes mobiles fléchant par cycle est de :

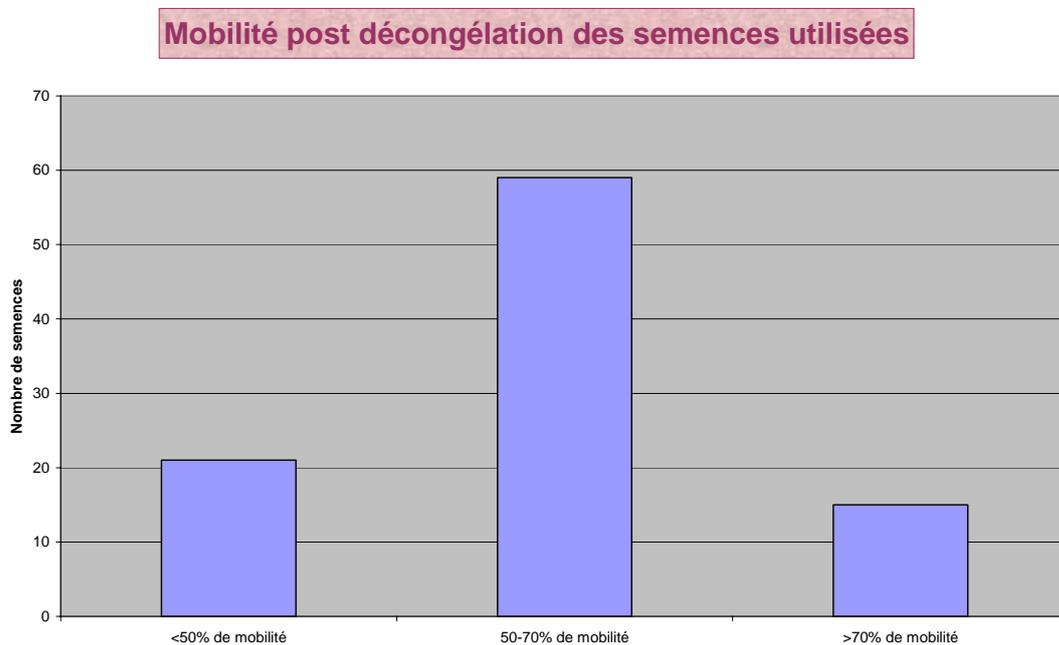
- 291 +/- 164 millions de spz.

On retrouve les mêmes résultats en s'intéressant aux spermatozoïdes mobiles fléchant que précédemment avec le nombre de spermatozoïdes totaux : En effet, le nombre de spermatozoïdes mobiles est proportionnel au nombre total de spermatozoïdes en général.

### 3.4.3.3 Mobilité des spermatozoïdes

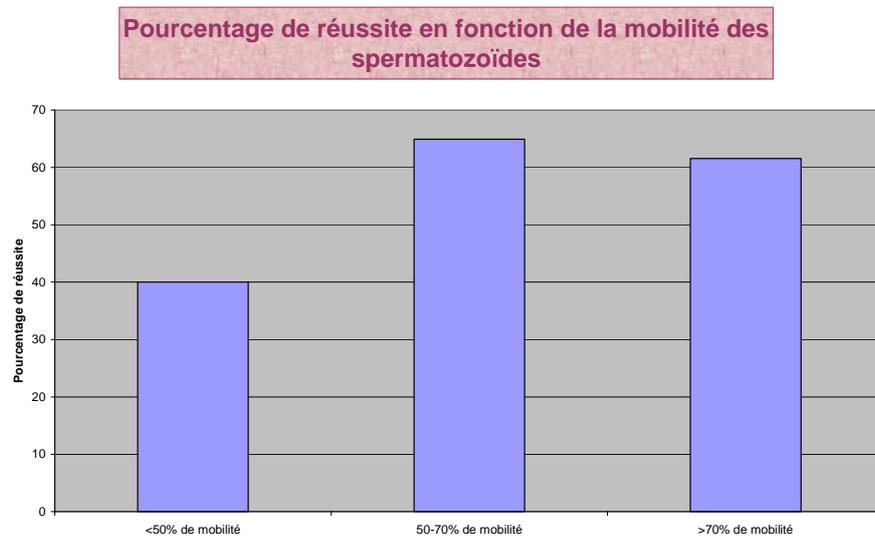
La mobilité des spermatozoïdes après décongélation est de **54,5 +/- 11,7 %**.

**Figure 53 :** Mobilité post décongélation des semences utilisées.



La mobilité des spermatozoïdes après la décongélation est convenable dans 79 % des cas (74/95), c'est-à-dire supérieure à 50% de spz mobiles après décongélation.

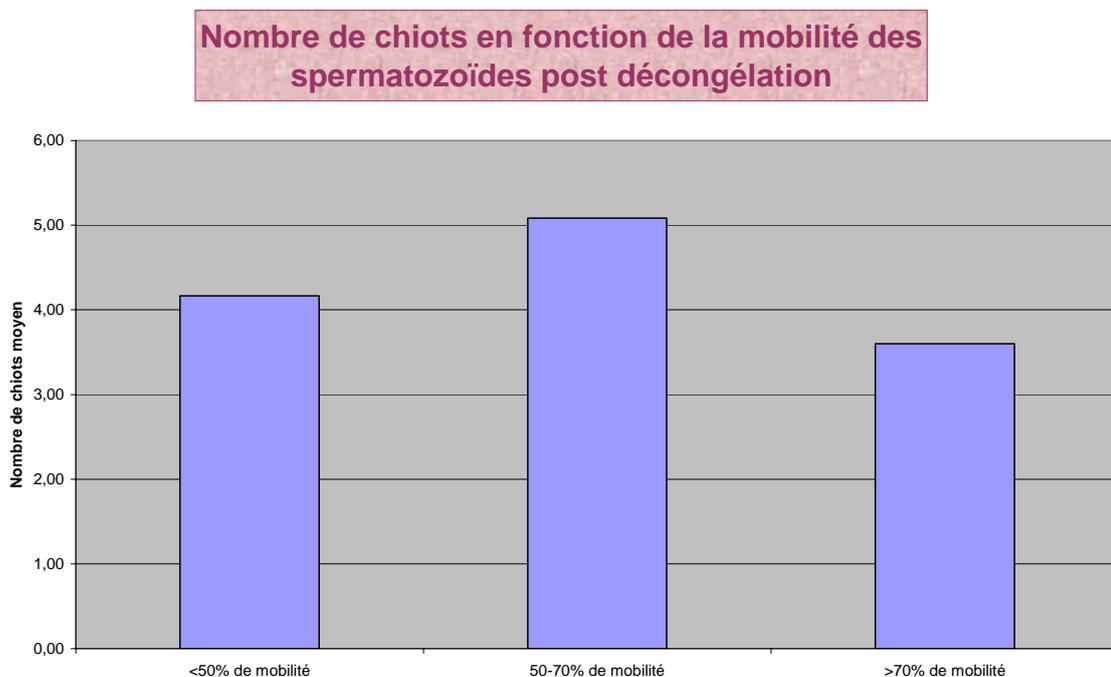
**Figure 54 :** Pourcentage de réussite en fonction de la mobilité des spermatozoïdes.



Le taux de réussite est :

- 64,7 % (46/71 chiennes) lorsque le pourcentage de mobilité post décongélation est **supérieur** à 50 %.
- 40 % (8/20 chiennes) lorsque le pourcentage de mobilité post décongélation est **inférieur** à 50 %.
- Si on étudie statistiquement cette différence, celle-ci apparaît significative avec un  $\chi^2$  égal à 3,97.

**Figure 55 :** Nombre de chiots en fonction de la mobilité des spermatozoïdes post décongélation.

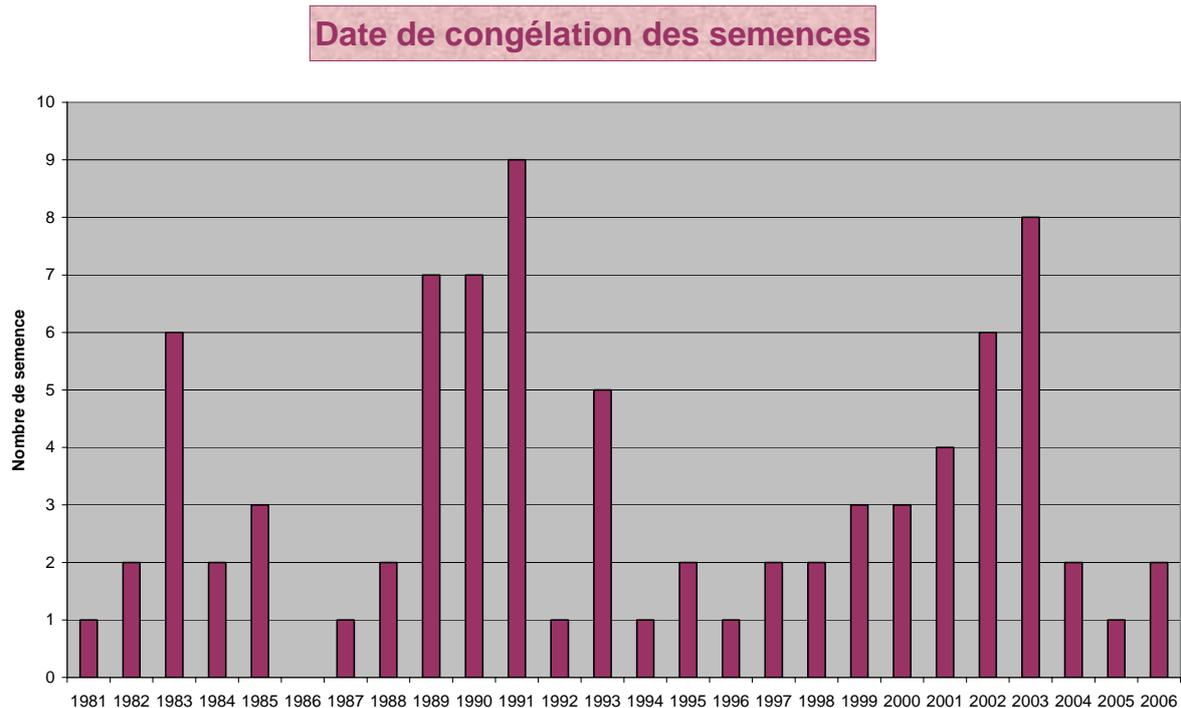


Selon la mobilité des spermatozoïdes, la taille de portée est de :

- 4,17 +/- 4,6 chiots avec une mobilité < 50 %.
- 5,08 +/- 3,2 chiots avec une mobilité entre 50-70 %.
- 3,6 +/- 2,9 chiots avec une mobilité > 70 %

### 3.4.4 Année de congélation

**Figure 56 : Date de congélation des semences.**

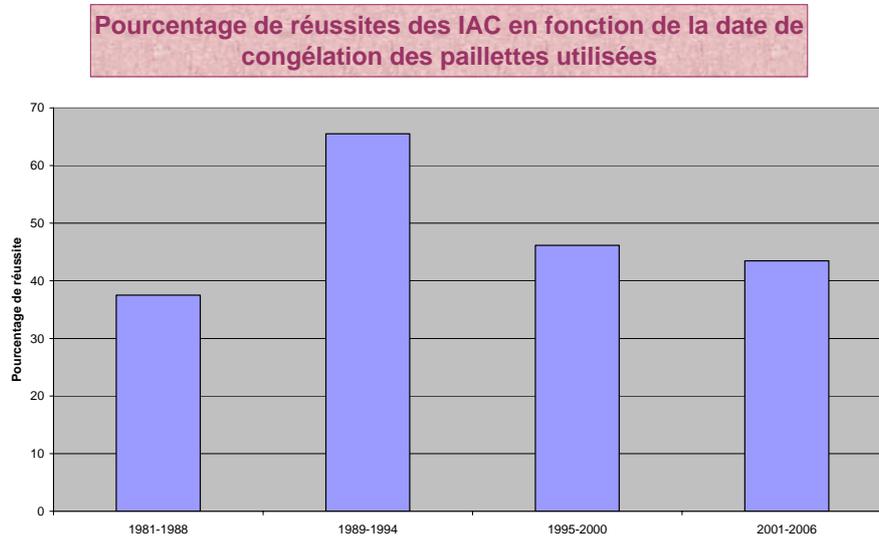


Le meilleur taux de réussite est de 65,5 % pour des semences congelées de 1989 à 1994. Sur les autres périodes, le taux de réussite est de 42,3 % en moyenne. (Cette différence n'est pas statistiquement significative  $\chi^2=1,12$ ).

Le taux de réussite est de 22% (2/9) lors de l'utilisation de paillettes congelées de 2003 à 2006. (cf.figure 57)

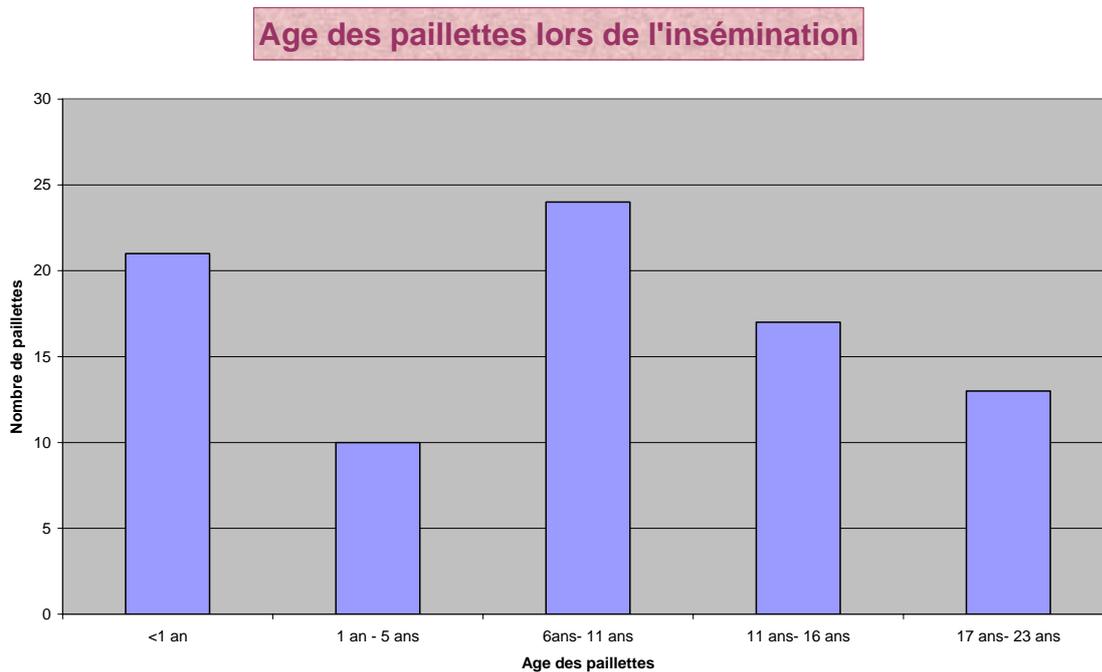
En recherchant, le taux de réussite par rapport à la date de congélation des paillettes, on vérifie qu'il n'y ait pas de variations importantes de la réussite pour une période de congélation donnée.

**Figure 57 : Pourcentage de réussites des IAC en fonction de la date de congélation des paillettes utilisées.**



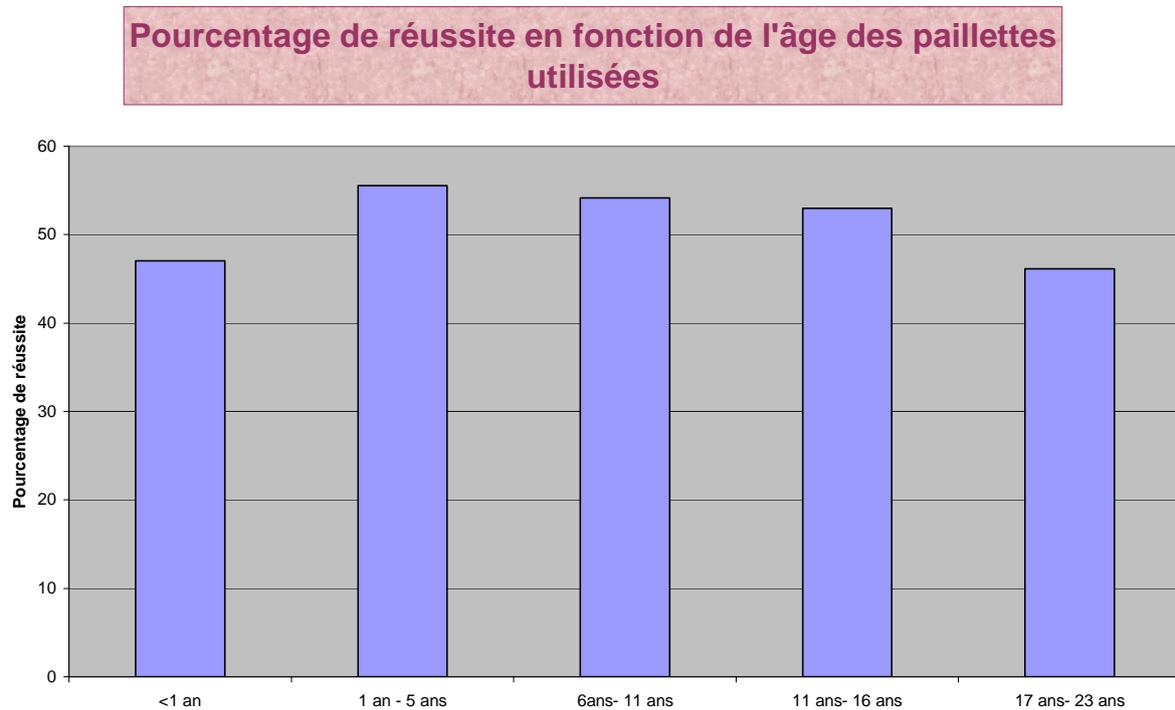
Dans la figure 58 ci-dessous, on cherche à savoir si la durée de conservation des paillettes a une influence sur leur qualité.

**Figure 58 : Durée de conservation des paillettes avant l'insémination.**



Le taux de réussite en fonction de l'âge des paillettes ne montre pas de variation importante (de 48 % à 56 % de réussite). (cf.figure 59)

**Figure 59 :** Pourcentage de réussite en fonction de l'âge des paillettes utilisées.



### 3.5 Conclusion :

Les résultats en sélectionnant certains critères sont :

- **Bonne qualité du suivi (suivi A et B) : 54 % (46/85 chiennes).**
- **Bonnes qualité de la semence (semence A et B) : 60 % (29/49 chiennes).**
- **Age de la chienne (moins de 7 ans) : 55 % (35/64 chiennes).**
- **Aucun antécédents d'infertilité connu : 52 % (47/91 chiennes).**
- **Protocole D'IAC classique (J2 et J3 après ovulation) : 70 % (23/33 chiennes).**
- **Multipares seulement : 63 % (16 :37 chiennes).**

## Troisième partie : Discussion

### 1 ECHANTILLON D'ETUDE

Le CERCA est le centre d'insémination canine ayant le plus fort recrutement en France. L'étude des dossiers du CERCA permet ainsi d'accéder à un nombre important de données concernant des inséminations artificielles en semence congelée. Cette étude porte sur 102 inséminations artificielles en semence congelée.

Cependant cet échantillon important pour l'espèce canine, n'est pas assez important pour pouvoir conclure dans tous les cas. En comparaison dans d'autres espèces comme chez les bovins, on dispose d'échantillon de plusieurs milliers d'individus permettant d'obtenir des résultats très précis.

### 2 RESULTATS

#### 2.1 Paramètres de reproduction concernant la femelle

##### 2.1.1 Fertilité

Le taux de réussite de toutes les inséminations artificielles en semence congelée pratiquées au CERCA de 2001 à 2006 est de 50,5 % (51/101 chiennes).

**Le taux de réussite dans les autres centres de reproduction français est :**

- Centre de reproduction de l'ENVN : **50 % (3/6 chiennes) de 1996 à 2000** d'après Bisson (5). (*différence non significative avec les résultats du CERCA  $\chi^2=5,0.10^{-4}$* )
- CERREC (ENVL): **66,7 % (53/80 chiennes) de 1994 à 2002** d'après Rostagnat (41). (*différence significative avec les résultats du CERCA  $\chi^2=4,53$* ).

L'étude des résultats du CERREC d'après Rostagnat (41) ne permet pas de mettre en évidence une variation de la méthode utilisée par rapport à celle du CERCA en ce qui concerne l'IAC et pouvant expliquer cette différence. En outre le Dr Fontbonne qui a réalisé la plupart des IAC de notre étude au CERCA, était au CERREC de 1994 à 2000. C'est donc lui aussi qui a réalisé la plupart de ces inséminations. La technique n'est donc pas en cause.

**Dans d'autres Pays :**

- En Suède, Linde Forstberg *et al.*, publient en 1999 (27), **un taux de réussite de 71,9 %**. (*différence significative avec les résultats du CERCA  $\chi^2=15,9$* .)
- En Afrique du Sud, Nötling *et al.* publient, en 1995 (32), **un taux de réussite 60 %** avec une technique particulière utilisant la voie intra vaginale et en répétant 5 à 6 fois les IAC. (*différence non significative avec les résultats du CERCA  $\chi^2=1,04$* )
- En Norvège, Thomassen *et al.* publient en 2006 (48): **73,1 % de réussite avec des portées de 5,7 chiots en moyenne** de 1994-2003. (*différence significative avec les résultats du CERCA  $\chi^2=21,6$* ).

Ce taux est à moduler en fonction de différents paramètres. En effet, certaines composantes extérieures à la technique du CERCA sont parfois responsables d'échec de la saillie : femelle trop âgée ou infertile, semence de mauvaise qualité, femelles référées avec un suivi de chaleur non contrôlé par le CERCA, choix et disponibilité de l'éleveur.

Le taux de réussite peut donc être corrigé en utilisant des critères de sélection, comme nous allons le voir ci-dessous.

- Il est important d'être sûr des **qualités maternelles de la femelle** (fertilité, prolificité) avant de s'engager dans une IAC, technique longue et coûteuse. Le taux de réussite est en effet de :

**• 63 % pour les multipares (16/37 chiennes).**

- De plus **la technique d'insémination** est aussi responsable de variations importantes du taux de réussite. (cf. tableau VI)

**Tableau VI : Taux de réussite en fonction de la méthode d'insémination utilisée.**

	Nombre d'IAC	Taux de réussite
Insémination Intra-utérine (méthode norvégienne)	87	53,7 % (45/83)
Insémination artificielle chirurgicale	8	12,5 % (1/8)
Insémination artificielle vaginale	1	0%
Insémination sous endoscopie	4	<b>75 % (3/4)</b>

- Si deux **inséminations sont réalisées le deuxième et le troisième jour après l'ovulation**. Le taux de réussite lorsque l'insémination est réalisée de cette manière est **de 70% (22/33 chiennes)**.
- **La répétition des IAC/ chienne** permet aussi d'améliorer le taux de réussite. (cf. Tableau VII)

**Tableau VII : Taux de réussite en fonction du nombre d'IAC pratiqués.**

Nombre IAC/ Cycle	Nombre IAC	Taux de réussite
<b>1</b>	33	<b>36,7% (11/30)</b>
<b>2</b>	57	<b>54,4% (31/54)</b>
<b>3</b>	11	<b>60,0% (6/10)</b>

La variation du taux de réussite en fonction de la date de réalisation de l'IAC est assez surprenante. On remarque en effet une baisse du taux de réussite de 2001 à 2006 avec **2 grandes périodes (différence significative :  $\chi^2_{\text{obs}}= 12,0$ )**

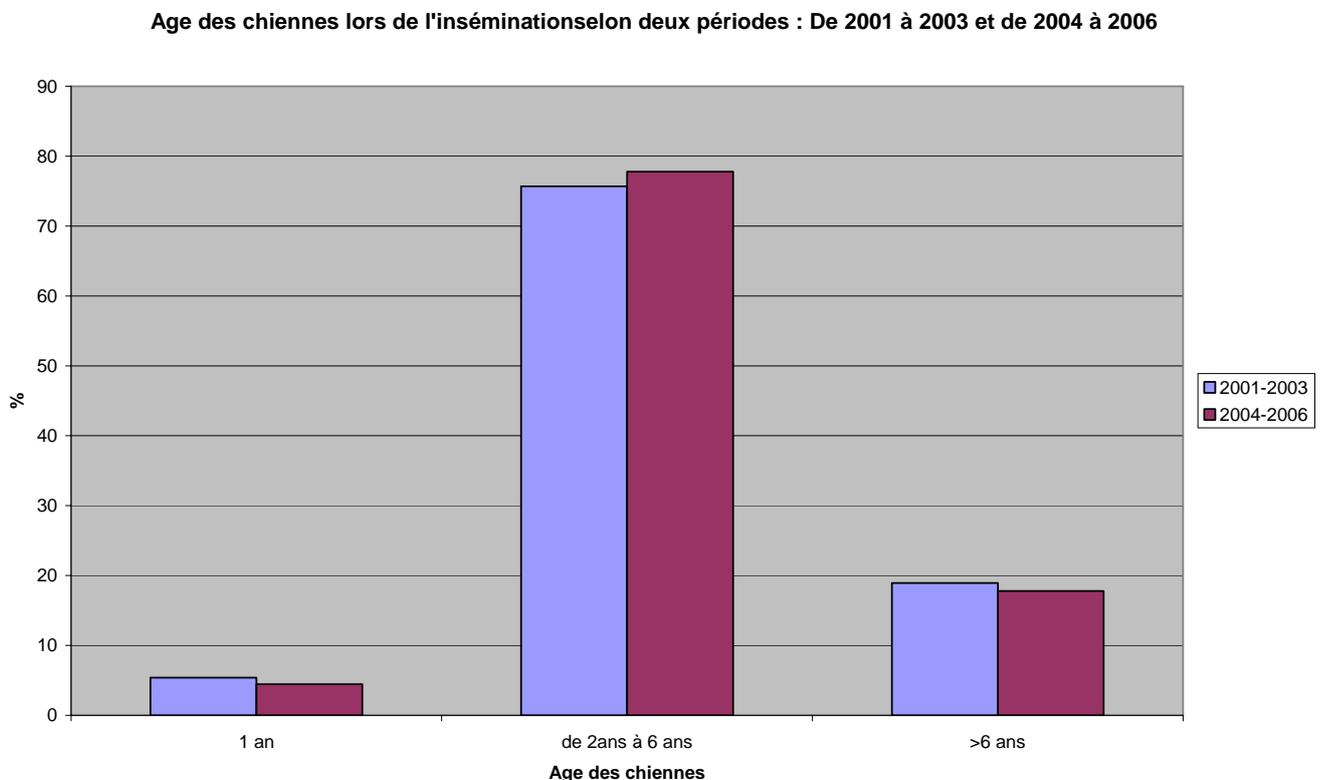
- De 2001 à 2003 : de 64 % à 77 % de réussite.
- De 2004 à 2006 : de 29 % à 40 % de réussite.

Pour expliquer ce résultat, étudions les **paramètres qui pourraient être à l'origine de cette baisse de résultats** :

- Qualité de la semence.
- Qualité du suivi.
- Age des chiennes.
- Rang de portée.
- Nombre d'IAC.
- Moment de l'insémination.
- Dose inséminante.
- Infertilité.

On ne remarque **pas de variations de l'âge moyen des chiennes** lors de l'IAC sur ces deux périodes. (cf.figure 60)

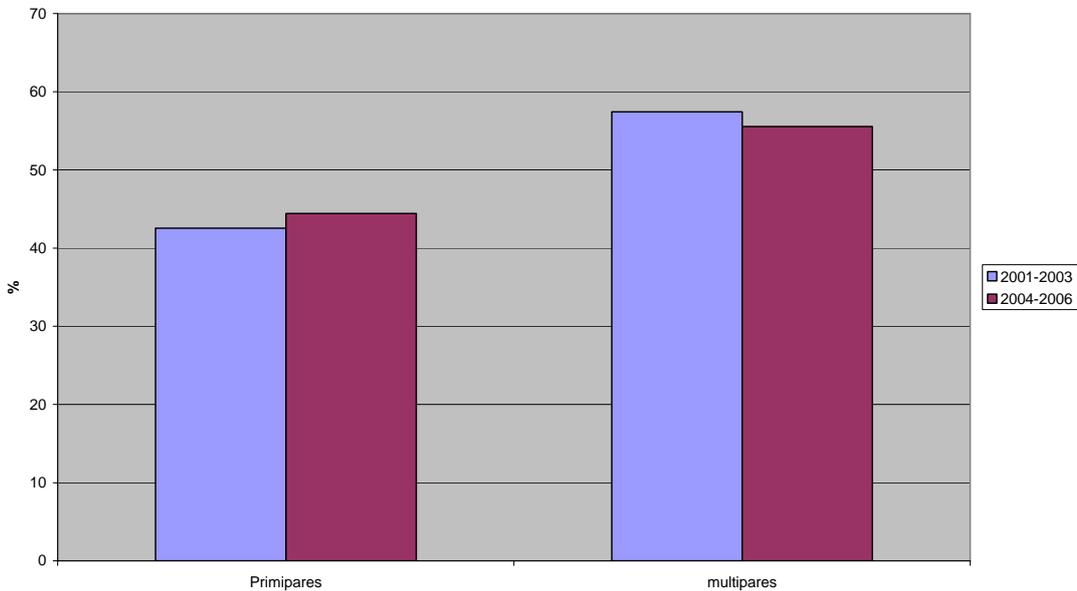
**Figure 60** : Age des chiennes lors de l'insémination selon deux périodes : De 2001 à 2003 et de 2004 à 2006.



De même le **pourcentage de primipares ne varie pas** d'une période à l'autre (cf.figure 61)

**Figure 61 : Rang de portée selon deux périodes : de 2001 à 2003 et de 2004 à 2006.**

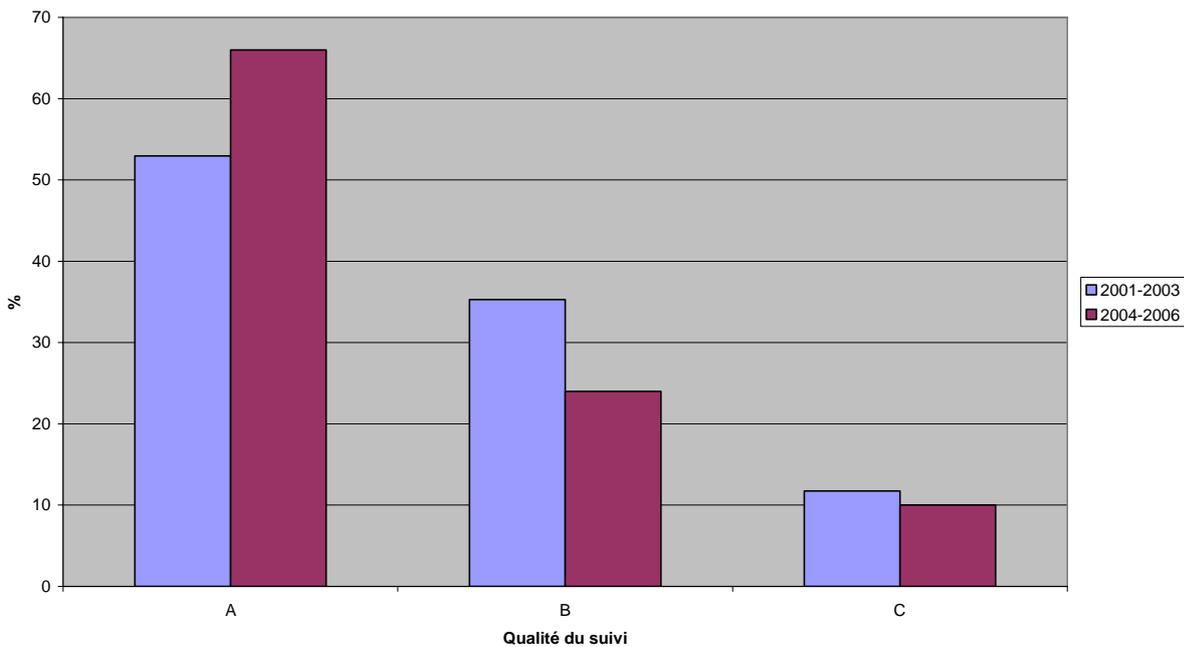
Rang de portée selon deux périodes : De 2001 à 2003 et de 2004 à 2006



Les suivis de chaleur semblent de meilleure qualité de 2004 à 2006. Ce n'est donc pas ce critère qui peut être à l'origine de la baisse des taux de réussite. (cf. figure 62)

**Figure 62 : Qualité des suivis de chaleur selon deux périodes : de 2001 à 2003 et de 2004 à 2006**

Qualité des suivis de chaleur selon deux périodes : De 2001 à 2003 et de 2004 à 2006



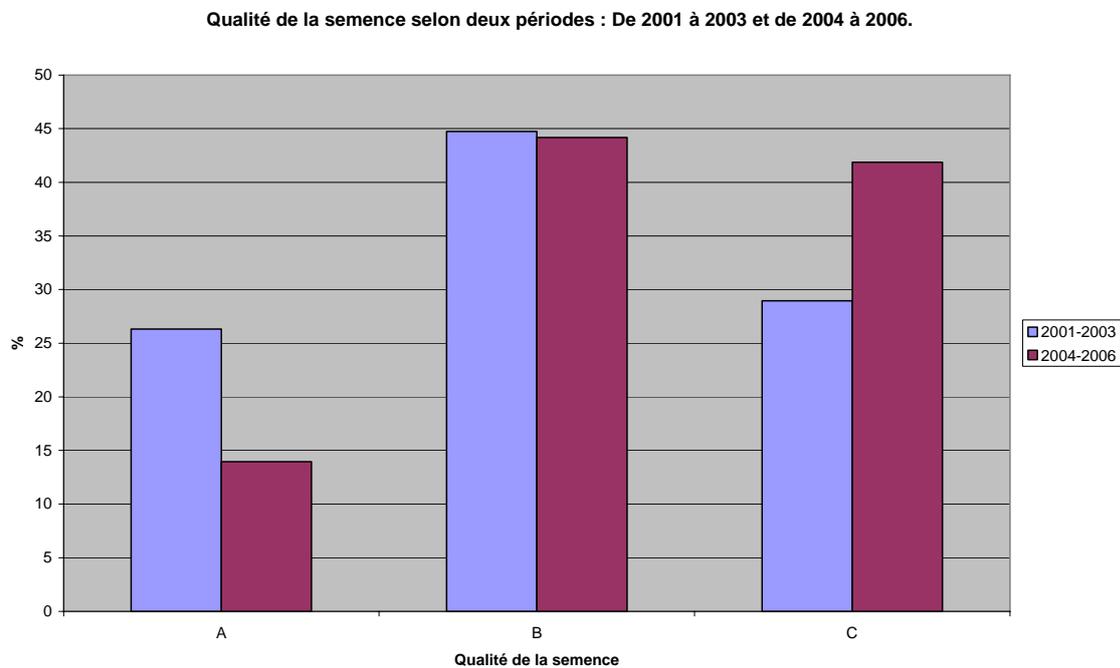
Suivi A :

- 53% des suivis (27/51) de 2001 à 2003.
- 66% des suivis (33/50) de 2004 à 2006.

*Différence non significative (Test  $\chi^2_{obs} = 1,78$ )*

Cependant on remarque qu'en général **la semence est de meilleure qualité de 2001 à 2003.** (cf.figure 63) Or, les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence une variation du taux de réussite avec la qualité de la semence (64 % de réussite avec une semence de qualité A, 56% de réussite avec une semence de qualité B, **28 % de réussite avec une semence de qualité C**). Cf. p56.

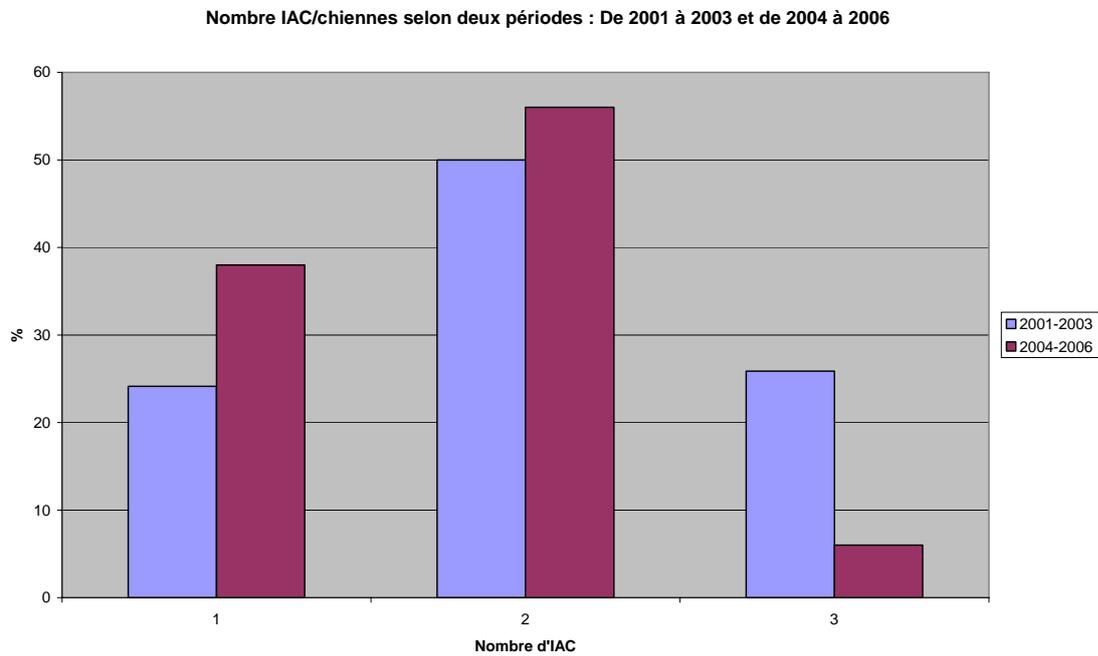
**Figure 63 :** Qualité de la semence selon deux périodes : de 2001 à 2003 et de 2004 à 2006.



*Si on s'intéresse aux semences de qualité A : la différence n'est pas significative et le  $\chi^2_{obs} = 1,94$ .*

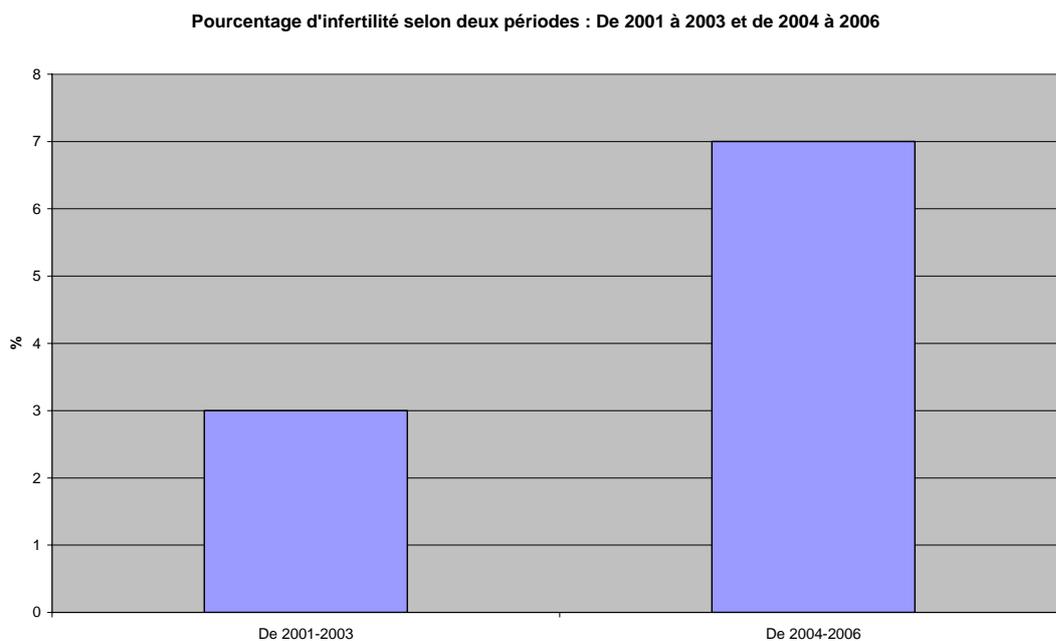
**Le nombre d'IAC par cycle est plus important de 2001 à 2003.** Or on a vu précédemment que ce facteur était responsable de la variation du taux de réussite de l'IAC (36,4 % avec 1 IAC, 54,4 % avec 2 IAC, 60 % avec 3 IAC). (cf.figure 64)

**Figure 64 :** Nombre d'IAC / chienne selon deux périodes : de 2001 à 2003 et de 2004 à 2006.



**Le nombre de chiennes infertiles de 2004 à 2006 est plus élevé.** (cf.figure 65) Cela peut être du à la **sélection des chiens** sur des critères morphologiques plutôt que reproducteur ou bien par le **choix d'une chienne par un éleveur peu sensibilisé** au fait qu'il est nécessaire de connaître le statut de sa chienne au niveau fertilité avant de s'engager dans une IAC.

**Figure 65 :** Pourcentage d'infertilité selon deux périodes : de 2001 à 2003 et de 2004 à 2006.



De plus, si on s'intéresse **au moment d'insémination**, les chiennes sont en moyenne inséminées :

- **2,55 +/- 0,45 jours post ovulation de 2001 à 2003.**
- **2,28 +/- 0,74 jours post ovulation de 2004 à 2006.**

On a donc une variation de 6 heures en moyenne. Il semble donc que **la réalisation des inséminations plus tardivement dans le cycle permet d'obtenir de meilleurs résultats.**

Depuis le début de l'année 2007, le protocole d'insémination du CERCA est de 2 inséminations à 3 jours post ovulation (protocole où les IA sont réalisées plus tardivement). Les résultats obtenus avec ce protocole semblent confirmer l'hypothèse ci-dessus, puisque le taux de réussite avec cette méthode est de 75 % (6/8 chiennes).

En se référant à la durée de gestation, on peut savoir si l'insémination a été réalisée au bon moment. La durée de gestation étant de 63 jours, on recherche un intervalle insémination-mise bas de 61 jours.

Celui-ci est ainsi :

- De 2001 à 2003 : 61,3 +/- 1,57 jours (IAC1), 60,4 +/- 1,59 jours (IAC2).
- De 2004 à 2006 : 61,7 +/- 2,45 jours (IAC1), 61,0 +/- 2,82 jours (IAC2).

Les écart-types de ces résultats sont trop élevés pour pouvoir interpréter.

En conclusion, la baisse du taux de réussite de 2004 à 2006 pourrait être due à **l'influence de 4 paramètres :**

- **La qualité de la semence.**
- **Le nombre d'IAC/chienne.**
- **L'infertilité observée.**
- **Moment de l'insémination (plus tardive de 2001 à 2003).**

Des facteurs extérieurs pourraient aussi être à l'origine de cette baisse comme par exemple :

- Un changement de la méthode de congélation ou de décongélation de la semence. Celle-ci a en effet été modifiée mais ce changement a eu lieu en 2005 et seulement quelques paillettes utilisant ce nouveau procédé de congélation ont été utilisées. Ce n'est donc pas une modification de la technique de congélation qui est à l'origine de la baisse des résultats de reproduction.
- Un changement dans la méthode de nettoyage du matériel. En effet, certains détergents peuvent être toxiques pour les spermatozoïdes. Lorsque le matériel n'est pas bien rincé, le détergent peut avoir un effet néfaste sur le spermatozoïde. Cependant, au CERCA, il n'y a pas eu de changements de la méthode de nettoyage.

En conclusion, il est donc **impératif de contrôler la qualité de la semence et de se renseigner sur le statut de la chienne au niveau infertilité.** On peut s'interroger sur une modification de la méthode d'insémination qui est actuellement de 2 IAC à 24h d'intervalle à J2 et J3 post ovulation, pour un protocole à **3 IAC plus tardivement dans le cycle.**

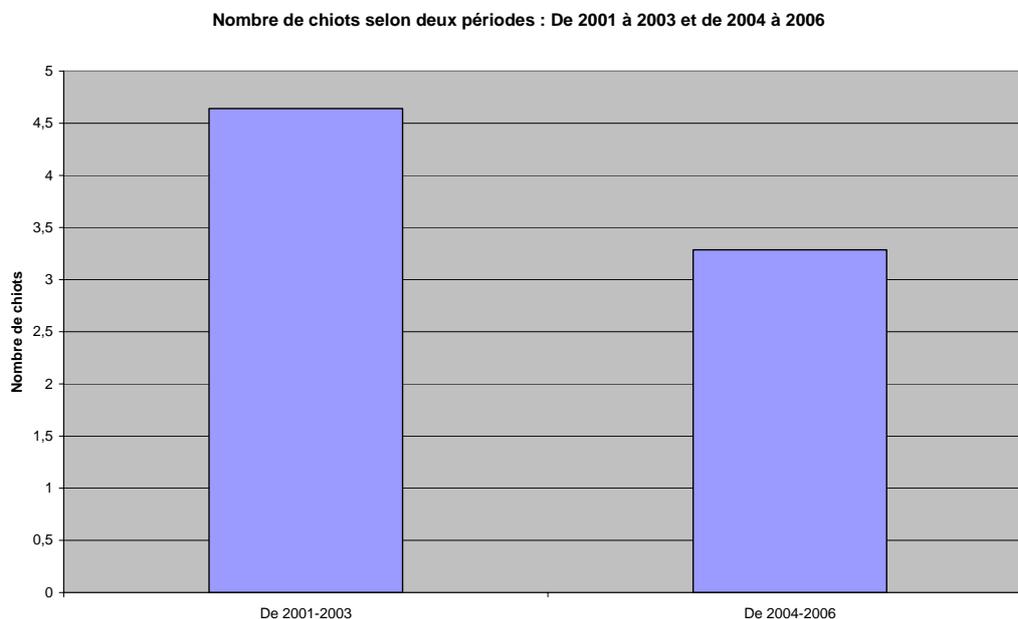
### **2.1.2 Prolificité**

Lors d'une IAC au CERCA de 2001 à 2006, on obtient une **moyenne de 4,0 chiots (+/-3,03).**

Les résultats du **CERCA de 1999 à 2000** d'après Bartolo (4) étaient de **3,4 chiots** en moyenne lors d'IAC. Le nombre de chiots par portée a donc progressé de 0,6 chiots. Cependant si on sépare les résultats selon deux périodes : De 2001 à 2003 et de 2004 à 2006, on remarque que **l'amélioration du nombre de chiots par chienne est importante de 2001 à 2003 (4,6 chiots/chienne ; +1,2 chiots/chienne)**. Mais ensuite **2004 à 2006**, le nombre de chiots diminue à **3,3 chiots** par chienne.

- Au **CERREC** : le nombre de chiot de 1994 à 2002 était de **5,3+/-2,7** en moyenne d'après Rostagnat (41).
- En **Suède**, Linde Forsberg *et al.* publient, en 1999 (27), une taille de portée moyenne de **5,0 +/-2,9 chiots**.
- En Norvège, Thomassen *et al.* publient, en 2006 (48), une taille de portée de **5,7+/-0,1 chiots**.

**Figure 66 : Nombre de chiots selon deux périodes : de 2001 à 2003 et de 2004 à 2006.**



Cette étude permet de mettre en évidence les **principaux paramètres influençant le nombre de chiots** :

- L'âge de la chienne
- Le format de la chienne
- La qualité du suivi de chaleur
- La qualité de la semence

Des **portées très nombreuses sont possibles** avec l' IAC (jusqu'à 13 chiots au CERCA), le bénéfice pour l'éleveur est alors important puisque les chiots obtenus par IAC sont généralement de très bonne qualité.

### 2.1.3 Sex ratio

Le sex ratio est de 1,28. Il y a donc en général plus de mâles que de femelles dans les portées obtenues par IAC.

#### 2.1.4 Age lors de l'insémination artificielle en semence congelée (IAC)

- Les chiennes sont âgées entre 1 an à 9 ans, en moyenne de 4,4 ans. On recommande en effet de ne **pas mettre une chienne** à la reproduction avant 2 ans (fin de la croissance) et **après 6 ans (24)**. Ainsi Thomassen *et al.* (48) obtiennent **un taux de réussite inférieur lorsque les chiennes sont âgées de plus de 6 ans : 68,2 % versus 76,9 %**.
- Les candidates à une IAC doivent en effet avoir eu **précédemment quelques portées pour vérifier qu'elles ont une bonne fertilité et prolificité**.
- L'analyse des dossiers révèle que le pourcentage de **primipares** sur l'ensemble des chiennes présentées pour IAC est de **43 %**, et que **18 % des primipares présentées pour une IAC se sont ensuite révélées infertiles** : 9 chiennes /102 ont donc été inséminées alors qu'elles étaient infertiles. Il est donc nécessaire d'attendre 1 ou 2 portées pour contrôler la fertilité avant de réaliser une IAC.
- En s'intéressant aux résultats de cette étude, on remarque une **baisse du taux de réussite après 6 ans. En moyenne, le taux de réussite après 6 ans est, en effet, de 26,7 % (4/15 chiennes)**.
- La **taille de portée diminue après 6 ans**. La mise à la reproduction de femelles de plus de 6 ans vient le plus souvent d'un choix de l'éleveur. Il est donc nécessaire de l'avertir des conséquences.
- Les **femelles de un an** ont en moyenne **3,0 +/- 1,41 chiots par portée** dans cette étude. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, il est recommandé de ne pas mettre à la reproduction les chiennes avant 2 ans.

#### 2.1.5 Influence du groupe cynophile

- Deux groupes sont particulièrement représentés : **le groupe des chiens d'arrêts (Groupe VII) et le groupe des chiens de Berger et Bouviers (Groupe I)**. L'IAC est un outil de sélection qui peut être particulièrement intéressant dans ces groupes essentiellement représentés par des **chiens de travail**.
- On ne remarque pas de variation de la fertilité entre les différents groupes cynophiles, en dehors du groupe 8 (Labrador et retriever) et du groupe 10 (Lévriers), qui ont des résultats plus élevés. Pour les lévriers, cette différence est significative. 7 IAC sur 8 ont été un succès. Les chiennes appartenaient aux races suivantes : Greyhound (1), lévrier Afghan (4), petit lévrier italien (1), saluki (1) et sloughi (1).
- Un taux de réussite de 92 % après des inséminations chirurgicales chez le greyhound a été rapporté (Boland P, communications personnelles).

#### 2.1.6 Format de la chienne

Le taux de réussite chez les chiennes de petit format est inférieur à la moyenne : 33 % de réussite au lieu de 50,5 % de réussite (échantillon d'étude faible : 6 chiennes et différence non significative).

En moyenne, les chiennes de **grand format** ont **1 à 1,5 chiots de plus**. En effet les races de grand format ont en général une taille de portée plus importante que les petites races (48).

### 2.1.7 Infertilité antérieure

Il est très important de s'intéresser à l'historique de la chienne afin de déterminer si elle est une bonne candidate à l'IAC. En effet si la chienne a connu des **problèmes d'infertilité** antérieure, le **taux de réussite** de l'insémination est de **40 %**. (*Différence non significative*).

### 2.1.8 Qualité du suivi effectué

Les suivis réalisés au CERCA sont en général très sérieux. Trois techniques complémentaires sont utilisées : frottis vaginaux, dosage de progestérone et échographie ovarienne. Généralement les suivis C correspondent à des chiennes dont les suivis ont été réalisés à l'extérieur de l'école. En effet très peu de vétérinaires sont équipés d'une machine permettant de faire des dosages qualitatifs de progestérone et utilisent des dosages quantitatifs dont la précision est trop faible pour pratiquer ensuite une IAC.

- **Suivi de qualité C** : On obtient par cette méthode un **taux de réussite de 20 %**. (*différence significative avec les suivis B*). La qualité du suivi de chaleur conditionne réellement la réussite de l'insémination.

Cependant l'apport de l'échographie associée aux dosages de progestérone, n'est pas établi dans cette étude.

- **Suivi de qualité A** : On obtient par cette méthode un **taux de réussite de 51 %**.
- **Suivi de qualité B** : On obtient par cette méthode un **taux de réussite de 61 %**.

(*Différence non significative entre les suivis de qualité A et les suivis de qualité B*)

La différence peu logique que l'on observe entre les suivis A et les suivis B peut être expliquée par un autre paramètre influençant la réussite de l'insémination : l'année de réalisation de IAC. En effet les taux de réussite de 2001 à 2003 sont plus élevés que de 2004 à 2006.

### 2.1.9 Taux de progestérone à l'insémination

En moyenne le taux de progestérone à l'insémination est de 22,0 +/- 6,9 ng/mL.

On ne remarque **pas de variation particulière du taux de progestérone s'il y a réussite ou échec de l'insémination**. De plus on remarque un **étalement des valeurs du taux de progestérone de 10 ng/mL à 40 ng/mL** lors de la réussite de l'IAC. Cela **confirme que le taux de progestérone à l'insémination n'est pas un critère fiable pour déterminer la date de l'ovulation**.

### 2.1.10 Durée de gestation

La durée de gestation théorique est de 63 jours post ovulation. Si on considère que la maturation de l'ovocyte demande 48 h, une durée de gestation de 61 jours permet de savoir si l'évaluation de la date d'ovulation était correcte.

La durée de gestation est :

- 61,5 +/- 1,8 jours par rapport à l'IAC1
- 60,6 +/- 1,9 jours par rapport à l'IAC2

Ces résultats sont compatibles avec les recommandations ci-dessus (61 jours de gestation). Cependant la précision de ces résultats pourrait être améliorée par l'étude d'un échantillon plus important. L'écart type serait alors diminué.

Ces résultats sont comparables aux publications d'autres centres européens :

Pour Thomassen *et al.* (48), la durée de gestation est de 61 jours par rapport à la première insémination et 60 jours par rapport à la dernière.

Linde Forsberg *et al.* (27) obtiennent 61,9 +/- 2,4 jours (première IAC) et 60,1 +/- 1,9 jours (deuxième IAC).

Si le suivi de l'ovulation utilise **l'échographie ovarienne**, la durée de gestation est de :

- 60,5 jours +/- 1,3 jours, l'IAC est alors pratiquée 1,7 +/- 0,79 jours post ovulation.

Si le suivi de l'ovulation n'utilise pas l'échographie ovarienne, la durée de gestation est de :

- 61,6 +/- 1,9 jours, l'IAC est alors pratiquée 2,1 +/- 0,76 jours.

On peut donc penser que les inséminations ont lieu en général plus tôt dans le cycle depuis l'utilisation de l'échographie ovarienne

- Les résultats ne sont pas assez précis pour pouvoir conclure.

Les spermatozoïdes décongelés vivent en général 12 à 48 heures dans les voies génitales femelles (9). Le moment d'insémination optimal est donc assez court et demande donc une détection de l'ovulation très précise.

### 2.1.11 Réalisation d'un diagnostic de gestation

30,6 % des IAC sont suivis d'un diagnostic de gestation par échographie. Ce pourcentage est assez faible. En effet la clientèle du CERCA est souvent référée par d'autres vétérinaires qui assureront le suivi des IAC. De plus, sans diagnostic de gestation, des chiennes ont pu être considérées comme non gestantes alors qu'en réalité elles ont eu un arrêt précoce de la gestation.

## 2.2 Paramètre concernant l'IAC

### 2.2.1 Type d'insémination

**Tableau VIII :** Importance de la technique d'insémination.

	Nombre d'IAC	Taux de réussite	Taille de portée	Sex ratio	Commentaires
<b>Insémination Intra-utérine (méthode norvégienne)</b>	<b>87</b>	<b>53,7%</b> <b>(45/83)</b>	<b>4,37</b> <b>(+/- 3,5)</b>	<b>1,25</b>	<b>La majorité des inséminations réalisées au CERCA ont utilisé cette technique. Fiable et facile à mettre en œuvre, elle est à recommander pour les vétérinaires qui ne possèdent pas d'endoscope.</b>
<b>Insémination artificielle chirurgicale</b>	<b>8</b>	<b>12,5%</b> <b>(1/8)</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>Cette technique est rarement utilisée, seulement dans le cas de semences de très mauvaise qualité. Elle est en effet discutable au niveau éthique.</b>
<b>Insémination artificielle vaginale</b>	<b>1</b>	<b>0%</b> <b>(0/1)</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>Ce type d'insémination est proscrit car elle donne de mauvais résultats lors d'IAC.</b>
<b>Insémination sous endoscopie</b>	<b>4</b>	<b>75%</b> <b>(3/4)</b>	<b>4</b> <b>(+/-3,6)</b>	<b>1</b>	<b>Cette technique facile à mettre en œuvre nécessite toutefois l'acquisition d'un endoscope. C'est une nouvelle technique de plus en plus utilisée au CERCA</b>

- La **technique d'insémination semble donc avoir beaucoup d'importance** : en effet une insémination en semence congelée doit préférentiellement être réalisée en **intra-utérine**. Le taux de réussite lors d'IAC intra-utérine est de 75 % d'après Thomassen *et al.* (49), 84,4 % d'après Linde-Forsberg *et al.* (27).
- Cette étude ne nous permet pas d'évaluer avec précision l'efficacité des inséminations par laparotomie. Silva et Versteegen (45) obtiennent un taux de 60 % (3/5 chiennes).

### 2.2.2 Moment de l'insémination

Le protocole utilisé au CERCA (**2 inséminations à 24 heures d'intervalle entre 48 heures minimum après l'ovulation et 72h après ovulation**) donne actuellement de bons résultats. En effet lorsque ce protocole est correctement suivi le **taux de réussite est très convenable (70 % 23/33)**. Cependant la variation des résultats entre un protocole d'insémination à J1 et J2 et un protocole d'insémination à **J2 et J3 ne montre pas de différence significative dans cette étude**.

Thomassen *et al.* (49) préconise ainsi d'inséminer des femelles de moins de 6 ans avec de la semence de bonne qualité appartenant à un mâle de moins de 8 ans, J2 et J3 post ovulation.

De plus il semble que **l'insémination à J3 post ovulation soit la plus importante du protocole** :

- Dans le cas où une seule insémination a été réalisée, les résultats sont de 83 % de réussite à J3 (5 chiennes sur 6).
- Le taux de réussite est significativement différent entre une seule insémination à J2 et une seule insémination à J3.

A l'inverse **l'insémination à J2 post ovulation semble un peu précoce** :

- Dans le cas où une seule insémination a été réalisée, le taux de réussite est de 30 % de réussite à J2 (6 chiennes/20).
- Lorsque celle-ci est réalisée à J1 et J2 post ovulation :
  - le taux de réussite est de 33 % (2 chiennes/ 6)

Au vu de ces résultats, on peut se demander **si la maturation des ovocytes ne nécessiterait peut être pas plus de 48 heures. Selon Reynaud *et al.* (38), après l'ovulation il faut en moyenne de 48 à 54 heures avant l'apparition d'ovocyte en métaphase II.**

Il semble donc **intéressant de tester un nouveau protocole avec des inséminations plus tardives dans le cycle.**

### 2.2.3 Nombre d'IAC

**Avec 2 ou 3 IAC par chiennes, le taux de réussite est plus élevé qu'avec une seule IAC.** Les enjeux d'une IAC étant assez important en général, il pourrait être intéressant de mettre au point un protocole utilisant 3 inséminations. Dans tout les cas, il est impératif de pratiquer au moins 2 IAC.

Thomassen *et al.* (48) constatent aussi cette variation. Avec une seule IAC, il obtient un taux de réussite de 70,5 % contre 78,1 % avec 2 IAC.

Linde-Forsberg *et al.* (27), en utilisant la technique par cathétérisme du col utérin, obtiennent un taux de réussite avec une seule insémination de 84,3 % contre 91,3 % avec 3 IAC. De plus, avec 2,1 +/- 0,9 IAC/chienne en moyenne, Le nombre d'inséminations réalisées par cycle est plus important qu'au Cerca (1,7 IA/cycle au CERCA).

Au CERCA, les protocoles à 3 inséminations utilisent à chaque insémination au moins 150 millions de spermatozoïdes. Un protocole à 3 IAC serait plus onéreux (consommation d'une dose plus importante de semence, coût du vétérinaire). Cependant lors de la réussite d'une IAC, les bénéfices pour l'éleveur peuvent largement justifier cet investissement.

#### 2.2.4 Année de réalisation de l'insémination

Le **nombre d'IAC pratiquées au CERCA a tendance à diminuer depuis 2003**. Certains éleveurs joints au téléphone ont montré une déception importante lors de l'échec d'une IAC sur une de leur chienne. En effet, la réalisation d'une IAC nécessite un investissement financier important qui lors d'**échec est difficile à supporter**.

Les éleveurs n'ont en effet pas tous à l'esprit que l'IAC n'est pas une technique fiable à 100 % et qu'il existe en général plus de 30 % d'échec.

#### 2.2.5 Difficultés

Il y a eu pour 6,9 % des chiennes (7/101) des difficultés d'inséminations. Le plus souvent, le passage du col avec la sonde norvégienne était difficile. Avec **l'utilisation de l'endoscopie**, on peut espérer diminuer ce pourcentage de difficultés. Il est important de se préparer bien à l'avance lors d'une IAC et **d'anticiper les principales difficultés pouvant être rencontrées**. En effet, la manipulation de la semence congelée est très délicate. **Dans cette étude, toutes les chiennes pour lesquelles il y a eu une difficulté lors de l'insémination sont restées vides.**

#### 2.2.6 Reflux

On obtient un taux de réussite de 61,5 % lors de l'existence d'un reflux et 54,1 % sans reflux ( $\chi^2=0,24$ )

Le volume inséminé est un peu plus grand et donc la dose inséminante est plus importante lors de l'existence d'un reflux.  $V= 3,6 \pm 1,3$  mL lors de l'existence d'un reflux et  $V= 3,4 \pm 1,2$  mL sans reflux

#### 2.2.7 Tranquillisation

Le taux de réussite semble meilleur lors du recours à une tranquillisation à la xylazine (*différence non significative*). Il est en effet important de déposer la semence dans l'utérus. Sur une chienne tranquilisée, cette étape est plus aisée. Ceci semble en contradiction avec l'hypothèse de Buff *et al.*, (données personnelles), selon laquelle la xylazine aurait une action néfaste sur la réussite des inséminations.

### 2.3 Paramètre concernant la semence

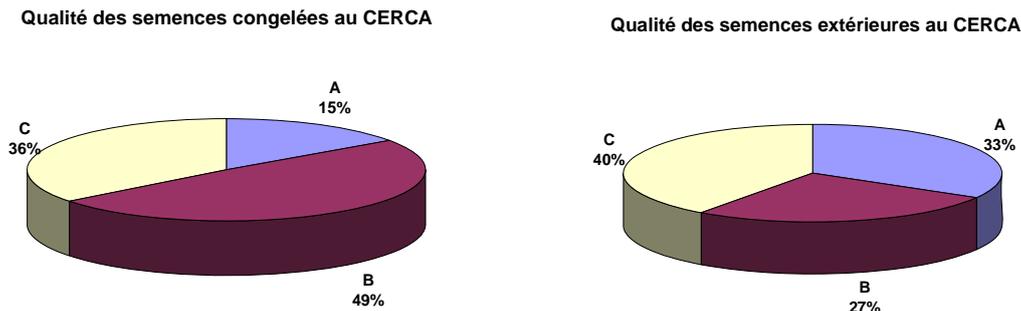
#### 2.3.1 Provenance de la semence

**20 % des semences** proviennent d'un **autre centre d'insémination** que le CERCA.

Le taux de réussite entre les inséminations réalisées avec de la semence en provenance de l'étranger est de **66,7 %** (10/15 chiennes) contre 47,7 % (41/86) avec de la semence venant du CERCA (*Différence non significative*).

L'étude comparative de la qualité des semences en fonction de leur provenance (cf.figure 67) montre qu'effectivement **le pourcentage de semence de très bonne qualité (qualité A) est plus important lorsque la semence provient de l'extérieur**. ( $\chi^2_{obs} = 2,55$  différence non significative)

**Figure 67 : Comparaison des qualités des semences selon leur provenance.**



La qualité de la semence dépend de différents facteurs. Pour expliquer cette différence, la technique de congélation peut être mise en cause.

### 2.3.2 Type de conditionnement de la semence : paillettes / pellets

Les pellets sont utilisés le plus souvent pour des semences provenant des Etats Unis.

Le taux de réussite semble meilleur avec les pellets (60,0 % 3/5 chiennes) au lieu de 49,3% (44/90 chiennes) avec des paillettes. Cependant cela correspond au cas de seulement 5 IAC et la différence n'est pas significative.

### 2.3.3 Qualité de la semence

Le pourcentage de semences de **mauvaise qualité** utilisé pour des IAC est de **36 %**, ce qui est trop élevé. En effet le taux de réussite (significativement différent dans cette étude) et le nombre de chiots chutent avec la qualité de la semence. Il est donc **primordial de se renseigner sur la qualité de la semence avant l'IAC**.

Thomassen *et al.* (48) augmentent la dose de spermatozoïdes inséminés lorsque le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est < 50 % ou si le nombre de spermatozoïdes anormaux est >20 %.

#### 2.3.3.1 Le nombre de spermatozoïdes

Le nombre de spermatozoïdes mobiles par IA est :

- 171 +/- 97 millions de spz.

Le nombre total de spermatozoïdes mobiles par cycle est de :

- 291 +/- 164 millions de spz.

On remarque une **augmentation du taux de réussite avec la dose de spermatozoïdes inséminés**. Si on en a la possibilité, il est intéressant de d'augmenter cette dose pour améliorer le taux de réussite.

Linde Forsberg *et al.* (27) constatent de même une augmentation du taux de réussite mais aussi du nombre de chiots avec la dose de spermatozoïdes inséminée.

### 2.3.3.2 Mobilité des spermatozoïdes

On remarque qu'une **mobilité des spermatozoïdes après décongélation inférieure à 50 % entraîne une baisse des résultats de reproduction (différence significative)**. A l'opposé, on n'observe pas d'augmentation de ces résultats lorsque ce seuil est dépassé.

En croisant **2 critères de sélection : une bonne qualité de semence (semence A), et un suivi de chaleur précis (suivi A) :**

- le taux de réussite est **de 77 % (7/9 chiennes)**.

## 2.4 La communication autour de l'IAC

Il est important de **bien expliquer aux éleveurs le principe**, les **enjeux** et les **limites** de l'IAC.

Cette information doit être réalisée **avant chaque IAC** mais aussi **lors de la congélation** d'une semence.

En effet, lors de la collecte de données auprès des éleveurs pour cette étude, ceux pour qui l'IAC n'avait pas été un succès, étaient très contrariés et pensaient que la responsabilité revenait au CERCA. Il faut comprendre qu'une IAC représente en effet un **investissement important de l'éleveur pouvant expliquer son ressentiment lors d'un échec**.

Cependant, il faut savoir qu'un client mécontent se plaint en moyenne à 7 personnes différentes, alors qu'un client satisfait n'en parlera qu'à 3 (7). Il faut donc éviter ce genre de situation en expliquant au préalable aux clients les difficultés pouvant être rencontrées lors d'une IAC. On pourrait par exemple **mettre en place une brochure d'information pour les éleveurs intéressés**.

# Conclusion

L'insémination en semence congelée (IAC), utilisée de manière raisonnée, est un **outil très efficace de sélection et d'amélioration génétique**.

La conduite d'une IAC nécessite une **rigueur absolue**. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, un contrôle des qualités de reproduction de la femelle, du suivi de chaleur, et de la qualité de la semence permet d'améliorer les résultats. Ainsi:

- Les **qualités de reproduction de la femelle** doivent être vérifiées : fertilité, âge (de 2 à 6 ans), nombre de chiots par portée.
- Le **suivi de chaleurs** doit déterminer de manière précise le moment de l'ovulation. La précision de cette évaluation devant se faire à quelques heures près. L'IA doit se faire au minimum 2,5 à 3 jours après l'ovulation.
- La **qualité de la semence** utilisée a une influence manifeste sur la réussite de l'IAC. Il est donc nécessaire de se renseigner sur celle-ci avant de pratiquer l'IAC.

**Le taux de réussite du CERCA en IAC est de 50,5 %** ce qui est inférieur à la plupart des autres centres d'inséminations canines mondiaux.

Ce résultat peut être expliqué par la réalisation des IAC trop précocement dans le cycle : En effet, au vu de cette étude, et comme nous avons pu le noter aussi dans la littérature, les chiennes semblent **plus fertiles à J3 qu'à J2**.

Cette étude a montré une **baisse des résultats de reproduction de 2004 à 2006**. Durant cette période, 3 paramètres de reproduction sont en effet différents de 2001 à 2003 : La qualité de semence, le nombre d'IAC/chienne, et le nombre de femelles infertiles inséminées. Enfin on remarque que les inséminations étaient en général réalisées plus tardivement dans le cycle de 2001 à 2003.

Le nombre d'IAC ainsi que la dose de spermatozoïdes inséminés semble augmenter le taux de réussite. Sur les croisements dont l'enjeu est important, il peut donc être intéressant de répéter les IAC.

Beaucoup de paramètres influent sur la réussite de l'IAC dont certains ne sont pas contrôlables par le centre de reproduction.

- *Semence de mauvaise qualité.*
- *Suivi de chaleur non réalisé au CERCA.*
- *Qualité de la reproductrice.*
- *Choix et disponibilité de l'éleveur.*

Il est donc nécessaire de contrôler ses paramètres par une anamnèse complète de la chienne. Une hospitalisation pendant les chaleurs permet aussi un suivi de chaleurs précis sans contrainte pour l'éleveur et le clinicien.

La **communication avec les éleveurs doit d'ailleurs être renforcée** afin de les avertir des limites de l'IAC et d'éviter le mécontentement de son client face à un éventuel échec.

A l'avenir, la **technique d'insémination par endoscopie semble prometteuse** : les premiers résultats sont satisfaisants et elle permet, par la vidéo, de montrer le bon déroulement de l'acte à l'éleveur (passage du col).

# Bibliographie

- (1) BADINAND F., FONTBONNE A., ADOUE C. Préparation, conditionnement, conservation et utilisation de la semence du chien en insémination artificielle. *Elevage et insémination*, 1990, **239**, 3-15.
- (2) BADINAND F., FONTAINE J.J., MOGGIA S., PERROS. Alterations of acrosome and membranes of dog spermatozoa during freezing and thawing. In: *Advances in dog, cat, and exotic carnivore reproduction*. Oslo, Norway, 29 June- 1 July, 2000, 86.
- (3) BADINAND F., PETIT C. Quels résultats attendre de la reproduction assistée chez la chienne ? *Recueil de médecine Vétérinaire. Spécial reproduction canine*, 1998, **174**, 153-161.
- (4) BARTOLO J. *Contribution à l'étude de la reproduction chez la chienne : Analyse des dossiers des chiennes suivies au centre d'étude en reproduction des carnivores de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort de 1999 à 2002*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2004, n°59.
- (5) BISSON C. *Insémination artificielle canine : premiers résultats nantais*. Thèse Méd. Vét., Nantes, 2002, n°64.
- (6) CATHENOZ L., MARSAN C. *Contribution à l'étude de la reproduction chez la chienne : analyse des dossiers des chiennes suivies au centre d'étude en reproduction assistée de l'école nationale vétérinaire d'Alfort de 1990 à 1993*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 1996, n°38.
- (7) CLERFEUILLE F. Difficultés diagnostiques de la typologie du client et thérapeutique de satisfaction. *Comptes-rendus scientifiques congrès AFVAC*. 2006, 93-94.
- (8) CONCANNON P. W., ENGLAND G., VERSTEGEN J., LINDE FORSBERG C. Determination of the optimal breeding time in the bitch : basic considerations. *Recent advances in small animal reproduction*. IVIS, 8 juin 2002.
- (9) CONCANNON P.W., McCANN J.P., TEMPLE M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod. Fertil. Suppl.* 1989, **39**, 3-25.
- (10) DOUCET F., VANNIMENUS C. *Contribution à l'étude de la reproduction chez la chienne : Analyse des dossiers des chiennes suivies au Centre d' Etude en Reproduction Canine Assistée de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort de 1994 à 1998*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2001, n°38.
- (11) ENGLAND G.C.W., BURGESS C.M., FREEMAN S.L., SMITH S.C., PACEY A.A. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. *Theriogenology*. 2006, **66**, 1410-1418.
- (12) FARSTAD W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 2000, **53**, 175-186.
- (13) FARSTAD W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Animal Reproduction Science*, 2000, **60-61**, 375-387.
- (14) FONTBONNE A. *Contribution à l'étude de la congélation du sperme de chien: influence de la glycérolisation et de la dilution*. Thèse Med.Vet. Alfort, 1991. 58-59.
- (15) FONTBONNE A. *Détermination du moment de l'ovulation de la chienne*. Polycopié. Ecole Nationale vétérinaire d'Alfort, Unité de Reproduction animale. 2006, 19p

- (16) FONTBONNE A. *L'insémination artificielle chez la chienne*. Polycopié. Ecole Nationale vétérinaire d'Alfort, Unité de Reproduction animale. 2006, 16p
- (17) FONTBONNE A. Utilisation de la mesure du taux de progestérone plasmatique pour la détermination de la période optimale de fécondabilité chez la chienne. *Conférence du congrès CNVSP*. 1992, 121-130, CNVSPA, Paris.
- (18) FONTBONNE A., BADINAND F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *J.Reprod. fert., Suppl.* 1993, **47**, 325-327.
- (19) FONTBONNE A., BUFF S., LEPERCQ M.F., GUERIN P., GARNIER F. Artificial insemination with frozen semen in the bitch: influence of progesterone level, inseminating dose and number of inseminations performed in the same bitch. In: *Advances in dog, cat, and exotic carnivore reproduction*. Oslo, Norway, 29 June- 1 July, 2000, 58.
- (20) GUERIN C., PETIT C., BADINAND F., Fécondité chez la chienne après saillie ou insémination artificielle. *Point vétérinaire* 1996-1997, **28**, 52-56.
- (21) GUILLONNEAU C. *Xylazine et insemination artificielle par voie intra uterine*. Thèse Méd. Vet.2002. Nantes n°88.
- (22) HORI T., HAGIUDA K., KAWAKAMI E., TSUTSUI T. Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs. *Theriogenology*, 2005, **63**, 1573-1583.
- (23) HORI T., ICHIKAWA M., KAWAKAMI E., TSUTSUI T. Artificial insemination of frozen epididymal sperm in beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 2004, **66**, 37-41.
- (24) JOHNSTON S.D. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, 2001, **4**, 61-65.
- (25) LEBLANC B. *Amélioration des techniques de congélation du sperme de chien en vue d'une utilisation au Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores*. Thèse Méd. Vét., 2004, n°102.
- (26) LECHEF O. *L'insémination artificielle à l'aide de sperme congelée dans l'espèce canine. Etude bibliographique*. Thèse Méd. Vét., Nantes, 1989, n°111.
- (27) LINDE-FORSBERG C., STRÖM HOLST B. AND GOVETTE G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology* 1999 **52**, 11-23.
- (28) MARSELOO N., FONTBONNE A., BASSU G., RIVIERE., LEBLANC B., RAULT D., BOURGE V., CHASTANT-MAILLARD S. Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches. *5<sup>th</sup> International symposium on canine and feline reproduction "Basic an applied research on domestic, exotic and endangered carnivores"*. 4 au 6<sup>th</sup> August 2004. **8**, 75-77.
- (29) MIMOUNI P., DUMON C. *Vade-Mecum de pathologie de la reproduction chez le chien*. Editions MED COM, 2005.
- (30) NAAKE D.E. et al. *Arthur's veterinary reproduction an obstetrics*. Eight ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001, **31**, 751-777.
- (31) NIZANSKI W. Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: Use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology*, 2006, **66**, 470-483.

- (32) NOTHLING J.O., GERSTENBERG C., VOLKMANN D.H. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen--a retrospective study. *J S Afr Vet Assoc.* 1995 Jun; **66**(2):49-55.
- (33) NOTHLING J.O., SHUTTLEWORTH R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology*, 2005, **63**, 1469-1480.
- (34) NOTHLING J.O., GERBER D., COLENBRANDER B., DIJKSTRA M., BAKKER T., DE CRAMER K. The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in biladyl with Equex STM paste or Andromed. *Theriogenology*, 2007, **67**(2), 264-75.
- (35) NOTHLING J.O., SHUTTLEWORTH R., DE HASS K., THOMPSON P.N. Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. *Theriogenology*, 2005, **64**, 975-991.
- (36) PLATZ C.C., SEAGER S.W. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Lab. Anim. Sci.*, 1977, **27**, 1013-1016.
- (37) PENA A., LINDE-FORSTBERG C. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 2000, **54**, 703-718.
- (38) REYNAUD K., FONTBONNE A., MARSELOO N., VIARIS DE LESEGNO C., SAINT DIZIER M., CHASTANT MAILLARD S. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis : a review. . *Theriogenology*. 2006, **66**, 1685-1693.
- (39) REYNAUD K., FONTBONNE A., MARSELOO N., THOUMIRE S., CHEBROUT M., VIARIS DE LESEGNO C., CHASTANT MAILLARD S. In vivo meiotic resumption, fertilisation and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*. 2005, **130**, 193-201.
- (40) RIJSSELAERE T., VAN SOOM A., VAN CRUCHTEN S., CORYN M., GORTZ K., MAES D., KRUIF A. Sperm distribution in the génital tract of the bitch following artificial insemination in relation to the time of ovulation. *Reproduction*. 2004, **128**, 801-811.
- (41) ROSTAGNAT L. *Contribution à l'étude de l'insémination artificielle dans l'espèce canine: Analyse des dossiers du Centre d'Etude et de Recherche en Reproduction et en Elevage des Carnivores*. Thèse Méd. Vét., Lyon, 2003, n°25.
- (42) ROTA A., IGUER-OUADA M., VERSTEGEN J., LINDE-FORSBERG C. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, 1999, **51**, 1045-1058.
- (43) ROTA A. Frozen canine semen. *Proceedings of the EVSSAR annual meeting, milano. 2001*, 66-81.
- (44) SHIMASU Y., YUZAWA H., ARUGA K., NAKURA M. Artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in dogs. *Veterinary record*, 2003, **153**, 369.
- (45) SILVA L.D.M., VERSTEGEN J.P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 1995, **44**, 571-579.

- (46) SIRIVAIDYAPONG S., URSEM P., BEVERS MM., COLENBRANDER B. Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *J Reprod. Fertil. Suppl.* 2001, **57**, 383-386.
- (47) TAINTURIER D., BENCHARIF D., GUINTARD C. Insémination artificielle intra utérine en sperme congelé chez la chienne ; technique opératoire scandinave : le cathétérisme du col en aveugle. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 2003, **38**, 237-242.
- (48) THOMASSEN et al. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non surgical approach. *Theriogenology*, 2006, **66**, 1645-1650.
- (49) THOMASSEN R., FARSTAD W., KROGENAES A., FOUIGNER J. A., ANDERSEN BERG K. Artificial insemination with frozen semen in the dog. Results from 1994-98. In: *Advances in dog, cat, and exotic carnivore reproduction*. Oslo, Norway, 29 June- 1 July, 2000, 59.
- (50) TSUMAGARI S., ICHIKAWA Y., TORIUMI H., ISHIHAMA K., MORITA M., KANAMAKI M., TAKEISHI M. Optimal timing for canine insemination with frozen semen and parentage testing by microsatellite markers in superfecundity. *J. Vet. Med. Sci.* 2003, **65(9)**, 1003-1005.
- (51) TSUTSUI T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1999, **39**, 269-275.
- (52) VAN HAAFTEN B. The optimal service period in bitches. *Tijdschr Diergeneeskd*, 1989, **114**, 1149-1153.
- (53) VERSTEGEN J., SILVA L.D.M., ONCLIN K. Is bitch cervical closure a limiting factor for fertility after natural mating or artificial insemination? In: *Advances in dog, cat, and exotic carnivore reproduction*. Oslo, Norway, 29 June- 1 July, 2000, 100.
- (54) WILSON M.S. Non surgical intra-uterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 1993, **47**, 307-311.
- (55) WRIGHT P.J. Practical aspects of the estimation of the time of ovulation and of insemination in the bitch. *Aust. Vet. J.* 1991, **68**, 10-13.

## Annexes.

- **ANNEXE 1 : Dossier de suivi de chaleurs des femelles au CERCA.**
- **ANNEXE 2 : Fiche de congélation de semences au CERCA.**
- **ANNEXE 3 : Dossier à remplir lors de la réalisation d'un spermogramme au CERCA.**
- **ANNEXE 4 : Analyses statistiques des résultats.**
- **ANNEXE 5 : Paramètres relevés pour chaque chienne.**
- **ANNEXE 6 : Liste des races ayant été inséminées artificiellement en semence congelée et nombre d'IA par race.**

**ANNEXE 1 : Dossier de suivi de chaleurs des femelles au CERCA.**

**CERCA- ENVA : SUIVI de CHALEURS**

N° CLOVIS :

NOM :

Type de « saillie » :

Lieu de réalisation :

Date	ième J				
Vulve					
Couleur					
N° de frottis	<input type="checkbox"/> HS <input type="checkbox"/> 555				
Hématies					
PMN					
% acido.					
% baso.					
% parab.					
Autres					
Fond					
Amas					
P4 N°tube	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
Conclusions					
Echo. Autres					

## ANNEXE 2 : Fiche de congélation de semences au CERCA.

### CONGELATION

N° CLOVIS :

NOM :

DATE : / /

Intervenant(s) prélèvement :

Présence d'une chienne en oestrus :

Race :

LIBIDO :

**SEMENCE** : Aspect macroscopique :

<b>VOLUME</b>	Phase 1 : ml	Phase 2 : ml	Phase 3 : ml
	Volume total si phases mélangées : ml		
	Volume après centrifugation : ml vol. dilueur : ml		
<b>MOBILITE</b>	%	Nombre total de spz :	
<b>ANOMALIES</b>	Anormaux : %	Têtes : %	Pièces int. : %
	Goutelettes : %	Flagelles : %	Décapités : %
	PMN <input type="checkbox"/>	Hématies <input type="checkbox"/>	Autres :

Concentration :

**Conclusion** :

**Mobilité au test de décongélation :**

Nombre de paillettes congelées :

Emplacement :

Nombre d'IA réalisables :

**EXAMENS COMPLEMENTAIRES :**

- Oestradiol :                       P4 :                       PAL sur semence :  
 Testostérone basale :                       T4 libre :                       RCCU :  
 post-stimulation :                       TSH :  
 Brucellose :                       Herpesvirose :                       Bactériologie :

Frottis prépuccial :

Echographie génitale :

**CONCLUSION** :

## ANNEXE 3 : Dossier à remplir lors de la réalisation d'un spermogramme au CERCA.

### SPERMOGRAMME

N° CLOVIS :

NOM :

DATE : / /

Intervenant(s) prélèvement :

Présence d'une chienne en oestrus :

Race :

LIBIDO :

**SEMENCE** : Aspect macroscopique :

<b>VOLUME</b>	Phase 1 : ml	Phase 2 : ml	Phase 3 : ml
Volume total si phases mélangées :		ml	
Volume après centrifugation :		ml	vol. dilueur : ml
<b>MOBILITE</b>	%	Nombre total de spz :	
<b>ANOMALIES</b>	Anormaux : %	Têtes : %	Pièces int. : %
	Goutelettes : %	Flagelles : %	Décapités : %
	PMN <input type="checkbox"/>	Hématies <input type="checkbox"/>	Autres :

Concentration :

**Conclusion** :

**EXAMENS COMPLEMENTAIRES :**

- Oestradiol :                       P4 :                       PAL sur semence :  
 Testostérone basale :                       T4 libre :                       RCCU :  
 post-stimulation :                       TSH :  
 Brucellose :                       Herpesvirose :                       Bactériologie :

- Frottis prépuccial :                       Echographie génitale :

**CONCLUSION** :

## Annexe 4 : Analyses statistiques des résultats.

### Différences du taux de réussite entre les chiennes avec antécédents d'infertilité et les chiennes sans antécédents :

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite entre les chiennes avec antécédents d'infertilité et les chiennes sans antécédents.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite entre les chiennes avec antécédents d'infertilité et les chiennes sans antécédent.

	Infertiles		Fertiles		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Reussite	4	5,04950495	47	45,95049505	51
Echec	6	4,95049505	44	45,04950495	50
Total	10	10	91	91	101

$$\chi^2 \text{ obs} = \mathbf{0,48904805}$$

Degré de liberté (DDL) = 1

$$\chi^2 \text{ t} = 3,84 \text{ à } 95\%$$

$$\chi^2 \text{ obs} < \chi^2 \text{ t}$$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

### Différences du taux de réussite entre les chiennes tranquilisées ou non.

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite entre les chiennes tranquilisées ou non.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite entre les chiennes les chiennes tranquilisées ou non.

	Non tranquilisées		Tranquilisées		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	36	37,90322581	11	9,096774194	47
Echec	39	37,09677419	7	8,903225806	46
Total	75	75	18	18	93

$$\chi^2 \text{ obs} = \mathbf{0,99825162}$$

Degré de liberté (DDL) = 1

$$\chi^2 \text{ t} = 3,84 \text{ à } 95\%$$

$$\chi^2 \text{ obs} < \chi^2 \text{ t}$$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

### Différences du taux de réussite entre l'utilisation de paillettes ou de pellets :

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite entre l'utilisation de paillettes ou de pellets.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite entre l'utilisation de paillettes ou de pellets.

	Paillettes		Pellets		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	44	44,52631579	3	2,473684211	47
Echec	46	45,47368421	2	2,526315789	48
Total	90	90	5	5	95

$\chi^2_{obs} = 0,23394405$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

**Différences du taux de réussite entre le groupe cynotechnique 10 et les autres groupes :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite entre le groupe cynotechnique 10 et les autres groupes.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite entre le groupe cynotechnique 10 et les autres groupes.

	Groupe 10		Autres groupes		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	7	4,042105263	41	43,95789474	48
Echec	1	3,957894737	46	43,04210526	47
Total	8	8	87	87	95

$\chi^2_{obs} = 4,77735935$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} > \chi^2_t$

On peut conclure à une différence significative.

**Différences du taux de réussite entre les chiennes primipares et multipares :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite entre les chiennes primipares et multipares.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite entre les chiennes primipares et multipares.

	Primipares		Multipares		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	16	18,28735632	27	24,71264368	43
Echec	21	18,71264368	23	25,28735632	44
Total	37	37	50	50	87

$\chi^2_{obs} = 0,98431147$

Degré de liberté (DDL)=1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

**Différences du taux de réussite lorsque la semence inséminée vient du CERCA ou d'un autre centre :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite lorsque la semence inséminée vient du CERCA ou d'un autre centre.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite entre lorsque la semence inséminée vient du CERCA ou d'un autre centre.

	CERCA		Autre centre		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	41	43,42574257	10	7,574257426	51
Echec	45	42,57425743	5	7,425742574	50
Total	86	86	15	15	101

$\chi^2_{obs} = 1,84299286$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

**Différences du taux de réussite entre les résultats de la période 2001-2003 par rapport à 2004-2006 :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite entre les résultats de la période 2001-2003 par rapport à 2004-2006.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite entre les résultats de la période 2001-2003 par rapport à 2004-2006.

	2001-2003		2004-2006		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	33	24,5	16	24,5	49
Echec	15	23,5	32	23,5	47
Total	48	48	48	48	96

$$\chi^2_{\text{obs}} = 12,0468954$$

Degré de liberté (DDL) = 1

$$\chi^2_t = 3,84 \text{ à } 95\%$$

$$\chi^2_{\text{obs}} > \chi^2_t$$

On peut conclure à une différence significative.

**Différence du taux de réussite lors de la survenue d'un reflux lors de l'insémination :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite d'un reflux lors de l'insémination.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite lors de la survenue d'un reflux lors de l'insémination.

	Reflux		Pas de reflux		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	8	7,202702703	33	33,7972973	41
Echec	5	5,797297297	28	27,2027027	33
Total	13	13	61	61	74

$$\chi^2_{\text{obs}} = 0,24008485$$

Degré de liberté (DDL)=1

$$\chi^2_t = 3,84 \text{ à } 95\%$$

$$\chi^2_{\text{obs}} < \chi^2_t$$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

**Différence du taux de réussite en fonction du format des chiens, petites races par rapport aux autres races :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite fonction du format des chiens, petites races par rapport aux autres races.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite fonction du format des chiens, petites races par rapport aux autres races.

	Petites races		Autres races		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	2	3,031578947	46	44,96842105	48
Echec	4	2,968421053	43	44,03157895	47
Total	6	6	89	89	95

$\chi^2_{obs} = 0,75734786$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

**Différence du taux de réussite entre le CERCA et le CERREC :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite entre le CERCA et le CERREC.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite entre le CERCA et le CERREC.

	CERREC		ALFORT		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	53	45,96685083	51	58,03314917	104
Echec	27	34,03314917	50	42,96685083	77
Total	80	80	101	101	181

$\chi^2_{obs} = 4,53314861$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} > \chi^2_t$

On peut conclure à une différence significative.

**Différence du taux de réussite entre le CERCA et l'ENVN :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite entre le CERCA et l'ENVN. **Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite entre le CERCA et l'ENVN.

	ENVN		ALFORT		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	3	3,028037383	51	50,97196262	54
Echec	3	2,971962617	50	50,02803738	53
Total	6	6	101	101	107

$\chi^2_{obs} = 0,00055524$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

**Différence du taux de réussite entre le CERCA et la Suède :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite entre le CERCA et la Suède.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite entre le CERCA et la Suède.

	Suède		ALFORT		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	235	218,5093458	51	67,49065421	286
Echec	92	108,4906542	50	33,50934579	142
Total	327	327	101	101	428

Test  $\chi^2_{obs} = 15,8958433$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} > \chi^2_t$

On peut conclure à une différence significative.

**Différence du taux de réussite entre le CERCA et les résultats de Nöthling :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite entre le CERCA et l'Afrique du Sud.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite entre le CERCA et l'Afrique du Sud.

	Afrique du Sud		ALFORT		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	24	21,27659574	51	53,72340426	75
Echec	16	18,72340426	50	47,27659574	66
Total	40	40	101	101	141

Test  $\chi^2_{obs} = 1,03966877$

Degré de liberté (DDL)=1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

**Différence du taux de réussite entre le CERCA et la Norvège :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite entre le CERCA et la Norvège.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite entre le CERCA et la Norvège.

	Norvège		ALFORT		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	501	481,0687023	51	70,93129771	552
Echec	184	203,9312977	50	30,06870229	234
Total	685	685	101	101	786

$\chi^2_{obs} = 21,5859869$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} > \chi^2_t$

On peut conclure à une différence significative.

**Différence du taux de réussite en fonction de la mobilité des spermatozoïdes :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite en fonction de la mobilité des spermatozoïdes.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite en fonction de la mobilité des spermatozoïdes.

	Mobilité < 50%		Mobilité > 50%		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	8	11,86813187	46	42,13186813	54
Echec	12	8,131868132	25	28,86813187	37
Total	20	20	71	71	91

$\chi^2_{obs} = 3,97413752$

Degré de liberté (DDL)=1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} > \chi^2_t$

On peut conclure à une différence significative.

**Différence de la qualité de la semence selon la provenance :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence de la qualité de la semence selon la provenance.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative de la qualité de la semence selon la provenance

	CERCA		Extérieur		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Qualité A	9	11,16216216	5	2,837837838	14
Qualité inférieure	50	47,83783784	10	12,16216216	60
Total	59	59	15	15	74

$\chi^2_{obs} = 2,54829163$

Degré de liberté (DDL)=1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

**Différence du taux de réussite en fonction du nombre d'IAC :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite en fonction de 2 ou 3 IAC pratiquées.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite en fonction de 2 ou 3 IAC pratiquées.

	3 IAC		2 IAC		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	6	5,78125	31	31,21875	37
Echec	4	4,21875	23	22,78125	27
Total	10	10	54	54	64

$\chi^2_{obs} = 0,02325288$

Degré de liberté (DDL)=1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite en fonction de 1 ou 2 IAC pratiquées.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite en fonction de 1 ou 2 IAC pratiquées.

	1 IAC		2 IAC		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	11	18,12631579	31	23,87368421	42
Echec	30	22,87368421	23	30,12631579	53
Total	41	41	54	54	95

$\chi^2_{obs} = 8,83482937$

Degré de liberté (DDL)=1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} > \chi^2_t$

On peut conclure à une différence significative.

**Différence du taux de réussite en fonction de la qualité du suivi de chaleur :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite en fonction de la qualité du suivi de chaleur.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite en fonction de la qualité du suivi de chaleur.

	Suivi B		Suivi A		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	17	15,15294118	29	30,84705882	46
Echec	11	12,84705882	28	26,15294118	39
Total	28	28	57	57	85

Test  $\chi^2_{obs} = 0,73175029$

Degré de liberté (DDL)=1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

	Suivi B		Suivi C		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	17	14	2	5	19
Echec	11	14	8	5	19
Total	28	28	10	10	38

Test  $\chi^2_{obs} = 4,88571429$

Degré de liberté (DDL)=1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} > \chi^2_t$

On peut conclure à une différence significative.

**Différence du taux de réussite en fonction de la qualité de la semence :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite en fonction de la qualité de la semence.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite en fonction de la qualité de la semence.

	Qualité A		Qualité C		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	9	5,534883721	8	11,46511628	17
Echec	5	8,465116279	21	17,53488372	26
Total	14	14	29	29	43

Test  $\chi^2_{obs} = 5,31976796$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} > \chi^2_t$

On peut conclure à une différence significative.

	Qualité B		Qualité C		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	19	14,57142857	8	12,42857143	27
Echec	15	19,42857143	21	16,57142857	36
Total	34	34	29	29	63

Test  $\chi^2_{obs} = 5,11688641$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} > \chi^2_t$

On peut conclure à une différence significative.

	Qualité A		Qualité B		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	9	8,166666667	19	19,833333333	28
Echec	5	5,833333333	15	14,166666667	20
Total	14	14	34	34	48

Test  $\chi^2_{obs} = 0,28811525$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

**Différence du taux de réussite en fonction du moment de l'insémination :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite en fonction du moment de l'insémination.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite en fonction du moment de l'insémination.

	J2		J3		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	6	8,461538462	5	2,538461538	11
Echec	14	11,53846154	1	3,461538462	15
Total	20	20	6	6	26

Test  $\chi^2_{obs} = 5,37858586$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} > \chi^2_t$

On peut conclure à une différence significative.

	J1J2		J2J3		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	2	3,846153846	23	21,15384615	25
Echec	4	2,153846154	10	11,84615385	14
Total	6	6	33	33	39

Test  $\chi^2_{obs} = 2,9174026$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

**Différence du taux de réussite en fonction de la date de congélation des paillettes :**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence du taux de réussite en fonction de la date de congélation des paillettes.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative du taux de réussite en en fonction de la date de congélation des paillettes.

	1989-1994		1981-1988/1995-2006		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	19	16,65957447	35	37,34042553	54
Echec	10	12,34042553	30	27,65957447	40
Total	29	29	65	65	94

Test  $\chi^2_{obs} = 1,11739857$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

Proportion des suivis de bonne qualité selon deux périodes :

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence de la proportion des suivis de bonne qualité selon deux périodes.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative de la proportion des suivis de bonne qualité selon deux périodes.

Suivi de chaleur de qualité A	2001-2003		2004-2006		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
A	27	30,2970297	33	29,7029703	60
autres	24	20,7029703	17	20,2970297	41
Total	51	51	50	50	101

Test  $\chi^2_{obs} = 1,78539598$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

**Proportion de semence de bonne qualité selon deux périodes 2001-2003 et 2004-2006:**

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence de la proportion de semence de bonne qualité selon 2 périodes.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative de la proportion de semence de bonne qualité selon 2 périodes.

Semence de qualité A	2001-2003		2004-2006		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
A	10	7,50617284	6	8,49382716	16
Autres	28	30,49382716	37	34,50617284	65
Total	38	38	43	43	81

Test  $\chi^2_{obs} = 1,94492279$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{obs} < \chi^2_t$

On ne peut pas conclure à une différence significative.

### Réussite de l'IAC avant et après 7 ans

**Hypothèse H0** : Il n'y a pas de différence de réussite de l'IAC avant et après 7 ans.

**Hypothèse H1** : Il existe une différence significative de la réussite de l'IAC avant et après 7 ans.

	Réussite de l'IAC après 7 ans		Réussite de l'IAC avant 7 ans		Total
	Réel	Théorique	Réel	Théorique	
Réussite	4	7,5	39	35,5	43
Echec	11	7,5	32	35,5	43
Total	15	15	71	71	86

$\chi^2_{\text{obs}} = 3,95680751$

Degré de liberté (DDL) = 1

$\chi^2_t = 3,84$  à 95%

$\chi^2_{\text{obs}} > \chi^2_t$

On peut conclure à une différence significative.

## ANNEXE 5 : Paramètres relevés pour chaque chienne.

- **Identité de la chienne :**
  - Nom de la chienne.
  - Nom du propriétaire.
  - Numéro de Clovis (identification de la chienne pour l'ENVA).
  - Numéro d'identification CERCA.
  - Age.
  - Race.
  
- **Renseignements sur l'historique de la chienne.**
  - Rang de cycle sexuel.
  - Nombre de chiots moyens par portée. Ce paramètre est connu pour 53 chiennes.
  - Antécédent d'infertilité : Insémination en semence fraîche ou saillie sans résultats auparavant.
  - Cause de l'infertilité.
  - Pathologie/ traitements antérieurs.
  
- **Suivi de chaleurs.**
  - Date présumée de l'ovulation : cette date est souvent inscrite clairement sur le dossier par le clinicien. Si cela n'est pas noté, la date d'ovulation est déterminée : soit en fonction du taux de progestérone pour les suivis utilisant un test quantitatif de progestérone seul, soit en fonction de l'ovulation détectée directement par échographie.
  - Méthode de détermination de l'ovulation : Dosages quantitatifs ou qualitatifs de progestérone, échographie ovarienne.
  - Nombre de jours après le début des pertes vulvaires.
  - Qualité du suivi de chaleur (utilisation d'un indice **A** ; **B** ; **C**).
    - **A** : Suivi très précis avec frottis, test quantitatif de progestérone, et échographie ovarienne permettant une détermination très précise de la date d'ovulation.
    - **B** : Suivi utilisant frottis et test quantitatif de progestérone.
    - **C** : Suivi insuffisant utilisant test qualitatif de progestérone ou irrégulier ne permettant pas une évaluation précise de la progestérone (commencé par le vétérinaire traitant par exemple).
  
- **Insémination artificielle.**
  - Nombre d'inséminations.
  - Date des inséminations.
  - Intervalle ovulation/insémination.
  - Taux de progestérone plasmatique le jour de l'insémination.
  - Type d'insémination : intra-utérine par cathétérisme, sous vaginoscopie, chirurgicale, intra vaginale.
  - Difficultés éventuelles lors de l'insémination.

- Volume de semence inséminé.
  - Existence éventuelle d'un reflux après l'I.A.
  - Utilisation d'un tranquillisant lors de l'insémination.
  - Réussite de l'insémination artificielle, c'est-à-dire gestation ou non. (S'il y a résorption, l'insémination est considérée comme réussie).
- **Semence du mâle.**
    - Spermogramme avant congélation.
      - Spermatozoïdes/mL.
      - Pourcentage de spermatozoïdes mobiles.
      - Pourcentage d'anomalies
    - Dose inséminante en million de spermatozoïdes.
    - Mobilité après décongélation.
    - Nombre de spermatozoïdes mobiles inséminés.
    - Date de congélation des paillettes.
    - Lieu de congélation des paillettes.
    - Procédés de congélation et de décongélation.
    - Paillettes ou pellets.
    - Qualité de la semence décongelé : Indice **A, B, C**.
      - **A** : **Très bonne semence** : > 60% de mobilité après décongélation, nombre de spermatozoïdes mobile inséminé > 150 millions (60 millions si méthode chirurgicale).
      - **B** : **Bonne semence** : > 50% de mobilité après décongélation, conservation depuis moins de 10 ans.
      - **C** : **Semence de mauvaise qualité** : < 50% de mobilité, conservation depuis plus de 15 ans, dose inséminante inférieure à 150 millions de spermatozoïdes.
- **Mise Bas.**
    - Date de la mise bas.
    - Réalisation d'une échographie de diagnostic de gestation.
    - Intervalle insémination/mise bas.
    - Nombre de chiots nés vivants.
    - Nombre de chiots morts nés.
    - Nombre de chiots anormaux.
    - Sex ratio.

**ANNEXE 6 : Liste des races ayant été inséminées artificiellement en semence congelée et nombre d'IA par races.**

• AKITA	1
• AMSTAFF	3
• BERGER ALLEMAND	4
• BEARDED COLLIE	1
• BEAUCERON	1
• BERGER AUSTRALIEN	2
• BERGER BELGES	10
• BERGER DE BRIE	1
• BERGER DES PYRENEES	2
• BERGER POLONAIS	1
• BOULEDOGUE	1
• BOUVIER AUSTRALIEN	1
• BRAQUE	1
• BRAQUE ALLEMAND	4
• BRAQUE FRANÇAIS	1
• BULL TERRIER	1
• CHOW CHOW	2
• COCKER AMERICAIN	1
• DALMATIEN	4
• DOBERMAN	1
• DOGUE ALLEMAND	2
• DOGUE ARGENTIN	3
• DOGUE DE BORDEAUX	1
• DRAHTHAAR	1
• ENGLISH SPRINGER SPANIEL	1
• EPAGNEUL BRETON	10
• EPAGNEUL DEL PONT	1
• EPAGNEUL FRANÇAIS	3
• FOX TERRIER	1
• GOLDEN RETRIEVER	1
• GREYHOUND	1
• JACK RUSSEL	1
• LABRADOR	3
• LANDSEER	1
• LEVRIER AFGHAN	4

• MASTIFF	1
• MATIN DE NAPLES	1
• MONTAGNE DES PYRENNES	1
• PETIT LEVRIER ITALIEN	1
• POINTER	2
• RHODESIEN	1
• ROTTWEILLER	2
• SALUKI	1
• SCHNAUZER	1
• SCOTTISH TERRIER	1
• SETTER GORDON	1
• SETTER IRLANDAIS	4
• SHAR PEY	1
• SHIPPERKE	1
• SLOUGHI	1
• TERRIER RUSSE NOIR	1
• WELSH CORGI	1
• YORKSHIRE	2