

II – Données actuelles sur la reproduction assistée de la chienne

1 – Rappel sur la physiologie des gamètes

1.1 – Le gamète femelle

L'ovulation survient chez la plupart des chiennes entre 48 et 72 heures après le début de l'œstrus. Sa durée oscille entre 1 et 4 jours (45) et dépend du nombre d'ovocytes primaires libérés. Ceux-ci ne sont pas fécondables ; ils doivent d'abord subir la première division méiotique les transformant en ovocytes secondaires, environ 60 heures après l'ovulation (61) (2-3 jours selon Concannon et al. (22), jusqu'à 5 jours selon Jeffcoate et Lindsay (45)(46)) : c'est la phase de maturation. A ce stade, ils ont parcouru les deux tiers de l'oviducte.

Les ovocytes secondaires restent fécondables jusqu'à 108 heures après l'ovulation, soit sur une période de 48 heures (45)(46)(61), voire 2 à 3 jours (4)(22)(41). Jeffcoate et Lindsay (46) estime cette même période fertile possible pendant 1 à 8 jours. Ainsi, les accouplements réalisés en fin d'œstrus (7-8 jours après le pic de LH) sont souvent fertiles.

Les ovocytes atteignent la partie distale de l'oviducte en 3 à 8 jours, puis migrent dans l'utérus le neuvième jour.

1.2 – Le gamète mâle

Les spermatozoïdes restent fertiles dans l'appareil reproducteur femelle pendant environ 5 jours (61) (4 à 6 jours selon les études (16), (41) et (45), 6 à 7 jours ou plus selon les études (4) et (22) et seulement 24 heures selon Bouchard (15)).

La période d'accouplement pendant laquelle la fécondation est possible est donc d'environ 7 jours (16)(61).

1.3 – Période optimale de fertilité

En raison de la longue période de fertilité des gamètes mâles et femelles chez le chien, la période de 7 heures requise pour la capacitation n'apparaît pas être un facteur significatif pour la fertilisation (61). Toutefois, compte tenu du temps de survie des ovules et des spermatozoïdes, la période optimale d'accouplement ou d'insémination artificielle se situe 1 à 3 jours après l'ovulation (62).

L'ovulation chez la chienne présente de très grandes variations : elle peut survenir à n'importe quel moment de l'œstrus (22). Certaines chiennes pourront ainsi être saillies 2-3 jours avant le pic de LH, d'autres jusqu'à 4-5 jours après. La période fertile est d'autant plus longue que la semence est de très bonne qualité (4) (Cf. Figures 2 et 3).

Le pic de fertilité en saillie naturelle est obtenu pour des saillies ayant lieu entre 0 et 5 jours après le pic de LH ; pour les inséminations artificielles en semence congelée, ce pic de fertilité est obtenu avec des inséminations réalisées 4 à 5 jours après le pic de LH (la durée de vie des spermatozoïdes décongelés étant plus courte) (22).

Bien qu'il ne soit pas toujours indispensable de définir avec précision la période de fertilisation optimale, ceci devient important si la semence du chien est peu fertile ou lorsque l'insémination est réalisée en semence congelée, afin de ne pas effectuer un accouplement trop décalé (45).

Figure 2: Répartition de la durée entre le début de l'écoulement vulvaire et l'ovulation chez 35 chiennes

Source : Tsutsui (61)

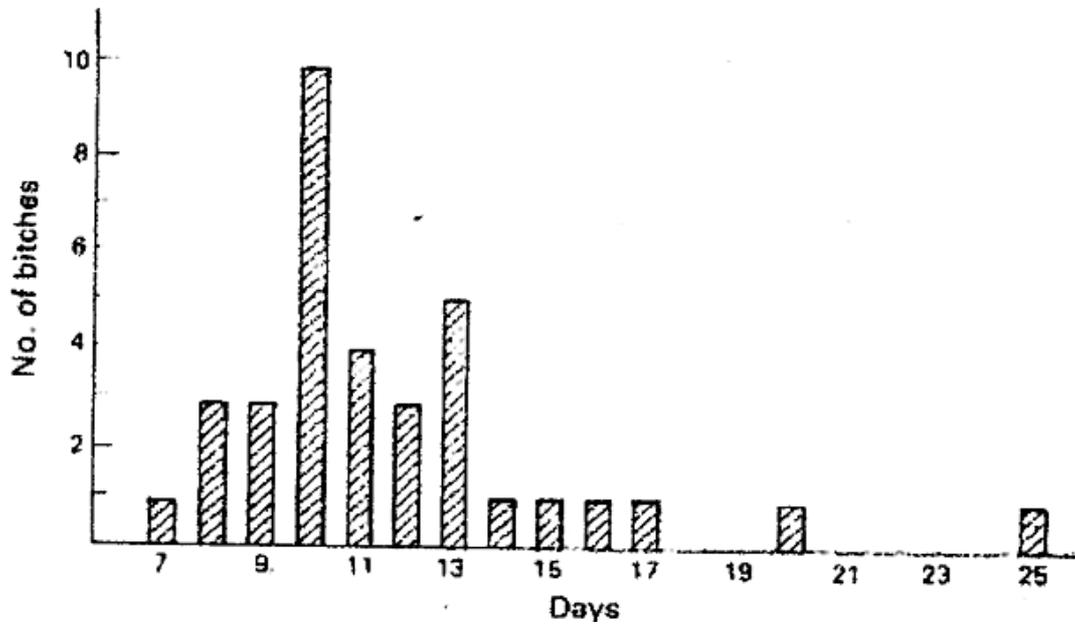
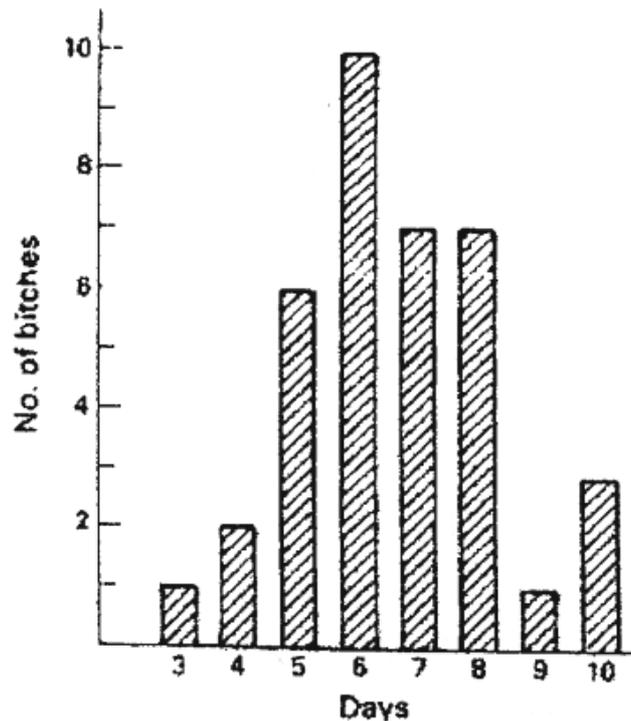


Figure 3: Répartition de la durée d'acceptation du mâle par la femelle après l'ovulation chez 37 chiennes

Source : Tsutsui (61)



2 – Méthodes de détermination du moment de l'accouplement

La période optimale pour faire saillir une chienne est loin d'être facile à repérer. Il faut pour cela prendre en compte les différents critères, plus ou moins précis, qui aident à déterminer le moment de l'ovulation, et tenir compte des paramètres physiologiques des gamètes mâles et femelles.

Pour cela, éleveurs et propriétaires s'appuient souvent sur des critères assez subjectifs et peu fiables ou pas assez précis ; des critères plus objectifs, du domaine des vétérinaires, sont désormais disponibles afin de permettre un suivi plus précis du cycle sexuel de la chienne et d'éviter les erreurs dues aux variations raciales et individuelles.

2.1 – Les différents critères utilisés en pratique

2.1.1 – Critères subjectifs

2.1.1.1 Le nombre de jours après le début des chaleurs

Il est courant de dire qu'une chienne est fécondable le 10^{ème} ou le 11^{ème} jour après le début des chaleurs, avec des variations allant de 10 à 15 jours. Cependant, il a été démontré que 30 à 40% des chiennes sont fécondables en dehors de cet intervalle (Cf. Figure 4).

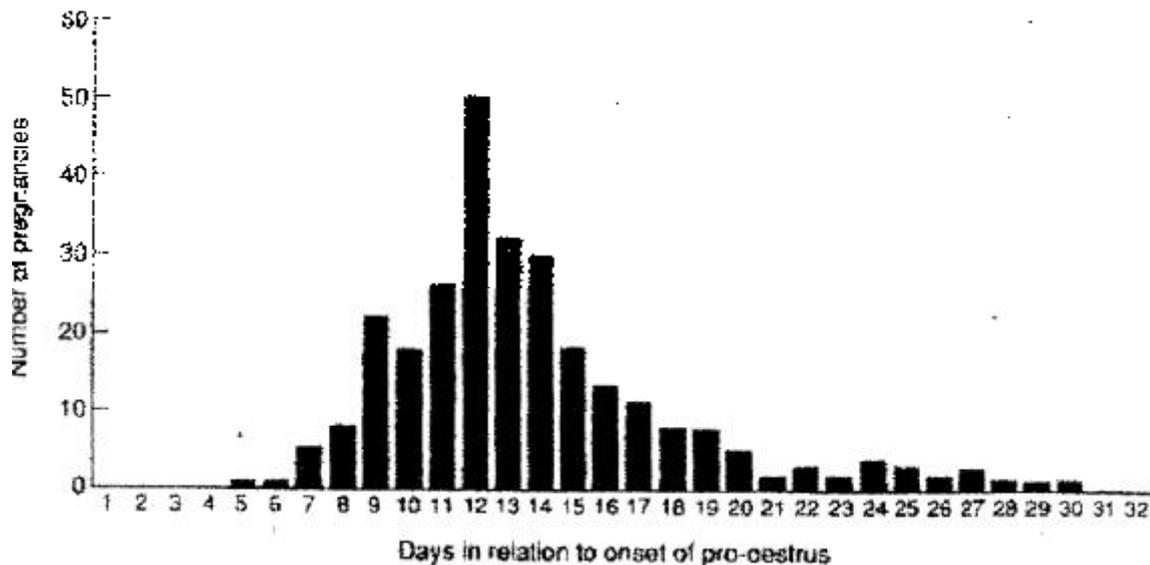
Ainsi les chiennes dites précoces sont souvent des femelles qui commencent à perdre du sang à la commissure vulvaire quelques jours après le début réel des chaleurs, et qui apparaissent donc décalées aux yeux de l'éleveur.

A l'inverse, certaines races sont plutôt tardives et considérées comme ayant un œstrus prolongé, telles les lévriers qui sont généralement prêtes vers le 18^{ème} à 25^{ème} jours de leurs chaleurs, sans que cela ne soit pour autant inquiétant pour l'éleveur.

Enfin, ce critère n'est pas répétable d'un cycle à l'autre : une même chienne peut être fécondable le 16^{ème} jour d'un cycle et le 6^{ème} du cycle suivant. La période optimale de saillie peut ainsi varier du 5^{ème} au 30^{ème} jour apparent des chaleurs (4).

Figure 4: Relation entre la date présumée de l'ovulation et le nombre de jours depuis le début des chaleurs chez 278 chiennes

Source : Arthur et al. (4)



2.1.1.2 L'acceptation du mâle par la femelle (35)

Ce critère est, pour plusieurs raisons, le plus mauvais :

- Tout d'abord, la plupart des chiennes commencent à accepter l'accouplement 2 jours avant l'ovulation, c'est-à-dire 4 à 5 jours minimum avant leur période fécondante.
- Certaines chiennes (de race Berger Allemand notamment) acceptent l'accouplement plus d'une semaine, alors que la femelle n'est fécondable que 48 heures.
- D'autres n'acceptent le mâle qu'une demi-journée sur toute la période des chaleurs
- Enfin, certaines chiennes acceptent le mâle alors qu'elles ne sont pas prêtes et le refusent au moment optimal.

2.1.1.3 L'acceptation de la chienne par le mâle (35)

Ce critère ne peut être valable qu'en présence d'un chien expérimenté effectuant régulièrement des saillies. Mais certains étalons auront tendance à saillir toute femelle qui leur sera présentée. Les mâles dominés, ma socialisés ou inexpérimentés, quant à eux, ne parviennent pas à s'accoupler au moment optimal. L'environnement semble également jouer un rôle important, et il est préférable d'amener la femelle chez le mâle que l'inverse.

2.1.1.4 L'aspect des écoulements vulvaires (35)

Les pertes vulvaires s'atténuent pendant l'œstrus, il est rare qu'une chienne prête à la saillie perde encore beaucoup de sang très coloré et foncé, mais certaines chiennes et certaines

rares (par exemple les Chow-chow) perdent du sang tout au long des chaleurs, sans aucune diminution apparente au moment optimal ; un tel critère est dans ce cas totalement inutile.

2.1.2 – Critères objectifs

Des techniques visant à préciser de manière plus étroite la période optimale de fécondation se sont développées depuis une quinzaine d'années.

2.1.2.1 La mesure de la résistivité du mucus vaginal

La conductance électrique du mucus vaginal se modifie au cours des chaleurs : il existe une relation entre la variation de la résistivité des sécrétions vaginales et le pourcentage de cellules kératinisées lors des chaleurs (16)(18).

La conductance augmente lors du pro-oestrus, jusqu'à atteindre un maximum au moment du pic d'hormone ovulante LH. La mesure de cette conductance est prise au moyen d'une sonde (ohm-mètre) introduite au fond du vagin de la chienne en chaleurs (28).

La thèse de Clero D. de 2009 (19) montre que l'on peut détecter le moment de l'ovulation à 24 heures près dans 73% des cas si la sonde est insérée à 6,5 cm de l'entrée du vagin. Il y a parfois un décalage entre la chute de résistivité et l'ovulation réelle. Dans 5% des cas l'ovulation n'est pas détectable. Cette technique, simple, donne de bons résultats si on l'associe aux dosages de progestérone, mais nécessite l'achat d'une sonde. Cependant, elle donne des résultats moins précis que les frottis vaginaux et est peu utilisée en pratique.

2.1.2.2 Les frottis vaginaux

Les frottis vaginaux consistent à effectuer un prélèvement de cellules vaginales à l'aide d'un écouvillon introduit dans la partie antérieure du vagin, puis à l'étaler sur une lame où l'on procède à sa coloration après fixation (42)(43).

Les cellules de l'épithélium vaginal se modifient sous l'influence des hormones activées pendant les chaleurs, notamment les oestrogènes libérés lors du pro-oestrus. La kératinisation des cellules, évaluée par les frottis vaginaux, donne une image de l'imprégnation oestrogénique de la chienne.

La cytologie vaginale permet donc au praticien de déterminer approximativement le pro-oestrus, l'oestrus et de début du dioestrus, et de donner une estimation du moment de l'ovulation. L'indice éosinophilique est un bon indicateur du moment de l'oestrus, mais pas de l'ovulation (24).

Un frottis isolé est très difficile à interpréter, c'est l'évolution des frottis vaginaux qui est important, d'où la notion de suivi de chaleurs chez la chienne.

2.1.2.3 Les dosages hormonaux

Ils sont beaucoup plus précis et plus fiables pour déterminer le moment de l'ovulation que la cytologie vaginale. Ainsi, l'ovulation aurait lieu 24-96 heures après le pic d'hormone LH, la maturation des ovocytes se ferait en 48-72 heures et ceux-ci resteraient fertiles durant 24-48 heures (9).

- Le dosage de la progestérone plasmatique (32)(43)(40)

Chez la chienne, il existe une lutéinisation des follicules pré-ovulatoires, qui se mettent à sécréter de la progestérone avant que l'ovulation ne se produise. Les concentrations plasmatiques de la progestérone augmentent vers le 6^{ème} jour du cycle et suivent une courbe avec une pente ascendante brutale autour de l'ovulation (Cf.II.2.3.1), puis atteignent un plateau à des taux élevés en une dizaine de jours.

Le taux de progestérone est relativement important dans le sang, aussi est-il facilement dosable en pratique.

- Le dosage de l'hormone LH

Cette hormone est sécrétée sous forme d'une décharge d'environ 36 heures, survenant 48 heures avant l'ovulation (24) (1 à 4 jours selon Jeffcoate et Lindsay (46)), ce qui peut être un repère de choix pour définir les dates d'insémination : la période de fertilisation survient 4 à 7 jours après le pic de LH (9)(17).

Il existe un test utilisant une technique d'immunomigration (WITNESS LH[®], Synbiotics) et permettant de repérer le pic de LH (Cf Annexe III). Cependant le protocole nécessite d'effectuer des prélèvements quotidiens en fin de pro-œstrus afin de bien détecter le pic, cela est contraignant.

Selon Badinand et coll. (9), il semblerait que l'accroissement initial du taux de LH soit plus important que le pic de LH en lui-même.

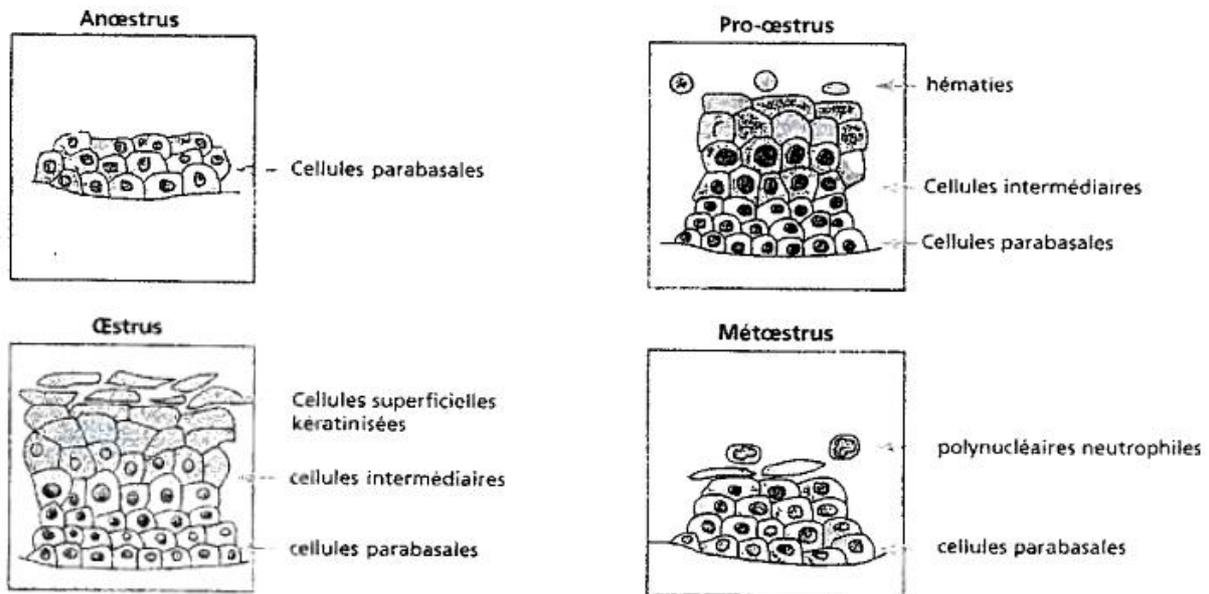
2.2 – Frottis vaginaux

2.2.1 – Modifications cytologiques de l'épithélium vaginal

Les types de cellules visibles sur le frottis vaginal sont le résultat de l'action des oestrogènes sur l'épithélium vaginal, qui subit des modifications histologiques et cytologiques au cours du cycle sexuel (Cf. Figure 5) (16)(53).

Figure 5: Les différentes catégories de cellules au cours du cycle

Source : Guérin et Fontbonne (42)



- Anœstrus

- Le frottis est sale et pauvre en cellules, la coloration est basophile (faible indice éosinophilique : $IE \leq 10\%$) (42). Les cellules parabasales sont rondes, de petite taille et pourvues d'un noyau rond et volumineux (36).

- Des polynucléaires neutrophiles sont présents en quantité faible à modérée.

- Pro-œstrus

- L'épithélium devient stratifié. Les cellules superficielles deviennent kératinisées.

- En début de pro-œstrus, le nombre de cellules augmente : les cellules parabasales disparaissent au profit des cellules intermédiaires basophiles (Cellules de grande taille, polygonales et possédant un noyau proportionnellement plus petit) ; la kératinisation des cellules se traduit par un début de coloration acidophile du frottis. Celui-ci prend un aspect sale en relation avec la présence de débris cellulaires et de mucus.

- En milieu de pro-œstrus, le frottis est sale et riche en cellules : le nombre de cellules intermédiaires non kératinisées diminue, celui de cellules superficielles à noyau pycnotique augmente (IE=50%).

- En fin de pro-œstrus, le frottis est assez propre, riche en cellules : les cellules vaginales sont essentiellement des cellules superficielles kératinisées à aspect anguleux et corné, à noyau pycnotique ou anucléés (IE≥70%).

- Les polynucléaires neutrophiles, initialement présents en faible quantité, diminuent progressivement et sont absents en fin de pro-œstrus.

- Les érythrocytes sont nombreux durant toute cette période, traduisant les pertes vulvaires hémorragiques.

- Œstrus

- La kératinisation est maximale ; 60-90% des cellules sont anguleuses, de coloration acidophile (IE≥80%) et prennent un aspect en pétale de maïs ; elles possèdent un noyau pycnotique ou en sont dépourvues ; ces cellules dites superficielles ont tendance à se regrouper. Cet aspect en amas est caractéristique du frottis vaginal en période d'œstrus ; il persiste 4 à 5 jours, puis les cellules se dispersent. Le fond du frottis est propre.

- En fin d'œstrus les cellules intermédiaires réapparaissent avec les polynucléaires neutrophiles. Les érythrocytes peuvent être absents, en faible quantité ou nombreux : ils n'ont pas de signification clinique.

- Métœstrus

- En 24 à 48 heures les cellules disparaissent et sont remplacées par de nombreuses cellules intermédiaires puis parabasales, basophiles (IE≤20%).

- Les polynucléaires neutrophiles affluent massivement à la fin de l'œstrus (36).

2.2.2 – Réalisation et lecture du frottis

2.2.2.1 Réalisation d'un frottis

- Le prélèvement

Le prélèvement est réalisé à l'aide d'un écouvillon stérile de 15 centimètres de long légèrement humidifié avec du sérum physiologique afin de récolter plus de cellules. Celui-ci est introduit dans la vulve, d'abord verticalement puis progressivement basculé à l'horizontale et enfoncé jusqu'au milieu du vagin. Après quelques mouvements de rotations, il est retiré lentement vers l'arrière.

Le prélèvement est étalé sur une lame propre en roulant l'écouvillon ; on réalise ainsi 3 voire 4 lignes parallèles (Cf. Annexe IV).

- Fixation et coloration

Le frottis est immédiatement fixé par de l'alcool à 70° ou par un mélange alcool-éther, puis coloré.

La méthode trichrome de Harris-Shorr (Cf. Annexe IV) utilisée au CERCA permet de différencier les cellules selon leurs affinités tinctoriales : les cellules kératinisées acidophiles apparaissent en rouge-orange, et les basophiles en bleu (Cf. Figure 6). On peut ainsi calculer l'index éosinophilique ou index de kératinisation (pourcentage de cellules kératinisées).

La coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG) permet de bien visualiser les hématies et les polynucléaires, mais ne permet pas de calculer l'index éosinophilique.

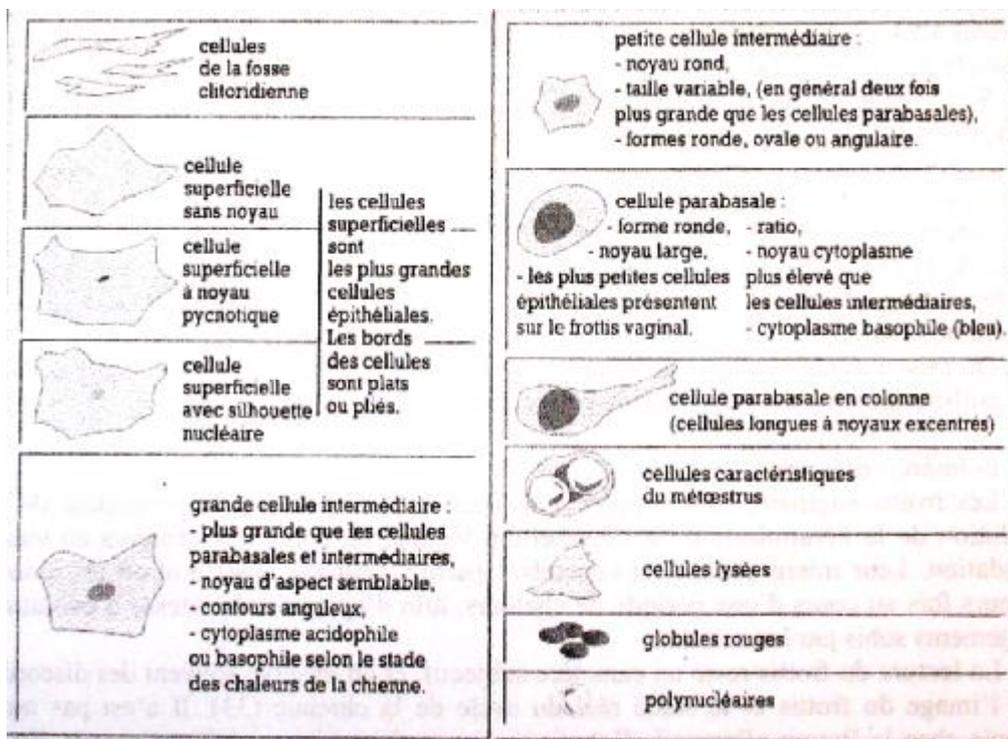
2.2.2.2 Lecture

A l'examen macroscopique l'aspect de l'écouvillon peut apporter une indication rapide (36)(42) : un écouvillon rose ou rouge est caractéristique de la chienne en chaleurs, probablement en pro-œstrus. Si l'écouvillon est marron « sale », la chienne entre en métœstrus (nombreux polynucléaires sur le frottis). Si l'écouvillon est très propre : la chienne peut être en œstrus comme en anœstrus, on ne peut pas conclure.

A l'examen microscopique l'observation se réalise en deux temps. Au grossissement 100 pour déterminer la coloration dominante, le nombre de cellules, leur regroupement ...et au grossissement 400 pour identifier les cellules observées (couleur, taille, forme, aspect du noyau) et calculer l'index éosinophilique.

Figure 6: Les cellules du frottis vaginal en coloration de Harris-Shorr

Source : Mialot et al. (50)



2.2.3 – Intérêts et limites

Les frottis vaginaux sont simples à réaliser et peu onéreux. La lecture du frottis reste cependant un caractère subjectif, et on observe souvent des discordances entre l'image du frottis et le stade réel du cycle de la chienne (41). Les frottis vaginaux s'avèrent être de bons indicateurs du déroulement des chaleurs, mais sont insuffisants pour la détermination de la période ovulatoire ; leur utilisation reste donc indissociable des dosages de progestérone (53)(64).

2.3 – Dosage de la progestérone

La mesure de la progestéronémie, effectuée tous les deux jours, fournit une indication précise sur une ovulation imminente.

2.3.1 – Evolution de la progestéronémie au cours du cycle

Le taux plasmatique de cette hormone passe de moins de 1 ng/mL (valeur de base inférieure à 0,5 ng/mL selon l'étude (43) lors de l'anœstrus et du pro-œstrus à une valeur comprise entre 2 et 4 ng/mL (1 à 2,5 ng/mL selon Fontbonne (32)) au moment du pic de LH.

Au moment de l'ovulation, le taux de progestérone sanguine s'élève significativement jusqu'à des valeurs atteignant 4 à 10 ng/mL. On considère que l'ovulation a bien lieu lorsque la valeur seuil minimale a été dépassée, ou lorsque la concentration de progestérone plasmatique atteint $5,44 \pm 0,93$ ng/mL par la technique de radio-immunoassay (15), $4,9 \pm 1,0$ ng/mL par le kit de progestérone ELISA selon Bouchard (1991)(15).

L'ovulation estimée grâce à un suivi échographique associée à des dosages très réguliers de progestérone est de $6,12 \pm 2,12$ ng/mL.

Après l'ovulation, le taux de progestérone continue d'augmenter. Une valeur de 15 ng/mL semble suffisante pour maintenir une gestation, et celui-ci s'élève généralement au-delà de 50-80 ng/mL dans un délai de 4 à 20 jours (32).

Selon Guérin (41)(43), le profil général de la courbe est constant pour 83% des chiennes. La progestéronémie est donc un témoin fiable de l'ovulation.

2.3.2 – Réalisation pratique

Les prélèvements sanguins sont effectués tous les deux à trois jours. On prélève du sang à la jugulaire, voire à la veine céphalique ou saphène externe, sur tube hépariné. Le sang est ensuite centrifugé et l'on récupère le plasma.

Il existe plusieurs méthodes pour la mesure de cette hormone (3)(41) :

- Un kit quantitatif destiné à mesurer les concentrations plasmatiques de progestérone chez les bovins, utilisant un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) fut utilisé chez la chienne (OVUCHECKND, Eurobio). Il permet des mesures au-delà de valeurs témoins, avec une fiabilité excellente, mais nécessite un appareil de lecture optique pour lequel il faut

comparer les valeurs obtenues avec les valeurs d'un laboratoire de référence, pour bien interpréter les résultats.

Bien que rapide à interpréter et demandant peu d'entraînement, le temps requis pour la procédure et l'équipement rendent cependant cette technique peu abordable pour les cliniques vétérinaires traitant peu de cas de reproduction (15).

- Plus récemment, des kits de tests ELISA qualitatifs rapides (ou semi-quantitatifs) ont été développés (PREMATEND, Vétoquinol), produisant un changement de couleur lors du passage d'une progestéronémie de base à une progestéronémie élevée signalant l'imminence de l'ovulation. L'échantillon à doser est comparé à deux plasmas témoins, correspondant au début de l'augmentation du taux de progestérone (moment du pic de LH) et à la valeur seuil supérieure du moment de l'ovulation (10 ng/mL). On procède au premier accouplement 24 à 48 heures après le franchissement de cette valeur. Ce test est très utile en pratique courante et représente une bonne alternative entre les deux autres méthodes.

Enfin, actuellement on dose la progestérone par des tests radio-immunologiques. La valeur de la progestéronémie prise comme témoin de l'ovulation est estimée à 5,44 ng/mL (43).

2.3.3 – *Intérêts et limites*

En pratique, en raison du coût des dosages de la progestérone, on utilise cette méthode conjointement avec les frottis vaginaux. Il est ainsi inutile de débiter les dosages tant que la chienne est encore en pro-œstrus ; de même, la mesure du taux de progestérone ne permettant pas de déterminer la fin de période de fécondabilité, un frottis vaginal montrant des signes avant-coureurs de métœstrus et un taux de progestérone élevé indiquent que la chienne n'est probablement plus fécondable.

La période optimale de fécondité survenant après la phase de maturation, il peut être utile de poursuivre le suivi de l'évolution de la progestérone au-delà de 10 ng/mL ; en pratique, en raison de la survie assez longue des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles, le premier accouplement ou insémination peut se produire lorsque le dosage indique des valeurs supérieures à 15-20 ng/mL, et renouvelé 48 heures plus tard (32)(41)(43).

En routine, on réalise en moyenne deux à quatre dosages de progestérone par suivi de chaleurs (41).

Le dosage de progestérone devient incontournable lors (40) :

- de chaleurs discrètes ou silencieuses
- de l'utilisation de l'insémination artificielle : en semence fraîche (comportement anormal des lices (agressivité) ou des étalons (saillies intempestives)) ou en semence réfrigérée ou congelée (éloignement des deux reproducteurs...)
- d'anomalies du cycle : chiennes ayant été mises à la saillie à des dates traditionnelles et ne remplissant pas (40% des chiennes n'ovulent pas dans la fourchette de dates habituelles de 10-15 jours)
- de la reproduction de races où la césarienne est quasi-inévitable, afin de prévoir la date de l'intervention.

2.4 – 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 (64). 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 émise 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^{ème} jour après le pic d'après Shimasu et al. (53).

2.5 – 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'échographiste et surtout, n'est réalisable que sous la forme d'un suivi échographique et d'examens rapprochés. Le jour de l'ovulation peut ainsi être déterminé de manière précise mais nécessite un suivi journalier par échographie (36). 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. La figure 7 montre la position de la chienne pour réaliser cet examen.

Figure 7: Technique d'échographie ovarienne

Source : Fontbonne A.©



Les ovaires sont situés en position sous lombaire au niveau de la 3^{ème} ou 4^{ème} 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 (21). (Cf. Fig. 8).

Figure 8: Ovaire en proœstrus

Source : Fontbonne A. ©

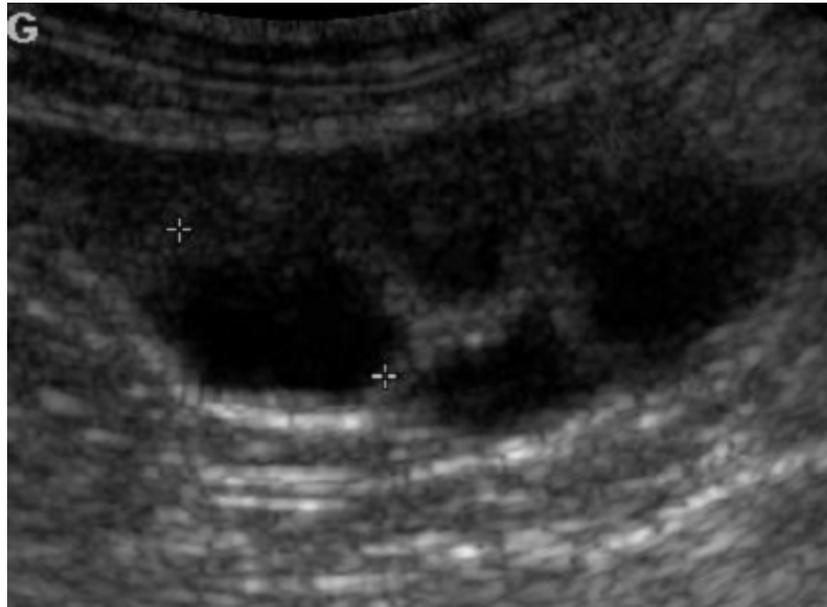


Les structures folliculaires ne sont pas encore bien délimitées et ont un aspect flou.

En période pré-ovulatoire, la paroi de l'ovaire est très fine et les follicules sont de grande taille environ 5 mm (21). (Cf. Figure 9 ci-dessous)

Figure 9: Ovaire en période pré-ovulatoire

Source : Fontbonne A. ©

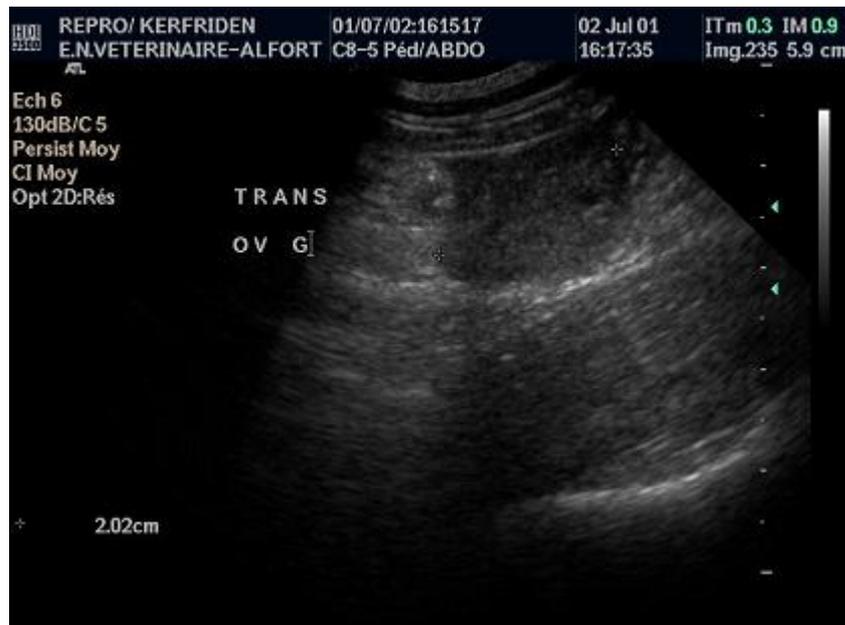


La paroi, très fine, donne une image à l'échographie appelée en « nid d'abeille » (en rapport à la ressemblance avec les alvéoles fabriquées dans la ruche, les follicules sont de grandes tailles : 6 à 9 mm (21).

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 10)

Figure 10: Ovaire post-ovulation : disparition des follicules

Source : 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 (21).

2.6 – Endoscopie vaginale

L'examen par endoscopie permet d'observer l'aspect de la muqueuse vaginale au cours du cycle (56). La figure 11 est une photo d'une partie de l'endoscope, avec à gauche la partie introduite dans le vagin.

Figure 11: Appareil d'endoscopie vaginale

Source : 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 proœstrus, la muqueuse est œdématiée, rose, recouverte de sérosité et de sang. La lumière du vagin est réduite. (Cf. Figure 12 ci-dessous).

Figure 12: Muqueuse vaginale lors du proœstrus vue par endoscopie

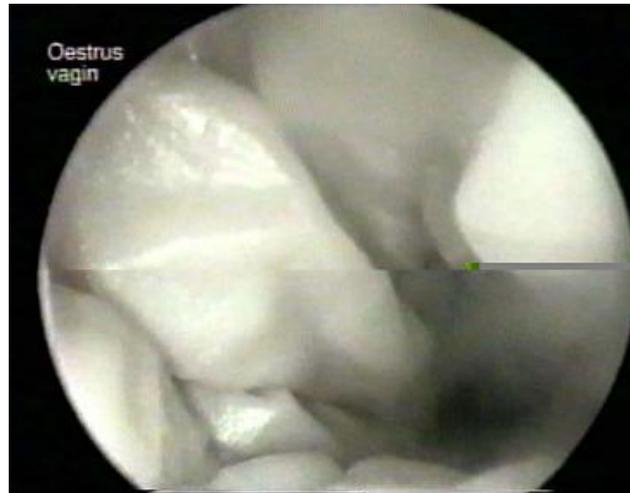
Source : Fontbonne A. ©



Lors de l'œstrus : La muqueuse est rosée, plissée (plis profonds) et la lumière vaginale est nette. (Cf. Figure 13 ci-dessous)

Figure 13: Muqueuse vaginale lors de l'œstrus vue par endoscopie

Source : Fontbonne A. ©



Lors du métœstrus : 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.

3 – L'insémination artificielle canine : matériels, méthodes et résultats

Trois types d'inséminations sont regroupés sous le terme d'insémination artificielle : insémination en semence fraîche, insémination en semence réfrigérée ou insémination en semence congelée (35)(62).

3.1 – Récolte du sperme

La première étape est celle de l'examen du chien à prélever : tout d'abord général, celui-ci sera poursuivi par un examen andrologique approfondi : scrotum, testicules, épидидymes, prostate, pénis et fourreau seront examinés avec soin. On veillera à ne pas prélever qu'un mâle en bonne santé et sans troubles apparents des organes reproducteurs.

La récolte du sperme nécessite l'utilisation de cônes de prélèvement en caoutchouc faisant office de vagins artificiels, adaptés à des tubes en plastiques stériles et incassables à usage unique de 15 mL. Ils seront posés sur un porte-tube préchauffé après récolte ; le prélèvement s'effectuant à l'aide de gants à usage unique qui évitent les infections zoonotiques comme la Brucellose pour le manipulateur (Cf. Annexe V).

Plusieurs cônes sont utilisés afin de fractionner le prélèvement selon les phases de l'éjaculat. L'insémination artificielle nécessite du matériel propre, voire stérile, dénué de tout pouvoir spermicide.

Après un contrôle qualitatif et quantitatif (62), celui-ci est réfrigéré, congelé ou inséminé directement, le plus rapidement possible, la durée de conservation des spermatozoïdes à température ambiante sans apports d'éléments nutritifs étant très limitée.

Selon le type d'insémination, le volume conservé varie : pour une insémination en semence fraîche, on ajoutera à la phase spermatique un volume variable de fraction prostatique ; pour une insémination en semence réfrigérée ou congelée, seule la fraction spermatique est conservée et diluée dans un milieu de conservation.

3.2 – Techniques d'insémination

Il existe deux manières pour inséminer : par voie intra-vaginale ou intra-utérine (7)(58).

3.2.1 – L'insémination par voie intra-vaginale

On utilise une sonde à usage unique en plastique souple, munie d'un petit ballonnet gonflable à son extrémité distale : le pistolet « Osiris » (50). Ce dispositif mime le gonflement des bulbes érectiles lors de la saillie, stimulant ainsi le péristaltisme vaginal ; il empêche de plus le reflux de la semence (Cf. Figure 14).

La sonde est introduite à la commissure vulvaire supérieure, verticalement, jusqu'au pli dorso-médian du vagin. Le ballonnet est alors gonflé pour garantir le maintien en place de la sonde. La semence est injectée grâce à une seringue ; l'animal est maintenu en position de brouette pendant une dizaine de minutes de façon à accélérer la pénétration des spermatozoïdes au travers du col de l'utérus par gravité (Cf. Figure 15). L'injection de 2 ou 3 mL d'air permet de vider totalement la sonde en fin d'injection. Celle-ci est ensuite retirée après dégonflement du ballonnet. La chienne est ensuite gardée au calme en évitant qu'elle n'urine pendant deux heures.

Figure 14: Pistolet Osiris : détail des différents composants

Source : Mialot et al. (50)

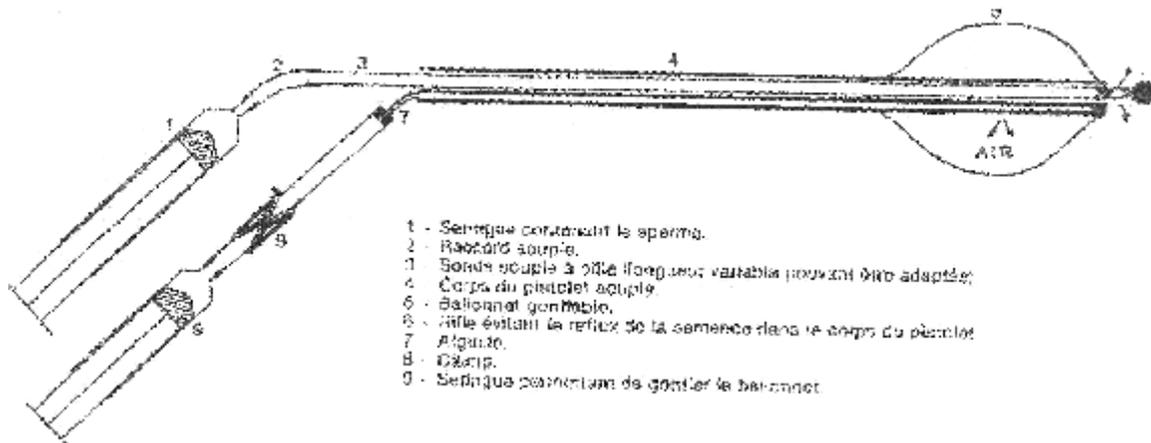
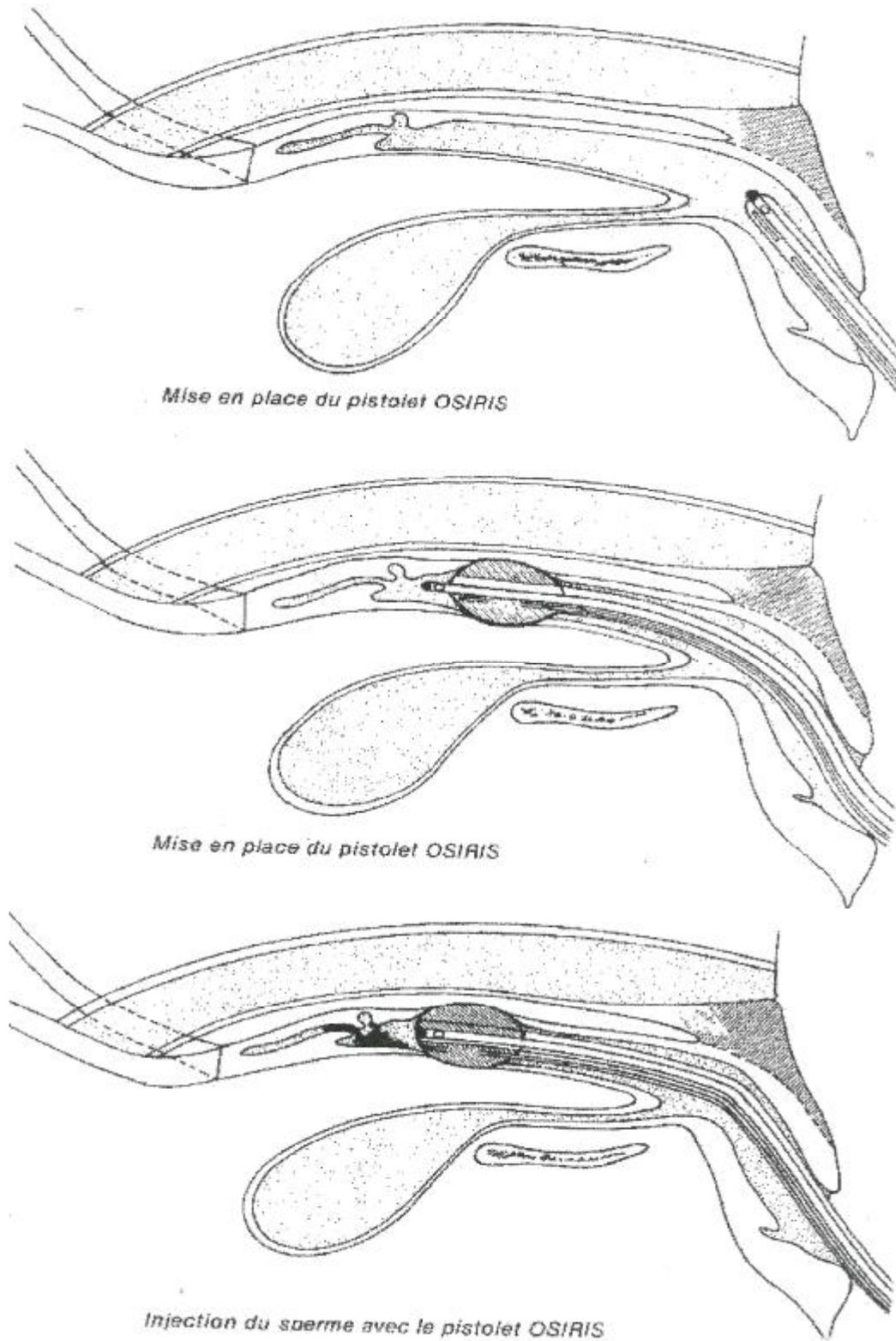


Figure 15 : Insémination intra-vaginale avec le pistolet souple Osiris

Source : Mialot (50)



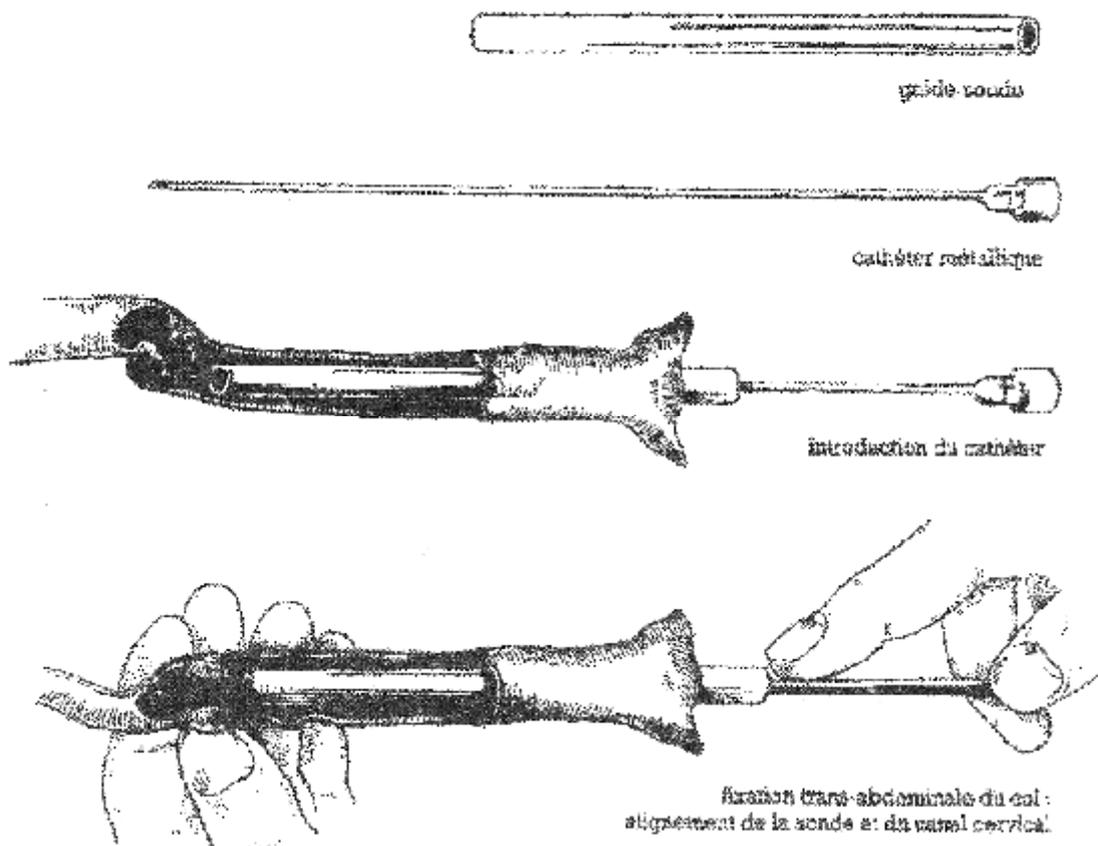
3.2.2 – L'insémination par voie intra-utérine

Elle est particulièrement intéressante pour la semence congelée, dont le pouvoir fécondant n'est maintenu que 12 à 24 heures. Il existe trois techniques : la technique scandinave ou norvégienne, la technique par endoscopie et la technique chirurgicale. Cette dernière peut se faire par laparoscopie (37) ou laparotomie et nécessite l'anesthésie générale.

La technique scandinave nécessite peu de matériel : le cathétérisme du col utérin se fait à l'aide d'un spéculum cylindrique creux en plastique rigide permettant de repérer le col et d'introduire la sonde intra-utérine métallique à l'extrémité mousse stérile (Cf. Figure 16). Cette technique est difficile à réaliser, le franchissement du col étant un obstacle dans cette espèce : le vagin est profond et courbé dorso-ventralement et le col utérin est accompagné postérieurement d'un repli du plafond vaginal de taille importante, qui détermine avec le plancher du vagin un « pseudo-cervix » (2)(23)(41). Pour la réalisation de cette technique, la chienne doit être très calme, ou au préalable tranquilisée, sans se coucher, afin d'obtenir un relâchement de l'abdomen facilitant le maintien du col par palpation trans-abdominale.

Figure 16: L'insémination intra-utérine par technique scandinave

Source : Guérin (41)



L'endoscopie permet de cathétériser le col utérin avec une sonde d'insémination, en visualisant le col au moment de l'insémination. L'endoscope (Cf. Figure 11) est introduit dans le vagin, et permet à l'opérateur de bien contrôler ses manipulations. La portion vaginale du cervix apparaît comme un tubercule distinct du pli dorso-médian, situé légèrement plus ventralement. L'orifice du col de l'utérus se trouve au centre d'une rosette dans la plupart des cas. Le cathéter est introduit dans l'ostium, puis poussé dans le canal cervical avec un mouvement de rotation. Il faut l'avancer le plus crânialement possible, mais sans forcer pour ne pas léser la muqueuse utérine qui est très fragile. La semence est inséminée lentement en gardant en vue le cathéter pour s'assurer qu'il n'y ait pas de reflux vaginal de semence. Si c'est le cas, la sonde peut être repositionnée. Il est conseillé d'insuffler ensuite une petite quantité d'air dans le cathéter pour vider complètement la sonde d'insémination (56)(63).

Ces techniques, bien qu'augmentant de manière sensible le taux de fertilité (15 à 20%) et la prolificité (plus d'un chiot par portée)(27) restaient lourdes et difficiles à réaliser en pratique courante et n'étaient pas utilisées à Alfort jusqu'en 1998. Depuis l'arrivée d'Alain Fontbonne au CERCA en septembre 2000, l'insémination intra-utérine par voie transcervicale a commencé à être pratiquée couramment (37). Actuellement cette méthode est tentée à chaque insémination, soit par sonde scandinave soit par endoscopie.

3.3 – Indications des différents modes d'insémination

Elles varient selon le mode d'utilisation du sperme (6)(10)(30)(35)(41)(39).

3.3.1 – *L'insémination en semence fraîche*

Le prélèvement est réalisé en présence de la chienne en chaleurs ou au pire en présence d'un linge imprégné de son odeur. Après examen rapide, la semence est directement utilisée, sans autre préparation, dans un délai de 15 minutes (2) ; cette méthode ne permet qu'une seule insémination par éjaculat.

Elle peut être réalisée pour des raisons :

- comportementales : jeunes mâles inexpérimentés et maladroits, femelles dominantes et agressives envers le mâle dans certaines races (Chow-chow, Rottweiler), absence de libido de certains mâles (Molosses, Retrievers, Yorkshire).
- anatomiques : lésions vulvaires ou vaginales (tumeurs, ptose vaginale, vaginite ou vulvite, eczéma vulvaire ou périvulvaire...)(28), malformations (brides vaginales, sténose du vagin, septum vaginal) ou malpositions de la vulve (vulve atrésique des Colley, vulve barrée des Berger Picard), fracture ancienne de l'os pénien chez le mâle, douleurs articulaires de la colonne ou du bassin chez les animaux plus âgés, disproportion de format et de poids entre le mâle et la femelle (Brachycéphales (47) : Bulldog anglais, Mâtin de Naples, Mastiff), présence de longs poils sur l'arrière train de certains terriers et le Bobtail.
- sanitaires : contamination vénérienne de l'herpès vireux (protection du mâle).

3.3.2 – L'insémination en semence réfrigérée

La semence de l'étalon est prélevée dans les heures ou les jours précédant la date d'insémination déterminée par le suivi de chaleurs de la chienne (33). La phase spermatique de l'éjaculat est diluée dans un milieu de conservation qui maintient le pouvoir fécondant des spermatozoïdes durant quelques jours : éléments tampons et nutritifs, antibiotiques et un cryoprotecteur (jaune d'œuf ou lait écrémé) qui protège les spermatozoïdes du choc thermique lors du refroidissement entre l'air ambiant et + 4°C. La semence est conditionnée dans un emballage isotherme (type bouteille thermos) et rapidement expédiée sous 24 heures (37) ou 48 heures (35).

Ses principales indications sont :

- l'éloignement géographique entre les deux reproducteurs
- doubler une insémination en conservant une partie de l'éjaculat au réfrigérateur lorsque le mâle donneur ne peut se déplacer
- l'existence d'une barrière sanitaire entre deux pays.

3.3.3 – L'insémination en semence congelée

Elle peut être pratiquée par des vétérinaires agréés mais les trois seules structures habilitées par le ministère de l'agriculture à conserver la semence des étalons en France sont le CERCA (Centre d'Etudes en Reproduction des Carnivores) à l'ENVA, le CERREC (Centre d'Etude et de Recherche en Reproduction et Elevage des Carnivores) à l'ENVL et le CIAC (Centre d'Insémination Artificielle Canine) à l'ENVN.

Les étalons sont prélevés en présence d'une chienne en chaleurs. La phase spermatique du sperme est diluée dans un milieu synthétique tamponné contenant du glycérol (protection des spermatozoïdes durant la congélation en évitant la formation de cristaux de glace à l'intérieur des spermatozoïdes et en leur apportant des nutriments nécessaires à la reprise de leur métabolisme lors de la décongélation). Le sperme est progressivement refroidi : de la température ambiante à 4°C ; puis jusqu'à -70°C dans les vapeurs d'azote ; puis à -196°C dans l'azote liquide. La semence se conserve quasi infiniment, sous forme de paillettes de 0.25 mL, 0,5 mL ou 1 mL, ou de pastilles.

Ses indications majeures sont (en raison du coût de la méthode) essentiellement génétiques :

- échanges internationaux, pour lesquels la durée d'acheminement du sperme dépasse 48 heures. L'autonomie des conteneurs pour la semence congelée est d'environ 1 semaine.
- barrière sanitaire imposant une quarantaine.
- indisponibilité d'un étalon de grande valeur génétique : maladie, exportation, accident, décès.
- sauvegarde de races à faible effectif en gardant une variabilité génétique et conservation du patrimoine génétique.

- retrempe : utilisation sur une lice de la semence de ses ascendants en vue de maintenir les caractères d'une lignée et la diversité génétique d'une race.

Cette méthode vise donc à l'amélioration des races et forme une véritable « épargne génétique ». Cependant, le sperme du chien étant relativement pauvre en spermatozoïdes et un certain nombre d'entre eux étant tués lors de la congélation, l'insémination en semence congelée ne permet pas de disséminer le potentiel génétique d'un chien comme c'est cas pour les bovins. Un éjaculat congelé de chien ne permet d'inséminer qu'une ou deux chiennes.

3.4 – Résultats comparés

Après accouplement naturel, le taux de mise-bas est de 92%, d'après Million (51).

Lorsque le protocole de suivi des chaleurs et de technique d'insémination a été correctement suivi, les résultats de l'insémination en semence fraîche sont excellents, de 95 à 98% d'après Mimouni et Dumon (52), 87% d'après Nizanski (54), et 85% d'après Million (51). D'après Linde-Forsberg (48) et (49), il est seulement de 48 % après insémination intra-vaginale, et de 62 à 65% après insémination intra-utérine. La prolificité est de l'ordre de 5.7 chiots (43).

L'insémination en semence réfrigérée donne également d'excellents résultats, le taux de mise-bas après insémination artificielle est identique à celui obtenu en semence fraîche, si l'insémination est effectuée dans les deux jours suivant la récolte de la semence. Puis le taux de mise-bas diminue jusqu'à être nul au-delà de quatre jours après la récolte (Million (51); Mimouni et Dumon (52)). D'après Linde-Forsberg (48) et (49), le taux de mise-bas après insémination intra-vaginale est de 45%, alors que le taux de mise-bas après insémination intra-utérine est de 65%. Au vu de ces bons résultats et des possibilités d'éloignement qu'elle offre, elle est la technique d'avenir pour les éleveurs.

Pour l'insémination en semence congelée, les résultats atteignent 55% selon Bartolo (12), 50% selon Bénéchet (13). Le taux de mise-bas après insémination intra-vaginale est de 30 à 40% d'après Mimouni et Dumon (52), 35 à 37% d'après Linde-Forsberg (48) et (49) et 10% d'après Thomassen et al. (60). Par contre, le taux de mise-bas après insémination intra-utérine est de 60 à 65% d'après Mimouni et Dumon (52), 52 à 55% d'après Linde-Forsberg (48) et (49) et 75% d'après Thomassen et al. (60).

Etant donné la plus courte durée de vie de la semence congelée dans les voies génitales femelles, il est préférable de pratiquer cette insémination en fin d'œstrus (2) en déterminant le plus précisément possible le moment optimal par le dosage de la progestérone (29)(Cf. II.2.3).

MCours.com