

DEUXIÈME PARTIE

Partie expérimentale

[MCours.com](https://www.mycours.com)

I. Objectifs

Dans cette étude, nous souhaitons optimiser la méthode de prélèvement de semence des grands félins sauvages en vue de leur conservation grâce aux biotechnologies. C'est pourquoi nous avons procédé à des prélèvements par électroéjaculation sur des félins issus de parc zoologiques français ou de parcs régionaux en Afrique du Sud.

Pour un expérimentateur novice, la technique d'électroéjaculation ne s'acquiert pas avec aisance. C'est pourquoi nous avons eu l'idée d'améliorer la sonde d'électroéjaculation. D'une part, nous souhaitons préciser le positionnement de cette sonde en intra-rectal (orientation ventro-caudale), quelle que soit l'espèce de grands félins sauvages prélevés ; d'autre part, concrétiser cela par la mise en place de graduations sur le manche de la sonde permettant au manipulateur de trouver la bonne orientation rapidement grâce au manche, et la profondeur grâce à une molette de positionnement.

Le but de notre étude est donc, entre autre, de préciser le positionnement des sondes d'électroéjaculation, de faciliter et rendre plus accessible l'utilisation de la sonde d'électroéjaculation chez les félins.

II. Matériels et méthodes

II.1. Animaux et lieux de prélèvements

II.1.1 Étude anatomique

Un chat mâle Siamois âgé de 13 ans appartenant au CERCA et atteint d'une maladie systémique conduisant à son euthanasie a été autopsié dans un premier temps.

Puis un guépard mâle de 4 ans du parc Letsatsi atteint, depuis son arrivée, d'une maladie systémique a été retrouvé mort. Le groupe CRESAM a procédé à son autopsie.

II.1.2 Animaux des prélèvements

Les félins prélevés sont ceux du parc zoologique du Mont Faron à Toulon (83) en juin 2010 : un léopard (*Panthera pardus*), un lynx boréal (*Lynx lynx*), un caracal (*Caracal caracal*) et un lion (*Panthera leo*) ; du parc régional du Letsatsi : 13 guépards (*Acinonyx jubatus*) et un lion (figure 18 et photo 8) en Afrique du Sud lors d'une mission du CRESAM en février 2011 ; et enfin au zoo du PAL (03) : un lion en mars 2011, dans le cadre d'une étude de fertilité. Les commémoratifs sont indiqués pour chaque animal de l'étude : le tableau 7 répertorie leurs caractéristiques (âge, sexe,...).

Tableau 7 : Commémoratifs des félidés sauvages prélevés pour notre étude.

(G) : guépard ; (L) : lion.

*Letsatsi **Zoo du Mont Faron ***Zoo du PAL ; - : non relevé.

<u>Animaux</u>	M1*	M2*	M3*	M6*	M7*
	(G)	(G)	(G)	(G)	(G)
N° Puce électronique	4A60294034	4A6020487E	4C11253051	4B66515C10	4C11257A5A
Âge (ans)	2	6.5	5	2	7
Origine	North West (Ryanna)	Western Cape	Western Cape	CKZ (réserve de chasse)	North West
<u>Animaux</u>	M8*	M9*	M10*	M11*	M12*
	(G)	(G)	(G)	(G)	(G)
N° Puce électronique	-	4342775477	4A4A3C6A3F	4534185E5D	4864116E26
Âge (ans)	4	3	5	6,5	7
Origine	Sauvage	Sauvage	Gaunteng	Sauvage	North West
<u>Animaux</u>	M13*	M14*	Sabou*	Alex*	Oless***
	(G)	(G)	(G)	(L)	(L)
N° Puce électronique	97800000108 5966	00066DF209	-	416943430B	25050578797 7435FR
Âge (ans)	7,5	6	5	2	11
Origine	Sauvage	Gaunteng	Letsatsi	Letsatsi	-
<u>Animaux</u>	Samba**	Léopard**	Lynx**	Caracal**	
	(L)				
N° Puce électronique	25026960264 5832FR	250177612745 832FR	250269602645 834FR	-	
Âge (ans)	10	5	4	3	
Origine	-	Italie	Italie	-	

Figure 18 : Localisation du parc Letsatsi [72].

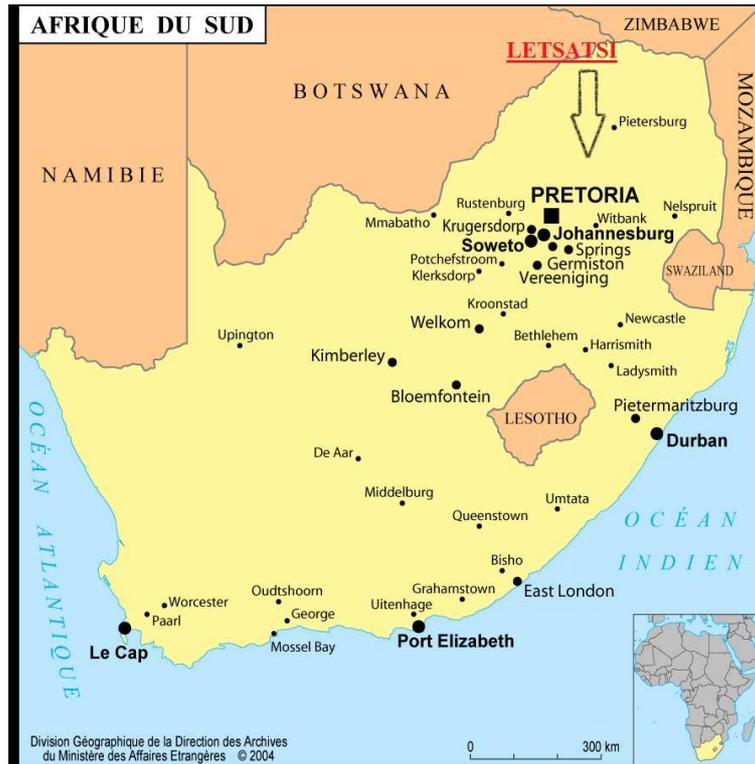


Photo 8 : Récolte de semence sur Alex, un lion du Letsatsi (CRESAM).



II.2. Matériels

II.2.1 Autopsie

Les autopsies effectuées ont nécessité des gants en latex jetables et des lames froides de 23 pour les dissections des plans cutanés, musculaires et profonds, ainsi qu'une pince à dents et des ciseaux de Mayo pour la mise en évidence des différents organes et de leur topographie. Enfin, un outil de mesure, type double-décimètre, est utile pour le marquage de la profondeur d'enfoncement.

II.2.2 Anesthésie

II.2.2.i Téléanesthésie

Afin d'endormir ces grands félins sauvages, nous avons procédé à leur téléanesthésie, méthode de choix en parc zoologique pour la plupart des interventions vétérinaires. Celle-ci se pratique à l'aide d'un fusil à lunette chargé de flèches hypodermiques pour des distances allant jusqu'à 30 m, ou à l'aide d'un petit fusil ou d'une sarbacane (photo 9) pour des petites distances.

Photo 9 : Téléanesthésie sur un lion du Letsatsi (CRESAM).



Flèche d'anesthésiques →

II.2.2.ii Molécules anesthésiques

L'animal est mis à jeun depuis au moins 24 à 48 heures. Nous avons choisi un protocole anesthésique à base de DEXDOMITOR®, Pfizer, (dexmédétomidine à 100 µg/kg en IM) et d'IMALGENE 1000®, Merial, (kétamine à 30 mg/kg en IM), nous laissant une durée de manœuvre de 30 à 50 mn environ.

II.2.2.iii Suivi anesthésique

Une voie veineuse est posée systématiquement sur chaque animal à l'aide d'un cathéter rose 20 G ou vert 18 G, de type VASOFIX® de chez Braun. Puis nous les mettons sous perfusion à un débit de 10 mL/kg/h de chlorure de sodium à 0,9 %. La bonne perméabilité des voies aériennes est vérifiée. Le temps d'anesthésie est précisément mesuré et contrôlé afin de prévoir au mieux les réactions de l'animal. Une trousse de molécules d'urgence (adrénaline, atropine) est à portée de main. Un tissu opaque est posé sur la face de l'animal (voir photo 10). Un lubrifiant oculaire type OCRYGEL®, AgecoM, est déposé dans les deux yeux de l'animal, le plus régulièrement possible.

Photo 10 : Anesthésie d'un lion par le CRESAM.



II.2.3 Matériels de prélèvement

II.2.3.i Flush vésicaux

A l'aide d'un cathéter bleu 22 G sans mandrin, nous avons sondé l'animal anesthésié et rincé sa vessie à l'aide d'une seringue de 20 mL remplie de M199 (Sigma-aldrich®), milieu de coloration cellulaire sensible au pH (photo 11). Ce colorant a la particularité d'être incolore en présence d'urine, ou légèrement jaune dû à la couleur de base de l'urine, et plus précisément violet dans un milieu à pH acide, mais est par contre naturellement de couleur rose, dès que le milieu est neutre ou légèrement basique, pH de la semence, c'est-à-dire lorsqu'il n'y a pas d'urine.

Le cathéter est laissé à demeure lors de l'électroéjaculation.

Photo 11 : Variation de couleur du M199 à différents pH.



Les bandelettes urinaires indiquent le pH du milieu et par conséquent la couleur du M199 au pH correspondant (de gauche à droite respectivement : 9, 8, 7, 6, 6, 7).

II.2.3.ii Sonde et électroéjaculateurs

Nous avons utilisé un électroéjaculateur genre P and T electronics®, Oregon, USA, et des sondes bipolaires de 12, 20 et 25 cm selon l'espèce de félin prélevés. L'annexe 4 regroupe les différents protocoles pour félinidés sauvages, avec le diamètre de sonde adéquat.

II.2.3.iii Récolte de la semence

Nous avons placé avant chaque série d'électroéjaculation l'extrémité du pénis de l'animal dans un tube à essai en plastique hermétique à bouchon bleu, type M23914 de chez Bioblock®, afin de récolter les différents éjaculats. Puis entre chaque série, le tube est changé. La semence récoltée est placée dans le milieu utilisé par le CERCA en vue de sa conservation comme décrits dans la première partie, chapitre 4.

II.3. **Méthodes : amélioration de la forme et du positionnement de la sonde d'électroéjaculation**

II.3.1 **Expérience 1 : position de la sonde analysée grâce à des examens nécropsiques**

II.3.1.i Etude préliminaire sur un chat domestique

Avant l'euthanasie du chat, nous avons procédé à la récolte de sa semence (photo 12) par électroéjaculation selon le protocole utilisé au CERCA et retranscrit en annexe 5. La sonde rectale, mesurant 12 cm de longueur, 1 cm de diamètre, a été laissée en place avant l'autopsie afin de prendre les mesures nécessaires quant à la distance électrode-prostate, pour un bon positionnement de sonde engendrant la protrusion des griffes des postérieurs.

Photo 12 : Marquage du positionnement de la sonde rectale puis récolte de semence par électroéjaculation sur un chat (CERCA).



II.3.1.ii Nécropsie d'un guépard

L'animal étant déjà mort à l'arrivée de l'équipe du CRESAM, aucune électroéjaculation n'a pu être mise en place, seule une étude anatomique avec placement de sonde bipolaire a pu être menée.

II.3.2 Expérience 2 : positionnement et forme de la sonde analysés grâce à différents prélèvements

II.3.2.i Fréquences et mode de prélèvements

Avant toute intervention, l'animal subit un examen clinique, notamment de son appareil génital mâle externe : les mesures morphométriques de tous les mâles prélevés dans les différents parcs sont répertoriées dans le tableau 10, ainsi que les caractéristiques particulières comme l'aspect des papilles du pénis par exemple (photo 13).

Photo 13 : Pénis extériorisé d'un Lion du Letsatsi (CRESAM).



La présence de papilles confirme la bonne imprégnation en testostérone du félin.

Le protocole utilisé correspond à ceux précédemment décrits dans la partie 1, utilisés par le CRESAM pour l'électroéjaculation des félinés, reporté en annexe 5 et illustré par la photo 14, à savoir :

- 1^{ère} série : 30 stimulations (10 stimuli de 4 volts, 10 de 5 volts, 10 de 6 volts),
- 2^{ème} série : 30 stimulations (10 stimuli de 5 volts, 10 de 6 volts, 10 de 7 volts),
- 3^{ème} série : 20 stimulations (10 stimuli de 6 volts, 10 de 7 volts).

Sur le dernier enchaînement de 10 stimulations de chaque série, un massage de la zone périnéale (photo 14) est entrepris afin d'augmenter la quantité d'éjaculat récolté.

Photo 14 : Massage périnéal lors d'une électroéjaculation sur un lion du Letsatsi (protocole du CRESAM, non publié).



II.3.2.ii Examen de la semence

i. Volume, aspect, pH

L'examen premier est visuel (aspect, pH) et quantitatif (volume, pH), puis à l'aide de colorations particulières, nous procédons à la quantification de la mobilité, morbidité et formes anormales.

Le volume mesuré correspond au volume total de sperme prélevé au cours de toutes les stimulations (somme de toutes les semences récupérées après chaque série). Ce volume est mesuré par pipetage.

Le pH est mesuré à l'aide de bandelettes de papier pH.

ii. Numération, mobilité, formes anormales

Pour le comptage des spermatozoïdes vivants, mobiles et des formes anormales, nous avons utilisé la coloration éosine-nigrosine : elle est la référence en matière d'examen morphologique de la semence [81]. Le colorant est constitué d'un mélange isotonique de 10 % de nigrosine et de 4 %

d'éosine. Il doit être conservé au réfrigérateur. Il s'agit d'une coloration différentielle. Elle permet de distinguer les cellules mortes (éosinophiles) des cellules vivantes (non éosinophiles). La nigrosine permet d'éliminer l'effet de coloration de milieu dû au premier colorant, ce qui offre une meilleure visualisation des cellules.

Les spermatozoïdes vivants restent incolores, ou se colorent partiellement en rose à la partie supérieure de la tête, tandis que les spermatozoïdes morts s'imprègnent intensément de colorant et apparaissent en rouge sur un fond rosé.

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

La technique de coloration est la suivante : une goutte de semence est prélevée à l'aide d'une pipette, dans l'échantillon de sperme maintenu à 37°C à l'aide d'un bain d'eau chaude. Cette goutte est mélangée à une goutte de colorant, et le nouvel échantillon est laissé 5 minutes à 37°C. On réalise ensuite un étalement sur une lame comme on le ferait pour un frottis sanguin. La lame séchée, l'observation se fait au microscope objectif ×40, puis à l'objectif ×100 à immersion.

II.3.3 Expérience 3 : essai de diminution de la contamination par l'urine

L'utilisation d'un milieu de coloration cellulaire sensible au pH, le M199 a été testée lors des derniers prélèvements par le CRESAM sur des grands félins. En effet, le but était de s'affranchir de la contamination urinaire, qui diminue la qualité de la semence prélevée, comme vu dans la partie 1, chapitre 3.

Ainsi avons-nous rajouté au protocole d'électroéjaculation cette étape : après cathétérisation de l'urètre avec un cathéter sans mandrin, des rinçages vésicaux sont pratiqués avec le M199 (une vingtaine de millilitres sont injectés puis réaspirés) jusqu'à obtention d'un liquide rose, donc sans contamination urinaire.

De plus, dans le tube de récolte des éjaculats, quelques millilitres de M199 sont rajoutés afin de vérifier la contamination urinaire : en effet, dès que le prélèvement change de couleur (de rose à jaune), l'électrostimulation est stoppée, nous procédons à de nouveaux rinçages vésicaux, puis reprenons le protocole d'électroéjaculation.