

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES PHOTOS.....	6
LISTE DES TABLEAUX.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
GLOSSAIRE.....	10
INTRODUCTION.....	11
Première partie:.....	13
Contexte bibliographique actuel.....	13
I. Rappels d’anatomie de l’appareil génital mâle et de physiologie de la reproduction chez le chat.....	15
I. 1 Rappels anatomiques.....	15
I.1.1 L’appareil génital externe : Le scrotum et les testicules [119].....	15
I.1.2 Le pénis [60,119].....	16
I.1.3 L’urètre et les glandes annexes [60,119].....	16
I.1.3.i L’urètre.....	17
I.1.3.ii La prostate.....	17
I.1.3.iii Les glandes bulbo-urétrales.....	17
I.1.4 Neuro-anatomie [60,99,119].....	19
I.2 Physiologie de la reproduction chez le chat mâle.....	20
I.2.1 Puberté.....	20
I.2.2 Saisonnalité [50,54,119].....	22
I.2.3 Carrière de reproduction.....	23
I.2.4 Comportement sexuel du chat mâle.....	23
I.2.5 Evènements post-coït.....	29
II. Méthodes de prélèvement du sperme de chat, examen et caractéristiques de la semence féline.....	32
II.1 Méthodes de prélèvement du sperme de chat.....	32
II.1.1 Vagin artificiel.....	32
II.1.2 Electro-éjaculation.....	33
II.1.3 Flush ou aspiration de l’épididyme.....	41
II.1.4 Cathétérisme urétral après injection de médétomidine.....	42
II.1.5 Autres.....	44
II.2 Méthodes d’appréciation et caractéristiques de la semence [119].....	45
II.2.1 Intérêt de l’analyse de la semence :.....	45

II.2.2	Examen macroscopique :	46
II.2.3	Examen microscopique de la semence :	47
II.2.4	Potentiel fécondant et fertilité.....	59
II.2.5	Caractéristiques de la semence, comparées selon le mode de prélèvement ...	65
II.2.5.ii	Caractéristiques de la semence récoltée par cathétérisme de l'urètre après injection de médétomidine	66
II.2.6	Qualité de la semence et fréquence de prélèvement [4,5]	67
III.	Facteurs influençant la qualité et la quantité de la semence	68
III.1	Affections d'origine génétique ou congénitale.....	68
III.1.1	Anomalies chromosomiques	68
III.1.2	Intersexualité.....	69
III.1.2.i	Hermaphrodisme vrai	69
III.1.2.ii	Pseudohermaphrodisme.....	69
III.1.3	Autres malformations.....	69
III.1.3.i	Ectopie testiculaire [89, 119]	69
III.1.3.ii	Hypoplasie testiculaire.....	70
III.2	Affection d'origine hormonale.....	70
III.2.1	dysendocrinies.....	70
III.2.2	Hypogonadisme [119,43]	70
III.3	Affection d'origine néoplasique.....	70
III.4.	Autres causes d'infertilité	71
III.4.1	Facteurs environnementaux	71
III.4.1.i	Eclairement	71
III.4.1.ii	Stress.....	71
III.4.1.iii	Alimentation [119]	71
III.4.2	Sperme de mauvaise qualité	72
III.4.2.i	Surexploitation.....	72
III.4.2.ii	Hyperthermie testiculaire.....	72
III.4.2.iii	Âge [101,102]	72
III.5	Tératozoospermie	73
III.5.1	Définition [46,120 ,123].....	73
III.5.2	Etiologie [46,120, 123].....	73
III.5.3	Caractéristiques de la semence de chats tératozoospermiques et anomalies morphologiques les plus fréquentes.....	73
III.5.4	Capacitation et réaction acrosomiale in vitro	76
III.5.5	Bases moléculaires de la capacitation.....	77

III.5.6	Stabilité de l'ADN nucléaire.....	78
III.5.7	Anomalies hormonales associées.....	79
III.5.8	Tératozoospermie chez les grands félins sauvages.....	80
III.5.9	Comment s'affranchir de ce problème ?.....	82
IV.	Conservation de la semence de chat.....	85
IV.1	Conditionnement.....	85
IV.1.1	Paramètre physicochimique de la dilution.....	85
IV.1.2	Choix d'un diluant.....	87
IV.1.2.i	Milieu de Hancock et Gledhill.....	88
IV.1.2.ii	Refrigeration medium test yolk buffer with gentamycin (Irvin Scientific). 88	
IV.1.2.iii	Ham's F10.....	89
IV.1.2.iv	Milieu Biggers Whitter witthingtam (BWW).....	89
IV.1.3	Additifs.....	89
IV.2	Conservation sans congélation.....	91
IV.2.1	Conservation à température ambiante [37,36].....	91
IV.2.2	Conservation à 37°C.....	91
IV.2.3	Réfrigération.....	92
IV.3	Congélation.....	93
IV.3.1	Domages cellulaires.....	93
IV.3.2	Additifs.....	95
IV.3.3	Traitements avant congélation.....	97
IV.3.4	Unités de congélation.....	99
IV.3.5	Vitesse de refroidissement.....	99
IV.3.6	Décongélation.....	100
IV.4	Caractéristiques de la semence après traitement.....	101
IV.4.1	Spermogramme.....	101
IV.4.2	Capacité à lier et à pénétrer la zone pellucide.....	103
IV.4.3	Capacitation.....	104
IV.4.4	Taux de fécondation et taux de gestation.....	104
IV.5	Dose fécondante nécessaire à l'insémination artificielle.....	105
Deuxième partie:		107
Etude expérimentale d'un protocole de prélèvement et de conservation de semence féline.....		107
I.	Objectifs.....	109
II.	Matériel et méthode.....	109
II.2	Animaux.....	109

II.3	Prélèvement du sperme.....	109
II.3.1	Protocole opératoire	109
II.3.1.i	Cathétérisme urétral.....	109
II.3.1.ii	Electro-éjaculation	110
II.3.1.iii	Flush épидидymaire	110
II.3.2	Fréquence de prélèvement	110
II.4	Analyse du sperme	110
II.5	Conservation du sperme	111
II.5.1.	Milieux de conservation	111
II.5.2	1 ^{ère} dilution	112
II.5.3	Transport	112
II.5.4	Traitement pour améliorer la qualité de la semence : la centrifugation	112
II.5.5	2 ^{ème} dilution.....	112
II.5.6	Réfrigération.....	112
II.5.7	Conditionnement et congélation	112
II.5.8	Décongélation.....	112
III.	Résultats	113
IV.	Discussion	114
IV.1	Mauvaise qualité de la semence féline	115
IV.1.1	Tératospermie	115
IV.1.2	Contamination urinaire	116
IV.1.3	Mobilité	116
IV.1.4	Origine probable des mauvais résultats rencontrés.....	116
IV.2	Points faibles du protocole expérimental.....	117
IV.2.1	Spermogramme.....	117
IV.2.2	Vitesses de refroidissement	117
IV.2.3	Milieux de dilution	117
IV.3	Significativité des résultats	118
	CONCLUSION	121
	BIBLIOGRAPHIE	123
	Annexes.....	133

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Testicule et épидидyme gauches de chat (d'après Barone [9]).....	16
Figure 2: l'appareil génital du chat mâle d'après Getty [33]	18
Figure 3: le pénis du chat, vue dorso-latérale d'après Getty [33]	18
Figure 4: innervation de l'appareil génital mâle. Points de stimulations et résultats (d'après Semans et Langworthy [99])	19
Figure 5: Conditionnement neuro-hormonal de la puberté chez le chat [118].....	21
Figure 6 : Phases comportementales caractéristiques du déroulement normal de la saillie dans l'espèce féline d'après Feldman et Nelson [30]	25
Figure 7: Diagramme de l'électro-éjaculateur et représentation graphique du courant électrique [119].....	34
Figure 8: Sonde Rectale [119]	35
Figure 9 : Cellule de Malassez (profil et quadrillage) [119].....	50
Figure 10 : Quadrillage de l'hémocytomètre de Fush-Rosenthal [119].....	51
Figure 11: Quadrillage de l'hémocytomètre de Neubauer [119].....	51
Figure 12: Diagramme montrant la convention pour le dénombrement des spermatozoïdes [119]	52
Figure 13: Structure d'un spermatozoïde de chat, d'après observation en microscopie électronique [110].....	61
Figure 14: Représentation schématique des défauts structuraux et fonctionnels observés chez les spermatozoïdes de chats tératospermiqes (morphologiquement normaux ou non) [89]	79
Figure 15 : Pourcentage de spermatozoïdes normaux d'après Pukazhenti <i>et al.</i> [89].....	81

LISTE DES PHOTOS

Photo 1: Evènements précoces lors de la fécondation d'ovule de chat par des spermatozoïdes épидидymaires (T0= Insémination, cellules colorées) [71]	31
Photo 2: Exemple de vagins artificiels (A : tube plastique et pipette pasteur ; B : tube en plastique de 5 ml, drain de Penrose et petit tube en verre) [132]	32
Photo 3: Exemple de modèle d'électro-éjaculateur (CERCA)	34
Photo 4 : Sondes rectales [119] (CERCA)	35
Photo 5: Positionnement de l'animal anesthésié durant la séance d'électro-éjaculation (CERCA).....	36
Photo 6 : Positionnement optimal de la sonde avec extension symétrique des postérieurs et extrusion des griffes (CERCA)	36
Photo 7 : Récolte de la semence dans un tube Eppendorff (CERCA).....	37
Photo 8 : Flacons de Domitor®, Dexdomitor® et Antisédan® (Pfizer)	42
Photo 9 : Matériel nécessaire au prélèvement par cathétérisme urétral (CERCA)	43
Photo 10 : Positionnement de la sonde pendant le cathétérisme urétral (CERCA)	43
Photo 11 : récolte du sperme dans un tube Eppendorff après cathétérisme urétral (CERCA).....	44
Photo 12 : Hémacytomètre utilisé au CERCA.....	49
Photo 13: Spermatozoïdes de chat colorés à l'aide de Spermac® (a : acrosome normal ; b : acrosome anormal) [97]	54
Photo 14: (coloration au vert FCF et rose Bengale) Quelques formes de spermatozoïdes retrouvés dans les éjaculats de chat normospermique (A) ou tératospermique (B) ; acrosome normal (C) ; acrosome lésé (D) ; acrosome enflée (E) ; absence d'acrosome (F) ; spermatozoïde normal (G) ; gouttelette cytoplasmique avec (H) ou sans (I et J) pièce intermédiaire ; gouttelette cytoplasmique proximale (I) ou distale (H et J) ; flagelle double (K) ; flagelle enroulé (L) ; macrocéphalie avec aplasie mitochondriale partielle (M) ; microcéphalie avec aplasie mitochondriale totale (N) ; flagelle en anneau (O) ; tête piriforme (P) [132]	57
Photo 15: Spermatozoïde marqué avec l'isothiocyanate de fluorescéine conjugué à une agglutinine de cacahuète [AI : acrosome intact (forte fluorescence se dégageant de toute la région de la tête) ; NAI : acrosome non intact (fluorescence cantonnée au segment équatorial)] [88]	63
Photo 16 : Pénétration de la « zona-free » » d'ovule d'hamster par un spermatozoïde de chat domestique [tête enflée (flèche) et queue attachée dans le vitellus de l'ovule] [47]	64
Photo 17: Entreposition des paillettes dans un cylindre d'acier à différentes distances de l'azote liquide (exposition à différentes vitesse de refroidissement) et immersion dans l'azote liquide quand la température de -40°C est atteinte [129]	100
Photo 18: Examen des dommages acrosomiaux provoqués par le choc thermique (×16 000, trait = 1 µm)) [86].....	103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques de la semence pour deux périodes de l'année d'après Johnstone <i>et al.</i> [50]	22
Tableau 2 : Protocole d'électro-éjaculation selon Howard [46,28]	39
Tableau 3 : Protocole d'électro-éjaculation selon Platz et Seager [80]	40
Tableau 4 : Protocole d'électro-éjaculation selon Dooley [26].....	40
Tableau 5 : Caractéristiques de la semence de chat récoltée par vagin artificiel [76,79,80,102]	46
Tableau 6 : Caractéristiques physicochimiques des différentes productions génitales [132,51]	47
Tableau 7 : Caractéristiques d'un éjaculat de chat normospermique d'après Howard <i>et al.</i> [46].....	55
Tableau 8 : Caractéristiques du fluide séminal, du fluide prostatique et des sécrétions bulbo-urétrales chez le chat d'après Johnstone <i>et al.</i> [51]	59
Tableau 9 : Caractéristiques de la semence récoltée par électro-éjaculation selon plusieurs études	66
Tableau 10 : Comparaison des caractéristiques du sperme obtenu par électro-éjaculation (EE) et par vagin artificiel (VA) d'après Zambelli <i>et al.</i> [134].....	67
Tableau 11 : Caryotype et fertilité des chats male tricolores ou écailles de tortue d'après Johnstone <i>et al.</i> [49].	68
Tableau 12 : Caractéristiques séminales, volume testiculaire, et incidence des spermatozoïdes de morphologie normale et anormale chez les chats normospermiques et tératospermiques (moyenne ± écart type, $p < 0,05$) [46]	74
Tableau 13 : Caractéristiques du sperme des félins d'après Long <i>et al.</i> [61]	80
Tableau 14 : Influence de la dilution, de la centrifugation et du « swim-up » sur la viabilité et la morphologie des spermatozoïdes chez les chats normospermiques et tératospermiques [46] ($p < 0,01$).	83
Tableau 15 : Les effets de quatre osmolarités de tampon TesTris sur la mobilité des spermatozoïdes de chat stockés 24 heures à +5°C (valeurs moyennes sur 5 animaux, un éjaculat par animal) d'après Glover et Watson 1985 [35]	87
Tableau 16: Composition du diluant utilisé par Tsutsui et al. pour la préparation à la congélation de la semence de chat [113]	87
Tableau 17 : Effet du jaune d'œuf à 20% (v/v) sur la survie des spermatozoïdes de chats soumis à des perturbations thermiques successives d'après Glover <i>et al.</i> [35] (le choc thermique expérimental consiste à immerger les échantillons de semence préalablement maintenus à 37°C, dans de la glace fondante pendant 5 minutes. Moyennes pour 4 animaux. $P < 0,001$).....	90
Tableau 18 : Effets de deux concentrations de jaune d'œuf et de L.D.F. sur la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes conservés à +5°C d'après Glover <i>et al.</i> [35] (moyenne pour 5 chats, un éjaculat par animal).....	90
Tableau 19: Index de mobilité des spermatozoïdes (SMI) avant et après congélation avec différents cryoprotecteurs d'après Nelson <i>et al.</i> [69]	95

Tableau 20 : Congélation du sperme de chat : mobilité après réchauffement et intégrité de l'acrosome des spermatozoïdes congelés (éjaculés et épидидymaires) selon différents protocoles.	101
Tableau 21 : Nombre de chattes gestantes en fonction du nombre de spermatozoïdes inséminés d'après Sojka 1970 [102].....	105
Tableau 22 : Individus prélevés (• Les chats ont continué leur croissance au fur et à mesure des différents prélèvements).....	109
Tableau 23 : Protocole d'électro-éjaculation selon Howard et al. [46,28]	110
Tableau 24 : Composition des milieux de dilution utilisés.....	111
Tableau 25 : Spermogramme de la semence après prélèvement par cathétérisme urétral (•Contamination urinaire, # non renseigné car semence de trop mauvaise qualité pour être congelée).	113
Tableau 26 : Spermogramme de la semence après prélèvement par électro-éjaculation (# non renseigné car semence de trop mauvaise qualité pour être congelée). ..	113
Tableau 27 : Spermogrammes comparés avant et après congélation (prélèvement par cathétérisme urétral).	113

LISTE DES ABREVIATIONS

EE : Electro-éjaculation

VA : Vagin artificiel

Spz : Spermatozoïdes

Nbre : Nombre

LH : Hormone lutéotrope

FSH : Follicule Stimulating Hormone

GSH : Gluthation

SMI : Index de mobilité

hCG : Hormone gonadotropine chorionique

ADN : Acide desoxyribo Nucléique

AMPc : Adénoside monophosphate cyclique

5-HT : Sérotonine ou 5-hydroxytryptamine

SPF : Specific Pathogen Free

HOST : Hypo-Osmotic Swelling Test

CERCA : Centre de Reproduction des Carnivores présent sur le site de L'Ecole Nationale
Vétérinaire d'Alfort

GLOSSAIRE

Biotechnologie : application de la science et de la technologie aux organismes vivants et à d'autres matériaux vivants ou non vivants pour la production de savoir, de biens, de services.

Contraction isométrique : les dimensions des fibres restent inchangées pendant la contraction.

Epistatique : caractère de dominance d'un gène sur d'autres non allèles.

Hypogonadisme : sécrétion anormalement faible d'hormone par les gonades.

Medisatinum testis : prolongement épaissi de la tunique albuginée, formant un septum dans le testicule.

Peigne pubien : partie du pubis située médialement.

Stratum spongiosum : couche médiane de l'endomètre.

Utricule prostatique : organe piriforme situé sur la ligne médiane entre les deux canaux déférents, à la face urétrale de la prostate.

INTRODUCTION

Certaines biotechnologies commencent à se développer dans l'espèce féline, notamment la reproduction assistée.

En effet, les propriétaires de mâles de haute valeur génétique ou affective sont de plus en plus demandeurs de la conservation du potentiel reproducteur de leur animal. On connaît les bénéfices de la castration : elle permet de lutter contre la surpopulation animale à l'origine de nombreux abandons et euthanasies. De plus, elle augmente la longévité du chat d'extérieur en modifiant son comportement territorial. Il est plus sédentaire et se bat moins, ce qui limite le nombre d'accidents de la voie publique, d'abcès et de plaies de morsure, ainsi que la transmission de certaines maladies. Cependant, il est certain qu'elle annihile l'espoir d'obtenir un jour une descendance. Dans cette optique, la congélation de la semence avant stérilisation apparaît une alternative à explorer. Du moins, serait-il appréciable, en tant que praticien vétérinaire, d'être à même de la proposer.

De plus, les éleveurs de chats peuvent rencontrer quelques difficultés à conserver certains individus mâles entiers au sein de leur élevage. Les mâles non castrés peuvent en effet développer une agressivité envers leurs congénères mâles et/ou femelles, ainsi qu'un comportement territorial exacerbé par la forte densité de population souvent présente au sein de l'élevage. Une banque de sperme à l'image de celles disponibles dans les espèces bovine et canine, pourrait être une solution confortable, plus sécurisée du point de vue sanitaire et, à terme, moins coûteuse que les saillies naturelles.

En outre, il apparaît que le chat domestique (*Felis catus*) représente une grande source d'informations et un modèle très utile à la sauvegarde des grands félins sauvages. En effet, la plupart des 37 espèces de félins sont menacées d'extinction. On peut penser qu'une meilleure connaissance des techniques de reproduction artificielle chez le chat donnera lieu à des applications bénéfiques quant à leur préservation. Plus précisément, la congélation de semence à grande échelle permettrait de créer une banque de sperme féline, véritable banque génétique à disposition, s'affranchissant des contraintes d'éloignement géographique, de pénurie de temps et d'individus. C'est pourquoi il nous apparaît judicieux d'étudier les techniques de reproduction artificielle chez le chat domestique, afin d'en faire un modèle.

Face à ces constats, il nous a semblé utile de réunir en un même travail toutes les données bibliographiques disponibles sur ce sujet et de tenter nous-mêmes de congeler des éjaculats félins. Ceci est l'objectif de notre travail. Aussi, nous développerons, après un bref rappel anatomo-physiologique de la reproduction du chat mâle, les différentes techniques de récolte de la semence et les protocoles qui ont fait leurs preuves.

Nous mettrons l'accent sur les caractéristiques de la semence de chat. Celles-ci nous sont révélées par le spermogramme en routine, mais également par une batterie de tests plus complexes et moins disponibles, mais souvent plus utiles.

En dernier lieu, notre travail expérimental consistera en l'établissement d'un protocole de congélation adapté à la semence de chat et à ses caractéristiques bien particulières : choix

d'un diluant, procédés d'amélioration de la qualité de la semence, concentration nécessaire à l'insémination artificielle...

Enfin, nous discuterons de l'adaptabilité de ce protocole à la pratique vétérinaire courante et des améliorations qui pourraient lui être apportées.

Première partie:
Contexte bibliographique actuel

I. Rappels d'anatomie de l'appareil génital mâle et de physiologie de la reproduction chez le chat

I. 1 Rappels anatomiques

Nous verrons dans ce chapitre les bases anatomiques de l'appareil reproducteur du chat. Seront détaillées les différentes structures, quelles soient glandulaires musculaires ou conjonctives. Nous détaillerons également l'innervation et la modulation neurochimique impliquées dans l'érection et l'éjaculation. Ces deux derniers mécanismes restent cependant en cours d'exploration.

L'anatomie de l'appareil génital mâle est rappelée dans les figures 2 et 3.

I.1.1 L'appareil génital externe : Le scrotum et les testicules [119]

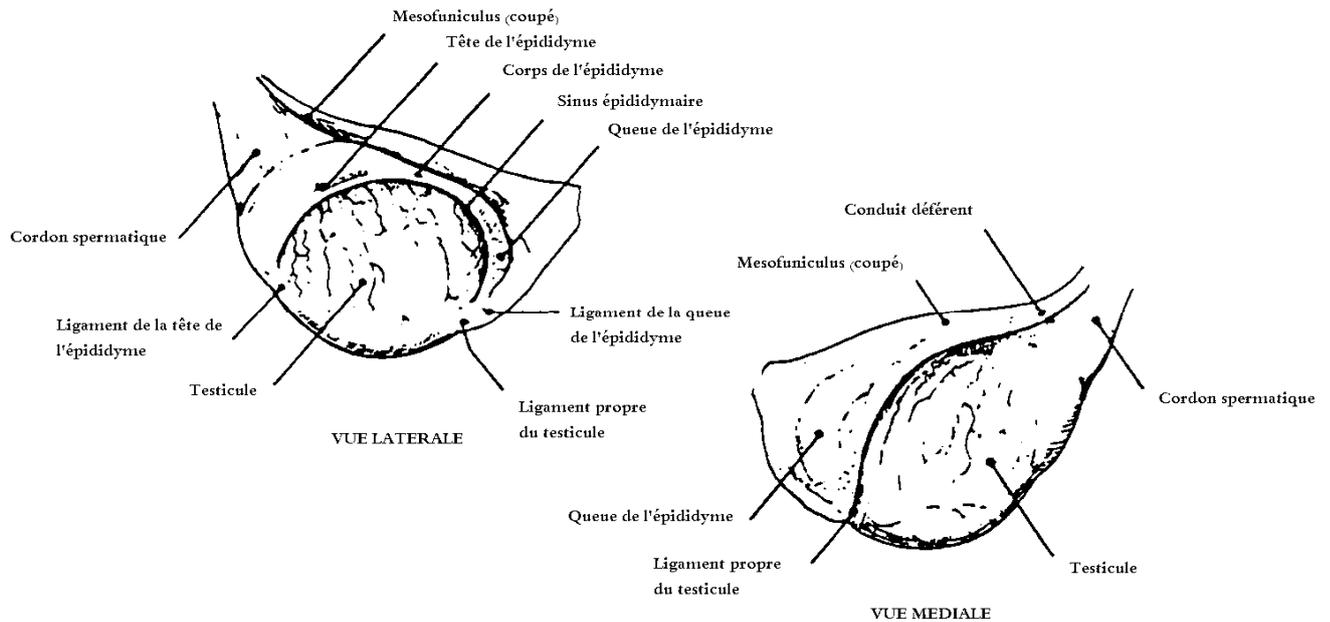
Le scrotum est situé en région périnéale haute, juste sous l'anus. Il est moins saillant et il est placé plus dorsalement et plus caudalement que chez le chien. Sa pilosité se confond avec celle des régions environnantes.

Les testicules sont ramassés et globuleux (longueur 1,2 à 2,0 cm et largeur 0,7 à 1,7 cm). Leur grand axe s'oriente ventralement et crânialement. Chaque testicule est complètement isolé et pèse 1,3g en moyenne. Son *mediastinum testis* est rectiligne, alors qu'il est incurvé en arc de cercle chez le chien. Sous le tégument scrotal se trouvent les fascias spermatiques, externe et interne, puis la tunique vaginale et enfin la tunique albuginée qui enveloppe le testicule et l'épididyme. Les testicules sont descendus à la naissance, mais peuvent monter et descendre le long de canal inguinal jusque vers 10 à 14 semaines.

L'épididyme est crânio-médial au testicule auquel il adhère fortement. Il est fixé à la paroi scrotale par le ligament de la queue de l'épididyme. Il est peu volumineux et pèse en moyenne 0,2g. La paroi du conduit déférent est totalement dépourvue d'ampoule et de glandes. Le canal déférent, très contourné longe le testicule en direction crâniale et pénètre dans le cordon spermatique. Le muscle crémaster est grêle et le cordon spermatique horizontal est beaucoup plus long que chez le chien. La vésicule séminale fait défaut comme dans l'espèce canine, et l'utricule prostatique manque habituellement.

La structure anatomique des testicules est rappelée dans la figure 1.

Figure 1 : Testicule et épидидyme gauches de chat (d'après Barone [9])



I.1.2 Le pénis [60,119]

L'os pénien est long d'un demi-centimètre à peine (3 à 4 mm). Il est rudimentaire et se présente sous la forme d'un long cône effilé distalement. Il s'ossifie tardivement. Inconstant, on ne l'observe généralement que chez les sujets âgés. Le pénis est court (8 à 10mm), cylindroïde et dirigé caudalement, sa face urétrale en situation dorsale. Lors de l'érection, il se redresse, mais se dirige plutôt en direction ventrale que crâniale. Il est constitué de trois corps érectiles. Le corps caverneux joue toutefois le rôle le plus important dans le mécanisme de l'érection. Son albuginée (*tunica albuginea corporum cavernosorum*) est renforcée dans sa partie crâniale, faisant courber l'organe crânialement lors de l'érection. Le gland est court et conique, relié ventralement au pénis par le frein. Il est recouvert d'un prépuce. Sa surface est hérissée chez l'adulte de fortes papilles (100 à 200) à l'épithélium épais et kératinisé et dont la pointe est dirigée vers la base. Ces papilles manquent parfois au niveau de l'apex et près du raphé du pénis, lequel est beaucoup plus net que chez le chien. Leur apparition est androgène-dépendante et elles régressent à la castration. Lors du coït, ces papilles se redressent dans le vagin.

Le prépuce est bref, conique et libre. Il est situé juste sous le scrotum et entourant le pénis. Sa paroi est épaisse et son ostium ouvert en direction caudale. La peau de sa surface est recouverte de poils rudes et courts.

On précisera cependant que le pénis n'est externé que lors de l'érection, contrairement à sa position de repos qui est interne.

I.1.3 L'urètre et les glandes annexes [60,119]

Une coupe transversale réalisée à la base du pénis met en évidence l'urètre entouré du corps spongieux du pénis, puis, de part et d'autre, de deux muscles bulbo-spongieux, et enfin de deux corps caverneux séparés par un septum. Au niveau du gland on observe les corps spongieux du gland qui entourent l'urètre et l'os pénien. Le chat se distingue de la

plupart des autres mammifères par la simplicité de son appareil génital, notamment par l'absence de vésicule séminale, d'ampoule et de glande sur ses conduits déférents.

I.1.3.i L'urètre

L'urètre du chat contourne l'arcade ischiatique. Il est court dans sa partie spongieuse. La partie pelvienne est par contre relativement longue (5cm) et dépourvue de stratum spongiosum. La vessie se prolonge par un col cylindrique, très étiré, mesurant 2 à 3 centimètres. La limite histologique entre le col et l'urètre prostatique se trouve juste en avant de la prostate (l'urètre se reconnaît à la présence de muscles striés). Les canaux déférents viennent s'aboucher, dorsalement à l'urètre et en dessous de la prostate. La partie pelvienne de l'urètre se prolonge dans le corps du pénis, à partir des glandes bulbo-urétrales, par sa partie spongieuse. Le bulbe du pénis est bien développé, et en raison de l'orientation de l'organe (Figure 3), le corps spongieux est situé à la face dorso-caudale du pénis.

I.1.3.ii La prostate

La prostate est relativement peu volumineuse (son corps est long de 1 cm environ). Elle est nettement bilobée, n'entoure pas complètement l'urètre et laisse libre sa face ventrale. La glande est située au niveau du peigne pubien (*pecten pubis*) et se retrouve relativement éloignée de la vessie (*vesica urinaria*). La partie disséminée est limitée à la face dorsale de l'urètre membranacé. La partie compacte (*pars compacta*) se présente sous forme de deux lobes allongés (5 mm sur 2 mm), séparés par un léger sillon médian, et n'entourant pas complètement l'urètre. On peut, par ailleurs, observer des lobules glandulaires de type prostatique (*pars disseminata*) disséminés dans le tissu conjonctif péri-urétral, compris entre le col de la vessie et les glandes bulbo-urétrales. Dans sa partie compacte, la prostate est constituée de lobules, regroupés en lobes, entourés d'un épais tissu conjonctif. Les canaux lobulaires s'unissent pour former des canaux lobaires qui s'ouvrent, individuellement, au niveau de l'urètre.

I.1.3.iii Les glandes bulbo-urétrales

Au niveau de l'arcade ischiale, le chat possède une paire de glandes bulbo-urétrales (*glandula bulbourethralis*) écrasées dorso-ventralement et entourées d'une mince couche musculaire (le muscle bulbo-urétral). Chacune d'elles est sphéroïde, d'un diamètre de 5 à 6 mm et reliée à l'autre par un tissu conjonctif. Elles possèdent un seul conduit excréteur court (*ductus gl. Bulbourthralis*), qui débouche au plafond de la partie membranacée sous un petit repli de la muqueuse. Elles fournissent une partie, prépondérante en volume, du plasma séminal. De même que la prostate, ces glandes sont de type tubulo-alvéolaire et secrètent des mucopolysaccharides.

Les corps caverneux sont distincts, courts et riches en tissu érectile. Ils se prolongent dans le gland par l'os pénien. Les muscles ischio-caverneux sont plus larges et plus courts en proportion que chez le chien.

Figure 2: l'appareil génital du chat mâle d'après Getty [33]

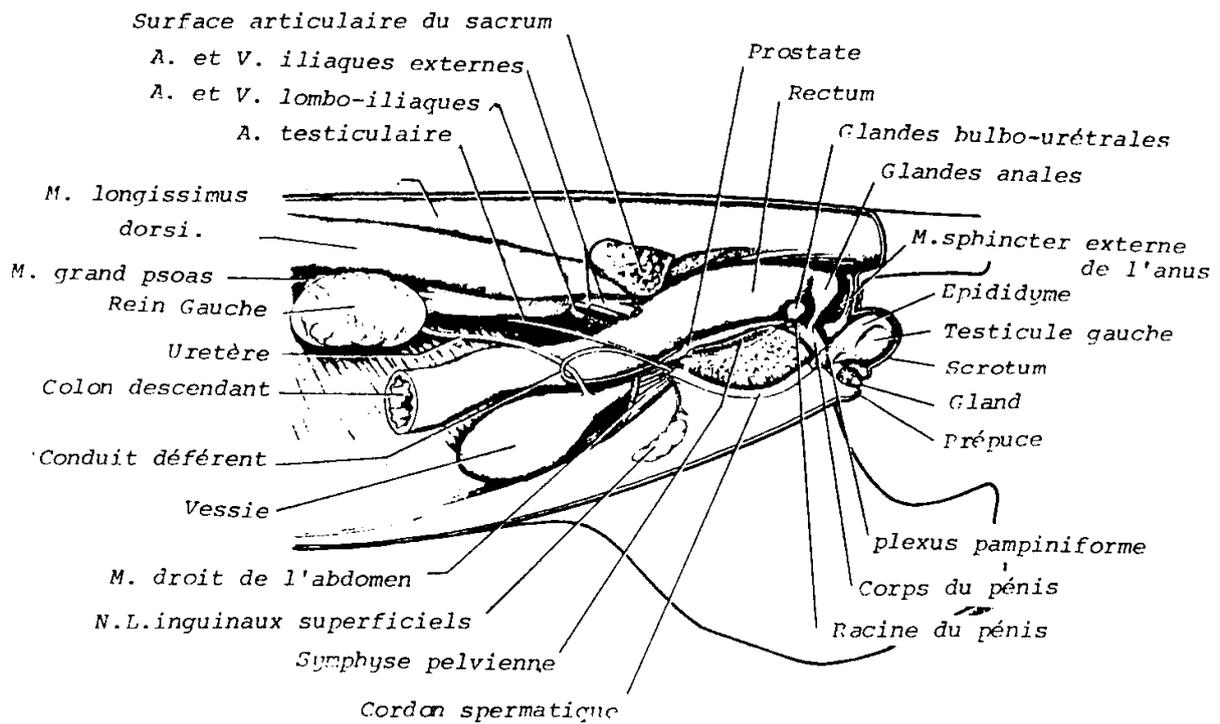
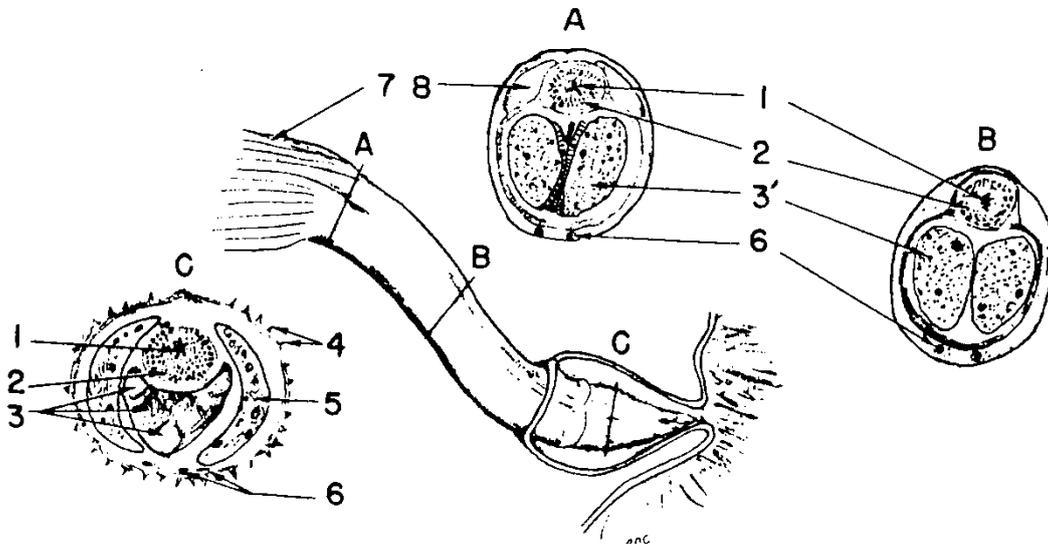


Figure 3: le pénis du chat, vue dorso-latérale d'après Getty [33]



1- Urètre ; 2- Corps spongieux ; 3- Os pénien ; 3'- Corps caverneux du pénis ; 4- Papilles cornées ; 5- corps spongieux du gland ; 6- Vaisseaux dorsaux ; 7- muscles ischio-caverneux ; 8- Muscles bulbo-caverneux.
A, B et C sont les sites des coupes transversales.

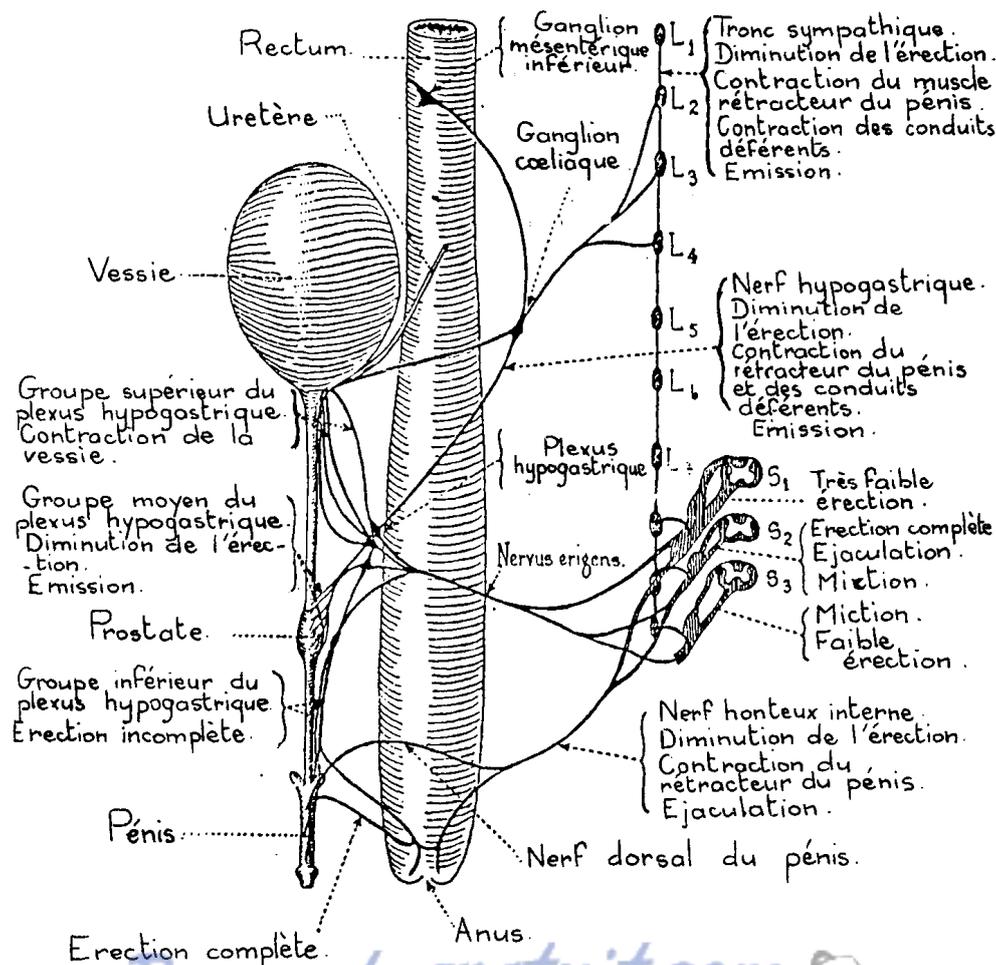
I.1.4 Neuro-anatomie [60,99,119]

L'appareil génital mâle reçoit une innervation de plusieurs origines (Figure 4) :

- Des fibres orthosympathiques, issues de la chaîne sympathique thoraco-lombaire et des plexus abdominaux qui s'anastomosent pour constituer le nerf hypogastrique ;
- Des fibres parasympathiques issues de racines médullaires sacrées S1, S2 et S3 qui constituent le *nervus erigens* qui rejoint ensuite le nerf hypogastrique pour former le plexus hypogastrique.
- Des fibres somatiques, issues de S1 et S2 qui forment le nerf honteux interne, innervant les fibres musculaires striées (muscle bulbo-caverneux, muscle ischio-caverneux et musculature périnéale).

Au niveau périphérique, les filets nerveux se rejoignent pour suivre les mêmes trajets et ne sont pas individualisables. Le plexus hypogastrique présente autour des organes génito-urinaires trois regroupements : un groupe crânial qui innerve la vessie et le début de l'urètre, un groupe moyen ou prostatique dont les nerfs viennent entourer la prostate et un groupe caudal avec des trajets vers le pénis et le rectum. Une des branches rectales s'anastomose au nerf honteux interne.

Figure 4: innervation de l'appareil génital mâle. Points de stimulations et résultats (d'après Semans et Langworthy [99])



I.2 Physiologie de la reproduction chez le chat mâle

Nous détaillerons ici la carrière de reproduction du chat mâle. La saisonnalité et le comportement lors de l'accouplement retiendront plus particulièrement notre attention. En effet, ces aspects de la physiologie de la reproduction peuvent avoir une forte incidence lors du prélèvement de la semence. De plus, les événements se produisant au sein de la semence après le coït, devront être reproduit à l'identique dans une démarche de reproduction assistée.

I.2.1 Puberté

I.2.1.i Définition

La puberté (du latin *puber*, de pubis, provenant lui-même de *pubes*, poils) est la période de la vie marquée par le début de l'activité des gonades et la manifestation de certains caractères sexuels secondaires. C'est le moment où se réalise la maturité sexuelle. « La puberté n'est ni un événement ni même un avènement : l'échéance de la maturité sexuelle n'est que la conclusion d'une maturation sexuelle commencée depuis longtemps et qui s'est développée sur toute une période de la vie. C'est donc une étape ; étape clé au cours de laquelle est réalisée dans tout l'organisme une métamorphose à nulle autre pareille » (LAPLANE (1971), cité par Vuillermoz [119]).

L'animal est dit pubère lorsqu'il atteint l'âge de la puberté. Dans le cas contraire, il est impubère.

I.2.1.ii Mécanisme de la puberté [60,118,119]

« Le facteur essentiel du déclenchement de la puberté est la mise en route du gonostat hypothalamo-hypophysaire qui sécrète alors des quantités importantes d'hormones gonadotropes » [118].

Après la naissance, se produit une lente maturation de l'hypothalamus qui devient fonctionnel au moment de la puberté. Cette maturation serait due à des facteurs génétiques modulés par l'environnement.

A cette époque, les sécrétions cortico-surréaliennes d'androgènes et d'œstrogènes débutent.

Les noyaux sécrétoires de l'hypothalamus sécrètent des quantités progressivement croissantes d'hormones hypothalamiques qui provoquent une maturation des cellules gonadotropes de l'antéhypophyse. Ces cellules élaborent à leur tour des taux croissants de gonadotropines (LH et FSH).

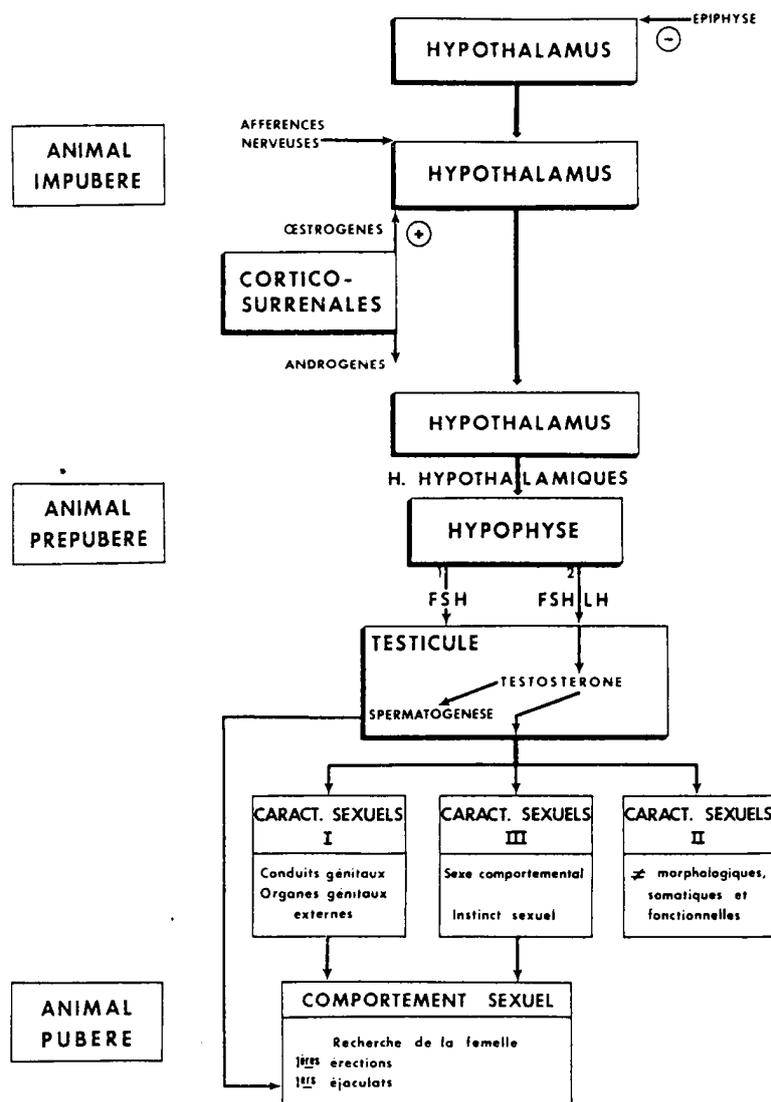
La FSH sensibilise les testicules à l'action de la LH. Sous l'action de la LH, se produit une maturation des cellules de Leydig. Ces dernières sécrètent de la testostérone à des taux de plus en plus importants. L'imprégnation de l'organisme par la testostérone provoque le développement des caractères sexuels secondaires.

La testostérone provoque la maturation des cellules de Sertoli et sous l'effet conjugué de la LH, de la testostérone et de la FSH sécrétées en quantités croissantes, la spermatogénèse se déclenche à son tour.

Le gonostat hypothalamo-hypophysaire fonctionne cycliquement chez la femelle et de façon continue chez le mâle (Figure 5).

Les caractères sexuels tertiaires apparaîtront, et les premiers éjaculats (sperme émis lors des éjaculations) signeront l'installation de la puberté.

Figure 5: Conditionnement neuro-hormonal de la puberté chez le chat [118]



1.2.1.iii Âge de la puberté [54,119]

En dehors de la mise en route du gonostat hypothalamo-hypophysaire due à des facteurs génétiques, l'âge de la puberté dépend de facteurs tels que le climat, l'hygiène et la nutrition. Une variation inter-races existe probablement, mais elle n'a pas encore fait l'objet d'études précises.

Chez le chat européen, le plus étudié, on sait que la spermatogénèse débute vers 5 mois, mais que les spermatozoïdes ne sont présents dans les tubes séminifères qu'à partir de 7 à 9 mois. Cela correspond à un poids des deux testicules supérieur à 1g [54]. Le comportement de reproduction (marquage du territoire, reflexe de prise de peau du cou de la femelle) se met en place de façon assez variable : il peut suivre ou précéder de près la production de spermatozoïdes. Mais Beaver cité par Vuillermoz [119] rapporte que, dans certains cas, ce comportement peut apparaître beaucoup plus tôt, dès 4 mois.

Il existe donc peu de possibilités d'action pour favoriser une puberté précoce. Tout au plus, peut-on conseiller d'assurer une excellente croissance aux chatons.

[1.2.2 Saisonnalité \[50,54,119\]](#)

Les mâles contrairement aux femelles sont fertiles toute l'année, mais le volume et le nombre de spermatozoïdes par éjaculat est 2 à 3 fois plus élevé en jours longs qu'en jours courts. Ainsi la libido s'atténue pendant les jours décroissants, de septembre à janvier dans l'hémisphère nord.

De même, d'après Kirkpatrick [54], le poids du tissu testiculaire varie, et est étroitement corrélé au taux de testostérone circulant ($r=0,929$ $p \leq 0,05$) ; ainsi, les chats atteignant huit mois en juin ont de plus gros testicules (1,21g en moyenne) que ceux atteignant cet âge en décembre ou en mars (0,84g en moyenne). L'activité sexuelle des chats mâles fluctue donc bien en fonction de la photopériode, mais elle ne connaît pas les mêmes interruptions que celle des femelles.

De plus, Johnstone [50] a constaté qu'en Australie (hémisphère sud), la production du sperme variait également en fonction de la saison (Tableau 1). Dans son expérience, l'éclairage artificiel (12 heures de jour, suivies de 12 heures d'obscurité) était complété par la lumière naturelle de septembre à mars jusqu'à un maximum de 14 heures de jour. Les « performances » (concentration et volume des éjaculats) des animaux ont atteint un maximum entre la fin de l'hiver et le début du printemps, de juillet à septembre. Ceci coïncide à peu près avec les fluctuations de la testostéronémie, maximale en août pour les chats de cette aire géographique d'après Johnstone *et al.* (1983) cité par Johnstone [50]. On peut penser qu'il en est de même pour l'hémisphère nord, avec des performances maximales de la fin de l'hiver au début du printemps (influence de la photopériode).

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques de la semence pour deux périodes de l'année d'après Johnstone *et al.* [50]

	Volume (μL) (Spermatozoïdes par éjaculat $\times 10^6$)			
	Janvier-Juin	Juillet-Décembre	Janvier-Juin	Juillet-décembre
Chat n°1	40,0 (14,2)	65,5 (9,8)	4,2 (0,6)	19,6 (4,9)
Chat n°2	37,3 (11,7)	46,3 (15,7)	9,3 (3,5)	21,7 (7,0)
Chat n°3	---	---	9,9 (2,2)	13,3 (3,1)

La différence est significative entre les deux saisons ($p \leq 0,05$, --- non renseigné).

De son côté, Kirkpatrick [54] a montré que la masse de tissu testiculaire des chats du Montana était significativement plus élevée ($p \leq 0,05$) en juin ($1,21 \pm 0,23$ g/Kg) qu'en décembre ($0,84 \pm 0,21$ g/Kg) ou en mars ($0,84 \pm 0,15$ g/Kg). Il a constaté l'existence d'une

corrélation étroite entre la testostéronémie et la masse testiculaire ($r=0,929$ et $p\leq 0,05$). Ces résultats permettent d'affirmer, avec quasi-certitude, que l'activité sexuelle des chats mâles fluctue en fonction de la photopériode.

1.2.3 Carrière de reproduction

Le mâle se reproduit jusqu'à plus de 14 ans (11-24). On admet toutefois qu'il n'a une activité sexuelle intense que durant 8 à 10 ans [60]. Un testicule pèse en moyenne 1,2g et produit environ 16 millions de spermatozoïdes par gramme de testicule et par jour [31].

1.2.4 Comportement sexuel du chat mâle

1.2.4.i Définition [119]

Le comportement est « la manière d'être et d'agir d'un organisme vivant par rapport au milieu où il vit ». C'est l'ensemble de l'activité externe apparente des organismes, caractéristique de l'espèce considérée. Elle est liée à la constitution anatomo-physiologique, aux grandes fonctions et aux stimuli externes auxquels l'organisme est soumis.

Le comportement sexuel des mammifères est fondé sur un « processus d'échange de signaux spécifiques qui jouent un double rôle, en permettant à un mâle et à une femelle de même espèce de se choisir sans erreur et sans apprentissage ; en synchronisant progressivement leur motricité et leur excitation pour donner en temps voulu, le maximum de chances statistiques aux gamètes mâles et femelles de se rencontrer ».

Le comportement sexuel présente un certain nombre de caractères fondamentaux qui se déroulent généralement ainsi :

- Recherche du partenaire
- Synchronisation comportementale après échange d'informations sensorielles (signaux visuels, auditifs, chimiques, tactiles) caractérisée par un comportement de « cour » (« parade sexuelle ») et excitation mutuelle. L'ensemble est rigoureusement lié à l'espèce, c'est-à-dire au code génétique ;
- Réflexe sexuel, comportement de copulation ou acte sexuel proprement dit.

1.2.4.ii Recherche mutuelle des partenaires [60,119]

Des signaux caractéristiques, émis par la femelle, donnent une indication de son état de réceptivité et attirent le mâle. La femelle n'accepte le mâle qu'au moment de l'imprégnation oestrogénique maximale, lors du « rut ». Ainsi, le mâle détecte les femelles en œstrus par l'intermédiaire de signaux olfactifs (phéromones) et des miaulements caractéristiques que ces dernières émettent.

Ces signaux olfactifs sont constitués de phéromones libérées par l'urine, des sécrétions des glandes anales ou des glandes de la queue. Ces odeurs seraient reconnues par le système olfactif voméro-nasal ; le chat s'arrête, relève la tête, puis ouvre la bouche, d'un centimètre environ. Il maintient cette position, immobile, pendant 1 à 5 secondes. C'est la position de « flehmen ».

1.2.4.iii Synchronisation comportementale [30]

Le comportement des deux partenaires lors du coït est tout à fait stéréotypé (Figure 6). Les différentes phases ont été décrites notamment par Feldman et Nelson [30].

Après que le mâle ait pris contact avec la femelle en lui flairant le nez puis la région génitale, que les deux partenaires se soient frottés l'un contre l'autre en émettant quelques cris, la femelle, si elle est bien en œstrus, adopte une posture de réceptivité : élévation du bassin, piétinement avec les membres postérieurs, déviation de la queue.

1.2.4.iv Comportement de copulation [60,119, 35, 30]

Le mâle chevauche la femelle et la bloque en lui maintenant la peau du cou entre les mâchoires. Il arrive que certains mâles n'exécutent pas la phase dite « de contact » et passent directement à la phase de chevauchement.

La chatte, en pliant l'extrémité antérieure du corps et en étendant la partie postérieure, repose à plat sur le sol. Le mâle exécute des mouvements des lombes qui amènent finalement le pénis contre la vulve de la femelle jusqu'à ce que celui-ci pénètre dans le vagin.

L'intromission ne dure que 1 à 2 secondes. L'éjaculation survient rapidement après quelques mouvements de bassin. Lorsque le mâle se retire, la femelle pousse un cri et se dégage rapidement de son emprise. Elle peut cracher. Rappelons en effet que le gland du chat est couvert de nombreuses papilles qui se redressent pendant l'accouplement et forment des petites pointes qui doivent sans doute atténuer la sensation voluptueuse pour la femelle et même lui causer des douleurs, ce dont témoignent ses cris.

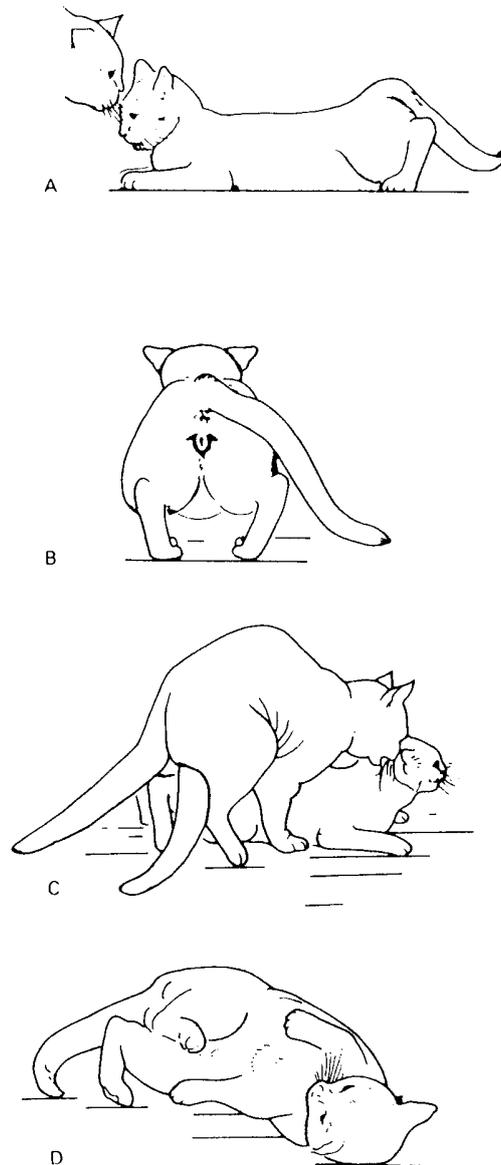
Une fois dégagee, elle se lèche la vulve et roule sur le dos. Cette dernière phase est importante car elle signifie que la copulation a bien eu lieu et que la stimulation de la paroi vaginale est effective.

Suit une période réfractaire de 5 à 60 minutes au cours de laquelle la femelle refuse tout contact avec le mâle. La chatte peut alors être assez agressive.

Une phase d'accouplement ne dépasse pas 5 minutes avec un chat expérimenté.

La saillie induit l'ovulation. Néanmoins, des saillies répétées sont nécessaires. Dans les conditions naturelles (chats errants), une chatte est fréquemment saillie plusieurs fois au cours d'un même œstrus. Comme plusieurs mâles peuvent saillir à la suite une même femelle (8 à 12 coïts sur une période de 4 heures selon une étude de GLOVER *et al.* [35], les fœtus d'une même portée peuvent provenir de plusieurs pères ; on parle de superfécondation. L'intervalle entre deux copulations qui était court initialement (6 à 12 minutes), s'allonge progressivement (18 à 61 minutes). On note également que la durée de l'accouplement est plus élevée le quatrième ou cinquième jour de l'œstrus (124,6 ±50,3 secondes) que le deuxième jour (55,0 ±38,6 secondes).

Figure 6 : Phases comportementales caractéristiques du déroulement normal de la saillie dans l'espèce féline d'après Feldman et Nelson [30]



A et B : flexion des membres, lordose et déviation de la queue ; C : Le chat maintient la femelle durant l'intromission ; D : Après le coït, la femelle se roule, crie et chasse le mâle.

1.2.4.v Réflexe ou acte sexuel [60,119]

L'accouplement ou coït comporte différentes phases, à savoir :

L'érection (extériorisation et turgescence pénienne), l'émission (collection dans l'urètre postérieur des composants du fluide séminal depuis les canaux déférents et les glandes annexes) et l'éjaculation proprement dite (expulsion du sperme hors de l'urètre).

En plus de ces trois phases, il faut prendre en compte la fermeture du col de la vessie, empêchant l'éjaculation rétrograde.

L'érection

Elle consiste dans le changement de forme, de consistance, de volume et de dureté de l'organe copulateur. Ce phénomène est indispensable à l'accomplissement de la fonction reproductrice.

De flasque qu'il est à l'état normal, le pénis devient rigide par une modification spéciale du tissu érectile. Le pénis, caché au repos dans le fourreau, s'allonge et se projette hors de cette gaine ; il se présente comme une tige rigide. Le gonflement et le durcissement se développent insensiblement de la base vers l'extrémité libre du pénis.

L'érection dépend du degré d'emménagement du sang sous pression dans les alvéoles du tissu érectile, provoquant un état de turgescence des corps caverneux et du corps spongieux.

L'érection constitue un phénomène réflexe habituellement déclenché par des excitations diverses provoquées par la présence de la femelle et certaines excitations tactiles, visuelles... etc.

L'innervation sensitive du pénis dépend du nerf honteux. L'innervation parasympathique est vasodilatatrice ou érectile (nerfs érecteurs d'Eckhardt). L'innervation orthosympathique est vasoconstrictrice.

Ainsi l'érection se traduit par un double phénomène :

- Un phénomène vasculaire : vasodilatation active et obstacle sur la circulation veineuse retour ;
- Un phénomène musculaire, correspondant à une contraction de type isométrique et réalisant vraiment, en raison du caractère incompressible de leur contenu liquidien, la rigidité des formations érectiles.

L'émission

L'excrétion des produits élaborés par le testicule, l'épididyme et les glandes annexes dans les voies spermatiques est un phénomène réflexe à point de départ pénien (contact avec les parois vaginales) et à composante médullaire lombaire (origine des nerfs sympathiques pelviens).

Les produits sécrétés lors de l'émission s'accumulent dans l'urètre au dessus du sphincter strié qui, par son tonus, empêche l'écoulement du sperme. La pression, dans cette portion de l'urètre, augmente de plus en plus au fur et à mesure de l'excrétion des glandes.

La prostate du chat interviendrait dans la synthèse de muco-polysaccharides et de métallo-enzymes à base de zinc telles que l'anhydrase carbonique, la 5-nucléotidase et les phosphatases acides et alcalines. En effet, le zinc est présent partout dans le cytoplasme des cellules prostatiques, mais il se concentre nettement en région luminale. De plus, on retrouve le zinc dans la lumière des tubules glandulaires. Il semble donc qu'il y ait un phénomène sécrétoire dépendant du zinc. La prostate serait composée de deux types cellulaires : le premier sécrétant des muco-polysaccharides et le second des protéines.

Les glandes bulbo-urétrales, la prostate et l'épithélium urétral en région prostatique contiennent d'importantes réserves de glycogène. Il semblerait que ces organes sécrètent le glucose et le fructose, en remplacement des vésicules séminales absentes dans cette espèce.

L'éjaculation

L'éjaculation est l'émission sous pression, saccadée, du sperme. Dans les conditions physiologiques, le coït entraîne, par mécanisme réflexe, l'éjaculation du sperme hors des voies génitales mâles.

En effet, à un certain moment du coït, de nouveaux réflexes entrent en jeu : ce sont des réflexes moteurs, dont les voies centripètes et centrifuges empruntent les nerfs honteux. Ils aboutissent à des contractions saccadées et synchrones de divers muscles du périnée antérieur : muscle superficiel, muscles ischio-caverneux et muscles bulbo-caverneux.

Sous l'effet des contractions de ces muscles, la forte pression réalisée sur l'urètre dilaté force le sphincter strié et le sperme s'écoule par saccades. Le sphincter strié participe probablement à l'expulsion du sperme hors du canal uro-génital en se contractant fortement entre les phases de relâchement.

Il se produit aussi une dilatation de l'urètre pénien au moment de l'écoulement du sperme.

Après l'expulsion du sperme, et au bout d'un temps variable, le tonus vaso-constricteur reprend son activité prépondérante : c'est la « détumescence » de la verge. Cette détumescence se fait en deux phases : l'une est rapide mais incomplète, l'autre est plus lente (sa durée dépend assez étroitement de la durée de l'érection), et est accompagnée d'une disparition de la vaso-congestion viscérale profonde. Une nouvelle érection ne peut se produire qu'après un certain délai appelé « phase réfractaire ».

1.2.4.vi Aspect neurophysiologique du coït [21,60,99,119]

Les centres nerveux de l'érection et de l'éjaculation sont multiples et disséminés dans l'axe cérébrospinal. Ils comprennent:

- Des centres médullaires : centre de l'érection, vaso-moteur, compris entre L1 et S3, centre de l'éjaculation, moteur, compris entre L2 et S1.
- Mais l'excitation de certains centres nerveux supérieurs est efficace dans le déterminisme des phénomènes d'érection et d'éjaculation. Signalons des centres bulbaires, des centres diencephaliques, situés dans la région infundibulo-tubérienne de l'hypothalamus, des centres corticaux, siège de réflexes conditionnels.

En 1938, Semans et Langworthy [99], ont mis en évidence, chez le chat, les rôles de chacune des afférences nerveuses. Ils ont su reproduire une éjaculation complète en stimulant électriquement les nerfs préalablement individualisés. Ils ont constaté, en premier lieu, que la stimulation de fibres parasympathiques issues des racines sacrées, principalement de S2, provoquait l'érection. Il semblerait que le nerf honteux assure à lui seul la principale voie motrice de l'érection pénienne. Les effecteurs de cette érection sont les muscles lisses des artères péniennes, les muscles lisses des corps caverneux et le muscle rétracteur du pénis. C'est le relâchement de ces muscles qui autorise l'irrigation sanguine des corps caverneux, via l'artère pénienne.

La stimulation du nerf hypogastrique induit l'émission, visualisée par des contractions péristaltiques du canal déférent au niveau de son abouchement à l'urètre. Cette phase fait intervenir la musculature lisse de la queue de l'épididyme, du canal déférent et des glandes sexuelles annexes. Cette musculature est innervée par des neurones adrénergiques « courts » qui se différencient par leur relais ganglionnaires qui sont très proches des organes cibles, situés parfois même dans la gaine conjonctivale de l'organe en question. La testostérone diminue l'activité spontanée de ces muscles et réduit leur sensibilité aux stimulants exogènes. L'activité de ces muscles est donc limitée aux seules périodes d'accouplement. Cela permettrait aux canaux déférents de jouer un rôle de réservoirs [60,99].

La fermeture du col de la vessie dépendrait de l'activité du groupe crânial du plexus hypogastrique. On trouve en effet, au niveau du col, des fibres cholinergiques et des fibres adrénergiques.

L'excitation du plexus hypogastrique est insuffisante pour déclencher l'éjaculation. En revanche, l'éjaculation survient à stimulation du nerf honteux interne. En effet, les effecteurs de l'éjaculation sont essentiellement des muscles striés (muscles bulbo-caverneux et ischio-caverneux notamment) [99].

Lors de l'accouplement, les afférences tactiles stimulent les fibres nerveuses de manière simultanée et indistincte, si bien que l'ordre chronologique que nous venons de décrire ne correspond pas à la réalité physiologique. L'éjaculation survenant quelques secondes seulement après l'intromission, les mécanismes ne peuvent que se superposer. Il faut rappeler par ailleurs le rôle des stimuli psychiques, en particulier dans le déclenchement de l'érection [99].

Plusieurs études menées chez le rat et le cochon d'inde ont mis en évidence la présence d'un mécanisme spinal inhibiteur de l'éjaculation dans sa phase finale et l'importance de cette composante spinale (possible centre d'automatisme spinal) dans la sommation des influx sensoriels pré-éjaculatoires. Il semblerait qu'il existe également un réflexe urétral chez le rat : la distension mécanique de l'urètre par l'injection d'une solution saline, mimant les sécrétions de plasma séminal, induit des contractions cloniques réflexes des muscles périnéales, une érection et des mouvements du pénis, ainsi que l'expulsion du contenu urétral [21].

I.2.4.vii Modulation neurochimique [21,56]

Il semblerait que le neurotransmetteur prépondérant dans les mécanismes de l'érection soit le 5-HT (Sérotonine), en association avec l'action de la dopamine. Les études ont été menées chez le rat. L'élévation de la concentration intra-synaptique en 5-HT et en dopamine par blocage des systèmes de recyclage par la p-chloramphétamine, active le centre d'automatisme spinal de l'éjaculation. L'activation des récepteurs lombosacrés 5HT-2C induit une activité des nerfs sympathiques du *vasa deferens*. L'activation des récepteurs D2-like ou l'injection intra-ventriculaire de D3 agonistes provoque la phase d'expulsion de l'éjaculation. L'apomorphine active les récepteurs D1 et D2 et induit l'éjaculation chez des rats dont la moelle a été sectionnée. Toutes ces données tendent à justifier une action activatrice du système dopaminergique spinal dans le centre générateur de l'éjaculation.

La yohimbine et la méthoxamine peuvent bloquer l'éjaculation. Au contraire, l'administration de muscarine facilite son expression. La modulation cholinergique se fait donc probablement par l'activation des récepteurs muscariniques M2, M3 et M4.

L'ocytocine semble activer l'éjaculation, alors que les opioïdes spinaux ont une influence inhibitrice qui peut être bloquée par l'administration de naloxone.

Le neuromédiateur impliqué chez l'homme est également le 5-HT, en synergie avec la dopamine. Les études concernant la nature du neurotransmetteur n'ont pas été menées chez le chat à ce jour. La stimulation de ces muscles (qui sont relâchés à l'état « normal ») est entretenue par l'action du système orthosympathique sur des récepteurs adrénergiques α . Ses fibres musculaires ont, de plus, une activité spontanée importante chez le chat.

En 1977, Larsson [56] a décelé la présence du VIP (Vaso Intestinal Peptide) au niveau des corps caverneux, de la prostate, de l'épididyme et des canaux déférents. Le rôle du VIP dans la sphère génitale reste à élucider. L'auteur pense qu'il interviendrait dans la régulation de la pression sanguine et du tonus musculaire.

1.2.5 Evènements post-coït

1.2.5.i Capacitation et réaction acrosomiale

La capacitation est un processus de maturation des spermatozoïdes dont le mécanisme est reconnu comme étant temps et espèce-dépendant [32]. Long *et al.* [61] ont étudié ce phénomène chez le chat *in vitro*. La semence de chat semble ne nécessiter qu'une courte durée d'incubation (2 à 2,5 heures) contrairement aux autres espèces étudiées comme le cochon (4 à 5 heures [23]), le taureau (4 heures [74]) ou encore le chien (4 à 5 heures [125]). De plus, le mécanisme mis en jeu semble être moins complexe que dans ces autres espèces dont le sperme peut nécessiter une exposition à un milieu hypertonique [15] ou à de l'héparine à 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ pendant 15 minutes [74]. Séparer les gamètes du plasma séminal n'est pas nécessaire puisqu'une simple dilution suffit à permettre leur maturation chez le chat comme chez le tigre (*Panthera tigris*) [18,47]. Il semblerait en effet que les facteurs anti-capacitants soient absents ou non fonctionnels dans ces espèces. En effet, Howard *et al.* (1988) cité par Byers *et al.* [18] rapportent que le retrait du plasma séminal n'est pas nécessaire pour la capacitation *in vitro* avant la pénétration de la « zona free » d'ovocyte d'hamster.

La perte spontanée de l'intégrité de la structure acrosomiale est relativement peu fréquente chez le chat, contrairement à ce qu'on peut observer chez le mouton ou le chien par exemple [61]. De plus, la capacitation peut s'accomplir à température ambiante (environ 20°C) alors que, pour beaucoup d'autres espèces, cela requiert une température de 37 à 39°C [126]. La capacitation chez le chat est donc unique en son genre, à la fois par sa rapidité, sa relative facilité et son absence de perte acrosomiale spontanée [61].

D'autres études plus anciennes ont montré que la capacitation pouvait être encore plus rapide dans certaines conditions : Hamner *et al.* [38] ont montré que la semence prélevée par éjaculation nécessitait entre 30 minutes et 24 heures d'incubation dans l'utérus (*in vivo*) avant d'acquiescer la capacité de féconder (fécondation *in vitro*). Bowen [14] a montré que le sperme récolté directement le *ductus deferens* était capable de féconder les ovocytes de chats *in vitro*, sans incubation préalable dans le tractus femelle. Niwa *et al.* [71] obtinrent

la pénétration d'ovocytes *in vitro* après seulement 30 minutes de co-incubation avec du sperme d'origine épидидymaire. Enfin en 1989 et 1993, Goodrowe *et al.* [36,37] utilisèrent également la pénétration de la zone pellucide comme indicateur de capacitation et observa de la même façon, une interaction dans les 30 premières minutes de co-incubation.

L'étude de Long *et al.* [61] a donc mis en évidence que 2 heures sont nécessaires à la capacitation du sperme de chat *in vitro*. Ces résultats ont été obtenus par stimulation au calcium ionophore A23187 qui facilite le transport membranaire du calcium et provoque la réaction acrosomiale. On note que la cinétique est influencée par le statut reproductif du mâle. En effet, nous développerons plus loin le cas fréquent des chats tératospermiques (>60% de spermatozoïdes de forme anormale).

I.2.5.ii Fécondation in vitro

La fécondation se produit en plusieurs étapes (Photo 1) [110] :

- Le spermatozoïde ayant subi la capacitation, interagit avec la zone pellucide, et la réaction acrosomiale se produit. Elle consiste en la libération du contenu acrosomial. Des protéines de surface (protéines ZP) formant un maillage au niveau de la zone pellucide, se lient à des récepteurs de la membrane plasmique du spermatozoïde, et ce de façon extrêmement spécifique à l'espèce. Cette liaison entraîne une lyse de la membrane de l'acrosome et la libération de son contenu dans la zone pellucide.
- Les enzymes lytiques libérées désorganisent la zone pellucide et permettent l'avancée progressive de différents spermatozoïdes. La membrane interne de l'acrosome comporte des récepteurs maintenant la liaison entre le spermatozoïde et les protéines (ZP2) de la zone pellucide. Ainsi, les spermatozoïdes progressent dans la zone pellucide jusqu'à la membrane plasmique de l'ovocyte.
- Le spermatozoïde se plaque sur la membrane plasmique de l'ovocyte. Le noyau, le centriole, et parfois quelques mitochondries sont internalisés dans l'ovocyte.

Niwa *et al.* ont étudié en 1985 la chronologie des événements intervenant lors de la fécondation obtenue par insémination artificielle *in vitro*. Cette étude a été menée chez le chat. Entre 15 et 20 minutes après insémination artificielle, ils ont pu observer un spermatozoïde pénétrant dans la zone pellucide. Entre 30 minutes et 5 heures, la plupart des ovocytes sont pénétrées (90 à 100%). Les premiers pro-noyaux sont observés 4 heures après insémination [71].

Goodrowe *et al.* confirment que la fécondation se produit entre 15 minutes et 5 heures post insémination artificielle *in vitro*. Le taux de pénétration varie de 0 à 100% après 3-4 heures [36].

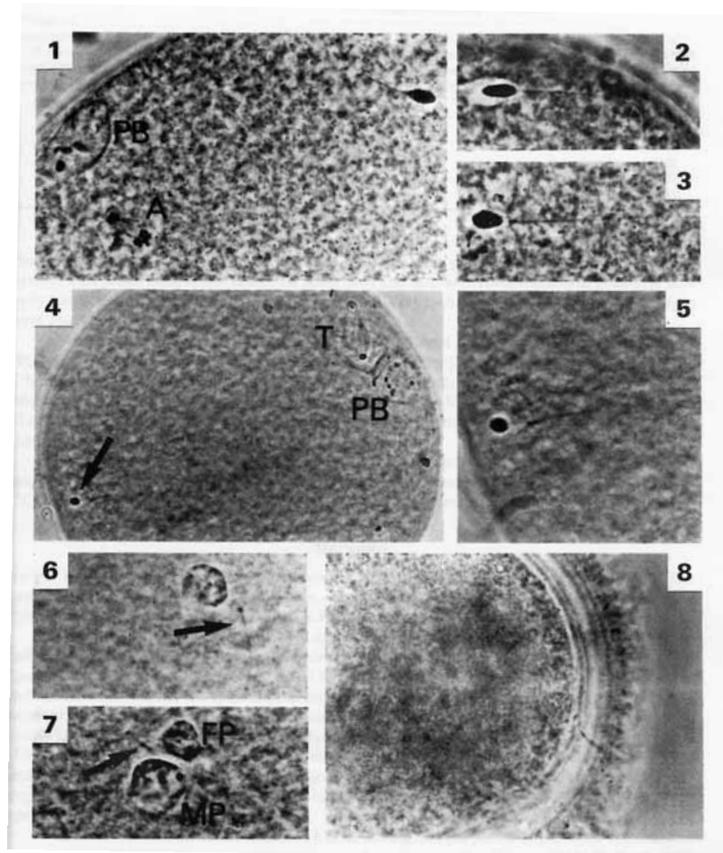
Les variations entre les résultats proposés peuvent s'expliquer par les différences entre les milieux utilisés *in vitro* et les doses inséminées (dose parfois inférieure à la dose fécondante). La tératospermie a pu également influencer les résultats.

Howard *et al.* ont montré que le taux de division cellulaire post fécondation *in vitro* était meilleur chez les chats normospermiques (86,3%) que chez les chats tératospermiques (24,1%). Les spermatozoïdes anormaux peuvent toutefois se lier (29%) et pénétrer (17%) la zone pellucide. Cependant, seulement 3% des spermatozoïdes retrouvés dans l'ovocyte étaient anormaux et tous ceux présents dans l'espace péri-vitellin étaient normaux. La zone

pellucide est donc un bon filtre naturel pour les spermatozoïdes anormaux, cependant ces derniers peuvent conserver leur pouvoir fécondant [48].

Aucune donnée concernant la fécondation *in vivo* n'est actuellement disponible chez le chat. On supposera que les étapes sont identiques *in vitro* et *in vivo* dans cette espèce.

Photo 1: Evènements précoces lors de la fécondation d'ovule de chat par des spermatozoïdes épидидymaires (T0= Insémination, cellules colorées) [71]



1) T0+30 min : spermatozoïde à tête élargie et queue pénétrante ; dans l'ovule, premier corps polarisé (PB) et chromosomes activés en anaphase II (A); 2) T0+1 h : queue et tête sont toujours attachées ; 3) T0+1,5 h : la tête se détache de la queue ; 4) T0+3 h : noyau décondensé (flèche), premier corps polaire (PB) et chromosomes activés en télophase II (T); 5) idem à plus fort grossissement ; 6) T0+4 h : pronucléus mâle et queue pénétrante (flèche) ; 7) T0+4,5 h : pronucléus mâle (MP) et femelle (FP) et pièce intermédiaire du spermatozoïde toujours visible (flèche) ; 8) sans coloration, T0+20 min : spermatozoïde dont la tête a pénétré la zone pellucide

Le mâle peut fournir de la semence à partir de la puberté (7 mois environ) et jusqu'à plus de 14 ans. De plus, le comportement sexuel du chat est codifié et bien connu. Nous verrons plus loin l'incidence du déterminisme nerveux et multifactoriel de l'érection-éjaculation, ainsi que des particularités anatomiques liées à l'espèce (pénis interné) sur les techniques de prélèvement de sperme.

Certaines questions quant à la régulation neurochimique de ces phénomènes physiologiques restent à exploiter.

II. Méthodes de prélèvement du sperme de chat, examen et caractéristiques de la semence féline

II.1 Méthodes de prélèvement du sperme de chat

Différentes techniques sont actuellement disponibles. Toutes permettent le recueil d'un très faible volume de semence. En effet, le volume d'un éjaculat moyen ne dépasse pas 0,5 mL [26]. On essaiera toujours d'obtenir une semence de qualité en infligeant un stress minimum à l'animal. Les caractéristiques du sperme obtenu seront décrites plus loin, en relation avec les techniques d'analyse de la semence. Nous détaillerons ici les principaux protocoles décrits, ainsi que leurs avantages et inconvénients.

II.1.1 Vagin artificiel

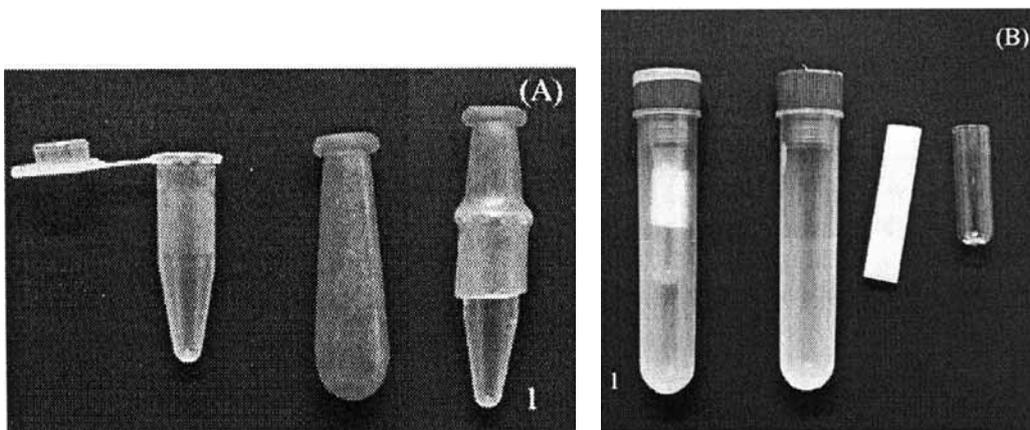
II.1.1.i Avantages et inconvénients

Cette technique donne des résultats très variables selon le tempérament du chat. Elle n'est applicable qu'à un nombre réduit d'individus qui doivent être longuement entraînés et habitués [79,102]. Sojka *et al.* rapportent tout de même avoir réussi, pour la première fois en 1970 [102], à prélever 3 mâles sur 5, sélectionnés de façon aléatoire, après seulement 2 semaines d'entraînement. On n'obtient en général de résultats positifs dans 60 à 70% des cas. C'est une technique peu coûteuse qui ne nécessite qu'un seul technicien et qui s'affranchit de l'utilisation de molécule pharmacologique. Une femelle en œstrus ou traitée aux œstrogènes doit être présentée au mâle afin d'initier la suite d'événements menant à l'accouplement [119].

II.1.1.ii Matériel nécessaire [132]

Le vagin artificiel peut être constitué à partir d'un petit tube à essai introduit dans une bouteille de polyéthylène elle-même remplie d'eau à 52°C (Photo 2).

Photo 2: Exemple de vagins artificiels (A : tube plastique et pipette pasteur ; B : tube en plastique de 5 ml, drain de Penrose et petit tube en verre) [132]



II.1.1.iii Protocole opératoire [132]

On dévie le pénis en érection au moment de l'accouplement.

La manœuvre complète prend environ 1 à 4 minutes et peut être reproduite trois fois par semaine sans altérer la qualité de la semence. A contrario, une récolte quotidienne entraîne une diminution du nombre de spermatozoïdes et du volume de l'éjaculat à partir du quatrième jour avec une nivellation à 14-45 millions de spermatozoïdes par éjaculat. On ne note cependant pas de différence en termes de mobilité, viabilité et pourcentage de formes anormales. La libido reste également inchangée.

II.1.1.iv Flux rétrograde dans la vessie

Il semble qu'il existe un flux rétrograde vésical physiologique chez le chat lors de l'éjaculation, celui-ci étant majoré lors de prélèvement par vagin artificiel comme par électro-éjaculation. Dooley *et al.* ont prélevé l'urine de 5 chats par cystocentèse après éjaculation dans un vagin artificiel. Tous les prélèvements contenaient des spermatozoïdes et 4 d'entre eux présentaient des spermatozoïdes mobiles. Le flux rétrograde moyen était de 46,82% des spermatozoïdes. La même manipulation ayant été effectuée après accouplement naturel, montra la présence de $29,42 \cdot 10^6$ spermatozoïdes vésicaux [28].

La semence récoltée par cette méthode apparaît évidemment comme celle se rapprochant le plus d'un éjaculat obtenu lors de monte naturelle, nous étudierons plus loin ses caractéristiques [132].

Les principales informations pratiques nécessaires à la réalisation d'un prélèvement à l'aide d'un vagin artificiel sont reportées dans l'annexe 1 (Annexe 1: Prélèvement de semence féline par vagin artificiel).

II.1.2 Electro-éjaculation

Cette technique ne nécessite pas la présence d'une chatte en chaleur et convient à tout chat mâle pouvant être anesthésié. Elle est décrite pour la première fois par Scott [98] et s'impose comme la méthode de choix pour le prélèvement du sperme de chat.

II.1.2.i Matériel nécessaire

Le matériel nécessaire comprend un stimulateur électrique et une sonde rectale métallique en téflon lubrifiée de 1cm sur 12 avec trois électrodes longitudinales en étain (3,75cm de long sur 2,6mm de large [46]).

L'électro-éjaculateur

L'électro-éjaculateur comprend six unités (Figure 7 et Photo 3) [119]:

- L'oscillateur : son amplitude varie de 0 à 20V et la fréquence des oscillations est ajustable entre 10 et 100Hz.
- Le contrôleur d'amplitude automatique : il détermine le stimulus envoyé à l'animal et la durée entre les stimuli successifs. Il contrôle la durée de la stimulation obtenue au niveau de la sonde rectale et la vitesse de montée et de descente du stimulus, c'est-à-dire l'intervalle entre 0V et le voltage désiré ainsi que l'intervalle entre ce

même voltage et le retour à 0V. L'électro-éjaculateur peut ainsi être préréglé, laissant les mains du manipulateur libres.

- L'amplificateur de puissance : il multiplie le signal en provenance de l'oscillateur et du contrôleur d'amplitude pour le distribuer à la sonde rectale.
- Le moniteur de puissance : le voltage et l'ampérage peuvent être réglés sur trois échelles (0-5V, 0-10V, 0-50V et 0-50mA, 0-100mA, 0-500mA).

Figure 7: Diagramme de l'électro-éjaculateur et représentation graphique du courant électrique [119]

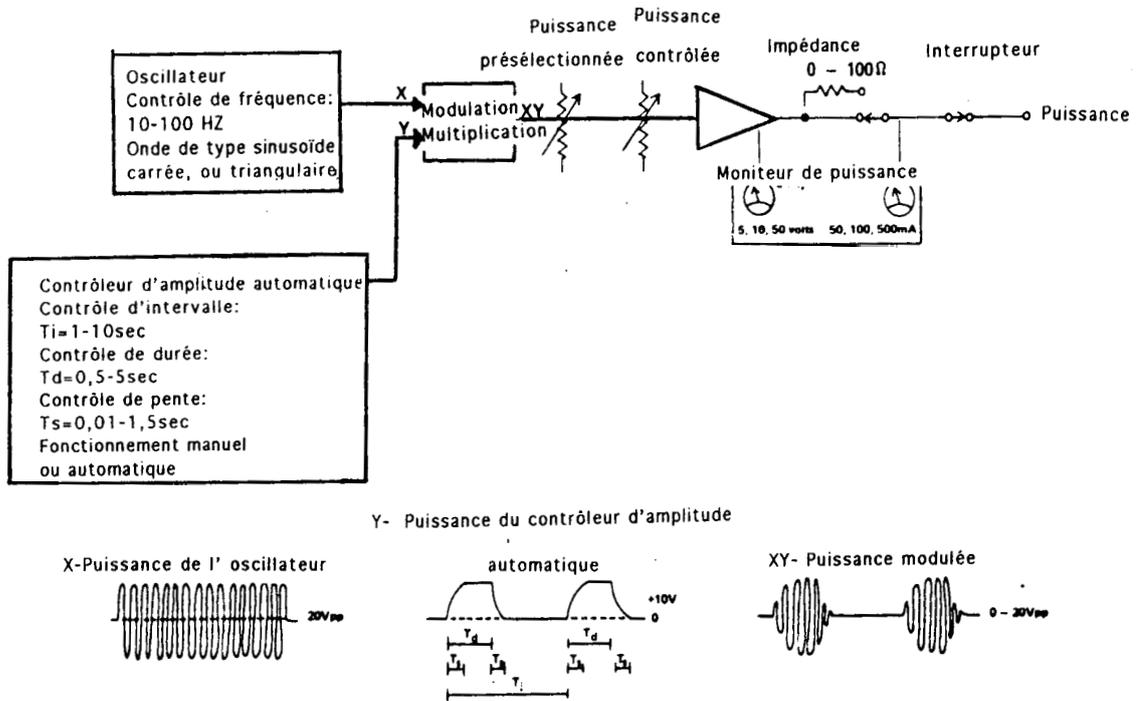


Photo 3: Exemple de modèle d'électro-éjaculateur (CERCA)



Sonde rectale

La sonde rectale est cylindrique et bipolaire (Figure 8 et Photo 4). Elle est constituée de plastique, de Téflon, d'un alliage de nickel et d'argent, de polyester et de résine Epoxy [50,76,78,80]. Les dimensions varient selon les auteurs : diamètre de 1 [50,80] à 1,5cm et longueur de 12 [80] à 14 cm [50]. Elle contient un nombre variable d'électrodes (3 à 5 [50,80]), toujours orientées en position ventrale. L'électrode la plus ventrale est orientée sur la prostate et la symphyse pubienne. La sonde est maintenue dans cette position à l'aide d'une pression ventrale douce durant toute la séance. L'ensemble des auteurs utilisent préférentiellement des électrodes longitudinales plutôt que des électrodes annulaires. Elles sont en acier inoxydable et leur longueur est de 5 à 8,5 cm [80]. Elles sont parallèles entre elles à l'intérieur de la sonde [119].

Figure 8: Sonde Rectale [119]

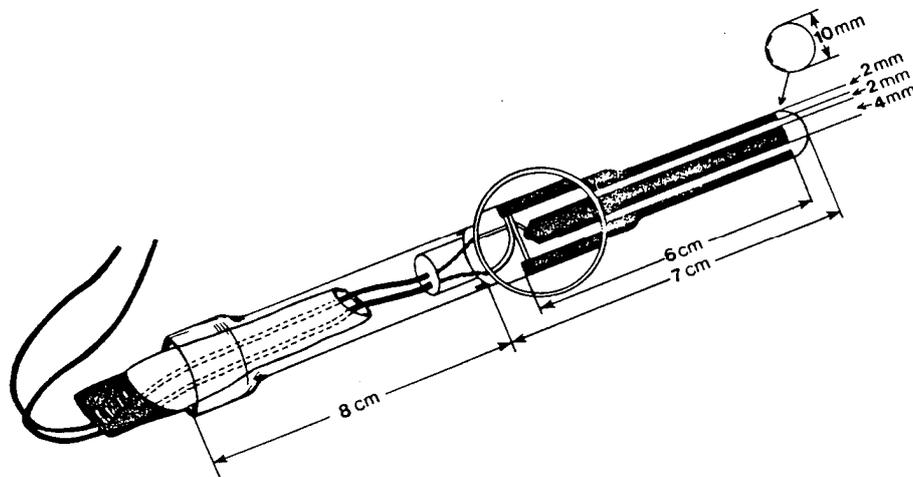
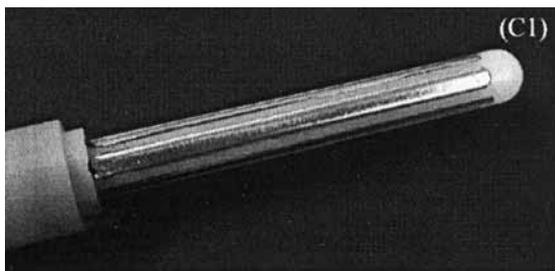


Photo 4 : Sondes rectales [119] (CERCA)



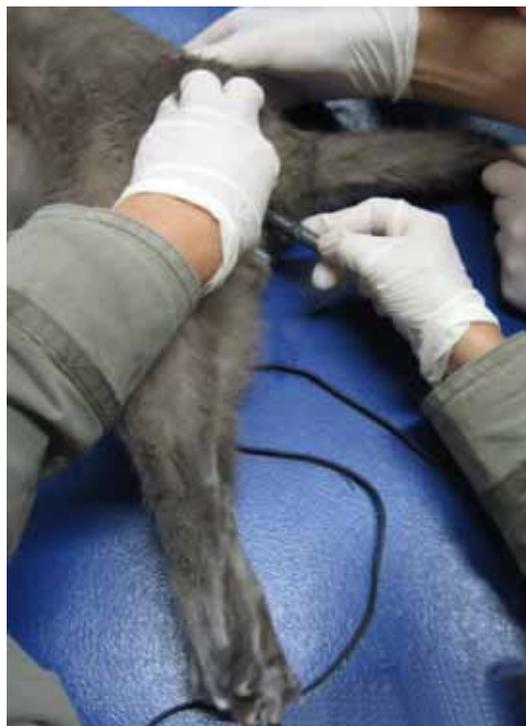
Contention

Certains auteurs utilisent une boîte de contention afin de positionner l'animal anesthésié pendant la séance [26]. Les postérieurs du chat sont attachés à l'aide de sangles afin de restreindre les mouvements induits par les stimulations électriques et non d'empêcher les mouvements de rétraction et d'extension des membres qui sont de précieux indicateurs d'un bon positionnement. Cette boîte de contention facilite le positionnement de la sonde ainsi que la récolte de la semence. Elle permet d'éviter les mouvements inopportuns de l'animal qui pourraient être à l'origine d'une perte de semence malencontreuse pendant la collecte. Une autre technique, plus utilisée, consiste à positionner l'animal en décubitus latéral (Photo 5 et 6) [78,80].

Photo 5: Positionnement de l'animal anesthésié durant la séance d'électro-éjaculation (CERCA)



Photo 6 : Positionnement optimal de la sonde avec extension symétrique des postérieurs et extrusion des griffes (CERCA)



II.1.2.ii Protocole opératoire

Il paraît préférable de maintenir le matériel de récolte dans une enceinte thermostatée à une température de 25°C à 28°C, afin de prévenir le choc thermique. Sojka (1986), cité par Vuillermoz [119], a montré que les spermatozoïdes sont très sensibles aux ions métalliques et aux antiseptiques que l'on peut rencontrer à la surface des parois des récipients. De manière générale, il faut minimiser le nombre de manipulations de la semence [79]. On utilise pour la récolte du sperme un tube à centrifugation conique en polystyrène de 15mL que l'on sectionne à la marque 3 mL, cette surface de section devant être émoussée. Le tube est positionné ensuite sur le pénis juste avant l'éjaculation [119]. On peut également utiliser un tube Eppendorff (Photo 7) [132].

Photo 7 : Récolte de la semence dans un tube Eppendorff (CERCA)



Cathétérisme urétral

Certains auteurs préconisent l'utilisation d'une sonde urétrale que l'on introduit sur 5cm de façon à ce que son extrémité distale se trouve en arrière du *colliculus seminalis*. Ce cathéter est préalablement gradué à l'aide de volumes d'eau connus (précision 0,001mL). Un double bandage est mis en place : l'un permet d'éviter les contaminations extérieures et d'extérioriser le pénis et l'autre, positionné autour de la partie extérieure de la sonde et rattaché au premier, évite l'expulsion du cathéter durant l'éjaculation. L'utilisation d'une sonde urétrale ne peut être que bénéfique car elle permet une récolte maximale de semence étant donné le faible volume éjaculé. Elle permet également d'observer la couleur et le volume du sperme. L'échantillon contenu dans la sonde peut servir directement à une insémination artificielle ou être transporté tel quel au laboratoire pour analyse. On note que le volume et la concentration restent les mêmes avec ou sans sonde [119].

Effets indésirables

On ne note pas d'effets indésirables dus à la répétition des récoltes. Les chats utilisés dans toutes les études citées se sont maintenus à un poids stable avec une activité et un comportement normaux. Ni l'anesthésie, ni les stimuli électriques ne semblent altérer la qualité de la semence. Cependant, la concentration en spermatozoïdes décroît au sixième jour lors de récoltes biquotidiennes (à 10 minutes d'intervalle) et on observe de plus en plus de formes immatures après le quatrième jour (15% au sixième jour). Ces résultats ont été confirmés quelque soit la méthode de prélèvement. On préférera donc une récolte tous les deux ou trois jours [45,107]. La majorité des études ne dépassent pas la récolte hebdomadaire [50,78,80,26].

Anesthésie

Une étude rapporte des électro-éjaculations sur chats vigiles [98], mais il est préférable d'effectuer une anesthésie générale pour faciliter les manipulations et pour le confort de l'animal. Certains auteurs préconisent une prémédication : xylazine à 1mg/Kg par voie intramusculaire ou thiopental sodique (2,5%) et atropine (au rapport ¼) par voie intraveineuse lente jusqu'à suppression du reflexe d'agitation des moustaches [50] ou encore acépromazine [119]. L'atropine est un parasympatholytique et nous avons vu que l'érection est déclenchée par l'excitation du parasympathique. L'emploi de cette molécule devrait donc inhiber l'érection, mais des études sont encore à fournir dans ce domaine [119].

On utilise préférentiellement le protocole anesthésique suivant : la kétamine seule à 25-33mg/Kg IM ou la kétamine à 5 mg/Kg associée à la médétomidine à 80 µg/Kg SC ou encore la médétomidine seule à 100-150 µg/Kg SC. Ce dernier protocole semble accroître la concentration en spermatozoïdes [132]. Les anesthésies répétées ne semblent pas altérer la qualité de l'éjaculat [78]. De plus, selon Dooley *et al.* [28], la kétamine n'est pas un facteur de contribution au flux rétrograde de spermatozoïdes dans la vessie durant l'électro-éjaculation comme cela avait pu être suspecté.

Protocole opératoire

La fréquence utilisée varie de 25Hz [50] à 30Hz [28,26,78,76], ce qui correspond aux fréquences ayant donné les meilleurs résultats dans les autres espèces. Tous les auteurs utilisent une onde de type sinusoïde. La tension maximale du courant est choisie soit arbitrairement (identiques pour tous les individus) [28,78,76,80], soit en choisissant une valeur minimale suffisant à provoquer l'extension des membres postérieurs et la protrusion des griffes [50]. Ceci correspond à une tension de 5 à 10V. Dans le cadre d'une pratique en clientèle, un réglage individuel paraît plus judicieux. Quelque soit la méthode employée, il existe un voltage seuil pour la production de plasma séminal (0 à 1V), pour l'obtention d'un nombre maximal de spermatozoïdes (entre 2 et 8V) et pour l'obtention d'un volume convenable (1 à 8V) [76]. L'érection est généralement obtenue entre 2 et 4V [80]. Aucun consensus n'est pourtant acquis sur la question : Le nombre de spermatozoïdes varie avec le voltage et le nombre de stimuli électriques, à la différence du volume qui ne semble pas être influencé par ces deux facteurs pour Zambelli *et al.* [132,76]. Dooley *et al.* [26] rapportent au contraire un effet du voltage à la fois sur le nombre de spermatozoïdes, le volume total et l'osmolarité. Le volume et la concentration obtenus à 1V seraient inférieurs à ceux éjaculés à 2,

4 ou 6V. D'après cet auteur, Il apparaît que c'est surtout le nombre de stimulations infligées qui influe sur le volume. Pineda *et al.* [78] l'expliquent par une sensibilité des glandes accessoires sexuelles plus forte aux stimulations. La production de plasma séminal est maximale vers 1 à 2V.

L'éjaculation est obtenue de façon inconstante avec des stimuli entre 2 et 8V et 5 et 220 mA. L'éjaculation sans érection est possible. Nous détaillerons plus loin le protocole de choix [46,28]. On note que l'éjaculation se produit le plus souvent entre 4 et 8V et les spermatozoïdes recueillis proviennent de l'épididyme et du *vasa deferens*. De plus, la composition d'un éjaculat recueilli à 6V s'apparente à celle de la semence obtenue par vagin artificiel [26,78]. La viabilité et la mobilité des spermatozoïdes n'est influencée ni par le voltage, ni par l'intervalle de collection [132,26]. L'éjaculat le plus concentré semble être celui obtenu à la deuxième éjaculation [78,76].

- Howard *et al.* [46,28] ont mis au point une suite de stimulations électriques (Tableau 2), permettant d'éviter la contamination urinaire et d'obtenir un éjaculat de qualité :

Tableau 2 : Protocole d'électro-éjaculation selon Howard [46,28]

	Série 1			Série 2			Série 3	
Stimulations	10	10	10	10	10	10	10	10
Voltage (V)	2	3	4	3	4	5	5	6

On augmente le voltage en 3 secondes, puis on reste au voltage voulu pendant 2 à 3 secondes et on revient à 0V en 3 secondes avant de recommencer la manipulation pour le voltage suivant. Les délais peuvent être plus rapide selon les différents auteurs, cependant la durée de la phase d'augmentation du voltage est la plus constante. On attend 2 à 5 minutes entre les séries [46]. Au moins 60 stimulations électriques sont nécessaires à l'éjaculation [76].

Il existe d'autres protocoles peu éloignés mis au point par Johnstone [50] et Platz et Seager [80], donnant des résultats approchants.

- Johnstone [50] fait varier la force du courant de 0V à un maximum de voltage correspondant à la valeur minimale provoquant l'extension des membres postérieurs et la protrusion des griffes.

Ce voltage maximum est maintenu pendant 3 secondes avant un retour à 0V. Une période de repos de 3 secondes est observée avant de recommencer la manipulation. Les auteurs réalisent ainsi une série de 10 stimulations. A l'issue de la dixième stimulation, le voltage est maintenu à son maximum et le manipulateur fait faire à la sonde deux mouvements de va et vient. Le voltage est abaissé à 0V et cette suite d'évènements provoque l'éjaculation. Une période de repos de 10 minutes est observée. Johnstone réalise en moyenne 4 séries de stimulation par séance. Après 5 électro-éjaculations complètes, 85 à 95% des spermatozoïdes ont été éjaculés et leur mobilité diminue de 90 à 50%. On peut cependant réaliser 9 récoltes avant l'observation d'une diminution notable du nombre de spermatozoïdes avec cette méthode.

- Platz et Seager [80] réalisent une séance constituée de 3 séries de 60 stimuli chacune entre lesquelles une période de repos de 5 minutes est respectée (Tableau 3).

On augmente le voltage en 2 secondes pour le maintenir à son maximum pendant 3 secondes et redescendre en 1 seconde à 0V avant de recommencer après 2 secondes de repos. Pour certains chats, l'éjaculation n'est obtenue qu'à la troisième série.

Tableau 3 : Protocole d'électro-éjaculation selon Platz et Seager [80]

	Série 1				Série 2					Série 3					
Stimulations	15	15	15	15	5	10	15	15	15	5	5	5	15	15	15
Voltage (V)	2	3	4	5	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7

- Dooley *et al.* [26] ont également décrit un protocole de 4 séries menant chacune à l'éjaculation (Tableau 4).

La durée de la stimulation électrique est de 2 secondes, le laps de temps entre chaque stimulus de 2 secondes également et la durée de repos entre les séries de 5 minutes. Lors de la quatrième série, un nombre considérable d'échantillon sont contaminés par l'urine, c'est pourquoi il est préférable d'appliquer un voltage de 6V (46 à 95mA) plutôt que de 8V.

Tableau 4 : Protocole d'électro-éjaculation selon Dooley [26]

	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4
Stimulations	60	60	60	60
Voltage (V)	1	2	4	8
Ampérage (mA)	8 à 12	21 à 30	48 à 75	90 à 150

Contamination urinaire

On remarque qu'une contamination urinaire se produit plus souvent à partir de 8V [28,76], comme c'est le cas chez le chien [27]. De plus l'importance du flux rétrograde varie d'un individu à l'autre. Nous avons vu précédemment que ce phénomène était présent physiologiquement chez certains chats. Il existe également une forte proportion de chats oligospermiques, mêmes s'ils sont matures sexuellement, ce qui est visible d'après la taille des organes génitaux externes et le développement des spicules sur le pénis. L'oligospermie peut être due au chat lui-même ou au flux rétrograde vésical plus ou moins abondant [78].

Pour éviter la contamination urinaire, certains auteurs proposent de vidanger préalablement la vessie et de la laver avec du NaCl. On peut la remplir ensuite avec du milieu de dilution afin de tamponner l'urine en prévention (Hill Debrandt, Institut zoologique de Berlin, données non publiées, communiquée personnellement).

L'émission de fèces est également rapportée [80].

II.1.2.iii Avantages de la technique de récolte par électro-éjaculation :

C'est une méthode sûre et facile d'emploi, pour peu que l'on dispose du matériel nécessaire. En clientèle, au moins deux électro-éjaculations sont nécessaires pour avoir une idée fiable de la fertilité [102].

Le volume de la semence obtenu avec cette méthode est supérieur à celui obtenu à l'aide d'un vagin artificiel ou par saillie naturelle. Ceci correspond à une meilleure contribution des glandes annexes en réponse à une stimulation électrique prolongée. L'analyse de la semence s'en trouve facilitée. Un éjaculat peut être utilisé pour inséminer plusieurs femelles. C'est particulièrement intéressant en chatterie ou en laboratoire. Il n'y a pas de contact physique entre animaux, ce qui est intéressant pour les laboratoires de recherche travaillant sur des chats isolés, SPF (Specific Pathogen Free), ou pour un élevage ne désirant pas l'introduction d'un mâle. Dans la même optique, il n'y a pas de détérioration du pelage, ce qui apparaît primordial pour les animaux d'exposition [132].

Pineda *et al.* [78] n'ont constaté, après 22 collectes réparties sur 32 semaines, aucun effet nuisible, décelable cliniquement, de la répétition des anesthésies et des stimulations électriques sur les animaux. Seuls des problèmes de fatigue musculaire, d'échauffement de la muqueuse rectale et de déséquilibres ioniques à la surface de cette muqueuse ont été observés chez les primates et chez l'homme [132]. Aucune des études citées a fait part d'effet néfaste du à l'électro-éjaculation lorsque les prélèvements sont réalisés à 2 ou 3 jours d'intervalle.

Toutes les informations pratiques nécessaires à la réalisation d'un prélèvement par électro-éjaculation sont résumées dans l'Annexe 2 (Annexe 2 : Prélèvement de semence féline par électro-éjaculation).

II.1.3 Flush ou aspiration de l'épididyme

Les spermatozoïdes frais ou décongelés ayant été prélevés dans le *ductus deferens* ou l'épididyme sont capables de féconder *in vitro* les ovocytes de chatte [14]. On récolte les spermatozoïdes en écrasant, hachant ou en flushant l'épididyme caudal ou le *ductus deferens*.

II.1.3.i Avantages et inconvénients

Cette technique peut être utilisée sur des animaux fraîchement castrés ou décédés. Ce n'est donc pas une technique répétable, mais plutôt un protocole de laboratoire. Ce peut être également une technique adaptée à la sauvegarde de la diversité génétique chez les grands félins sauvages : un animal fraîchement décédé appartenant à une espèce dont il reste peu de représentants, peut faire l'objet d'un flush épididymaire dans le but de conserver sa semence [132,67].

II.1.3.ii Protocole opératoire

La technique a été décrite chez le chien : on place le testicule immédiatement après son exérèse dans une solution saline isotonique à température ambiante supplémentée en pénicilline (100 UI/mL) et streptomycine (0,1mg/mL). L'épididyme est disséqué le plus tôt possible et rincé avec une solution saline à 0,9%. Une boîte de Pétri de 35mm de diamètre recueille le mélange et les spermatozoïdes en suspension sont séparés des débris et placés dans un tube en plastique stérile [127,67]. On peut ne disséquer que le *ductus deferens* (à 1 cm de la fin de l'épididyme) [14] ou la partie caudale de l'épididyme (4mm) et ajouter de l'huile minérale légère dans la boîte de Pétri [40].

II.1.4 Cathétérisme urétral après injection de médétomidine

II.1.4.i Utilisation d' α 2 agonistes dans d'autres espèces

L'utilisation d'agents α 2-agonistes provoque chez l'étalon, l'éjaculation d'un sperme de bonne qualité, sans nécessité d'accouplement. Cette éjaculation induite pharmacologiquement permet le prélèvement de la semence de chevaux indisposés à la monte naturelle (fracture, blessure débilite...) et ne nécessite pas d'anesthésie générale, contrairement à l'électro-éjaculation [116]. Les molécules utilisées sont le clomipramide qui induit l'érection et la masturbation, ainsi que la xyzaline par voie intraveineuse qui provoque l'éjaculation sans érection en quelques minutes. L'imipramine couplée à une de ces deux molécules, amène le pourcentage d'éjaculation provoquée à 42%. L'imipramine est un antidépresseur humain connu pour ses effets sur l'érection et l'éjaculation. Les systèmes dopaminergique et sérotoninergique qui jouent un rôle dans la libido sont également stimulés par ces composés. On rapporte l'utilisation de prostaglandines F₂ α chez le cheval. Jusqu'à aujourd'hui, seul le protocole associant xylazine et imipramine à une stimulation sensitive par des juments en œstrus a permis la conception d'embryons par insémination de semence fraîche [20].

II.1.4.ii Protocole opératoire et avantages chez le chat [133,134]

Le prélèvement par éjaculation pharmacologiquement induite a également été étudié chez le chat par Zambelli *et al.* en 2007 [133,134]. Les α -adénorécepteurs épидидymaires semblent être responsables de la contraction du canal déférent, du trigone et des sphincters urinaires lorsqu'ils sont stimulés. A intervalle de 4 jours, l'auteur a prélevé des chats pubères à l'aide d'un cathéter urétral de 9 cm de long après injection de médétomidine à la dose de 140 μ g/Kg (Photo 8). Le cathéter utilisé est un cathéter (Portex Jackson, dlc) 3 French[♦] de 11 cm de long, sectionné dans sa partie distale à environ 9cm (Photos 9, 10 et 11). C'est la méthode la plus simple et la plus rapide. Sur 60 prélèvements réalisés dans l'étude, 10 ont présenté un reflux vésical et un chat n'a pas éjaculé. On peut toute fois profiter de l'anesthésie déjà en place pour pratiquer une électrostimulation sur les animaux n'ayant pas éjaculé par la première méthode. On peut donc coupler les techniques pour obtenir un résultat meilleur.

Photo 8 : Flacons de Domitor®, Dexdomitor® et Antisédan® (Pfizer)



[♦] Une sonde urinaire de X French possède un diamètre externe de X/3 mm.

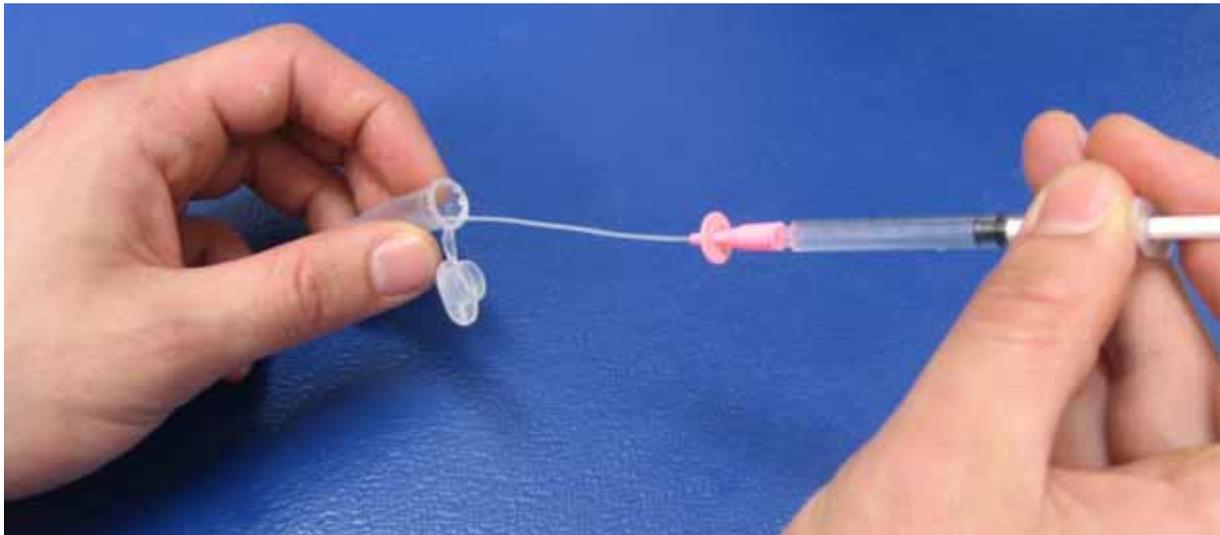
Photo 9 : Matériel nécessaire au prélèvement par cathétérisme urétral (CERCA)



Photo 10 : Positionnement de la sonde pendant le cathétérisme urétral (CERCA)



Photo 11 : récolte du sperme dans un tube Eppendorff après cathétérisme urétral (CERCA)



II.1.4.iii Influence de la matière utilisée pour le cathéter

Une étude menée chez l'homme en 1993 a montré que l'exposition rapide (1 à 5 minutes) à des cathéters de différentes compositions (latex, silicone, téflon et caoutchouc) avec ou non ajout de lubrifiant non toxique n'affectait pas négativement la mobilité et la viabilité du sperme [25].

Toutes les informations pratiques nécessaires à la réalisation d'un prélèvement par cathétérisme urétral sont résumées dans l'annexe 3 (Annexe 3 : Prélèvement de semence féline par cathétérisme urétral après injection de médétomidine).

II.1.5 Autres

On décrit également la possibilité d'exécuter une cystocentèse post-éjaculation ou un lavage vaginal post-coït. Cependant, ces manipulations sont effectuées dans le but de détecter la présence de spermatozoïdes plutôt que dans le but de les prélever [132].

La récolte de la semence chez le chat se fait donc préférentiellement par électro-éjaculation qui reste la méthode de choix. Le cathétérisme urétral après injection de médétomidine semble plus rapide et plus aisé. Nous manquons cependant de recul sur cette nouvelle technique prometteuse puisque nous ne disposons que des publications de Zambelli et al. [132,133,134]. Le flush et l'aspiration épидидymaire restent exploitables dans le cas d'animaux morts ou d'animaux fraîchement stérilisés. Toutes les techniques décrites permettent d'obtenir une semence de qualité (dans les capacités de l'animal prélevé), mais dont les caractéristiques diffèrent fortement comme nous le verrons dans le chapitre suivant. Les données concernant les effets de l'urine sur les spermatozoïdes sont contradictoires, mais il semble que toute contamination urinaire soit à redouter chez le chat.

II.2 Méthodes d'appréciation et caractéristiques de la semence [119]

Nous développeront dans cette partie le spermogramme à proprement parler, c'est à dire les examens histologiques et biophysiques de la semence effectués en laboratoire. Celui-ci ne constitue qu'une approche, une évaluation du pouvoir fécondant du sperme de chat. Le seul critère totalement fiable étant l'aptitude réelle à féconder *in vivo* l'ovule de la femelle.

Les éjaculats sont très variables selon l'individu en volume, pH, osmolarité et concentration en spermatozoïdes [26,50,78,132]. Les prélèvements sur le même chat peuvent également subir de grandes variations, c'est pourquoi on estime que 5 prélèvements et spermogrammes sont nécessaires pour juger du potentiel reproducteur d'un mâle [50] (Sojka *et al.* [102] n'en recommande que deux à quinze jours d'intervalle). Le printemps est plus propice à la récolte du sperme car c'est la période où les éjaculats sont les plus concentrés et les plus volumineux, à relier avec l'activité sexuelle grandissante des femelles [50].

La connaissance et l'évaluation des caractéristiques du sperme de chat, de sa « qualité », s'est améliorée avec l'avènement de la reproduction assistée dans cette espèce grâce au développement de l'insémination artificielle et des méthodes de prélèvement décrites plus haut.

Nous présenterons, en parallèle, les caractéristiques de la semence récoltée par vagin artificiel, étant donné les importantes modifications induites par l'électro-éjaculation. La semence de chat n'a fait l'objet que d'un petit nombre de publications, mais qui donnent des résultats relativement similaires. Elle contient un ensemble d'éléments figurés, des spermatozoïdes, des cellules épithéliales exfoliées, des débris cellulaires et des bactéries [78].

II.2.1 Intérêt de l'analyse de la semence :

Il est une demande récurrente des propriétaires ou futurs propriétaires de chats mâles : « quel est le potentiel reproducteur de mon animal ? » En outre, le spermogramme est un excellent recours lors de problèmes de fertilité avérés. Cet examen de routine, mis en relation avec des informations essentielles concernant aussi bien le mâle que la femelle, comme la date de la dernière portée, le nombre de chatons par portée, le nombre de portées, le nombre de femelles saillies, la fréquence des saillies, la libido, le comportement sexuel et les moyens de reproduction assistée déjà employés ainsi que leurs résultats.

Toutes ces informations doivent permettre de mettre en lumière l'origine de l'infertilité. Le mâle peut avoir été infertile depuis toujours (infertilité d'origine congénitale). Il peut également l'être devenu récemment à la faveur d'une infection urinaire, d'une inflammation du tractus génital ou d'un problème matériel lors de la récolte du sperme. Il peut également être subfertile. Il faut toujours vérifier la fertilité de la femelle en même temps.

Le spermogramme reste le meilleur moyen d'évaluer le potentiel reproducteur d'un mâle même s'il n'existe pas encore de test de laboratoire fiable pour juger de la fonction de reproduction d'un futur étalon [93].

En raison du faible volume récolté chez le chat, les techniques habituellement utilisées dans les autres espèces, comme chez le chien, ne sont pas directement transposables [132].

Les caractéristiques attendues pour la semence de chat récoltée par vagin artificiel et qui doivent être étudiées en routine lors d'un spermogramme sont reportées dans le tableau [76,79,80,102]. Les résultats présentés dans le Tableau 5 sont issus de différentes études, répertoriées dans la première colonne.

Tableau 5 : Caractéristiques de la semence de chat récoltée par vagin artificiel [76,79,80,102]

Référence	Volume (ml)	Nombre total de spermatozoïdes	Concentration en spermatozoïdes (/ml)	Mobilité (%)	Autres observations
Sojka <i>et al.</i> [102]	0,04 (0,01-0,12)	57.10 ⁶ (13-143)	1,73.10 ⁹	78 (35-100)	pH=7,4
Platz <i>et al.</i> [80]	0,02-0,12	15-130.10 ⁶	--	(60-95)	Vitesse de progression 4,5 à 5,0
Platz <i>et al.</i> [79]	0,034 ±0,048	60,7 ±12,9.10 ⁶	--	82,5 ±2,7	--
Pineda et Dooley [76]	0,06 ±20 (0,03-0,09)	60,97.10 ⁶ ±31 (21,5-117)	--	58 ±27 (4-87)	pH=8,32 Osmolarité=324 31 mOsm/Kg

II.2.2 Examen macroscopique :

II.2.2.i Examen physique de l'animal :

Un examen physique doit toujours compléter une évaluation de la semence. Une attention particulière doit être portée au système cardiovasculaire, au système musculaire, au squelette ainsi qu'à toute anomalie qui pourrait entraver la libido ou l'intromission, et de ce fait, être responsable d'une stérilité ou d'une hypofertilité [119].

II.2.2.ii Aspect

La semence de chat a un aspect blanc laiteux. Elle est homogène, mais trouble. Elle peut être de couleur anormale, signe d'une contamination par l'urine (jaune), par le sang (rouge ou brun), ou par le pus (vert). Le volume de l'éjaculat étant très faible, il est parfois difficile de distinguer les discolorations [119].

II.2.2.iii Volume

On mesure le volume à l'aide d'une pipette graduée de 100 µL ou d'une pipette à volume variable [80]. Le chat libère, en moyenne et à chaque éjaculation 0,04 ml de sperme. Le faible volume des éjaculats de chat est à l'origine d'un certain nombre de contraintes. Les techniques d'examen de la semence doivent être adaptées, de manière à ne pas en gaspiller. De plus, l'utilisation de la semence passe généralement par le regroupement de plusieurs éjaculats en un échantillon unique. En 1984, Pineda et Dooley [77] ont déduit de leurs expériences, que le volume des éjaculats était indépendant de l'intensité de la spermatogénèse. En effet, la vasectomie chirurgicale ou chimique n'a aucun effet sur le volume éjaculé.

Le volume d'un éjaculat obtenu par électro-éjaculation est nettement supérieur (0,27 mL en moyenne) à celui obtenu spontanément (0,04mL en moyenne) à l'aide d'un vagin artificiel. Rappelons que le volume de la semence éjaculée dépend des sécrétions des glandes annexes et s'accroît avec le niveau d'énergie électrique qu'elles reçoivent comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent [50].

II.2.2.iv pH

Le pH de la semence est rarement mesuré et semble varier de 7,4 selon Sojka *et al.* [102] à 8,61 selon Dooley et Pineda [26]. Ces derniers auteurs affirment que la semence récoltée par électro-éjaculation est plus alcaline (pH=8,61) que celle récoltée à l'aide d'un vagin artificiel (pH=8,32). En réalité il faut tenir compte du fait qu'une séance d'électro-éjaculation comprend différentes récoltes. Or, plus le temps séparant la récolte de l'analyse est grand, plus le pH s'alcalinise. Ceci permettrait d'expliquer la différence de pH obtenue, l'électro-éjaculation étant un protocole demandant à peu près une demi-heure de manipulation avant de pouvoir commencer les analyses. Les valeurs du pH des différentes productions génitales mâles est reporté dans le tableau [132,51].

II.2.2.v Osmolarité

La mesure s'effectue à l'aide d'un osmolarimètre à dépression du point de fusion. L'osmolarité d'un éjaculat de chat se situerait environ à 320 mOsm/Kg [64]. De la même façon que le pH, l'osmolarité semble augmenter avec le temps qui s'écoule entre la récolte et l'analyse. Les valeurs moyennes d'osmolarité du plasma séminal, du fluide prostatique et du fluide issu des glandes bulbo-urétrales et de la prostate associées sont reportées dans le Tableau 6 [132,51].

Tableau 6 : Caractéristiques physicochimiques des différentes productions génitales [132,51]

	Plasma séminal	Fluide prostatique et issu des glandes bulbo- urétrales	Fluide prostatique
Osmolarité (mOsm/L)	323	327	331
pH	6,6	6,7	7,8

II.2.3 Examen microscopique de la semence :

Avant toute manipulation destinée à l'appréciation de la semence, il apparaît judicieux, afin d'éviter le gaspillage et pour faciliter son utilisation ultérieure, de diluer la semence dans une solution salée isotonique (NaCl 0,9%) [119]. Ceci ne semble pas lui infliger de dommage. Zambelli *et al.* ont montré que l'utilisation de la solution de Hancock et Gledhill (IV.1.2.i page 88) à cette fin était un meilleur choix, cependant il utilise le milieu de conservation lorsque la semence est destinée à être congelée [128].

II.2.3.i Mobilité

Dans les 10 à 15 minutes suivant la récolte de la semence, il est possible d'évaluer la mobilité du sperme, c'est-à-dire le pourcentage de spermatozoïdes mobiles.

Cette évaluation est hautement subjective et de les biais sont nombreux : matériel sale, tube à essai non lavé avant son premier usage, mauvaise manipulation... Tous ces paramètres peuvent engendrer une baisse de mobilité. La dilution de l'éjaculat une solution saline chaude à 0,9% ou d'une solution de citrate de sodium chaude (température non précisée) à 2,9% facilite cette évaluation. On peut toutefois estimer la mobilité sur sperme non dilué [132].

Si la semence est gardée à 23°C après éjaculation, les spermatozoïdes vont rester mobiles pendant un temps, grâce à l'énergie issue du métabolisme des nutriments contenus dans le fluide séminal. La vitesse des cellules augmente avec l'élévation de la température, et inversement : Si la température dépasse 38°C, les spermatozoïdes perdent rapidement leur mobilité, ceci étant du à l'accumulation rapide de métabolites toxiques. De même, si la température devient inférieure à 30°C, la mobilité des spermatozoïdes diminue avec le métabolisme [119].

Pourcentage de mobilité

La mobilité est évaluée en plaçant une goutte de sperme dilué entre lame et lamelle, sur une platine chauffante à 37°C, et en observant de préférence au microscope à contraste de phase au grossissement $\times 40$. Il faut alors recenser le pourcentage de spermatozoïdes mobiles [80,48]. La mobilité est dite normale quand les spermatozoïdes présentent une mobilité progressive, les faisant nettement avancer, en ligne droite avec une certaine rapidité. Ils se déplacent grâce à des mouvements ondulatoires de la queue, associés à une rotation autour de leur axe longitudinal, de telle sorte que leur progression est rectiligne [80,48].

Echelles de mobilité [119]

Une autre alternative consiste en une estimation subjective de la mobilité sur l'échelle de Watson qui va de 0 à 5+, avec :

- 0 pour aucun mouvement,
- 1 pour 20% de spermatozoïdes à progression rapide,
- 2 pour 40% de spermatozoïdes à progression rapide,
- 3 pour 60% de spermatozoïdes à progression rapide,
- 4 pour 80% de spermatozoïdes à progression rapide
- 5 pour 100% de spermatozoïdes à progression rapide.

Cette même technique peut être utilisée pour une estimation individuelle de la mobilité des spermatozoïdes. A chaque chiffre correspond alors une signification différente : c'est l'échelle de Seager et Platz (rapportée par Vuillermoz [119]), avec :

- 0 pour un spermatozoïde immobile,
- 1 pour un spermatozoïde avec de petits mouvements sur place, de côté, sans progression,
- 2 pour un spermatozoïde avec des mouvements sur place, rapides, sans progression,
- 3 pour un spermatozoïde avec des mouvements sur place, rapides, une progression intermittente et par à-coups,
- 4 pour un spermatozoïde avec une nette progression, mais lente,

- 5 pour un spermatozoïde avec une progression franche et rapide.

SMI et caractéristiques de la semence de chat

La notation terminée, il faut alors calculer la moyenne des notes obtenues par les spermatozoïdes observés. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles dépasse généralement les 60% et l'éjaculat « normal » de chat contient en moyenne 78% de spermatozoïdes mobiles. Notés selon une échelle de progression, de 0 à 5,5, les spermatozoïdes du chat obtiennent de bons scores, souvent supérieurs à 4,5 [79].

Pour obtenir une valeur tenant compte à la fois du pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de la mobilité progressive, on calcule l'index de mobilité des spermatozoïdes (SMI) [48]. $SMI = 0,5 \times [(Mobilité progressive \times 20) + (\%mobilité)]$. Chez le chat normospermique, il vaut environ 84,4% [46]. Nous verrons plus loin que le SMI est un des critères de choix pour l'évaluation de la semence après congélation et réchauffement.

II.2.3.ii Le nombre de spermatozoïdes :

Des estimations précises, quant à la concentration spermatique, peuvent être réalisées à partir d'une solution de sperme dilué, et à l'aide d'un hématimètre. L'exactitude de la méthode dépend de la représentativité du prélèvement : celui-ci doit être homogène et convenablement dilué. La solution de dilution utilisée est une solution saline hypertonique de chlorure de sodium à 3% destinée à tuer les spermatozoïdes afin d'en faciliter le dénombrement. On peut également utiliser une solution d'eau distillée ou le milieu de Hancock et Gledhill [128] si l'on veut préserver la semence [46]. La dilution se fait à l'aide de pipettes automatiques. Le taux de dilution varie de 1/10 à 1/400 en fonction de l'échantillon et du type de matériel utilisé [46].

Le dénombrement des spermatozoïdes est ensuite effectué à l'aide d'un hématimètre dont il existe plusieurs sortes. L'hémacytomètre utilisé au CERCA (Quomed, LTD, Celltrac, CML) est présenté dans la photo 12.

Photo 12 : Hémacytomètre utilisé au CERCA

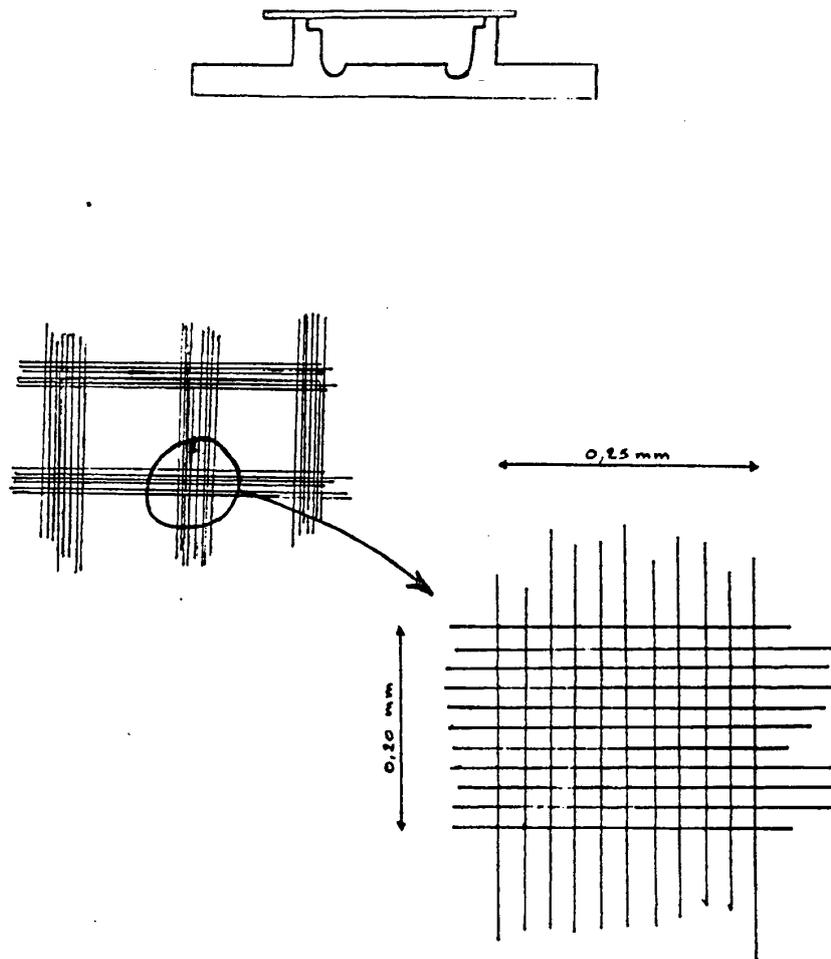


L'hématimètre de Malassez [119]

La cellule hématimétrique est constituée d'un plateau de verre, creusé de deux gouttières encadrées par deux tétons surélevés, et d'une plaque de verre quadrillée en 100 rectangles de 250 microns de longs et de 200 microns de large. La hauteur entre lame de verre et le plateau est de 200 microns. Le volume de la cellule est donc de $1/100 \text{ mm}^3$ et de 1 mm^3 pour 100 rectangles.

Le décompte s'effectue sur 10 grands rectangles constitués de 10 petits rectangles chacun (Figure 9).

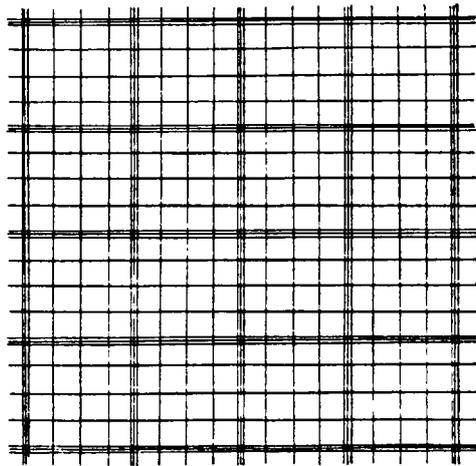
Figure 9 : Cellule de Malassez (profil et quadrillage) [119]



Hémocytomètre de Fusch-Rosenthal [119]

Il consiste en une lame de microscope sur laquelle sont gravés 16 grands carrés de 1 mm de côté, séparés par des lignes triples (Figure 10). Chaque grand carré est divisé en 16 petits carrés séparés par des lignes simples. La partie de la lame contenant le dessin se trouve à 0,2 mm au dessous du reste de la lame ; le volume de chaque petit carré est donc de $1/80 \text{ mm}^3$. Le dénombrement des spermatozoïdes s'effectue sur 16 petits carrés, ce qui correspond à un volume de $0,2 \text{ mm}^3$.

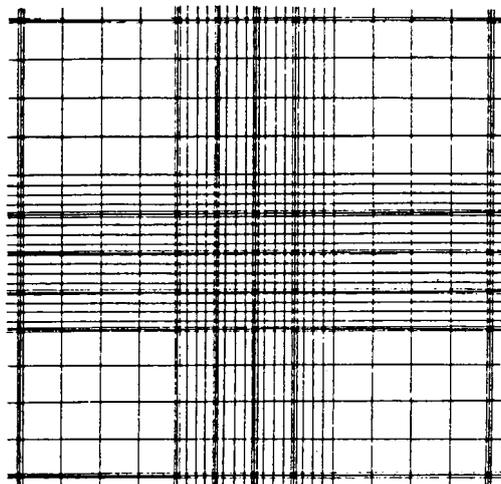
Figure 10 : Quadrillage de l'hémocytomètre de Fush-Rosenthal [119]



Hémocytomètre de Neubauer [119]:

Il contient 9 carrés de 1mm de côté, le carré central étant divisé selon la grille de Thoma, en 16 carrés séparés par des lignes triples, eux-mêmes divisés en 16 petits carrés de $1/256 \text{ mm}^2$ (Figure 11). Le dénombrement des spermatozoïdes se fait sur 5 carrés (les 4 carrés situés dans les coins et celui du centre).

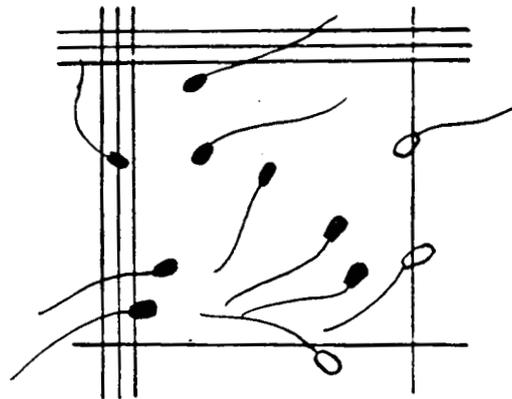
Figure 11: Quadrillage de l'hémocytomètre de Neubauer [119]



Technique et mode de calcul [119]

L'échantillon de sperme dilué, convenablement mélangé, est déposé au bord de la lamelle. Il diffuse par capillarité. L'examen est effectué à l'aide de l'objectif $\times 40$ du microscope. Par convention, les spermatozoïdes situés sur le haut ou sur le côté gauche du carré son pris en compte et on ignore ceux situés en bas et à droite (Figure12). On peut également ne prendre en compte que les spermatozoïdes dont la tête se trouve dans le carré en question.

Figure 12: Diagramme montrant la convention pour le dénombrement des spermatozoïdes [119]



Deux dilutions d'un échantillon sont préférables, chacune étant dénombrée et prise en compte.

Le nombre de spermatozoïdes par millilitre est obtenu, en fonction des hématimètres, comme suit :

- Malassez : N dans 10 rectangles $\times 10 \times$ dilution ;
- Fusch-Rosenthal : N dans 16 carrés $\times 5000 \times$ dilution ;
- Neubauer : N dans 5 grands carrés $\times 32000 \times$ dilution.

Caractéristiques de la semence de chat

Chaque éjaculat renferme, en moyenne, 60 millions de spermatozoïdes [26,79], soit, en moyenne, $1,73 \cdot 10^9$ spermatozoïdes par millilitre.

Au moins 100 à 200 spermatozoïdes doivent être visibles sur chaque champ à grossissement $\times 400$ ou $\times 1000$ pour une semence non diluée [132].

On peut également utiliser une cellule de Thoma ou la spectrophotométrie pour connaître la concentration. Il existe deux spectrophotomètres disponibles dans le commerce : le Spermacue® (Minitube) et l'Accuread® (IMV).

II.2.3.iii Identification des substances étrangères

L'étape suivante consiste en l'évaluation sous fort grossissement de la présence, dans l'éjaculat, de substances autres que les spermatozoïdes. On classe ces substances étrangères sur une échelle de 0 à 4+ avec 0 pour l'absence de substance étrangères et 4 pour un champ de microscope rempli de substance autre que des spermatozoïdes. On peut remarquer la présence d'autres cellules : des leucocytes ou des précurseurs de spermatozoïdes.

II.2.3.iv Identification des formes anormales de spermatozoïdes

Colorations possibles

- Eosine nigrosine :

L'examen morphologique des spermatozoïdes est effectué après coloration de l'échantillon. La coloration la plus utilisée en routine est l'éosine-nigrosine. Elle est la référence en matière d'examen morphologique de la semence. 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.

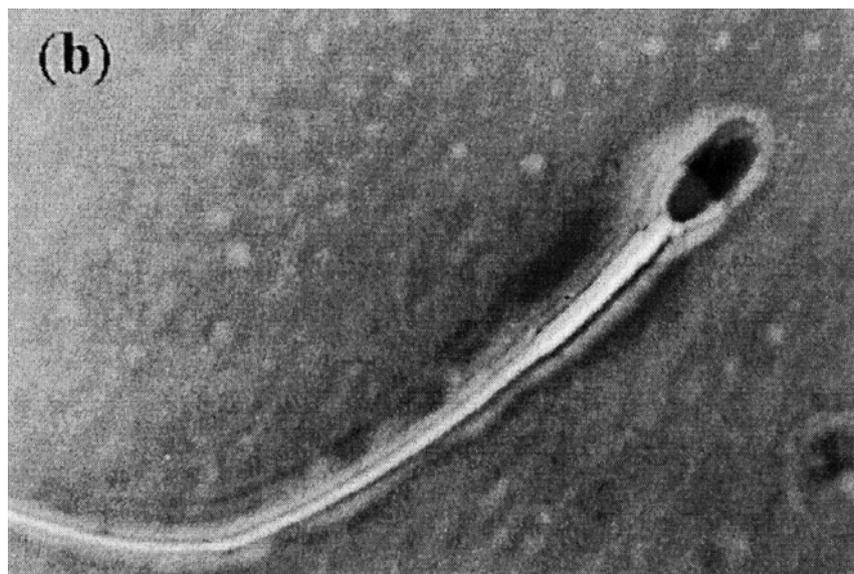
- Vert FCF :

Zambelli *et al.* ont comparé en 1993 l'emploi de différents colorants dans le spermogramme de chat [128]: la coloration rapide de rose de Bengale associé au vert FCF [83] a permis d'obtenir les meilleurs résultats. En effet, la différenciation de l'ultra-structure (et plus spécialement de l'acrosome) est meilleure et les artéfacts liés à la coloration sont moindre que dans les autres tests étudiés.

- Autres : rose Bengale, méthyle violet, Spermac® (Photo 13) et Giemsa [128,97]

D'autres colorations morphologiques peuvent également être recommandées : La coloration au rose Bengale, la coloration à l'aide d'une solution alcaline de méthyle violet (durée de vie brève après reconstitution, environ 10 minutes), la coloration de Giemsa (le temps requis pour la coloration est de 2 heures) et la coloration Spermac® (spécifique de l'acrosome, utilisable sur semence congelée).

Photo 13: Spermatozoïdes de chat colorés à l'aide de Spermac® (a : acrosome normal ; b : acrosome anormal)
[97]



Il est également possible d'utiliser un microscope à contraste de phase ou un microscope électronique, ceci étant peu disponible en pratique courante.

- Effet du jaune d'œuf et du glycérol

Dans l'étude de Zambelli [128], les interactions entre les diluants et les colorants ont été étudiées. Le jaune d'œuf et le glycérol affectent négativement les résultats obtenus avec la coloration rapide au rose de Bengale et vert FCF car le jaune d'œuf provoque l'agglutination et le glycérol diminue la différenciation des ultra-structures. Cependant, la solution de Hancock et Gledhill conseillée dans l'article contient également du jaune d'œuf et provoque donc également l'agglutination. Une centrifugation préalable de la semence permet de réduire l'impact de ces interférences [128,132].

Recensement des formes anormales

Une fois la coloration réalisée, on effectue un recensement des spermatozoïdes morts et des vivants. Simultanément on réalise le décompte des anomalies morphologiques.

Celles-ci peuvent être classées en fonction de leur localisation. Parmi elles, on distingue des anomalies majeures qui se trouvent souvent associées à une baisse de la fertilité, et des anomalies mineures qui provoquent une diminution de la fertilité seulement si elles sont suffisamment nombreuses.

Les anomalies les plus fréquentes sont les spermatozoïdes piriformes, micro et macrocéphales, bicéphales, les anomalies d'acrosome, les doubles flagelles, les spermatozoïdes immatures, les gouttelettes cytoplasmiques distales et proximales, les têtes, flagelles ou pièces intermédiaires collés et les têtes arrachées (Photo 14) [80]. Les proportions de ces anomalies sont reportées dans le Tableau 7 [46].

Tableau 7 : Caractéristiques d'un éjaculat de chat normospermique d'après Howard *et al.* [46]

	Ejaculats normospermiques (n=18)
Volume (μL)	124,1 \pm 9,5
Concentration en spermatozoïdes ($\cdot 10^6/\text{ml}$)	167,6 \pm 43,6
Mobilité (%)	84,4 \pm 5,9
Mobilité progressive	4,2 \pm 0,3
Index de mobilité	84,4 \pm 5,2
Spermatozoïdes mobiles/éjaculat ($\cdot 10^6$)	17,0 \pm 3,8
Volume testiculaire (cm^3)	4,3 \pm 0,6
Spermatozoïdes normaux (%)	71,6 \pm 6,4
Macrocéphale	0,1 \pm 0,03
Microcéphale	0,1 \pm 0,03
Bicéphale	0,2 \pm 0,2
Tricéphale	0,0
Aplasie mitochondriale	0,0
Flagelle enroulé	2,1 \pm 1,6
Pièce intermédiaire liée avec gouttelettes	9,3 \pm 3,5
Pièce intermédiaire liée sans gouttelette	1,0 \pm 1,3
Flagelle lié avec gouttelettes	0,9 \pm 6,2
Flagelle lié sans gouttelettes	5,8 \pm 7,0
Gouttelettes cytoplasmiques proximales	2,2 \pm 1,5
Gouttelettes cytoplasmiques distales	6,7 \pm 2,0

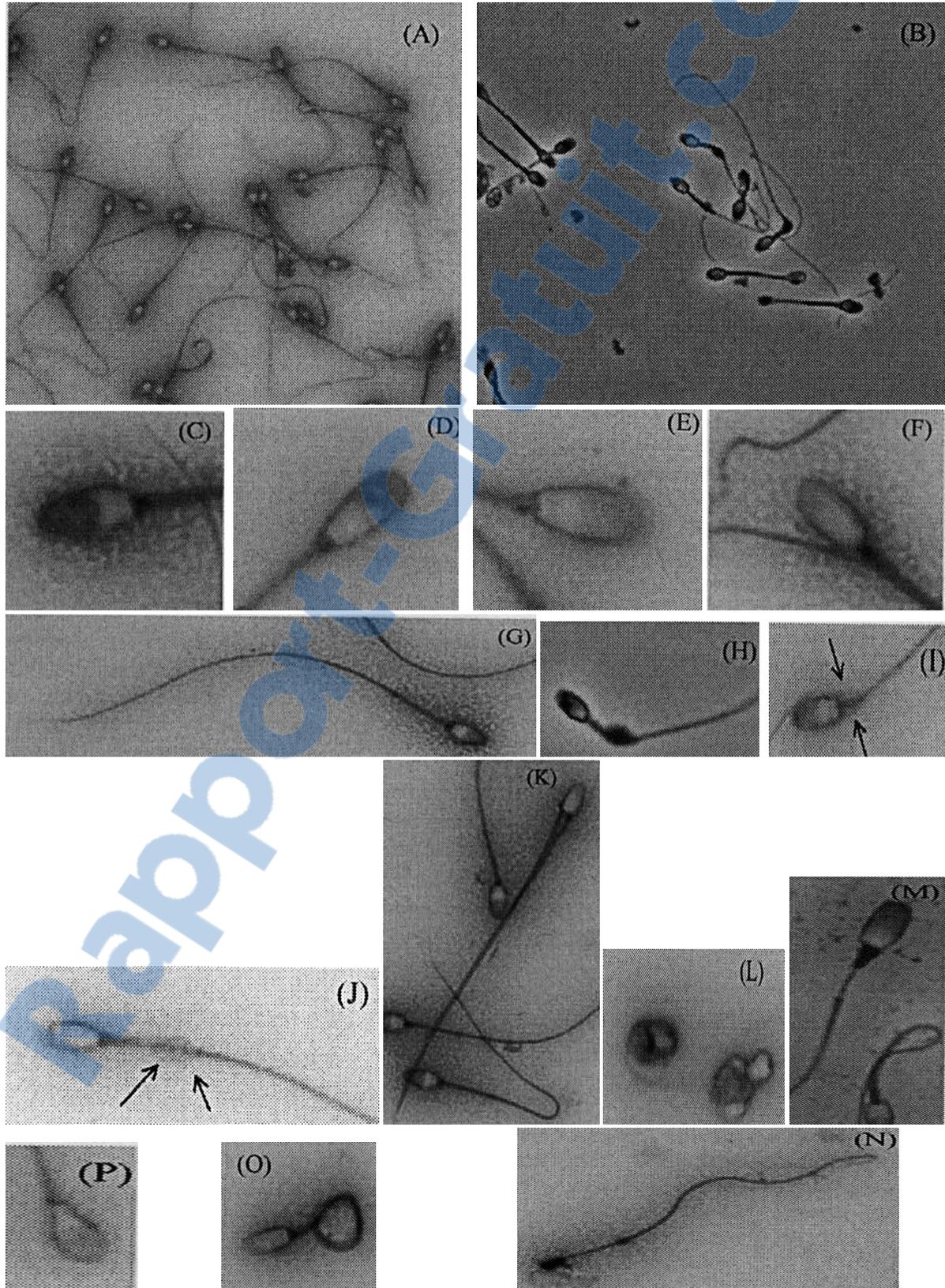
Certains chats présentent un taux anormalement élevé d'anomalies morphologiques : nous développerons cette particularité du sperme de l'espèce féline plus loin [88]. Les chats normospermiques produisent un sperme contenant moins de 30% d'anomalies

morphologiques, alors que les chats tératospermiques présentent plus de 60% de spermatozoïdes anormaux [46,80,88,119].

- Anomalies de l'acrosome :
 - Majeures : labié, en sac, distribution anormale ;
 - Mineures : réaction acrosomiale spontanée, lésion sévère, acrosome enflé ou absent ;
- Anomalies de la tête :
 - Majeures : macro-encéphale, micro-encéphale, piriforme, défaut du diadème, vacuole nucléaire, tête cannelée, forme double, pléiomorphe, forme anormale ;
 - Mineures : étroite, détachée, base étroite, sans tête, piriforme, implantation ab-axiale ;
- Anomalies de la pièce intermédiaire :
 - Majeures : gouttelette protoplasmique, pseudo-gouttelette, pliée, cassée ;
 - Mineures : gouttelette distale ;
- Anomalies de la queue :
 - Majeures : enroulée sur elle-même ;
 - Mineures : recourbée, lovée, enroulée distalement ;
- Agglutination spermatique :
 - Majeures : tête à tête, tête à queue, queue à queue ;
 - Mineures : agglutination avec d'autres cellules.

La prédominance d'un défaut majeur a une signification plus importante qu'une dispersion d'anomalies. Quand le sperme possède plus d'une anomalie, il doit être classé dans la catégorie de l'anomalie la plus importante ou dans l'anomalie prédominante si les anomalies sont de même signification.

Photo 14: (coloration au vert FCF et rose Bengale) Quelques formes de spermatozoïdes retrouvés dans les éjaculats de chat normospermique (A) ou tératospermique (B) ; acrosome normal (C) ; acrosome lésé (D) ; acrosome enflée (E) ; absence d'acrosome (F) ; spermatozoïde normal (G) ; gouttelette cytoplasmique avec (H) ou sans (I et J) pièce intermédiaire ; gouttelette cytoplasmique proximale (I) ou distale (H et J) ; flagelle double (K) ; flagelle enroulé (L) ; macrocéphalie avec aplasie mitochondriale partielle (M) ; microcéphalie avec aplasie mitochondriale totale (N) ; flagelle en anneau (O) ; tête piriforme (P) [132]



Les anomalies observées peuvent également être classées selon leur origine. C'est ainsi qu'ont été définies des anomalies primaires, trouvant leur origine durant le développement des spermatozoïdes dans les tubes séminifères et des anomalies secondaires apparaissant lors du stockage des spermatozoïdes dans l'épididyme ou les voies urétrales hautes. On peut enfin citer des anomalies tertiaires survenant lors des managements de l'animal, lors des chocs osmotiques que l'on fait subir au sperme, ou provoquées par la toxicité des colorants. Ceci rappelle l'intérêt d'une technique de prélèvement soignée [119].

II.2.3.v Viabilité

La viabilité du sperme peut être évaluée par l'utilisation de la coloration éosine-nigrosine qui permet comme vu précédemment la différenciation entre les cellules mortes et les cellules vivantes [132,134].

II.2.3.vi Le plasma séminal [51]

Le principal obstacle à la réalisation des analyses du plasma séminal est le faible volume des éjaculats, c'est pourquoi très peu d'études sont disponibles. Les analyseurs automatiques ont cependant facilité la tâche depuis peu, mais restent peu adaptés au sperme de cette espèce, ce qui explique sans doute le manque d'information sur la teneur en fructose. Les résultats confirment que le volume de la semence dépend essentiellement de la production des glandes bulbo-urétrales et nous indiquent que le fluide prostatique est plus alcalin que le plasma séminal. Enfin ils suggèrent une origine épидидymaire de la sécrétion de phosphatase alcaline.

Les résultats de Johnstone *et al.* obtenus en 1988 [51] sont reportés dans le Tableau 8.

Le fluide prostatique et les sécrétions urétrales correspondent à un éjaculat obtenu après vasectomie. Le fluide prostatique seul est obtenu après vasectomie et excrèse des glandes bulbo-urétrales. Les résultats indiqués sont les moyennes des électro-éjaculats de 6 chats, accompagnées de l'écart-type (--).

Tableau 8 : Caractéristiques du fluide séminal, du fluide prostatique et des sécrétions bulbo-urétrales chez le chat d'après Johnstone *et al.* [51]

Paramètres	Plasma séminal	Fluide prostatique et sécrétions bulbo-urétrales	Fluide prostatique seul
Volume d'un éjaculat (ml)	0,125 (0,011)	0,165 (0,019)	0,04 (0,006)
pH	6,6 (0,1)	6,7 (0,1)	7,8 (0,6)
Densité	1,007 (0)	1,006 (0)	1,007 (0)
Osmolarité (mOsm/ml)	323 (3)	327 (2)	331 (3)
Albumine (g/dl)	0,155 (0,008)	0,115 (0,024)	0,115 (0,009)
Phosphatase acide (U/L)	23,6 (2,8)	3,7(1,1)	7,0 (1,8)
Alanine Transaminase (U/L)	18,0 (5,6)	41,2 (5,3)	37,5 (9,4)
Phosphatase alcaline (U/L)	160335 (15558)	445 (170)	281 (164)
Aspartate Transaminase (U/L)	16 (2)	13 (2)	22 (4)
Calcium (mg/dl)	<4	<4	<4
Chlore (mèq/L)	161 (1,4)	163 (3)	159 (0)
CO ₂ total (mèq/L)	11,4 (0,5)	12,3 (0,7)	12,4 (1,6)
Glucose (mg/dl)	1,0 (0,5)	0 (0)	1,5 (0,5)
Phosphore (mg/dl)	1,18 (0,17)	0,20 (0,4)	0,75 (0,015)
Potassium (mèq/L)	14,1 (0,5)	16,0 (0,6)	15,5 (0,5)
Protéines totales (g/dl)	0,31 (0,04)	0,17 (0,02)	0,19 (0,04)
Sodium (mèq/L)	166 (2)	168 (3)	151 (17)
Azote uréique (mg/dl)	16,2 (0,5)	14,0 (0,7)	15,5 (2,5)

II.2.3.vii Flore

Une flore bactériologique aérobie a parfois été retrouvée dans des éjaculats de chats asymptomatiques [49]. Il semblerait que ce phénomène soit lié à une contamination par la flore urétrale normale lors de l'éjaculation car les mêmes bactéries furent retrouvées dans des cultures de mucus prélevé au niveau du prépuce de chats [49,24].

II.2.4 Potentiel fécondant et fertilité

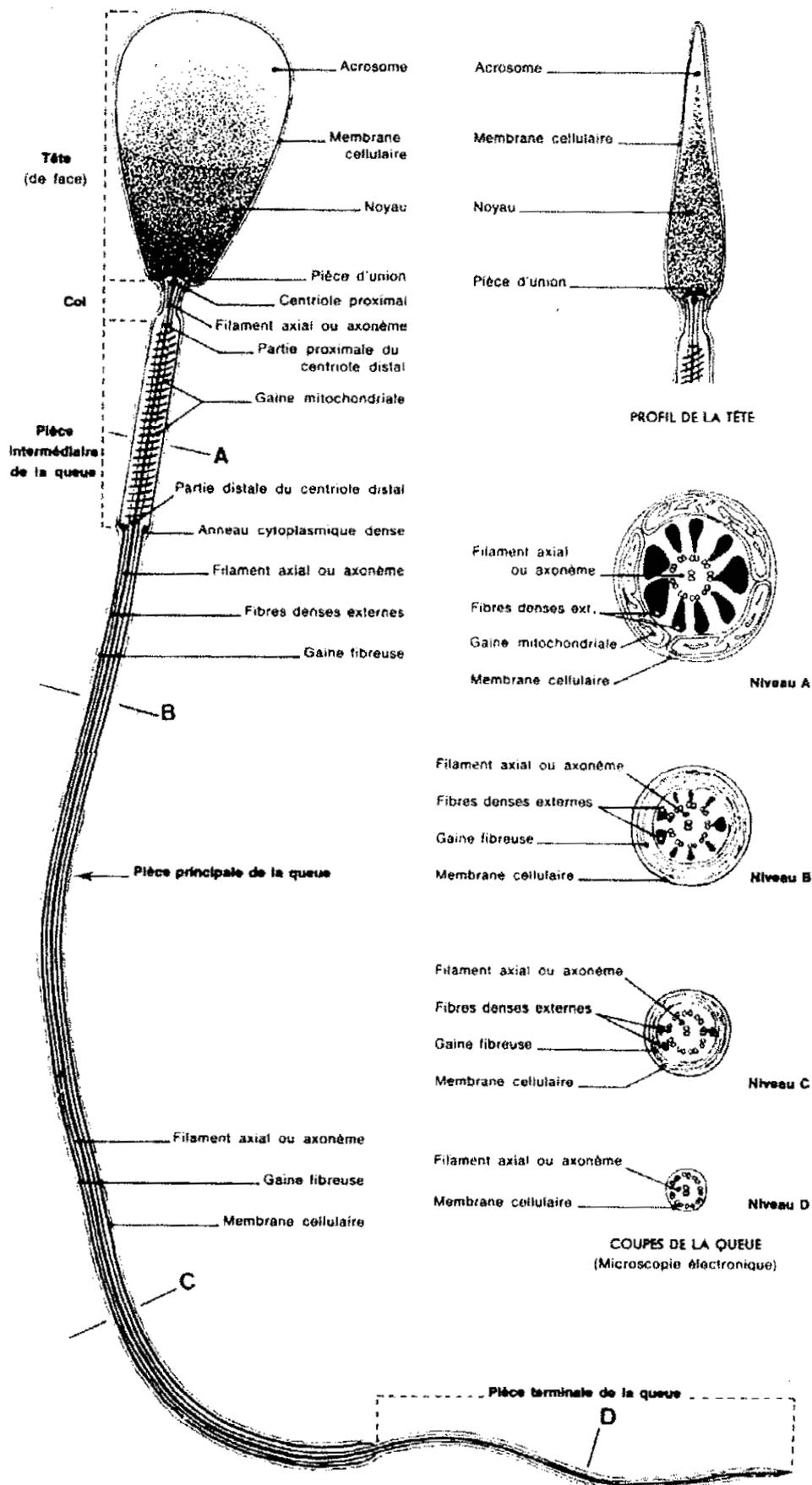
Les tests de routine vus plus haut sont peu corrélés à la fertilité : en effet, il existe de très fortes variations de qualité parmi les éjaculats d'un même individu ainsi qu'au sein d'un même éjaculat. Il est donc nécessaire de combiner un maximum de tests et de les répéter pour obtenir un résultat interprétable [93].

II.2.4.i Ultrastructure et intégrité membranaire

Description[60,83,110]

Les spermatozoïdes du chat ont une tête allongée, ovale, qui présente deux niveaux de symétrie : une symétrie axiale et une symétrie plane (latérale). La tête comprend un acrosome qui entoure presque complètement le noyau très condensé. La région du cou présente un petit rétrécissement et contient des mitochondries qui s'enroulent autour du complexe axonémal formant le flagelle. La structure axonémale se simplifie et permet le prolongement du flagelle qui comprend dans toute sa longueur, un complexe micro-tubulaire formé d'une partie centrale et de neuf paires périphériques surmontées de neuf fibres denses. Dans la pièce intermédiaire, on observe des mitochondries en disposition circulaire et en périphérie. Les fibres denses vont en s'amincissant à mesure que l'on s'éloigne de la tête. La pièce principale est dépourvue de mitochondries, mais contient une tunique fibreuse, composée de côtes semi-circulaires. La pièce terminale se caractérise par la disparition progressive de la tunique fibreuse. Le complexe micro-tubulaire n'est alors plus recouvert que par la membrane plasmique. La membrane de l'acrosome entoure environ les deux tiers de la tête et la matrice est dense et compacte. La figure 13 représente un spermatozoïde félin vu en microscopie électronique.

Figure 13: Structure d'un spermatozoïde de chat, d'après observation en microscopie électronique [110].



Intérêt de la coloration et/ou du marquage

Il semble que l'intégrité acrosomiale soit corrélée positivement à la fertilité. Nous développerons ce point plus loin, avec les autres anomalies rencontrées lors de tératospermie. L'ultra-structure de l'acrosome des spermatozoïdes félines est très difficile à visualiser même avec un microscope à contraste de phase à gros grossissement. Il est donc nécessaire de faire une coloration ou un marquage.

Coloration

- Triple coloration

La méthode « triple-coloration » fut la première décrite. Elle se heurte à deux inconvénients majeurs : elle nécessite plusieurs étapes chronophages (>2 heures) et un relativement grand volume de semence, alors que l'éjaculat de chat est le plus souvent de très faible volume [83].

Pour évaluer le statut de l'acrosome qui peut présenter des anomalies aussi bien morphologique que structurale, on dispose de plusieurs autres méthodes. Celles-ci requièrent généralement soit la microscopie électronique à transmission, soit la microscopie à fluorescence qui sont des outils de précision.

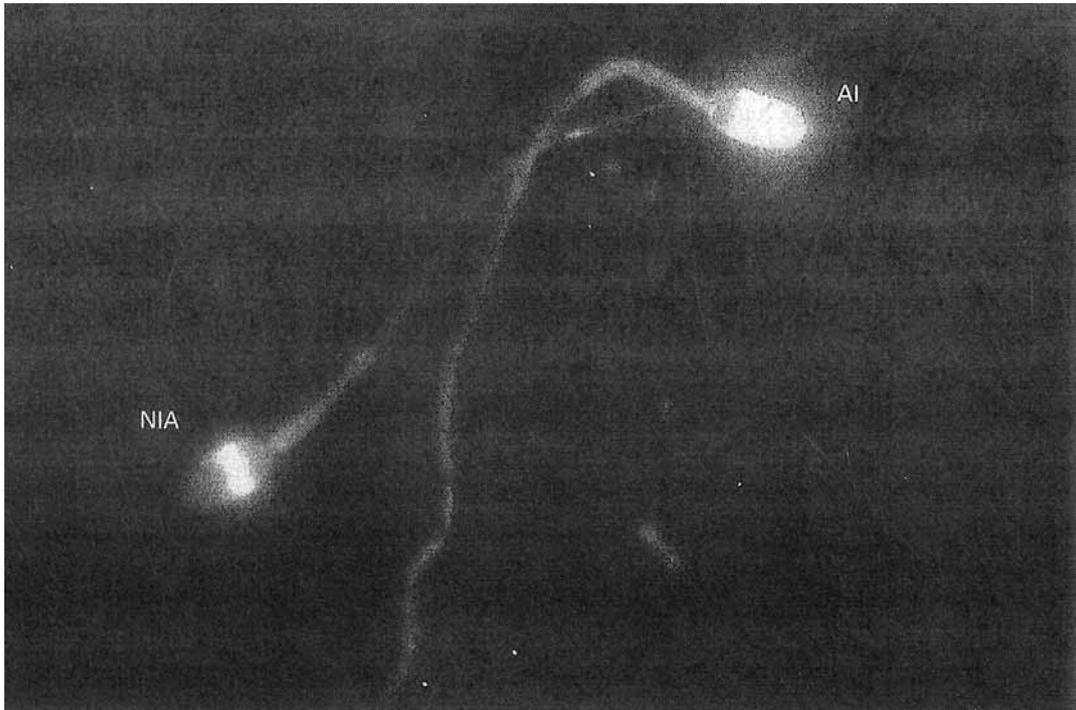
- Rose de Bengale et vert FCF

Pope *et al.* proposent une méthode de coloration qui associe 1% de rose de Bengale, 1% de coloration rapide au vert FCF, 40% d'éthanol dilué dans de l'acide citrique (0,1 M) et du phosphate de disodium (0,2M). 10 microlitres de la solution de coloration sont déposés sur la semence diluée (1 μ L de semence pour 9 μ L de citrate de sodium dihydraté) et laissés pendant 70 secondes à température ambiante. La lecture se fait au microscope optique. Les acrosomes anormaux apparaissent plus pâles : d'incolores à rose pâle. Les stades précoces de la réaction acrosomiale apparaissent donc rose pâles et les stades plus avancés présentent une ombre bleue dans la moitié antérieure. Le milieu ajouté à la coloration ne semble pas modifier les résultats obtenus. Cette méthode obtient des résultats très corrélés à ceux obtenus grâce à la triple coloration, et ce en une seule et unique étape qui ne nécessite que 2 à 3 minutes. On note cependant que cette technique ne permet pas de différencier les cellules mortes, des cellules vivantes comme le permet la technique à triple-coloration qui possède une étape au bleu de trypan. On peut supposer qu'ajouter cette étape à la technique sus-décrite permettrait de corriger ce défaut. Cette coloration est donc une bonne alternative si l'on ne possède pas les tests sophistiqués décrits ci-dessous [83].

- Isothiocyanate de fluorescéine associé à une agglutinine de cacahuète et fluorophores (Photo15)

Il semble que l'utilisation de isothiocyanate de fluorescéine associé à une agglutinine de cacahuète ou des fluorophores EthD-1 et SYBR-14 soient les meilleurs marqueurs. Ils permettent de distinguer si l'acrosome est intact ou non [6]. On peut également utiliser, comme c'est réalisé chez le chien, un test hypo-osmotique (Hypo-Osmotic Swelling Test) pour évaluer l'intégrité membranaire [55,83,91].

Photo 15: Spermatozoïde marqué avec l'isothiocyanate de fluorescéine conjugué à une agglutinine de cacahuète [AI : acrosome intact (forte fluorescence se dégageant de toute la région de la tête) ; NAI : acrosome non intact (fluorescence cantonnée au segment équatorial)] [88]



- Chlortétracycline

On rapporte également l'utilisation de la chlortétracycline, un antibiotique fluorescent. Avec cette méthode, on peut différencier les spermatozoïdes capités des non capités, même si leur acrosome est intact. Le test est fondé sur le transfert du complexe neutre de chlorotétracycline à travers la membrane plasmique. L'antibiotique entre dans la cellule si elle contient un niveau élevé de calcium libre, ionise le calcium en anion et se lie à lui en un composé fluorescent. Le complexe se lie préférentiellement aux régions hydrophobes de la membrane cellulaire, ce qui donne un aspect caractéristique de la membrane lorsqu'elle est visualisée en microscopie [65].

- Cytométrie de flux : décondensation de la chromatine et apoptose

Il existe des anomalies autres que les dommages acrosomiaux qui soient corrélées négativement à la fertilité. C'est pourquoi l'intégrité de la chromatine est également étudiée. En effet, comme nous verrons plus tard, chez les chats tératospermiques, la décondensation du noyau se fait mal au moment de la fécondation. L'analyse de la structure de la chromatine (protamines, histamines, ADN) peut donc se révéler enrichissante. Elle se fait par la méthode de cytométrie de flux. De la même façon, le phénomène d'apoptose se produit physiologiquement au sein du sperme vers la fin de sa maturation. Il apparaît que les chats tératospermiques ont un taux d'apoptose moins élevé, ce qui sera également développé plus loin. [93]

II.2.4.ii Capacité à se lier à la zone pellucide ou à la pénétrer

Des tests de liaison à l'ovocyte homologue et hétérologue, ainsi que des tests de pénétration de la zone pellucide ont été mis au point [37,69,105]. Ils évaluent le potentiel fécondant. En effet, ils sont des indicateurs de la capacitation.

- Adhésion à la zone pellucide d'ovocyte homologue :

C'est un test disponible pour les chromosomes ayant subi la réaction acrosomiale. Certains auteurs [37,65], comme nous le verront plus loin, ont rapporté que les spermatozoïdes réfrigérés ou congelés se lient en plus grand nombre que les cellules fraîchement prélevées. Ceci semble s'expliquer par la perte de l'intégrité acrosomiale, qui réduit le potentiel fécondant. Ce test ne peut donc pas être une référence pour l'évaluation de la qualité de la semence lorsqu'elle est réfrigérée ou congelée [37,65]. De plus, le test de capacité à se lier à la zone pellucide n'est pas un test bien corrélé à la viabilité car certains spermatozoïdes vivants ne se lient pas à la zone pellucide [93].

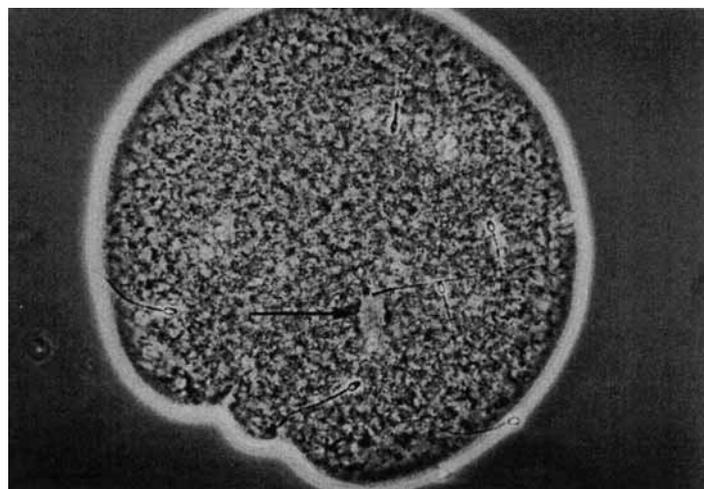
- Pénétration de la zone pellucide d'ovocyte homologue ou hétérologue (intra-spécifique) :

C'est un meilleur indicateur de la capacitation car les spermatozoïdes ne font plus que se lier à la zone pellucide, ils la pénètrent. Les ovocytes doivent être conservés dans une solution saline pour ne pas accomplir prématurément la réaction corticale, ce qui fausserait le résultat, permettant à un grand nombre de spermatozoïdes non capités de pénétrer. Ce test est également disponible pour analyser la semence des félins sauvages [65].

- Pénétration de la « zona-free » d'ovule de hamster (Photo 16) :

Les ovocytes sont traités avec une solution de hyaluronidase à 0,1% afin de dissoudre les cellules du cumulus et avec une solution de trypsine à 0,2% pour éliminer la zone pellucide. Sans ces traitements préalables, les spermatozoïdes hétérologues, même capités, seraient incapables de pénétrer l'ovule. Ce test peut se révéler très utile dans le cas d'évaluation de la semence de félins sauvages pour lesquels on ne dispose pas forcément d'ovocyte homologue [18,69].

Photo 16 : Pénétration de la « zona-free » d'ovule d'hamster par un spermatozoïde de chat domestique [tête enflée (flèche) et queue attachée dans le vitellus de l'ovule] [47]



- Fécondation d'ovocytes homologues :

C'est le test le plus fiable, car le plus proche de la situation *in vivo*.

II.2.4.iii Taux de fécondation

Le taux de fécondité après fécondation *in vitro* varie de 40 à 50% si la maturation des ovocytes se fait *in vitro* et de 60 à 80% si la maturation se fait *in vivo* (Pope, données communiquées personnellement à Farstad [29]).

La fécondation *in vitro* a réussi chez le chat tant pour la production d'embryons que pour leur développement [36]. Des embryons ont également pu être produits chez le tigre (*Panthera tigris*) et chez le chat du désert indien (*Felis silvestris*) [29,45].

Cependant, peu de données sont disponibles quant à l'application de ces méthodes de fécondation *in vitro* à l'appréciation de la qualité du sperme de chat. Le critère le plus fiable pour évaluer la valeur reproductive d'un futur étalon reste pourtant l'étude de sa descendance, comme c'est réalisé chez les bovins. Cependant cela nécessite de nombreuses inséminations sur de nombreuses générations de femelles et donc des coûts conséquents.

II.2.5 Caractéristiques de la semence, comparées selon le mode de prélèvement

Comme nous l'avons vu dans ce même chapitre, la semence collectée par vagin artificiel est celle correspondant le mieux à celle obtenue lors d'une saillie naturelle. Il semblerait que le flush épидидymaire donne des résultats similaires. Seule la proportion de gouttelettes cytoplasmiques, signe d'inactivité, serait plus importante [46]. Nous développerons ici, les caractéristiques de la semence obtenus par les autres moyens de récolte que nous avons vus : l'électro-éjaculation et le cathétérisme urétral.

II.2.5.i Caractéristiques de la semence récoltée par électro-éjaculation

Les volumes de sperme obtenus dans les différentes études s'échelonnent de 0,042mL à 0,74mL et le nombre de spermatozoïdes de 0,09 à 153.10^6 par éjaculat. Il existe donc une grande variabilité des résultats obtenus par électro-éjaculation. Les résultats des différentes études sont regroupés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Caractéristiques de la semence récoltée par électro-éjaculation selon plusieurs études

	Nombre de chats	Nombres d'éjaculations	Volume (µL)		Concentration (.10 ⁶)		Mobilité progressive (%)
			EE	VA	EE	VA	
Platz <i>et al.</i> [79]	6	45	224 ±50		29,7 ±9		70,4 ±2,6
	6	45		34 ±4,8		60,7 ±12,9	82,5 ±2,7
Platz et Seager[80]	17	303	233 (140-738)		28 (9-153)		60 (47-81)
Pineda et Dooley [76]	4	8	260 ±130 (110-490)		42,7 (11,1-65,9)		65 ±14 (44-85)
	4	8		60 ±20		60,97 ±31	58 ±27 (4-87)
Howard <i>et al.</i> [46]		18	124 ±10		167 ±43,6		84,40 ±5,9
Sojka <i>et al.</i> [102]	6	24		40 (10-120)		57 (3-143)	78 (35-100)
Zambelli <i>et al.</i> [132]	13		127,5 ±132,3 (30-400)		319,7 ±159,2 (76-633)		

Les caractéristiques du sperme obtenu par cette méthode sont relativement semblables à celles de la semence obtenue par la technique du vagin artificiel : viabilité, mobilité et osmolarité restent inchangées [26,132]. Des gestations ont été obtenues avec du sperme prélevé par cette méthode, ce qui vient corroborer nos informations sur sa qualité. Un seul éjaculat permettrait d'inséminer plus d'une femelle [80]. Cependant il semble que le pH de la semence recueillie par électro-éjaculation soit plus alcalin que celui obtenu par vagin artificiel. Le pH moyen physiologique étant de 7,4, on incrimine la plus grande contribution des glandes sexuelles accessoires stimulées par les influx électriques. On obtient donc un éjaculat d'un plus grand volume et moins concentré [132,26]. Des pourcentages plus élevés de formes anormales sont rapportées parfois [80], mais des études ont prouvé ultérieurement qu'il n'y avait pas de lien entre la proportion d'anomalies morphologiques et la méthode de récolte [89,107]. De plus, Les anomalies sont présentes dans les mêmes proportions dans l'épididyme caudal avant et après électro-éjaculation [5].

II.2.5.ii Caractéristiques de la semence récoltée par cathétérisme de l'urètre après injection de médétomidine

Le sperme obtenu est de plus petit volume (10,5 ±5,3 µL), plus concentré (1868,4 ±999,8.10⁶/mL) et de pH plus acide (7,0 ±0,4). Le plasma séminal est présent en moins grande quantité que lors d'électro-éjaculation, ce qui peut expliquer cette différence de pH [134].

Les résultats de l'étude [134], comparant le sperme collecté par cathétérisme urétrale et électro-éjaculation après injection de médétomidine, sont reportés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Comparaison des caractéristiques du sperme obtenu par électro-éjaculation (EE) et par vagin artificiel (VA) d'après Zambelli *et al.* [134]

Sperme	Volume (μL)	pH	Mobilité totale	Mobilité progressive (1 à 5)	Viabilité (%)	acrosomes normaux (%)	Concentration (.10 ⁶ /mL)	Nbre de spz total (.10 ⁶)
CU	10,5 ±5,3	7,0 ±0,4	78,1 ±9,6	4,7 ±0,5	80,0 ±10,1	93,6 ±3,4	1868,4 ±999,8	21,0 ±18,1
EE	67,1 ±25,9	7,9 ±0,4	78,1 ±10,3	4,5 ±0,5	81,4 ±9,6	92,4 ±3,3	542,9 ±577,9	33,6 ±34,5

II.2.6 Qualité de la semence et fréquence de prélèvement [4,5]

Axnèr *et al.* ont montré que la mobilité et le pourcentage de spermatozoïdes normaux sont plus élevés dans un second éjaculat récolté par électro-éjaculation, 5 à 10 minutes après le premier (respectivement 70,7 % ± 12,7 vs 55,7% ± 20,8 et 54,6% ± 1,2 vs 40,9% ± 24,5) [4]. Les anomalies observées dans le premier éjaculat étaient surtout des gouttelettes distales et des queues enroulées. Ces anomalies peuvent être du au vieillissement des spermatozoïdes dans l'épididyme. L'intervalle de 5 à 10 minutes semble adapté puisque les saillies sont naturellement répétées à ce rythme chez le chat dans les conditions naturelles. On peut donc conseiller de récolter un deuxième éjaculat systématiquement et ce quelque soit la méthode de prélèvement [5]. On note cependant que la concentration en spermatozoïdes est moindre dans ce deuxième éjaculat [4].

Toutes les informations pratiques nécessaires à la réalisation d'un spermogramme de routine et les résultats que l'on peut en attendre sont résumés dans l'annexe 4 (Annexe 4 : Spermogramme et caractéristiques de la semence féline selon le mode de prélèvement).

L'analyse de la semence se décompose donc en deux temps :

Le premier temps est représenté par l'analyse macroscopique : aspect, volume, pH, osmolarité. Vient ensuite le spermogramme en lui-même : mobilité, concentration, identification des formes anormales, viabilité, analyse du plasma séminal... Toutes ces analyses de routine sont plus ou moins faciles à réaliser, mais elles ne sont que des indicateurs puisque nous avons vu que le potentiel reproducteur ne pouvait être réellement évalué que par le taux de fécondation. Le taux de liaison et de pénétration de la zone pellucide en sont de précieux indicateurs. Il est nécessaire d'avoir l'estimation la plus précise de la qualité de la semence afin de pouvoir proposer à la congélation un sperme qui pourra subir ce traitement tout en conservant son potentiel fécondant.

Dans l'espèce féline, le sperme de chat est concentré, de très faible volume et contient de fortes proportions de formes anormales de façon très fréquente (nous développerons plus loin cet aspect pathologique propre à la semence du chat domestique et des félins sauvages). Nous avons également vu que ces caractéristiques variaient en fonction du mode de prélèvement utilisé.

III. Facteurs influençant la qualité et la quantité de la semence

Nous abordons un domaine encore peu exploré. Peu d'études sont consacrées chez le chat à l'endocrinologie de la reproduction notamment. En effet, les dosages hormonaux sont, chez le chat, de mise en œuvre tardive de plus, les études cytogénétiques sont encore très rares. C'est pourquoi ce chapitre traite plus de la libido et du comportement du chat que de la qualité de la semence elle-même.

III.1 Affections d'origine génétique ou congénitale

III.1.1 Anomalies chromosomiques

L'altération du nombre des chromosomes sexuels est responsable d'anomalies de la fonction de reproduction. Chez le chat mâle, les conséquences de ces anomalies gonosomiques sont connues grâce aux mâles de robes « écailles de tortue » ou tricolore.

En effet, le gène donnant sa couleur orangé à la robe (*locus* « o ») est porté par le chromosome sexuel X. Ce gène est épistatique pour le gène de la couleur noire (« + ») et du caractère moucheté. Son allèle est exprimé chez les sujets porteurs de 2 chromosomes X, donc chez les chattes normales. Or, on a trouvé des chats mâles « écailles de tortue » ou tricolore. Leur fréquence semble être de 1 pour 3000 chats. Il y a donc une anomalie chromosomique chez ces mâles. On peut même parler de syndrome de Klinefelter car la plupart du temps le caryotype montre 39 chromosomes dont 2« X » et 1« Y ». Chez beaucoup de ces chats, on observe une hypoplasie testiculaire. Les testicules sont de taille réduite et la migration vers le scrotum est retardée ou incomplète. On observe parfois une monorchidie (absence de développement d'un testicule), voire une cryptorchidie et une spermatogénèse incomplète, même dans des testicules de volume normal et en position scrotale. Chez ces animaux, toute la lignée germinale dégénère. Cependant les cellules de Sertoli semblent fonctionnelles. Le comportement sexuel de ces animaux est d'ailleurs souvent normal. L'analyse du caryotype révèle bien des caryotypes 39XXY (29%), mais il existe d'autres configurations. Les différents types de caryotypes et la fertilité associée sont répertoriés dans le Tableau 11 [49].

Tableau 11 : Caryotype et fertilité des chats male tricolores ou écailles de tortue d'après Johnstone *et al.* [49].

Caryotype	Nombre de chats	Nombres de chats fertiles	Nombre de chats stériles	Nombre de chats de fertilité inconnue
39,XXY	11	0	11	0
38,XX/38,XY	7	3	3	1
38,XY/38,XY	6	5	1	0
38,XY/39,XXY	6	1	4	1
38,XX/57,XXY	4	0	4	0
38,XY/57,XXY	2	1	0	1
38,XY/39,XXY/40,XXYY	1	0	1	0
38,XX/38,XY/39,XXY/40XXYY	1	0	1	0
	38	10	25	3

L'existence de chimères explique la fertilité de certains animaux (26%).

III.1.2 Intersexualité

L'intersexualité, c'est l'état d'un animal dont le sexe n'est pas parfaitement différencié. On distingue chez le chat deux cas d'intersexualité : l'hermaphrodite vrai qui possède les gonades et les organes génitaux des deux sexes, et le pseudo-hermaphrodite qui possède les gonades d'un seul sexe et les organes génitaux évoquant l'autre sexe.

III.1.2.i Hermaphrodisme vrai

Vuillermoz [119] rapporte qu'un cas a été décrit par Felts *et al.* sur un chat américain à poils courts de 4 ans présentant une incontinence urinaire et une hématurie. Cet animal possédait un utérus bicorné expliquant l'incontinence et des ovotestis bilatéraux.

III.1.2.ii Pseudohermaphrodisme

Quelques cas de pseudohermaphrodisme ont été décrits. Il s'agit de chats présentant des testicules, le plus souvent abdominaux, et un tractus génital femelle, plus ou moins développé, dont la présence anormale a pour conséquence une incontinence urinaire. Leur vulve est infantile souvent plus ventrale qu'à la normale. Jamais on ne note la présence chez ces chats de clitoris péniforme, pourtant fréquent chez les chiens pseudo-hermaphrodites. Malheureusement, on ne dispose pas encore d'étude cytogénétique, ni d'étude hormonale sur ces animaux [119].

III.1.3 Autres malformations

III.1.3.i Ectopie testiculaire [89, 119]

Normalement les testicules sont descendus dans le scrotum avant la naissance. Cependant, ils peuvent chez certains chats rester mobiles dans le trajet inguinal et être difficilement perçus avant la puberté. Il est donc plus judicieux d'attendre 7 à 8 mois avant de faire un diagnostic d'ectopie testiculaire.

La fréquence de cette anomalie chez le chat est très faible (moins de 4 pour 1000). On ne sait si elle est héréditaire.

Le plus souvent, elle est unilatérale et abdominale. Le testicule gauche est plus fréquemment touché que le droit.

Les symptômes associés à cette ectopie sont souvent inexistantes. Si les chats ectopiques unilatéraux semblent capables de se reproduire, les cryptorchides doubles sont stériles et leur libido est peu marquée. Ils ont même parfois un phénotype asexué, voire féminisé. Cependant, on note parfois une concentration et une mobilité moindre chez les animaux ectopiques unilatéraux.

L'évolution vers la tumorigénèse de la gonade interne ne semble pas être de rigueur. Le seul traitement est chirurgical.

Les ectopiques unilatéraux, qui sont fréquemment fertiles comme nous l'avons vu, sont écartés de la reproduction en raison du potentiel caractère transmissible de cette affection.

III.1.3.ii Hypoplasie testiculaire

L'hypoplasie testiculaire congénitale peut être la conséquence de l'infection par le virus de la panleucopénie du fœtus et du nouveau-né. Les testicules sont alors atrophiés et la spermatogénèse inexistante. Lorsque l'hypoplasie testiculaire est associée à une dilatation scrotale, elle peut être due à une infection par le virus de la péritonite infectieuse féline.

III.2 Affection d'origine hormonale

III.2.1 dysendocrinies

De très nombreuses dysendocrinies peuvent être responsables de stérilité ou d'hypofertilité dans l'espèce féline. Ces interférences peuvent être d'origine :

- Endogène : hypercorticisme, hypothyroïdie (peu fréquente)
- Exogène : progestagènes de synthèse fréquemment utilisés en thérapeutique chez le chat, anabolisants à activité androgène, corticoïdes ou antifongiques.

III.2.2 Hypogonadisme [119,43]

L'étiologie de l'hypogonadisme est encore très mal connue dans l'espèce féline. Il est certain qu'il faut envisager les causes reconnues dans les autres espèces comme les subcarences alimentaires en vitamines liposolubles et en acides gras polyinsaturés, d'autant plus que le chat y est très sensible. Les dysendocrinies (cortico-surrénalienne et thyroïdiennes) ont aussi des répercussions importantes sur l'équilibre gonadique, de même que les atteintes graves de l'état général (troubles hépatiques, rénaux ou diabète). Ces hypothèses sont donc à vérifier avant d'essayer de traiter l'hypogonadisme.

Comme chez le chien, l'hypogonadisme ne peut être affirmé que par une épreuve de stimulation (prise de sang avant et 24 heures après injection par voie intramusculaire de 300 à 500 UI d'hCG), la concentration post-stimulation doit être supérieure à 45nmol/L.

Herron [43] recommande des injections de testostérone (0,25 à 0,5 mg/Kg), notamment pour les reproducteurs âgés, tout en reconnaissant qu'aucun déficit sécrétoire en hormone mâle n'ait été mis en évidence. Cet auteur mentionne par ailleurs qu'une utilisation prolongée de la testostérone inhibe la spermatogénèse. On préconisera donc l'injection de testostérone que chez les individus âgés et sur une courte période de traitement. Dans tous les autres cas, on évitera d'utiliser ces injections.

Les données concernant l'endocrinologie gonadique du chat sont encore peu nombreuses, mais avec le développement de l'élevage félin et l'intérêt croissant des propriétaires, comme des vétérinaires pour les chats, on peut espérer accroître rapidement dans les prochaines années la connaissance de la pathologie de la reproduction féline.

III.3 Affection d'origine néoplasique

Les tumeurs génitales ne sont pas des causes importantes d'infertilité dans l'espèce féline. Elles sont rares, et ne surviennent que chez les animaux de plus de 8 ans. Les affections de la prostate, néoplasiques ou non, sont exceptionnelles. Des tumeurs testiculaires ont été rapportées, notamment des tumeurs des cellules de Sertoli, chez des chats âgés. Ces

tumeurs uni- ou bilatérales semblent toucher indifféremment des testicules eutopiques ou ectopiques. Les seuls symptômes observés sont des symptômes locaux et ceux associés à une gêne mécanique. On ne dénote jamais de signe de féminisation. Il existe des possibilités de métastases [119].

III.4. Autres causes d'infertilité

III.4.1 Facteurs environnementaux

III.4.1.i Eclairage

De la photopériode dépend l'activité sexuelle et la libido. Comme chez la femelle, le mâle est très sensible à la photopériode, dont dépend son activité sexuelle et sa libido. Il faut donc essayer d'augmenter l'éclairage artificiel des chats dont la fertilité reste discutable [119].

III.4.1.ii Stress

Tout stress peut affecter la libido. Notons que le transport est un facteur de stress important et qu'il peut affecter de façon considérable la libido. Ceci peut poser problème lors saillie organisée à distance.

III.4.1.iii Alimentation [119]

La malnutrition est également un facteur de stress, mais plus insidieuses sont les carences d'une alimentation incorrecte.

Seules les carences graves ou les déséquilibres majeurs durables produisent des effets nets. Parce que la fonction de reproduction est prioritaire, elle est l'une des premières à être affectée par les déficits nutritionnels.

D'un point de vue qualitatif, les aliments indispensables sont les acides gras essentiels, les vitamines liposolubles, la vitamine B12 (elle intervient dans le catabolisme des stéroïdes), l'acide pantolénique (c'est un cofacteur de la synthèse des stéroïdes), l'iode (qui intervient dans le métabolisme thyroïdien) et le phosphore (c'est un élément clé des transports d'énergie à l'échelle cellulaire).

De plus, le chat est sujet à des troubles du métabolisme de la vitamine A. L'hypervitaminose A provoque une dégénérescence testiculaire qui s'accompagne d'un arrêt de la spermatogénèse. Elle correspond en général à un surdosage de foie d'animaux de boucherie dans le régime alimentaire. D'autre part, le chat, du fait de son impossibilité à métaboliser le β carotène, est très sujet à ces hypovitaminoses A dont les conséquences sur la fonction de reproduction restent à démontrer. On note cependant que cette affection se traduit par l'apparition de lésions ankylosantes de la colonne vertébrale. La raideur qui en résulte peut rendre le coït impossible et/ou douloureux.

Tout comme la malnutrition, l'excès alimentaire est un facteur d'infertilité par perturbation des métabolites hormonaux, notamment celui des acides gras précurseurs d'hormones stéroïdes. L'obésité affaiblit également la spermatogénèse. Elle peut rendre le coït difficile.

Nous verrons plus loin que certaines carences majorent la tératospermie.

III.4.2 Sperme de mauvaise qualité

Les autres causes de mauvaise qualité de semence chez le chat mâle sont peu étudiées. Il s'agit de l'oligospermie et de l'azoospermie. Nous avons choisi de consacrer un chapitre à la tératospermie du fait de l'importance de ce phénomène dans cette espèce. Nous ne traiterons ici que des autres causes de mauvaise qualité de la semence.

III.4.2.i Surexploitation

Comme nous l'avons vu précédemment, et ce quelque soit la méthode de prélèvement utilisée, les mâles ne doivent pas être prélevés plus souvent que tous les 2 ou 3 jours [108]. Une récolte hebdomadaire est le plus souvent rapportée [50,78,80,26]. En effet, lors d'une récolte biquotidienne (2 prélèvements à 10 minutes d'intervalle), la concentration en spermatozoïdes diminue au 6^{ème} jour et la fréquence des anomalies augmente à partir du 4^{ème} jour (+15% au 6^{ème} jour). Il ne semble pas nécessaire d'effectuer deux récoltes successives pour « vider » le ductus deferens des spermatozoïdes morts ou anormaux dont on a longtemps pensé qu'ils s'y accumulaient. En effet, les volumes, concentration, pourcentage de mobilité et pourcentage d'anomalies morphologiques ne varient pas d'un prélèvement à l'autre [108].

III.4.2.ii Hyperthermie testiculaire

Une inflammation du scrotum entraîne une infertilité, généralement temporaire (30 à 60 jours selon [43]). Si elle n'est pas soignée, elle peut aboutir à une stérilité définitive. L'inflammation du scrotum, voire des testicules, s'observe relativement fréquemment chez le chat. Elle est la conséquence des plaies, blessures et griffures à ce niveau ou d'une contamination rétrograde. Une dermatose prurigineuse peut aussi provoquer des irritations et une augmentation de la température testiculaire. L'orchi-épididymite peut également être consécutive à une hernie inguinale ou périnéale. On mentionne les *brucellas* (espèce non précisée) et le virus de la péritonite infectieuse féline comme cause d'orchite peu fréquente [119].

III.4.2.iii Âge [101,102]

Le chat mâle est fertile dès 10 mois en moyenne. Mais, bien souvent, la qualité du sperme est alors médiocre : de nombreuses gouttelettes cytoplasmiques dans les spermatozoïdes et de nombreuses formes anormales des spermatozoïdes sont observées. La concentration peut être faible. Passé l'âge d'un an, ces anomalies disparaissent généralement. Chez les vieux chats, on observe également fréquemment une baisse de la concentration en spermatozoïdes. Sojka [101] considère que la semence n'est de très bonne qualité qu'après 12 mois et jusqu'à au moins 6 ans.

III.5 Tératozoospermie

III.5.1 Définition [46,120,123]

Un animal tératozoospermique produit un éjaculat contenant moins de 40% de spermatozoïdes normaux. Au contraire, le sperme d'un mâle normospermique contient plus de 60 % de spermatozoïdes normaux.

III.5.2 Etiologie [46,120, 123]

La fréquence des chats tératospermiques est très élevée, puisqu'on trouve plus de 29% de mâles touchés dans la population de laboratoire [120]. Cependant, il semblerait que l'espèce féline soit touchée dans son ensemble [46].

L'étiologie de cette affection est encore inconnue dans cette espèce. Des études ont été menées chez certains grands félins sauvages comme le guépard [120] et dans une population isolée de lions [123]. On a pu établir un lien avec la consanguinité et la diminution du panel génétique qui en résulte. Une concentration diminuée en testostérone circulante a également été corrélée à l'incidence de la tératospermie.

Chez le chat domestique, l'élevage intensif et la perte présumée de diversité génétique liée à la consanguinité augmente la tératospermie et la concentration de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Les études ont été menées sur une génération et n'ont pas révélé de différence histomorphométriques entre les parents et les enfants. On note cependant une taille augmentée des testicules chez les mâles tératospermiques (30% plus large) et un volume des tubes séminifères plus grand de 40% environ ($p < 0,05$) [70].

Un lien direct entre une carence en sélénium et des anomalies du flagelle a pu être mis en évidence par Olson *et al.* chez le rat [73]. Ceci met en lumière l'importance d'une nutrition optimum nécessaire à la spermatogénèse et la maturation épидидymaire.

Les gènes exprimés par le testicule sont en voie d'expérimentation. Pukazhenti *et al.* [84] nous donnent déjà quelques indications : 71 gènes sont surexprimés (2 gènes de réparation de l'ADN et de recombinaison) et 97 sont sous-exprimés par rapport aux chats normospermiques (6 gènes de réparation de l'ADN et de recombinaison, 5 gènes de transcriptions, 5 gènes d'apoptose et 4 gène du cycle cellulaire). D'autres études plus précises concernant ces gènes « candidats » sont nécessaires, afin de mettre en lumière leur rôle dans le caractère tératospermique de la semence.

III.5.3 Caractéristiques de la semence de chats tératozoospermiques et anomalies morphologiques les plus fréquentes

En 1990, Howard *et al.* [46] a comparé deux populations de chats, l'une tératospermique et l'autre normospermique. Les caractéristiques des éjaculats sont répertoriées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Caractéristiques séminales, volume testiculaire, et incidence des spermatozoïdes de morphologie normale et anormale chez les chats normospermiques et tératospermiques (moyenne \pm écart type, $p < 0,05$) [46]

	Ejaculats normospermiques (n=18)	Ejaculats tératospermiques (n=18)
Volume (μL)	124,1 \pm 9,5	97,4 \pm 9,5
Concentration en spermatozoïdes ($\cdot 10^6/\text{ml}$)	167,6 \pm 43,6	361,3 \pm 43,6
Mobilité (%)	84,4 \pm 5,9	73,3 \pm 5,9
Mobilité progressive	4,2 \pm 0,3	3,7 \pm 0,3
Index de mobilité	84,4 \pm 5,2	73,6 \pm 5,2
Spermatozoïdes mobiles/éjaculat ($\cdot 10^6$)	17,0 \pm 3,8	24,6 \pm 3,8
Volume testiculaire (cm^3)	4,3 \pm 0,6	3,8 \pm 0,6
Spermatozoïdes normaux (%)	71,6 \pm 6,4	33,8 \pm 6,4
Spermatozoïdes anormaux (%)		
Macrocéphale	0,1 \pm 0,03	0,2 \pm 0,03
Microcéphale	0,1 \pm 0,03	0,2 \pm 0,03
Bicéphale	0,2 \pm 0,2	2,1 \pm 0,2
Tricéphale	0,0	0,8 \pm 0,5
Aplasia mitochondriale	0,0	0,4 \pm 0,1
Flagelle enroulé	2,1 \pm 1,6	5,3 \pm 1,6
Pièce intermédiaire liée avec gouttelettes	9,3 \pm 3,5	24,1 \pm 3,5
Pièce intermédiaire liée sans gouttelette	1,0 \pm 1,3	2,3 \pm 1,3
Flagelle lié avec gouttelettes	0,9 \pm 6,2	5,4 \pm 6,2
Flagelle lié sans gouttelettes	5,8 \pm 7,0	8,2 \pm 7,0
Gouttelettes cytoplasmiques proximales	2,2 \pm 1,5	5,1 \pm 1,5
Gouttelettes cytoplasmiques distales	6,7 \pm 2,0	12,1 \pm 2,0

Le volume de l'éjaculat, la mobilité, la mobilité progressive, l'index de mobilité et le volume testiculaire sont comparables dans les deux populations étudiées. La concentration est plus élevée dans la semence des chats tératospermiques, mais il n'y a pas de différence significative entre les deux populations en ce qui concerne le nombre de spermatozoïdes mobiles par éjaculat ($p < 0,05$) [46]. Il apparaît cependant dans d'autres études que le nombre de spermatozoïdes soit supérieur [47,120].

Les chats tératospermiques produisent plus de spermatozoïdes car leur tissu de synthèse est plus développé. De plus, les cellules germinales sont plus nombreuses par cellule de Sertoli et la réduction du nombre de cellules (apoptose) lors de la spermatogénèse est moins intense. Des études récentes montrent que la dégénérescence cellulaire physiologique est maximale pendant la phase de méiose [13]. En outre, un index mitotique de 2,8 suggère que le taux d'apoptose normal après les deux premières méioses est d'environ 30% [31]. Les chats tératospermiques ne perdent que 15% des cellules germinales à ce stade. On sait également que ces chats produisent 30% de spermatides en plus par pachytène [31]. On a

donc un dysfonctionnement au niveau de l'apoptose et de la phagocytose, associé à une plus grande production cellulaire (index méiotique augmenté [70]). Ceci contribue à augmenter la concentration cellulaire du sperme des chats tératospermiques. Le cycle de production des spermatozoïdes a été étudié récemment [31] et a permis de mettre en évidence 8 étapes de 10,4 jours en moyenne chacune, ce qui correspond à une spermatogénèse de 46,8 jours (soit 4,5 cycles). On note l'absence de certaines générations de cellules sur des champs (un relativement grand nombre) sans pouvoir l'expliquer. Le nombre total de cellules germinales pour une cellule de Sertoli est de 9,8 au stade I. Nous sommes donc confrontés au plus faible rendement des cellules de Sertoli parmi les espèces de mammifères étudiées de nos jours [31,70]. Grâce au grand volume que représentent les tubes séminifères (70 à 90% du testicule) et parce que le cycle est de courte durée, l'efficacité de la spermatogénèse chez le chat n'est considérée que comme légèrement inférieure comparée à celles des autres espèces domestiques [31].

On suppose une adaptation du testicule à la tératospermie par un meilleur rendement. Le gain en termes de quantité se fait donc au détriment de la qualité, suggérant un dysfonctionnement majeur de la fonction testiculaire chez les animaux tératospermiques. De même, il a été démontré que des anomalies étaient présentes dans l'expression des gènes testiculaires chez ces chats [89,46]. Ces individus compensent la pauvre qualité de leur semence par une quantité abondante. On retrouve cette politique quantitative avec la copulation multiple, fréquente chez le chat et chez certains félins sauvages comme le lion.

La morphologie des spermatozoïdes est le caractère qui diffère le plus entre les deux populations de l'étude d'Howard *et al.* ($p < 0,01$) [46]. Les chats tératospermiques produisent une plus grande proportion de spermatozoïdes anormaux, et ce quelque soit le type d'anomalie morphologique étudié. L'anomalie la plus fréquemment rencontrée chez les chats normospermiques est la liaison de la pièce intermédiaire associée à des gouttelettes cytoplasmiques distales. Chez les chats tératospermiques, on retrouve également très souvent cette anomalie, associée à des gouttelettes cytoplasmiques (distales ou proximales) et un flagelle lié avec ou sans gouttelette. Cependant, l'anomalie la plus fréquente dans cette population est l'enroulement du flagelle.

Dans cette même population, les anomalies de la tête affectent 3,3% des spermatozoïdes, contre seulement 0,4% chez les chats normospermiques [46]. Dans l'espèce humaine, on attribue les anomalies de tête à une méiose anormale [135]. Aucune étude de ce type n'a été menée chez le chat jusqu'à aujourd'hui.

On remarque également la forte proportion de spermatozoïdes avec un acrosome défectueux. La microscopie électronique à transmission révèle plusieurs anomalies de cette structure, comme des grandes vacuoles, la protrusion de la matrice acrosomiale et un acrosome replié sur lui-même [46].

Des résultats similaires ont été publiés par Howard *et al.* en 1993 [48].

Il semble que les anomalies morphologiques observées chez le chat soient liées à un trouble conjoint de la spermatogénèse et du transport épидидymaire. Ces anomalies ont été retrouvées dans du sperme collecté par flush épидидymaire [58]. Il ne s'agit pas simplement de cellules âgées, accumulées depuis longtemps dans l'épididyme puisque des récoltes multiples ont montré les mêmes résultats de façon constante. En outre, les anomalies sont

présentes dans les mêmes proportions dans l'épididyme caudal avant et après électro-éjaculation [5]. Ni la fréquence du prélèvement et ni la méthode de collection ne semblent donc modifier l'incidence de ces malformations d'après Tanaka *et al.* [107,108]. Or, Axnèr *et al.* ont montré que le deuxième éjaculat, récolté 5 à 10 minutes après le premier, montrait un sperme plus pauvre en gouttelettes distales et plus riche en flagelles enroulés ; cette étude appuie donc la thèse des anomalies présentes par vieillissement des cellules dans l'épididyme [3,5,4]. En effet, les gouttelettes distales disparaissent la plupart du temps pendant ou après l'éjaculation. Elles ne semblent toutefois pas altérer la fertilité [5]. De plus, les anomalies de flagelles peuvent s'expliquer par les variations de pH et l'action osmotique stressante du plasma séminal qui vient se surajouter. Aux vues de ces observations concernant les anomalies du flagelle, nous prendrons donc spécialement garde au pouvoir osmotique et au pH des diluants utilisés [5]. Malheureusement, les conditions expérimentales observées par Tanaka *et al.* [107] et Axnèr *et al.* [4] ne sont pas comparables, on peut donc difficilement conclure sur l'origine effective de ces malformations. On peut toutefois certifier que la proportion des anomalies de tête et d'acrosome n'est pas influençable par la fréquence de récolte car elles se forment lors de la spermatogénèse et de la spermiogénèse [3].

En effet, la plupart des modifications fonctionnelles impliquent l'altération ou la modification des protéines épидидymaires à la surface du spermatozoïde pendant son transport. En outre, l'acquisition de la capacité à lier la zone pellucide se fait également dans l'épididyme [48]. Un taux de testostérone faible, comme nous le verrons plus loin, peut influencer ou directement altérer la fonction testiculaire et épидидymaire.

Howard *et al.* [48] ont étudié le pouvoir fécondant des spermatozoïdes tératospermiques . Ils ont montré que le taux de division embryonnaire, ainsi que le taux de pénétration de la zone pellucide étaient meilleurs chez les chats normospermiques (86,3% et 73,7%) comparés aux chats tératospermiques (50,3% et 24,1%). Cependant le développement embryonnaire de la morula au blastocyte et la proportion de spermatozoïdes normaux liés à la zone pellucide ne diffèrent pas entre les deux populations. De plus, il semble que les spermatozoïdes anormaux soient capables de se lier à la zone pellucide (29%). Cependant, seulement 3% des spermatozoïdes l'ayant pénétrée présentent une anomalie et tous étaient normaux dans l'espace périvitellin. Il semblerait également que les spermatozoïdes normaux des chats tératospermiques pénètrent moins facilement la zone pellucide que leurs homologues structuraux prélevés chez des chats normospermiques : des anomalies de l'ultra-structure rentrent donc certainement en compte dans le dysfonctionnement de ces cellules. Ces résultats indiquent que la liaison à la zone pellucide est un bon test pour écarter les spermatozoïdes morphologiquement anormaux, mais que ceux-ci peuvent conserver leur pouvoir fécondant et leur capacité à produire un embryon se développant normalement. Les anomalies structurales plus fines ne sont cependant pas détectées par cette méthode.

III.5.4 Capacitation et réaction acrosomiale in vitro

L'internalisation d'ions calcium extracellulaires est un pré-requis indispensable à la réaction acrosomiale comme vu précédemment (page 32). L'ionophore calcique A23187 facilite les transports membranaires de calcium et permet ainsi artificiellement la capacitation [88]. En effet, la réponse à la stimulation par l'ionophore calcique est corrélée au taux de pénétration des spermatozoïdes humains dans la zone libre des ovocytes d'hamster [117]. Chez l'homme

infertile, les spermatozoïdes répondent moins bien à la stimulation par l'ionophore calcique [53] ou la progestérone [72] : la capacitation se fait donc moins bien que chez l'homme fertile. Ceci suggère un lien direct entre anomalie de l'acrosome et baisse de la fertilité. De plus, on sait que les spermatozoïdes de chats tératospermiques se lient et pénètrent moins bien la zone pellucide d'ovocytes *in vitro* [48]. L'hypothèse que les spermatozoïdes avec une anomalie de l'acrosome ne peuvent pas être capités et subir la réaction acrosomiale a été expérimentée chez le chat par Long et al. en 1996 [61]. On a exposé les spermatozoïdes à l'ionophore calcique A23187 et à des extraits solubilisés de zone pellucide de chat. La cinétique de la capacitation a été suivie par l'emploi d'une agglutinine de cacahuète conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine qui est un marqueur spécifique de la membrane externe de l'acrosome. Les spermatozoïdes de chat normospermique ont fini leur capacitation en seulement 2 heures, ce qui est beaucoup plus rapide que le temps requis par les spermatozoïdes de chats tératospermiques (2,5 heures). Les individus tératospermiques possèdent donc une semence partiellement incapable de subir la capacitation. Il ne s'agit pas d'un artéfact relié à une mort cellulaire plus importante car la mobilité était conservée et comparable dans les deux populations étudiées : normo et tératospermique. Le calcium ionophore a induit la capacitation dans de plus grandes proportions (70%) que les extraits de zone pellucide (30%). Même les spermatozoïdes normaux prélevés chez les chats tératospermiques et sélectionnés par « swim-up » présentaient un retard à la capacitation par rapport à leurs homologues prélevés chez les chats normospermiques. On note dans ces échantillons traités la persistance de spermatozoïdes à anomalie acrosomiale. Il semble donc que ce retard à la capacitation soit très lié à des modifications structurales fines de l'acrosome (dont on ne peut s'affranchir par « swim-up »), en plus des anomalies morphologiques. Ceci expliquerait le fait que les éjaculats de chats tératospermiques traités par « swim-up » pénètrent la zone pellucide des ovocytes homologues dans des proportions moindre que chez les chats normospermiques [48].

III.5.5 Bases moléculaires de la capacitation

Chez la souris, la phosphorylation est un des mécanismes de régulation de la réaction acrosomiale : l'utilisation d'un inhibiteur de la tyrosine kinase réduit le taux de réaction acrosomiale induite par contact avec la zone pellucide [1,59].

Le rôle de la phosphorylation de protéines spermatiques par la tyrosine dans la capacitation chez les mâles tératospermiques a été étudié par Pukazhenti *et al.* en 1996 [85]. Le chat exprime au moins deux protéines phosphorylées par les tyrosines (p160 et p95, de 160 et 95 kDa). L'inhibition des tyrosines kinases par l'emploi de tryphostine a permis de réduire la phosphorylation de ces deux protéines. Ceci a eu pour conséquence le blocage de la réaction acrosomiale induite par la zone pellucide. La pénétration de celle-ci est donc inhibée. La capacitation semble stimuler ces deux protéines, mais dans de moindres proportions chez les tératospermiques.

Ces résultats indiquent que la réaction acrosomiale induite par la zone pellucide est régulée par un mécanisme impliquant une tyrosine kinase ainsi que l'AMPc comme second messager. Chez les chats tératospermiques, un dysfonctionnement dans ce mécanisme perturbe l'interaction entre les protéines (p160 et p95) présentes sur la membrane plasmique du spermatozoïde et les glycoprotéines de la zone pellucide de l'ovocyte [85,88].

On avance l'hypothèse d'un stress oxydatif accru, associé à la création de radicaux libres [111]. nous détailleront cet aspect plus loin, lors du choix des diluants.

De plus, comme nous l'avons vu précédemment, rentrent en jeu un défaut de perméabilité membranaire et/ou un trouble du transport du calcium. On note que chez l'homme tératospermique, le taux de calcium après stimulation de la réaction acrosomiale par la progestérone est anormalement bas [72]. De plus, dans cette même espèce, certains individus stériles présentent une faible proportion de phospholipides dans la membrane des spermatozoïdes, altérant ainsi la fluidité membranaire. La capacitation s'en trouve donc logiquement perturbée [86,88].

III.5.6 Stabilité de l'ADN nucléaire

La qualité de la chromatine des spermatozoïdes de morphologie normale chez les chats tératospermiques a été étudiée selon deux séries d'expériences. En effet, il semblerait que ces spermatozoïdes soient incapables de décondenser leur ADN à l'intérieur de l'ovule, mettant en péril la fertilisation et la formation du pronucléus [88].

La dénaturation de l'ADN a été testée par Ballachey *et al.* [10] à l'aide de colorant orange d'acridine métachromatique en association avec une cytométrie de flux. Le sperme de chat tératospermique semble se dénaturer plus facilement (données non publiées de Penfold *et al.*). La chromatine issue de ce sperme présenterait selon l'auteur des sites de « pause » qui affecteraient négativement la fertilisation [10].

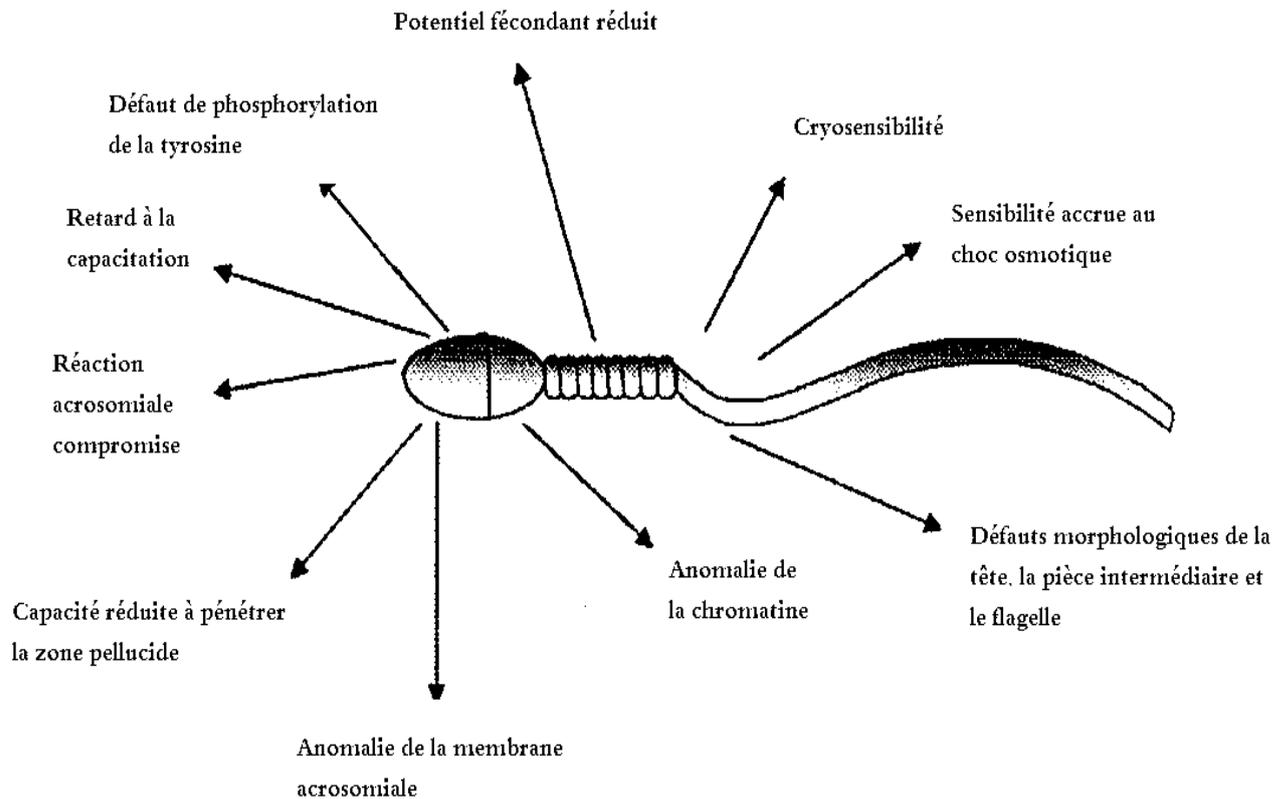
La décondensation du noyau spermatique, étudiée par Anzalone *et al.* en 1998 [1], semble être plus fréquente chez les chats tératospermiques. En effet, après seulement 40 minutes d'incubation dans une solution contenant 2% de (w/v) SDS, 0,04 mg d'héparine et 40 mmol de glutathione réduit par litre, une proportion plus grande de spermatozoïdes a accompli une décondensation du noyau chez les mâles tératospermiques. Ces résultats ont été obtenus quelque soit le traitement effectué au préalable : « swim-up » ou lavage. Grâce à une technique d'émission de rayons X à induction de protons, cette tendance à la décondensation nucléaire a été reliée à une diminution de la concentration en sulfure au niveau des têtes des spermatozoïdes ($p < 0,05$, tératospermiques 63 fg contre normospermiques 72 fg). L'auteur émet l'hypothèse que la décondensation serait due à un manque de protamine ou une formation de disulfide au sein et entre les protamines. Il est toutefois nécessaire d'effectuer de nouvelles expériences pour déterminer la structure complète de la chromatine chez les chats tératospermiques avant de chercher à comprendre les mécanismes de ses dysfonctionnements potentiels.

Nous avons vu la forte fréquence de la tératospermie dans l'espèce féline et ses conséquences sur la qualité de la semence. Les spermatozoïdes morphologiquement anormaux présentent une capacitation plus longue et un défaut de réaction acrosomiale et de pénétration de la zone pellucide dus à la structure anormale de leur acrosome. Ceci les handicape pour féconder les ovocytes. Nous avons vu que l'altération fonctionnelle pouvait être d'origine structurale (anomalie de l'acrosome) ou moléculaire (absence ou défaut des protéines phosphorylées par les tyrosines kinases (160 et 95 kDa)). On note également une sensibilité accrue au choc induit par le froid et le stress osmotique, ainsi qu'une condensation incomplète de l'ADN contenu. Ceci confirme le fait que les anomalies

morphologiques du sperme sont essentiellement d'origine épидидymaire et liées au processus de maturation.

La figure 14 récapitule les défauts structuraux et fonctionnels observés dans la semence féline.

Figure 14: Représentation schématique des défauts structuraux et fonctionnels observés chez les spermatozoïdes de chats tératospermiques (morphologiquement normaux ou non) [89]



III.5.7 Anomalies hormonales associées

Howard *et al.* [46] ont étudié les taux circulants de FSH, LH et testostérone chez les chats de deux populations : tératospermique et normospermique. Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour les taux de LH et FSH.

Beardsley *et al.* [11] ont cependant montré que la baisse des taux de FSH et de testostérone chez les rats adultes entraîne un défaut de désengagement des spermatozoïdes qui restent attachés des cellules de Sertoli pendant la spermatation.

Des études menées chez le lion par Brown *et al.* [16] n'ont pas pu établir de lien entre le taux de testostérone, la concentration en récepteurs aux gonadotropines et les caractéristiques morphologiques du sperme.

Cependant, la concentration moyenne de testostérone circulante est deux à trois fois supérieure chez les chats normospermiques. On peut donc penser qu'il existe un lien entre

la faible concentration en testostérone et la production de spermatozoïdes pléiomorphiques [46,70].

La littérature contient peu d'études mettant en évidence une relation entre le taux de testostérone circulante et l'incidence du pléiomorphisme des spermatozoïdes chez les espèces non-carnivores. Cependant, des troubles de la fertilité ont été décelés chez des étalons présentant une libido peu active, et corrélés à un taux basal de testostérone très bas, ainsi qu'à un pourcentage de formes anormales avoisinant les 91% [7].

III.5.8 Tératozoospermie chez les grands félins sauvages

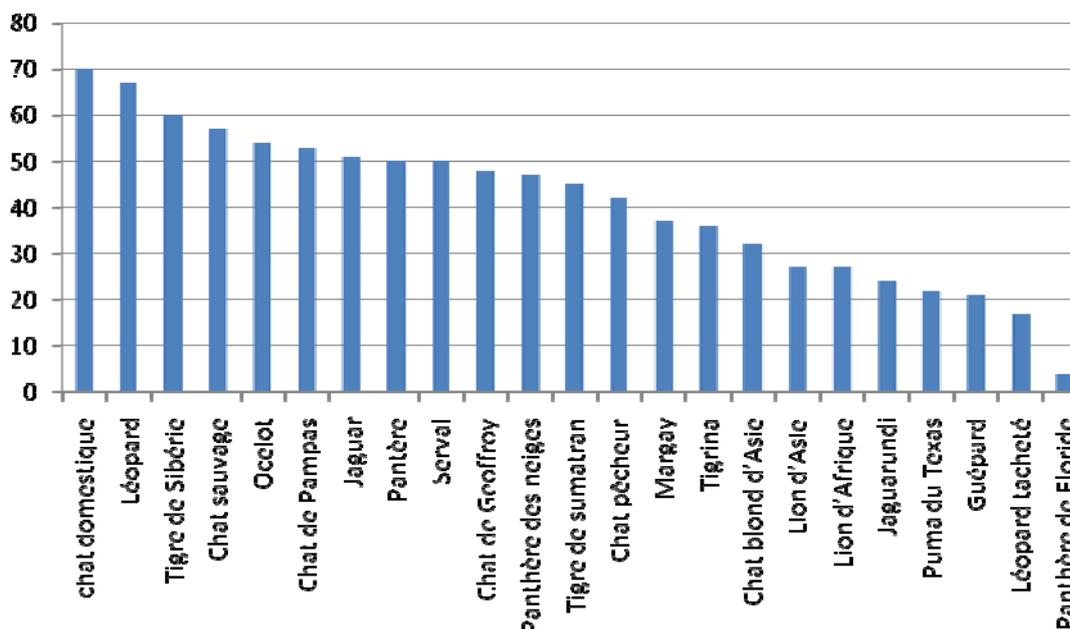
Le but de notre travail expérimental présenté plus loin consiste en la mise en place d'un protocole de congélation de la semence de chat en vue d'en faire un modèle pour la sauvegarde des grands félins. Il nous a donc semblé intéressant de développer ici les similitudes des caractéristiques du sperme des différentes espèces de félins.

22 des 28 espèces de félins sauvages dont le sperme a été étudié se sont révélées tératospermiques, comme le présentent le Tableau 13 [48] et la figure 15 [89]. La plupart du temps, la tératozoospermie s'accompagne d'oligospermie ou d'aspermie.

Tableau 13 : Caractéristiques du sperme des félins d'après Long *et al.* [61]

Ejaculat	Chat (<i>Felix catus</i>) normosp. n=45	Léopard (<i>Prionailus bengalensis</i>) n=43	Tigre (<i>panthera tigris</i>) n=62	Chat (<i>Felix catus</i>) tératosp. n=31	Guépard (<i>Acinonyx jubatus</i>) n=60	Léopard tacheté (<i>Néofélis nebulosa</i>) n=147	Panthère de Floride (<i>Felis concolor coryi</i>) n=39
Volume	0,23 ±0,06	0,29 ±0,1	6,46 ±0,4	0,20 ±0,09	1,5 ±0,1	0,95 ±0,1	1,6 ±0,2
Concentration (.10 ⁶ /ml)	198,0 ±19,3	55,6 ±7,7	38,8 ±6,7	215,0 ±10,6	29,3 ±5,6	37,6 ±3,3	9,3 ±1,9
Mobilité (%)	86,2 ±1,7	68,4 ±2,9	70,8 ±3,1	80,2 ±1,4	67,0 ±2,0	66,1 ±1,4	50,3 ±4,0
Mobilité progressive	4,2 ±0,3	3,6 ±0,1	3,5 ±0,6	3,7 ±0,2	3,6 ±0,1	3,4 ±0,1	2,7 ±0,2
Spermatozoïdes normaux (%)	76,2 ±3,1	68,8 ±4,6	62,1 ±1,8	24,6 ±1,6	21,3 ±2,0	15,9 ±3,1	8,6 ±1,1
Spermatozoïdes anormaux (%)	23,8 ±1,3	31,2 ±4,1	37,9 ±2,1	75,4 ±2,4	78,7 ±1,3	84,1 ±1,3	91,4 ±1,1
Acrosome anormal	3,5 ±0,4	4,3 ±0,8	6,2 ±0,1	2,6 ±0,1	15,4 ±2,1	36,7 ±2,3	36,5 ±2,2

Figure 15 : Pourcentage de spermatozoïdes normaux d'après Pukazhenti *et al.* [89].



Le guépard produit une très grande proportion de spermatozoïdes anormaux par éjaculat : 65 à 76% d'après Wildt [120,121,122]. Le taux sérique de testostérone chez les guépards anesthésiés est généralement compris entre 0,3 et 0,5 ng/ml [121,122], ce qui correspond aux valeurs mesurées chez le chat tératospermique [46].

On retrouve la même corrélation entre tératospermie et taux bas de testostérone chez le lion. Deux populations de lions ont été étudiées en Tanzanie par Wildt *et al.* en 1987 [123]. Une d'elles possède une grande variabilité générique et ne produit que 25% de spermatozoïdes pléiomorphiques avec un taux de testostérone circulante de 1,2 à 1,8 ng/ml. L'autre est géographiquement isolée, issue d'un nombre restreint d'individus (15) et sa variabilité génétique est réduite (forte homozygotie): elle produit environ 50% de formes anormales par éjaculat et sa concentration sérique en testostérone circulante est de 0,4 à 0,7 ng/ml.

L'incidence du type d'anomalie retrouvée semble être étroitement liée à l'espèce étudiée [46]. Le guépard, le léopard et le puma produisent le plus fréquemment des spermatozoïdes avec un flagelle enroulé ou une pièce intermédiaire liée, alors que les lions semblent plus touchés par les gouttelettes cytoplasmiques et les flagelles liés [120,121,123].

Chez l'homme, on retrouve nombre de cellules diploïdes ou aneuploïdes et seulement 3,1% des spermatozoïdes exprimant une information chromosomique correcte. Par exemple, nombre de cellules présentent une protéine du cytosquelette dans la région du flagelle, alors qu'elle n'est habituellement présente qu'au niveau de la tête.

La co-incubation de spermatozoïdes de chats normospermiques, de léopards (*Prionailurus bengalensis*) ou de tigres (*Panthera tigris*) avec des ovules con-spécifiques a donné lieu à une fécondation dans plus de 60% des cas. Le tigre et le léopard sont connus pour produire peu d'anomalies morphologiques. Au contraire, peu de fécondation ont eu lieu avec le sperme

de chats tératospermiques (50,3%), de guépard (26,2%), de puma (33,5%) et de léopard tacheté (0%). Les trois espèces de félins sauvages citées appartiennent à des espèces connues pour être tératospermiques. On peut donc dire que la fertilisation *in vitro* connaît des résultats moindres en présence de gamètes anormaux en grandes quantités [45].

De même la capacitation est plus longue dans ces espèces, comme chez le chat tératospermique [61] : le léopard, le léopard tacheté et le guépard produisent une semence qui nécessite 3 heures pour être capacitée, alors qu'il suffit de 2 heures au chat normospermique. Les spermatozoïdes de tigre n'ont pas même réussi la capacitation dans les conditions de l'expérience. L'expérience de Byers *et al.* [18] a cependant permis la capacitation des spermatozoïdes de tigre de Sibérie en 2 heures d'incubation à 37 °C dans du plasma séminal ou un milieu capacitant.

III.5.9 Comment s'affranchir de ce problème ?

En 1990, Howard *et al.* [46] ont montré que la technique de « swim-up » permettait d'améliorer la qualité de la semence de chats tératospermiques. Ceci nous concerne tout spécialement car il pourrait s'avérer nécessaire d'obtenir une semence de qualité avant d'envisager de mettre en place le processus de congélation qui altérera de façon immuable une partie des spermatozoïdes comme nous le verrons plus loin.

Les auteurs ont étudié l'évolution de la qualité du sperme une heure après traitement, en comparant les procédés de « swim-up », de centrifugation et de dilution. Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 14. Les éjaculats n'ayant pas subi de « swim-up » ont été centrifugés et remis en suspension dans le surnageant.

Tableau 14 : Influence de la dilution, de la centrifugation et du « swim-up » sur la viabilité et la morphologie des spermatozoïdes chez les chats normospermiques et tératospermiques [46] ($p < 0,01$).

	Traitement du sperme							
	Ejaculats normospermiques (n=18)				Ejaculats tératospermiques (n=18)			
	Dilution	Pas de dilution	Pas de « swim-up »	« Swim-up »	Dilution	Pas de dilution	Pas de « swim-up »	« Swim-up »
Mobilité (%)	84,4 ±1,2	76,4 ±1,2	75,3 ±1,2	90,8 ±1,2	73,3 ±1,2	64,7 ±1,2	63,6 ±1,2	88,6 ±1,2
Mobilité progressive	4,2 0,1	3,7 0,1	3,9 0,1	4,4 0,1	3,7 0,1	3,3 0,1	3,4 0,1	4,0 0,1
Index de mobilité	84,4 1,1	75,1 1,1	76,3 1,1	89,0 1,1	73,6 1,1	65,6 1,1	66,3 1,1	84,0 1,1
Spermatozoïdes normaux (%)	71,6 2,3	43,9 2,3	41,9 2,3	65,9 2,3	33,8 2,3	22,7 2,3	25,8 2,3	56,4 2,3
Spermatozoïdes anormaux (%)								
Macrocéphale	0,1 0,04	0,0	0,1 0,04	0,0	0,2 0,04	0,1 0,04	0,1 0,04	0,0
Microcéphale	0,1 0,03	0,1 0,03	0,1 0,03	0,0	0,2 0,03	0,1 0,03	0,1 0,03	0,0
Bicéphale	0,2 0,2	0,1 0,2	0,1 0,2	0,0	2,1 0,2	1,5 0,2	1,6 0,2	0,2 0,2
Tricéphale	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8 0,1	0,4 0,1	0,5 0,1	0,1 0,1
Aplasia mitochondriale	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4 0,1	0,1 0,1	0,2 0,1	0,1 0,1
Flagelle enroulé	2,1 0,8	3,5 0,8	4,0 0,8	0,9 0,8	5,3 0,8	10,0 0,8	8,7 0,8	2,3 0,8
Pièce intermédiaire liée avec gouttelettes	9,3 1,8	10,3 1,8	9,0 1,8	6,2 1,8	24,1 1,8	14,6 1,8	14,3 1,8	11,5 1,8
Pièce intermédiaire liée sans gouttelette	1,0 0,5	3,7 0,5	3,8 0,5	2,7 0,5	2,3 0,5	4,8 0,5	4,1 0,5	2,6 0,5
Flagelle lié avec gouttelettes	0,9 1,5	7,5 1,5	8,0 1,5	3,5 1,5	5,4 1,5	19,9 1,5	18,9 1,5	7,4 1,5
Flagelle lié sans gouttelette	5,8 1,8	29,7 1,8	31,7 1,8	18,9 1,8	8,2 1,8	21,7 1,8	21,5 1,8	2,0 1,8
Gouttelettes cytoplasmiques proximales	2,2 0,3	0,2 0,3	0,5 0,3	0,3 0,3	5,1 0,3	2,3 0,3	2,5 0,3	2,0 0,3
Gouttelettes cytoplasmiques distales	6,7 1,6	1,0 1,6	0,8 1,6	1,6 1,6	12,1 1,6	1,8 1,6	1,7 1,6	1,5 1,6

Les caractéristiques séminales (% de spermatozoïdes mobiles, mobilité progressive, index de mobilité) et la morphologie des spermatozoïdes ont été modifiées par le traitement infligé ($p < 0,01$). Chez les chats normospermiques aussi bien que chez les tératospermiques, les éjaculats n'ayant subi aucun traitement (pas de dilution) et ceux qui ont été remis en suspension après centrifugation (pas de « swim-up ») ont montré une diminution de la mobilité et des formes normales. La centrifugation ne permet donc pas de s'affranchir de la tératospermie.

Le procédé de « swim-up » permet de réduire le pourcentage de formes anormales, excepté pour ce qui est de l'anomalie de liaison du flagelle dont le pourcentage double. Chez les chats tératospermiques, on obtient 1,5 fois plus de spermatozoïdes normaux après le « swim-up ». La mobilité (pourcentage de spermatozoïdes mobiles et index de mobilité ou SMI) est améliorée quelque soit la population considérée.

Une autre étude d'Howard *et al.* [48] montre des résultats similaires concernant l'effet bénéfique du « swim-up » avec un pourcentage de formes normales augmenté (28,6% avant contre 66,5% après), approchant la valeur normospermique des éjaculats témoins (71,8%).

Nous avons vu que la concentration en spermatozoïdes était plus élevée chez les chats tératospermiques, mais que le nombre de spermatozoïdes normaux par éjaculat était le même que chez les normospermiques. Il semblerait cependant que l'on ne récupère qu'une moindre proportion de ces spermatozoïdes normaux chez les tératospermiques après « swim-up »: 4,9% contre 11,1 % chez les normospermiques.

La dilution améliore les qualités du sperme tératospermique. Cependant, elle n'a pas d'influence sur le sperme des chats normospermiques.

Pukazhenti *et al.* [85] a montré que le « swim-up » ne permettait pas d'éliminer efficacement les anomalies acrosomiales qui semblent responsables de la capacitation incomplète dans la population des chats tératospermiques. Il faut donc relativiser l'intérêt du « swim-up »: cette technique permet de s'affranchir de la plupart des anomalies morphologiques, mais les anomalies d'acrosome suspectées d'être à l'origine de l'incapacité à féconder persistent.

Toutes les informations pratiques nécessaires à la réalisation d'un « swim-up » sont résumées dans l'annexe 5 (Annexe 5: Le « swim-up » ou migration ascendante (adaptation à la semence féline de la technique décrite chez le chien [2])).

Nous avons vu que beaucoup d'affections pouvaient entraîner une baisse de la fertilité, voire une infertilité complète: les mâles « écailles de tortue », l'hermaphrodisme, l'ectopie testiculaire, l'hypogonadisme... Mais surtout, la tératospermie (>60% de spermatozoïdes de formes anormales) est une affection très répandue dans cette espèce ainsi que chez les grands félins sauvages. L'étiologie de cette maladie reste encore inconnue chez le chat domestique, cependant on soupçonne la diminution de la variabilité génétique due à la consanguinité chez certains félins. La semence de chats tératospermiques contient des spermatozoïdes en grandes quantités, mais avec une forte proportion de formes anormales et une fonctionnalité réduite le plus souvent. Le gain en termes de quantité est donc au détriment de la qualité et témoigne d'un dysfonctionnement de la spermatogénèse ainsi que du transport épидidymaire. La principale anomalie altérant le pouvoir fécondant des spermatozoïdes touche l'acrosome. Ce peut être une malformation, visible en microscopie optique, comme une anomalie structurelle, membranaire. On suppose que la capacitation et la décondensation de l'ADN sont altérées dans ces cellules anormales. On avance également une relation avec un taux de testostérone anormalement bas chez certains félins. Il semblerait que la technique du « swim-up » permette de diminuer la proportion de spermatozoïdes à morphologie anormale, mais le pouvoir fécondant ne s'en trouve pas forcément amélioré pour autant.

IV. Conservation de la semence de chat

La qualité du sperme de chat domestique varie fortement d'un individu à l'autre, de même qu'elle fluctue entre les différentes espèces de félins sauvages. La forte incidence de la tératospermie semble être à mettre en relation avec la grande quantité de spermatozoïdes présentant un acrosome anormal et la faible variabilité génétique. Un déficit en phosphorylation de certaines protéines impliquées dans la capacitation est une hypothèse plausible chez le chat domestique et démontrée chez certaines espèces sauvages. Les tests de liaison et pénétration de la zone pellucide ainsi que le procédé de « swim-up » permettent de sélectionner une semence de la meilleure qualité possible.

Cependant, il a été démontré que la fécondation *in vitro* était possible, même dans les espèces les plus touchées par la tératospermie [36,90,96]. Le taux de fécondation varie de 40% à 80% selon le traitement infligé aux ovocytes.

Nous développerons ici les techniques de conservation de la semence de chat, les questions qu'elles soulèvent et les moyens de prévenir les risques qui y sont associés. Les études dans ce domaine sont peu nombreuses et aucun consensus n'a été obtenu jusqu'à présent : les résultats sont très variables, mais prometteurs. Toute notre démarche sera tournée vers l'obtention d'une dose fécondante destinée à l'insémination artificielle. La semence doit en effet conserver sa viabilité et son potentiel fécondant après réchauffement. Notre but est double : l'amélioration des performances de la reproduction assistée chez le chat domestique et la conservation de la variabilité génétique chez les félins menacés d'extinction.

Les principaux problèmes rencontrés à la mise au point d'un protocole de congélation sont relatifs aux lésions membranaires, à la sensibilité des cellules au choc thermique, à la formation de cristaux de glace et aux solutions de forte osmolarité. Le point critique du processus de réfrigération est le passage de l'eau à travers la membrane plasmique dont le taux dépend de la perméabilité de la membrane, du ratio surface-volume de la cellule, de la température infligée et de la différence d'osmolarité entre les milieux intra et extracellulaires [63]. Nous verrons également que les caractéristiques propres du sperme de chat compliquent le procédé.

La congélation de sperme peut se faire à partir de semence prélevée par éjaculation ou par flush épидidymaire. Cette deuxième option est particulièrement intéressante pour la préservation du matériel génétique d'animaux stérilisés ou même décédés ! On note que la congélation de tissu issu des gonades mâle et femelles n'en est qu'à un stade expérimental, mais peut à terme représenter un outil très précieux.

IV.1 Conditionnement

IV.1.1 Paramètre physicochimique de la dilution

L'incidence d'une solution de dilution sur la conservation de la semence dépend en grande partie, de l'adéquation de deux paramètres : le pH et l'osmolarité. De plus, la conservation peut être améliorée par incorporation d'un ou de plusieurs adjuvants.

IV.1.1.i Ph, pouvoir tampon

Rappelons que le pH du sperme de chat est d'environ 8,5 et qu'il varie selon la méthode de prélèvement. Le bon sens conduit à tester des solutions de pH voisin de celui de la semence. En pratique, la détermination, par l'expérience, du pH idéal est délicate. En effet, le pH des solutions salines habituellement employées, tout comme celui des tampons phosphate et citrate, varie sensiblement en fonction de la température. Il varie fortement autour du point de congélation car les sels présents dans la solution cristallisent à des températures différentes [60]. La meilleure stabilité des tampons organiques (TEST, Tris) est une des raisons de leur utilisation fréquente. Chez le chat, des diluants à base de tampons organiques ont donné des résultats encourageants. Ceux-ci sont reportés dans le tableau 15.

Cependant, une étude menée chez la panthère des neiges (*Panthera uncia*) [95] a montré l'effet néfaste du pH alcalin sur la semence. La mobilité était altérée et la capacitation ne se produisait pas dans les conditions habituellement requises pour la semence de cette espèce.

Ces résultats contradictoires sont peut-être dus aux qualités intrinsèques de la semence de panthère des neiges. Toutefois, il serait intéressant de mener de nouvelles études sur l'influence du pH sur la mobilité et la capacitation.

IV.1.1.ii Osmolarité, choc hypo-osmotique

L'osmolarité du sperme de chat est comprise entre 290 mOsm/Kg et 320 mOsm/Kg comme vu dans les chapitres précédents. Le diluant optimum devrait être isotonique.

Pukazhenth et al. ont montré en 2000 [87] que le pourcentage de mobilité était influencé négativement par des milieux d'osmolarité inférieure à 200 ou supérieure à 450mOsm. De plus, il a été démontré que les dommages créés par les solutions hypotoniques étaient plus importants que ceux induits par les solutions hypertoniques [34,84,87]. L'intégrité membranaire est le paramètre sur lequel les études ont porté principalement. Le sperme de chat apparaît extrêmement résistant aux conditions hypertoniques (600,1200 et 2400mOsm), avec plus de 85% de cellules dont l'acrosome reste intact. Au contraire, l'exposition à une solution hypotonique majeure fortement les lésions de l'acrosome. On note que la baisse de mobilité semble la première modification à apparaître lors de faibles variations d'osmolarité [87]. Les cellules germinales sont donc sensibles au choc hypo-osmotique et elles le sont d'autant plus qu'elles sont issues de chats tétratospermiques [87].

On ne connaît pas toujours les différents milieux utilisés dans les études que nous avons citées dans le chapitre sur l'analyse la semence. En effet, ceux-ci ont pu affecter les résultats obtenus. Certaines études présentent des conclusions dont les différences peuvent s'expliquer par les dommages infligés aux spermatozoïdes dus au choc osmotique [5].

Le tableau 15 confirme l'intérêt d'utiliser une solution iso-osmotique quelques soient les traitements infligés à la semence. De plus, la mobilité diminue avec les traitements thermiques, atteignant ses minimas avec la congélation. Il apparaît alors indispensable de choisir un milieu garantissant une mobilité maximale avant la congélation.

Tableau 15 : Les effets de quatre osmolarités de tampon TesTris sur la mobilité des spermatozoïdes de chat stockés 24 heures à +5°C (valeurs moyennes sur 5 animaux, un éjaculat par animal) d'après Glover et Watson 1985 [35]

osmolarité	Avant réfrigération		Après réfrigération		Après réfrigération et stockage	
	% mobilité	Indice de mobilité	% mobilité	Indice de mobilité	% mobilité	Indice de mobilité
390	63,0	3,8	50,4	2,8	38,5	2,5
325	64,0	3,9	51,0	3,1	41,9	2,5
260	51,0	2,8	44,2	2,4	42,7	2,6
195	30,7	2,1	28,5	1,9	32,5	2,2
Moyenne	52,2	3,2	43,5	2,6	38,9	2,5

IV.1.1.iii Dilution

Si la survie d'une semence non diluée est faible [36], une dilution trop élevée exerce des effets néfastes par perte de composants intracellulaires (notamment le potassium) ou à cause de la dilution des substances protectrices contenues dans le plasma séminal [60]. Howard *et al.* [46] et Tsutsui *et al.* [115] diluent un éjaculat dans 200µL de diluant.

La présence du plasma séminal affecte négativement le potentiel fécondant des spermatozoïdes d'après McLaughlin et Hamner (1984) [66]. On pratiquera donc le retrait du plasma séminal après centrifugation à vitesse réduite (300 g [113] ou 700 g [134]), ce qui prolonge la durée de vie des spermatozoïdes.

IV.1.2 Choix d'un diluant

En 2000, Tsutsui *et al.* et Tanaka *et al.* [108,113] ont comparé deux types de milieux : un mélange de Tris, fructose, jaune d'œuf et acide citrique (EYC-FC) avec une solution de citrate de sodium et de jaune d'œuf (EYC). Le premier a donné les meilleurs résultats, basés sur le taux de fécondation après décongélation. La composition du milieu EYC-FC est décrite dans le Tableau 16. La semence a été diluée une première fois à 20°C, puis une deuxième fois après refroidissement à 4°C. La concentration finale en glycérol est de 7%.

Tableau 16: Composition du diluant utilisé par Tsutsui et al. pour la préparation à la congélation de la semence de chat [113]

Ingrédients	EYC-FC	
	1 ^{er} diluant	2 ^{ème} diluant
Acide citrique	1,30 g	1,30 g
Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane	2,40 g	2,40 g
Fructose	1,00 g	1,00 g
Potassium de pénicilline	100 000 U	100 000 U
Sulfate de streptomycine	0,10 g	0,10 g
Glycérol	-	14 ml
jaune d'œuf	20 ml	20 ml
Eau distillée (qsp volume final)	100 ml	100 ml

Zambelli *et al.* [134] proposent un mélange de Tris, glucose et citrate associé à 20% de jaune d'œuf, 8% de glycérol et 1% d'Equex.

Platz *et al.* [79] avaient utilisé une solution de lactose.

Hay et Goodrowe [40] ont comparé trois diluants contenant 20% de jaune d'œuf et 3% de glycérol : TE (Tris, acide citrique et fructose), TC (Tris, acide citrique et glucose) et CP (lactose). Dans cette étude, la mobilité progressive diminue de 20% environ par rapport aux valeurs avant congélation. Les pertes subies après dilution en présence de Tris et de monosaccharides sont moindres que celles infligées par le lactose.

Une étude compare les différents milieux. Les milieux Tris et Test obtiennent les meilleurs résultats. Le milieu Test est constitué d'acide sulfonique et de méthane de trihydroxyméthyl-amine dont le pH est de 7,4 et l'osmolarité de 292 à 325 mOsm/Kg. Le milieu Tris est constitué de méthane de trishydroxy-méthyl-amine. Ils ont été testés, associés à 4% de glycérol ou de DMSO et de 20% de jaune d'œuf (l'action des cryoprotecteurs sera évoquée plus loin). L'étude n'a montré aucune différence entre les deux milieux [29,5].

Une étude menée chez le chien a montré la supériorité du milieu Tris associé au jaune d'œuf [91]. En effet, Rota et al ont comparé les caractéristiques du sperme de chien en incubation pendant 4 jours à 4°C dans différents milieux (le plasma autologue, le milieu Tris associé au jaune d'œuf, le lait écrémé avec du jaune d'œuf et le lait entier avec du jaune d'œuf). Les plus mauvais résultats ont été obtenus avec le sérum autologue : la mobilité est descendue jusqu'à 0% en 2 jours et les anomalies d'acrosome étaient plus fréquentes que dans les autres milieux. La mobilité était meilleure dans le milieu Tris associé au jaune d'œuf (53,6%) que dans le lait (30,4%) ou la crème (14,1%) jusqu'au quatrième jour. Cependant aucune différence n'était significative quant au statut acrosomial entre ces trois milieux ($p > 0,05$).

Les milieux TEST et Tris semblent donc être les plus adaptés. Harris *et al.* [39] ont comparé l'effet de la réfrigération sur semence diluée ou non dans le milieu TEST : ils rapportent de meilleurs résultats dans le milieu TEST (69% contre 51,4%) pour la mobilité et des résultats identiques entre les deux milieux pour la viabilité (91% contre 88,5%).

IV.1.2.i Milieu de Hancock et Gledhill

Il semblerait également que la dilution dans la solution de Hancock et Gledhill préserve le mieux les morphologies des spermatozoïdes de chat. En effet, certains milieux diminuent la proportion des gouttelettes protoplasmiques, ce qui n'est pas le cas de cette solution [128,132].

IV.1.2.ii Réfrigération medium test yolk buffer with gentamycin (Irvin Scientific)

La composition précise de ce milieu n'est pas disponible actuellement. Ce milieu peut être utilisé pour la réfrigération et/ou la congélation de semence de chat.

IV.1.2.iii Ham's F10

C'est le milieu utilisé par Roth *et al.* et Swanson *et al.* [105,104,94,95]. Il lui ajoute 5% de FCS qui sont des protéines sériques de veau.

IV.1.2.iv Milieu Biggers Whitter wittingtam (BWW)

C'est le milieu utilisé par Howard *et al.* [47,46]. Ils lui ajoutent parfois du BSA [46].

IV.1.3 Additifs

IV.1.3.i Additifs protéiques : le jaune d'oeuf

Le jaune d'œuf, le lait entier et le lait écrémé entrent dans la composition de nombreux diluants de conservation de semence. Leurs propriétés sont désormais reconnues, mais sujettes à variation selon les espèces étudiées.

Le jaune d'œuf, en particulier, protège les membranes acrosomiales et mitochondriales. Il préserve la mobilité durant la congélation. Pour obtenir un produit homogène, le jaune d'œuf est centrifugé 20 minutes à 1500g. On récupère le surnageant, que l'on dilue à différentes concentrations dans une solution salée isotonique ou une solution tampon TEST ou Tris.

Les propriétés du jaune d'œuf sont dues, pour l'essentiel, à la fraction des lipoprotéines de basse densité (LDF). Celles-ci interagissent avec les phospholipides de la membrane plasmique et la stabilise.

Glover *et al.* [35] ont montré les premiers que l'adjonction à la semence d'un diluant simple au jaune d'œuf (20% vol. /vol. dans du soluté NaCl 0,9%), à raison d'une partie de semence pour 3 parties de diluant, accroît très sensiblement sa résistance à des variations thermiques répétées ($p < 0,01$). Les résultats sont rapportés dans le Tableau 17.

Chez le chat, ces LDF ne présentent pas la même toxicité à forte concentration que le jaune d'œuf. Glover *et al.* [35] a montré que l'élévation de la concentration en LDF de 2% à 20% n'entraîne aucune altération significative. Toutefois, les auteurs notent le fait que les résultats (Tableau 18) obtenus avec la fraction LDF à 2% ou 20% ne sont guère meilleurs qu'avec le jaune d'œuf à 2%.

Tableau 17 : Effet du jaune d'œuf à 20% (v/v) sur la survie des spermatozoïdes de chats soumis à des perturbations thermiques successives d'après Glover *et al.* [35] (le choc thermique expérimental consiste à immerger les échantillons de semence préalablement maintenus à 37°C, dans de la glace fondante pendant 5 minutes. Moyennes pour 4 animaux. P<0,001)

	Sans jaune d'œuf		Avec jaune d'œuf	
	% spz mobiles	Indice de mobilité	% spz mobiles	Indice de mobilité
Avant choc thermique	69,3	4,75	70,9	4,50
Après un 1 ^{er} choc	54,5	4,25	67,5	4,50
Après un 2 ^{ème} choc	32,5	3,88	61,8	4,38
Après un 3 ^{ème} choc	27,7	2,38	50,8	4,25
moyenne	46,0	3,82	62,8	4,41

Tableau 18 : Effets de deux concentrations de jaune d'œuf et de L.D.F. sur la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes conservés à +5°C d'après Glover *et al.* [35] (moyenne pour 5 chats, un éjaculat par animal)

Concentration en additif	Réfrigération /conservation	Jaune d'œuf			L.D.F.		
		% spz mobiles	Index de mobilité	% spz colorés	% spz mobiles	Index de mobilité	% spz colorés
2 %	Avant réfrigération	70,0	4,0	16,6	63,3	3,9	18,4
	Stockage de 24 heures	57,4	3,5	25,0	46,9	2,8	27,8
	Stockage de 46 heures	33,3	2,2	33,4	36,2	2,1	49,2
	moyenne	52,6	3,2	28,5	48,2	2,9	35,2
20 %	Avant réfrigération	60,2	4,2	16,2	57,6	3,8	12,2
	Stockage de 24 heures	37,1	3,6	25,4	48,5	2,8	24,4
	Stockage de 46 heures	36,0	2,9	41,6	45,6	2,9	46,2
	Moyenne	44,0	3,6	31,6	50,5	3,2	32,4
	Moyenne globale	48,5	3,4	30,1	49,7	3,1	33,8

C'est la moindre sensibilité de la semence de chat au choc thermique qui pourrait expliquer les effets contradictoires de l'incorporation de lipoprotéines protectrices. On traitera du choc osmotique plus loin.

Une étude menée par Hermansson *et al.* en 2007 [42] a montré l'action bénéfique du jaune d'œuf dans la congélation de sperme de chat. Il a comparé des éjaculats conservés dans le milieu Tris avec de la semence conservée dans un mélange de Tris et de jaune d'œuf à 20%. La mobilité et le statut acrosomial était meilleur lors d'ajout de jaune d'œuf. Aucune conclusion n'a cependant pu être donnée vis-à-vis de l'intégrité membranaire car la différence n'était pas significative.

IV.1.3.ii Sucres

Seuls le glucose, le fructose et le mannose sont métabolisés par la glycolyse au sein des spermatozoïdes. D'autres sucres ont cependant été employés dans les diluants comme le xylose, le lactose ou l'arabinose. On sait que les sucres exercent un effet protecteur non seulement en tant que substrats énergétique, mais aussi par leur rôle osmotique et protecteur. Chez le chat, l'adjonction de glucose, de galactose ou de fructose n'a apporté aucune amélioration durant une conservation de 96 heures à +5°C [35].

IV.1.3.iii Antibiotiques

Depuis les débuts de l'insémination dans l'espèce bovine, l'habitude a été prise d'incorporer des antibiotiques dans les diluants. Une association de pénicilline et de streptomycine (dosées respectivement à 500-1000UI/ml et 500-1000µg/ml) exerce une activité antibactérienne de large spectre, sans incommoder les spermatozoïdes. La plupart des antibiotiques récents semble également peu toxique, malgré le faible nombre d'études dont ils ont été l'objet chez le chat [119].

IV.1.3.iv Autres [119]

La kalicrine, la caféine et les prostaglandines, stimuleraient la mobilité des spermatozoïdes. De plus, quelques enzymes semblent intéressantes comme les amylases α ou β qui préviennent la formation de peroxyde d'hydrogène, très toxique pour les membranes. Nous verrons plus tard avec les additifs antioxydants et stimulants ajoutables avant la congélation que les résultats ne sont pas univoques.

IV.2 Conservation sans congélation

IV.2.1 Conservation à température ambiante [37,36]

Goodrowe *et al.* [36] ont montré que la semence de chat se conservait plus longtemps à température ambiante (23°C) qu'à 37°C. En effet, à 23°C, la mobilité diminue de 97% à 50% en 2h15. Elle approche encore les 20% après 2h40 de conservation. Dans cette étude, le sperme est dilué au préalable par un rapport 1 pour 1 avec du mBSW. Les résultats obtenus en ne diluant pas la semence ou en la conservant à 37°C sont bien moins bons : au mieux, la mobilité atteint 10% au bout de 2h de conservation.

Certains auteurs relatent une baisse de mobilité plus importante pour les échantillons de sperme épидидymaire refroidis que pour les échantillons maintenus à température ambiante pendant 12 heures [37]. Il semblerait donc que la conservation à température ambiante soit une solution de conservation à court et moyen terme.

Comme nous le verrons plus loin, ces résultats sont en contradiction avec une étude plus récente qui préconise le refroidissement [42].

IV.2.2 Conservation à 37°C

La semence non diluée et maintenue à 37°C s'altère très rapidement : la mobilité des spermatozoïdes est quasiment nulle au-delà de soixante minutes [36]. Son utilisation, notamment pour inséminer une chatte, doit donc suivre immédiatement la récolte et les

examens de qualité, mais la réalisation quasi-simultanée de la récolte et de la mise en place n'est pas toujours aisée. Il va de soit que le développement de l'insémination artificielle dans l'espèce féline passe par l'affranchissement de la condition de proximité des deux géniteurs. D'où l'intérêt de maîtriser les différents procédés de conditionnement de la semence pour la conserver de quelques heures à quelques jours en la réfrigérant ou bien plusieurs mois grâce à la congélation. En effet, la conservation de la semence de chat est actuellement bien moins connue que celle des animaux de rente, du chien, ou de l'homme.

Il est donc vain d'essayer de conserver la semence à 37°C puisqu'elle se conserve deux fois plus longtemps à température ambiante (23°C) comme nous l'avons vu précédemment [36]. Par ailleurs, une simple dilution, en parties égales, avec un milieu BSW prolonge la survie des spermatozoïdes aussi bien à 37°C qu'à 23°C [36].

Il convient également de maintenir la semence à l'abri de tout facteur de vieillissement prématuré, comme des variations de pH ou de température. Une fois la réfrigération ou la congélation réalisée, la température doit rester la plus stable possible. On évitera tout contact avec l'air.

IV.2.3 Réfrigération

La semence de chien contient encore des spermatozoïdes mobiles dont la membrane est intacte après un stockage de 8 jours à 4°C [127]. On peut donc supposer que la réfrigération a également des effets bénéfiques pour le stockage du sperme de chat.

La réfrigération à +5°C autorise une utilisation de la semence de chat différée de quelques heures à quelques jours par rapport à la récolte. Les différentes études rapportent une conservation pendant 12 heures [37], 24 heures [35,82,83] et même jusqu'à 5 à 7 jours [39].

Par exemple, le sperme peut être refroidi jusqu'à la température de 4°C et conservé à cette même température pendant 24 à 48 heures dans un milieu Test (acide sulfonique et de méthane de trishydroxyméthyl-amine) dont le pH est de 7,4 [5,29].

Habituellement chez les mammifères, le sperme est refroidi lentement jusqu'à une température de +5°C à laquelle il est maintenu pendant 20 minutes avant d'être congelé. La vitesse de refroidissement est contrôlée par l'utilisation d'un réfrigérateur programmable.

Chez le chien, les dommages subis par les spermatozoïdes sont moindres si la semence est refroidie lentement. En effet, le nombre de spermatozoïdes liés à la zone pellucide par ovocyte est meilleur pour la semence refroidie lentement ($3,6 \pm 0,9$) que pour la semence refroidie rapidement ($2,4 \pm 0,6$) [41].

Chez le chat, Puzakheni *et al.* [86] ont montré qu'un refroidissement rapide (14°C/min) de 25°C à 0°C était plus délétère vis-à-vis de l'intégrité morphologique des spermatozoïdes qu'un refroidissement lent (0,5°C/min). On observe des lésions acrosomiales massives, sans réduction de la mobilité associée. Ceci démontre que l'acrosome est une structure fortement sensible au froid contrairement à la mobilité qui semble bien résister au choc thermique.

Une autre étude plus récente [42] remet ces résultats en cause. La mobilité, l'intégrité de la membrane plasmique et de l'acrosome ont été contrôlés après refroidissement à différentes

vitesse (0,5°C/min et 3°C/min). Le froid ne semble pas influencer les paramètres observés qui restent équivalents à la semence fraîche conservée à température ambiante pendant 96 heures.

Zambelli *et al.* proposent une vitesse de refroidissement de -0,2°C/min [134].

Certaines études remettent même en question l'intérêt du refroidissement en lui-même comme processus de conservation de la semence à court terme. Comme vu précédemment, Goodrowe *et al.* [37] ont montré que la baisse de mobilité était plus importante pour les échantillons de sperme épидидymaire refroidis que pour les échantillons maintenus à température ambiante pendant 12 heures [37].

Une piste d'explication nous vient du sanglier chez qui une étude [19] a montré que les changements de températures réduisent la fluidité membranaire. En effet, des changements de fluidité membranaire se produisent de façon physiologique et semblent être reliés au phénomène de capacitation. Le calcium peut reproduire ces changements artificiellement. De plus, on sait que la membrane plasmique des spermatozoïdes de certains hommes stériles contient une moindre proportion en phospholipides, altérant ainsi la fluidité membranaire [86]. Le refroidissement et le réchauffement sont donc des enclaves au bon déroulement de la capacitation en ce qu'ils influent négativement sur la fluidité membranaire.

Toutes les informations pratiques nécessaires à la conservation de semence réfrigérée ou à température ambiante sont résumées dans l'annexe 6 (Annexe 6 : Conservation de semence féline réfrigérée ou à température ambiante).

IV.3 Congélation

IV.3.1 Dommages cellulaires

IV.3.1.i Choc thermique

La congélation inflige des dommages irréversibles aux membranes des cellules.

Lorsque la température avoisine 0°C, l'eau se cristallise et les substances dissoutes se concentrent dans l'eau restée à l'état liquide. La membrane cellulaire constitue un obstacle au développement des cristaux cellulaires. L'eau intracellulaire reste donc à l'état liquide en dessous de son point de fusion : elle est en surfusion. On observe de part et d'autre de la membrane, une différence de pression de vapeur qui entraîne une migration de l'eau intracellulaire vers le compartiment extracellulaire. Si la vitesse de congélation est lente, l'eau a « le temps de fuir » hors de la cellule et de cristalliser à l'extérieur. En revanche, lorsque cette vitesse est élevée, l'eau migre peu, la différence de pression de vapeur augmente et l'eau cristallise dans la cellule. La formation de cristaux intracellulaires serait beaucoup plus nocive que la formation de cristaux extracellulaires, ce qui expliquerait la nocivité des congélations ultra-rapides. Les inconvénients des vitesses lentes seraient au contraire dus à des modifications des concentrations et du pH, ainsi qu'à des précipitations. Le rythme optimal d'abaissement de la température serait un compromis entre ces deux facteurs d'altération [60].

La fourchette de température entre -10°C et -40°C représente la zone de sensibilité maximale pour la semence. En deçà, il y a formation d'un eutectique : l'eau et les substances dissoutes cristallisent simultanément et la semence se comporte alors comme un corps simple [60].

Il semblerait, d'après Pukazhenthil *et al.* [86], que les spermatozoïdes issus de chats tératospermiques soient plus sensibles que ceux prélevés sur les chats normospermiques, même après traitement (« swim-up »). Ils sont en effet plus susceptibles de développer des anomalies acrosomiales lorsqu'ils sont soumis à un refroidissement de -4 à -14 °C par minute.

Une étude plus récente [42], n'a pas montré de différence significative en ce qui concerne la sensibilité au froid des spermatozoïdes éjaculés et des spermatozoïdes d'origine épидидymaire. En effet, les variations de mobilité, de statut acrosomial et d'intégrité membranaire n'ont pas été influencées après congélation par l'origine du prélèvement de la semence.

IV.3.1.ii Choc hypo-osmotique

Rappelons ici que l'osmolarité de la semence de chat est d'environ 300mOsm/L et qu'elle est surtout sensible aux conditions hypo-osmotiques. Les principales altérations observées sont des lésions membranaires.

D'après Pukazhenthil *et al.* [88], le retrait des cryoprotecteurs osmotiquement actifs réduit la perte de mobilité et les dommages membranaires.

IV.3.1.iii Stress oxydatif

La production de radicaux libres dans les éjaculats congelés augmente de façon significative. Il en résulte une peroxydation des lipides membranaires qui peut entraîner des altérations de l'acrosome proches de la réaction acrosomiale, ainsi qu'une perte de mobilité irréversible [55]. Une modification profonde du métabolisme de la cellule et une augmentation du transport de composés intracellulaires sont également rapportées chez le sanglier [75]. La membrane plasmique et la chromatine sont également des structures susceptibles d'être sensibles au stress oxydatif.

Il semblerait que les plus gros dommages cellulaires causés par les radicaux libres le soient au moment du réchauffement post-congélation.

De plus, une étude menée chez la souris [111] a montré que la concentration en vitamine E dans le sperme de l'épididyme est très forte. La consommation en Vitamine E semble beaucoup plus forte dans la partie caudale de l'épididyme (70%) que dans sa partie proximale (13%). Ceci suggère la participation des radicaux libres aux modifications acrosomiales et membranaires qui ont lieu lors de la capacitation.

Chez l'homme, l'utilisation de pentoxifylline, de caféine, de L-carnitine et d'acétyl-carnitine a été proposée chez les individus subfertiles [100]. En effet, le rôle du stress oxydatif dans la réaction acrosomiale et la capacitation a été établi dans cette espèce du fait de la sensibilité des structures riches en acides gras polyinsaturés comme les membranes. Son effet néfaste sur la mobilité, la viabilité et la fonction fécondante des spermatozoïdes a également été

prouvé. De même, la chromatine est une structure sensible au stress oxydatif. Les modifications induites peuvent provoquer l'apoptose, des fragmentations, des crossing-over, etc. La supplémentation en vitamine E induit une augmentation de la GSH responsable de la décondensation du noyau et de la formation des microtubules. Cependant, l'efficacité de cette supplémentation n'a pas pu être prouvée pour quelque molécule antioxydante que ce soit.

IV.3.2 Additifs

IV.3.2.i Cryoprotecteurs

Glycérol

Son mode d'action est mal connu et mettrait en jeu une grande affinité pour l'eau. En présence de glycérol, d'avantage d'eau reste à l'état liquide lors de la congélation. La concentration relative en électrolytes s'élève donc moins qu'en l'absence de glycérol. Pourtant ce phénomène n'explique pas tout car le glycérol agit, et parfois plus efficacement, même si le temps de contact avec la semence avant congélation est suffisamment court pour ne pas lui permettre de pénétrer à l'intérieur des cellules. Son action serait donc à la fois intra et extracellulaire [60].

Il est généralement utilisé à la dose de 20% pour la conservation des gamètes de mammifères, mais les spermatozoïdes de chats y sont particulièrement très sensibles. On recommande donc une concentration de 4 ou 5%, mais n'excédant pas 8%, dose toxique pour ces cellules [29,69].

Dans l'espèce canine, il a été prouvé que l'ajout de glycérol, même à de faibles concentrations (4%), n'avait pas d'effet bénéfique sur la mobilité, le statut acrosomial ou la pénétration des ovocytes homologues [41].

DMSO : diméthylsulphoxide

Nelson *et al.* [69] a étudié les effets protecteurs du glycérol et du DMSO à différentes concentrations (4% et 8%). La concentration de 8% de DMSO comme de glycérol semble être toxique pour les spermatozoïdes de chat. L'étude ne permet pas de privilégier l'action d'un cryoprotecteur plutôt qu'un autre (Tableau 19).

Tableau 19: Index de mobilité des spermatozoïdes (SMI) avant et après congélation avec différents cryoprotecteurs d'après Nelson *et al.* [69]

Traitement	SMI avant congélation	SMI après congélation
4% DMSO	64,2 1,8	56,2 2,6
4% Glycérol	69,7 3,2	67,8 2,1
8% DMSO	55,0 1,8	35,1 2,4
8% Glycérol	56,5 3,4	43,0 2,5

IV.3.2.ii Antioxydants

Taurine

Luvoni *et al.* [62] ont étudié l'action de la taurine, un antioxydant osmotiquement inactif, ajoutée au diluant habituel. La taurine est un acide aminé β qui contient du sulfure et qui est présent dans le tractus génital de plusieurs mammifères [68] ainsi qu'en grande quantités dans les spermatozoïdes, le plasma séminal et le fluide épидидymaire [17]. L'ajout de taurine augmente la mobilité des spermatozoïdes après réchauffement quelque soit sa dose (25nM ou 50nM). Cependant, la proportion de spermatozoïdes ayant subit la réaction acrosomiale dans l'échantillon congelé supplémenté en taurine était largement plus élevée (>90%) que dans l'échantillon frais (8 à 30%). L'intégrité acrosomiale a été évaluée grâce au test à la chlorotétracycline [62]. L'augmentation de la mobilité en présence de taurine s'explique donc par son action capacitante [68], cependant les résultats sont difficilement interprétables du fait que la congélation en elle-même peut être à l'origine des modifications acrosomiales observées [62]. L'addition de composés stimulants la mobilité peut donc être bénéfique, mais il est nécessaire d'associer systématiquement un protecteur cellulaire et membranaire.

Sélénium

Chez le rat, une carence en Sélénium provoque des anomalies du flagelle que l'on peut rapporter à un dysfonctionnement à la fois de la spermiogénèse et de la maturation épидидymaire [73].

De plus, chez l'homme subfertile, la complémentation en sélénium est pratiquée, mais aucun résultat n'est prouvé [111].

Il n'existe pas d'étude pour le chat dans ce domaine.

Vitamine E

Chez le sanglier, l'ajout d'un analogue liposoluble de la vitamine E, le Trolox (l'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), possède un effet bénéfique sur la mobilité et l'intégrité des membranes mitochondriales pendant la congélation. Cet effet est dose dépendant : les résultats obtenus avec la dose de 200 μ M/L ont été meilleurs que ceux obtenus avec 100 μ M/L. La vitamine E a la capacité d'absorber les radicaux libres et sa dose doit être choisie en fonction de la concentration en spermatozoïdes [75].

Aucun résultat n'est actuellement disponible pour l'espèce féline.

Autres : Pyruvate, EDTA et catalase

Chez les bovins, il semblerait que l'ajout de ces composés permette une réduction des effets délétères des fortes concentrations en radicaux libres dans la semence décongelée [12]. Cette étude a été menée sur de la semence diluée dans le milieu Tris associé à du jaune d'œuf qui est le milieu de référence utilisé dans cette espèce. La mobilité était le paramètre pris en compte.

L'utilisation des antioxydants reste empirique puisque leur efficacité sur la mobilité et les anomalies morphologiques n'a pas été prouvée [57] chez le chat.

IV.3.2.iii Détergents

Dans l'espèce canine, on sait que l'ajout d'un détergent, l'Equex® STM, lors de la congélation, a un effet bénéfique sur la mobilité, l'intégrité membranaire et la longévité [92]. Ces résultats semblent être dus à une protection accrue de l'acrosome [81]. Or nous avons vu que l'intégrité de cette structure était un point clé du potentiel fécondant des spermatozoïdes de chat.

Récemment, une étude [6] a montré que l'ajout d'Equex® STM au diluant permettait d'éviter les modifications acrosomiales « capacitation-like » pendant le processus de congélation, en préservant l'intégrité de la membrane de l'acrosome. Le composé actif du détergent est le sulfate de sodium dodecyl. Son action est mal connue : le détergent semble induire une modification de la structure des lipoprotéines du jaune d'œuf, les rendant ainsi aptes à protéger la membrane pendant la congélation. Comme cela avait déjà été prouvé chez le chien, la semence de chat d'origine épидidymaire, congelée en présence de 0,5% (v/v) d'Equex® STM subit moins de dommages acrosomiaux. La proportion d'acrosome intact après congélation en présence du détergent est meilleure, mais reste bien inférieure à celle présente dans la semence fraîche ou refroidie. De plus, la viabilité des spermatozoïdes (laissés 6 heures à 38°C après congélation), définie par l'association de deux critères, intégrité membranaire et mobilité, est influencée négativement par la présence du détergent. Il semble que le détergent possède un effet négatif ou une toxicité à haute température. De nouvelles études sont nécessaires pour démontrer si le fait de séparer le détergent du milieu immédiatement après réchauffement annule cette potentielle nocivité vis-à-vis de la viabilité des spermatozoïdes.

Zambelli *et al.* [134] proposent une concentration de 1% d'Equex STM.

IV.3.2.iv Stimulants

Les caractéristiques de la semence de chat peuvent être améliorées par l'ajout de caféine, pentoxifylline et 2'-deoxyadénosine. L'action de ces composés est dose-dépendant. Ils produisent un état d'hyper-activation sans baisse de la mobilité pendant plus de 6 heures à 37°C après congélation-réchauffement [103]. Ces molécules induisent une augmentation du taux d'AMPC qui est un second messenger, mis en jeu lors du processus de capacitation comme nous l'avons déjà vu. D'après Stachecki *et al.* [103], il semblerait que leur présence réduise la perte de mobilité infligée par la congélation de 10%. De nouvelles études devraient à présent porter sur l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes soumis à l'ajout de tels stimulants.

IV.3.3 Traitements avant congélation

IV.3.3.i Centrifugation

Nous avons vu précédemment que le plasma séminal affectait négativement le potentiel fécondant des spermatozoïdes. Son retrait après centrifugation à 300g prolonge la durée de vie des cellules d'après Mc Laughlin et Hamner [66]. Zambelli *et al.* [129] proposent une centrifugation pendant 8 minutes.

IV.3.3.ii Tératospermie

Nous avons vu précédemment que la tératospermie (>60% de spermatozoïdes anormaux) touchait largement la population des chats domestiques et des félins sauvages. En effet, rappelons qu'une grande proportion des spermatozoïdes présente des gouttelettes cytoplasmiques, ainsi que des pièces intermédiaires et des flagelles mal orientés. Les anomalies acrosomiales sont également légion avec des lésions comme des grandes vacuoles, la protrusion de la matrice et le repliement de l'acrosome sur lui-même [69,88]. On note également des anomalies de la chromatine. Ces malformations n'affectent pas la mobilité des spermatozoïdes, mais le pouvoir fécondant est réduit. On cherchera donc à limiter la proportion des ces spermatozoïdes anormaux avant la congélation d'un échantillon.

IV.3.3.iii « Swim-up »

La technique de « swim-up » permet une amélioration du pourcentage de mobilité et de la mobilité progressive [58,46]. En effet, afin de compenser la réduction de mobilité infligée par la congélation, les cellules mobiles peuvent être séparées des non mobiles et des débris cellulaires. Cependant, ce procédé ne permet pas de réduire la fréquence des modifications de type capacitation ou réaction acrosomiale, or celles-ci doivent être impérativement prises en compte.

Comme vu précédemment (voir le chapitre sur la tératospermie), la technique du « swim-up » apparaît comme une méthode de choix pour sélectionner les spermatozoïdes normaux, aptes à féconder [70,46,88,61]. Cependant, elle ne permet pas de s'affranchir complètement de la tératospermie puisque des anomalies plus fines (membranaires) persistent et mettent en péril la réaction acrosomiale et la capacitation [61]. On sait que la congélation majore les lésions de membranes et ce de façon irréversible. De plus, comme nous l'avons déjà vu, les spermatozoïdes issus de chats tératospermiques sont plus sensibles aux dommages générés par le froid que leurs homologues issus de chats normospermiques [87,88].

IV.3.3.iv Lavage

Zambelli *et al.* [131] relatent le fait qu'après la procédure de « swim-up », des spermatozoïdes mobiles sont parfois présents dans le culot et non dans le surnageant comme on s'y attendrait. Ceci peut s'expliquer par la forte proportion d'anomalies morphologiques chez le chat. Les spermatozoïdes anormaux se déplaceraient moins bien et resteraient dans le culot. La mobilité diminue donc après séparation du culot et du surnageant dans certains cas. De plus, dans l'étude d'Howard *et al.* réalisée en 1993 [48], il n'y a pas de différence de résultats entre le lavage et le « swim-up » : la mobilité, le SMI, le taux de fécondation et le taux de division sont semblables après les deux traitements.

IV.3.3.v Dilution

La dilution se fait à température ambiante, soit environ 20°C. La concentration finale doit permettre, comme nous le verrons plus tard, d'obtenir une dose fécondante dans une paillette. Cela correspond à une concentration d'environ 50 millions de spermatozoïdes par ml, soit 3,5 millions par paillette. On dilue généralement jusqu'à atteindre 200µL [131].

IV.3.4 Unités de congélation

Trois types de conditionnement de la semence en vue de la congélation, sont répandus à travers le monde : les ampoules de 1mL, les « pellets » contenant 0,03 à 0,86mL et des paillettes de 0,25 à 1,2mL. Les ampoules sont à l'origine prévues pour une congélation lente. Les pastilles ou « pellets » sont des boulettes de matières premières congelées en la forme de petites billes sur un bloc de glace carbonique [124]. Les paillettes peuvent être immergées directement dans l'azote liquide à -196°C. La méthode des paillettes est la plus utilisées en France [60]. Cependant, elle impose plus de contraintes de stockage et d'utilisation [79].

La congélation en paillettes donne d'aussi bons, voire de meilleurs résultats que la congélation en « pellets » [83]. En effet, la mobilité (respectivement 67,0% et 66,2%) et les anomalies acrosomiales (27,4% et 28,6%) sont similaires avec les deux moyens de stockage [124,83]. Cependant ces résultats sont difficilement comparables car les auteurs n'ont pas utilisé le même protocole de congélation.

IV.3.5 Vitesse de refroidissement

IV.3.5.i Refroidissement

Rappelons que nous avons vu dans le chapitre sur la réfrigération que la vitesse de refroidissement idéale n'est pas établie avec certitude. Une vitesse lente (3 à 4°C/min) semble plus adaptée, mais certains auteurs n'ont pas trouvé de différence significative entre les dommages cellulaires causés par les différentes vitesses de refroidissement.

Le même bilan est donné par l'étude d'Axnèr *et al.* [6] : les dommages provoqués par le refroidissement sont négligeables devant ceux induit par la congélation.

Le refroidissement conduit la semence à une température de +5°C. Une période d'équilibration à 5°C de 20 minutes environ est nécessaire à la stabilisation des membranes et à la pénétration du glycérol dans la cellule. Les pastilles et les paillettes autorisent des vitesses de congélation plus rapides que les ampoules dont le rapport surface sur volume est plus faible. De plus, la vitesse de refroidissement doit varier inversement à la concentration de glycérol ajoutée [60].

IV.3.5.ii Congélation

La congélation est un processus possible quelque soit la méthode de récolte de la semence.

Chez la plupart des mammifères, on expose le sperme mis en paillette à la vapeur d'azote pendant 10 à 30 minutes avant de le plonger dans l'azote liquide où il sera stocké (-196°C).

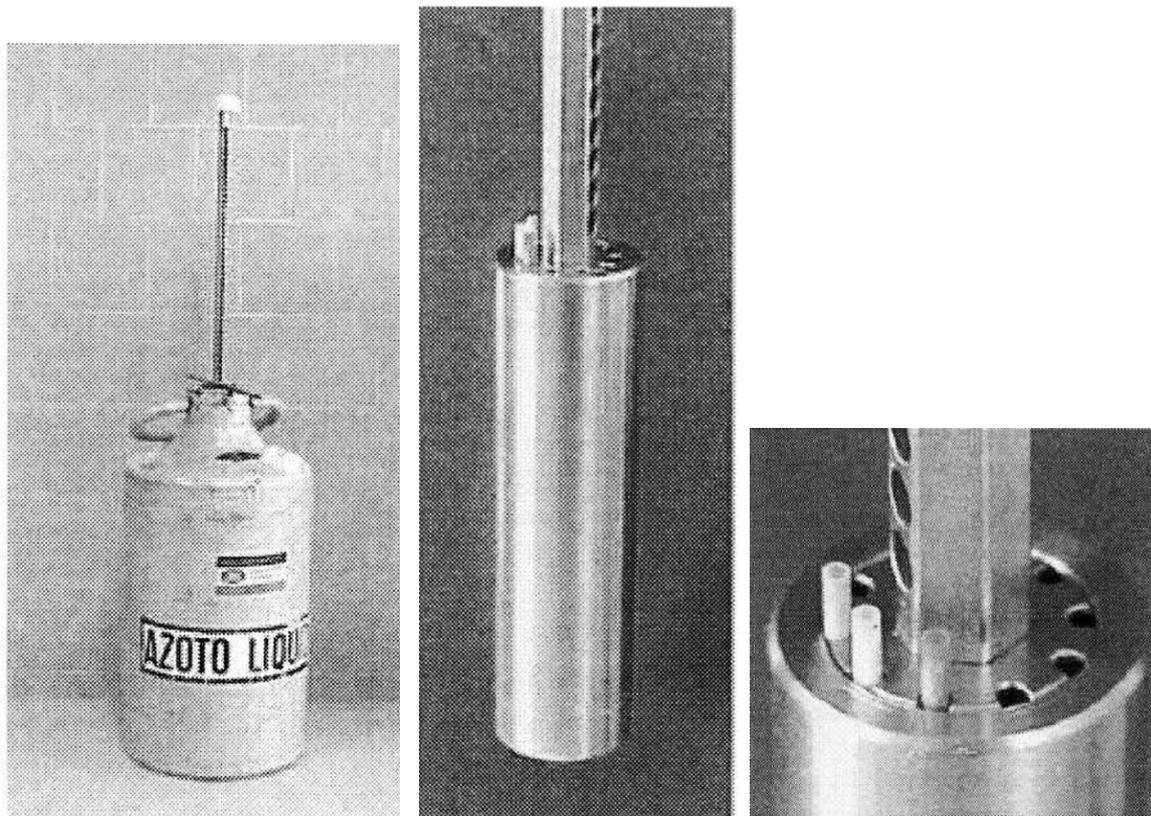
Il semble que la vitesse de refroidissement adaptée pour la congélation du sperme de chat soit -10°C/min de +5°C à -80°C avant immersion dans l'azote liquide [83]. Cependant, il a été récemment montré qu'une vitesse de refroidissement plus lente (3,85°C/min) de +5°C à -40°C donnait un meilleur résultat avec une plus grande mobilité et moins d'anomalies morphologiques. Cette vitesse a été comparé à des vitesses plus rapides (de 9°C/min à 43°C/min) [129]. Ces résultats prouvent que de plus amples études sont nécessaires à la mise au point d'une vitesse de refroidissement optimum pour la congélation du sperme de

chat. On considérera dans l'état actuel des recherches qu'il est suffisant de suspendre la paillette à 4 ou 5 cm au dessus de l'azote liquide, puis de l'immerger une fois la température de -40°C atteinte.

En ce qui concerne la méthode des « pellets », il suffit de pipeter une goutte de semence et de la déposer dans une rainure de 3 mm faite dans un bloc de glace carbonique. Après 3 minutes, le bloc est retourné et les « pellets » plongés dans l'azote liquide.

Les paillettes, « pellets » et ampoules peuvent être conservés dans l'azote liquide pendant des mois, voire des années (Photo 17).

Photo 17: Entreposition des paillettes dans un cylindre d'acier à différentes distances de l'azote liquide (exposition à différentes vitesse de refroidissement) et immersion dans l'azote liquide quand la température de -40°C est atteinte [129]



IV.3.6 Décongélation

On décongèle habituellement la paillette rapidement jusqu'à 35°C en l'immergeant dans un bain-marie.

Nelson *et al.* [69] ont prouvé que le réchauffement rapide dans un bain-marie à 50°C pendant 10 secondes était plus efficace en comparaison avec le réchauffement à température ambiante ou dans un bain-marie à 36°C pendant 2 minutes ($p=0,007$).

En effet, une décongélation lente donne lieu à des phénomènes de recristallisation intracellulaire et d'augmentation de la taille des cristaux existants. La décongélation doit donc être conduite rapidement [60].

Les ampoules peuvent être réchauffées plus lentement, dans un bain de glace pendant 10 minutes, avant le transfert de la semence pour l'insémination.

Les « pellets » sont réchauffés rapidement, en les plongeant dans une solution saline à 0,9% maintenue à 37°C [44].

On préconise de séparer le glycérol de la semence après réchauffement par centrifugation (300g pendant 8 minutes) [134].

Toutes les informations pratiques nécessaires à la congélation de semence féline sont résumées dans l'annexe 7 (Annexe 7 : Congélation de semence féline).

IV.4 Caractéristiques de la semence après traitement

IV.4.1 Spermogramme

Il est bien établi que la congélation et la décongélation du sperme affectent de façon importante la mobilité et la morphologie de l'acrosome. Les résultats des différentes études sont présentés dans le Tableau 20. La mobilité diminue de 20 à 50% selon les études et les anomalies d'acrosome augmentent de 15 à 30% [82,8]. Dans l'étude de Luvoni *et al.* [62], les anomalies de l'acrosome ont été détectées par le test à la chlorotétracycline, contrairement aux autres expérimentations. Nous avons vu précédemment que la méthode utilisant la chlorotétracycline était plus sensible.

Tableau 20 : Congélation du sperme de chat : mobilité après réchauffement et intégrité de l'acrosome des spermatozoïdes congelés (éjaculés et épидидymaires) selon différents protocoles.

Sperme	Mobilité (%)		Intégrité de l'acrosome (%)		Meilleur traitement			Etudes
	Frais	Réchauffé	Frais	Réchauffé	Dilueur	Jaune d'œuf	Glycérol	
Ejaculé	87 ±5	44 ±4	92 ±2	62 ±3	TEST	20%	5%	[82,83]
	82 ±8	62 ±11	93 ±4	77 ±4	Tris	20%	4%	[129]
	87,9 ±7	53 ±11	8 ±3	26 ±9	Tris	20%	3%	[8]
	87,5	30	--	--	Tris	20%	7%	[113]
Epididymaire	76 ±2	52 ±3	67 ±6	21 ±5	Tris	20%	3%	[40]
	59 ±14	61 ±19	67 ±15	35 ±22	Tris + 0,5% Equex	20%	5%	[6]
	76 ±10	53 ±9	46 ±15	28 ±13	TEST	15% LDF	7,5%	[58]
	65 ±10	47 ±14	<5	<5	TEST	15% LDF	7,5%	[97]
	79 ±2	53 ±3	--	--	TEST	20%	5%	[103]
	67 ±5	24 ±4	--	--	Tris	20%	7%	[115]
	83 ±1	53 ±4	22 ±0	95 ±2	Tris	20%	3%	[62]

Ces résultats montrent que les spermatozoïdes issus de l'épididyme ou éjaculés ont une mobilité similaire, comme nous l'avons déjà vu précédemment. Cependant, la proportion d'acrosome intact est plus faible en ce qui concerne les spermatozoïdes épididymaires et cette différence s'accroît encore après congélation-réchauffement.

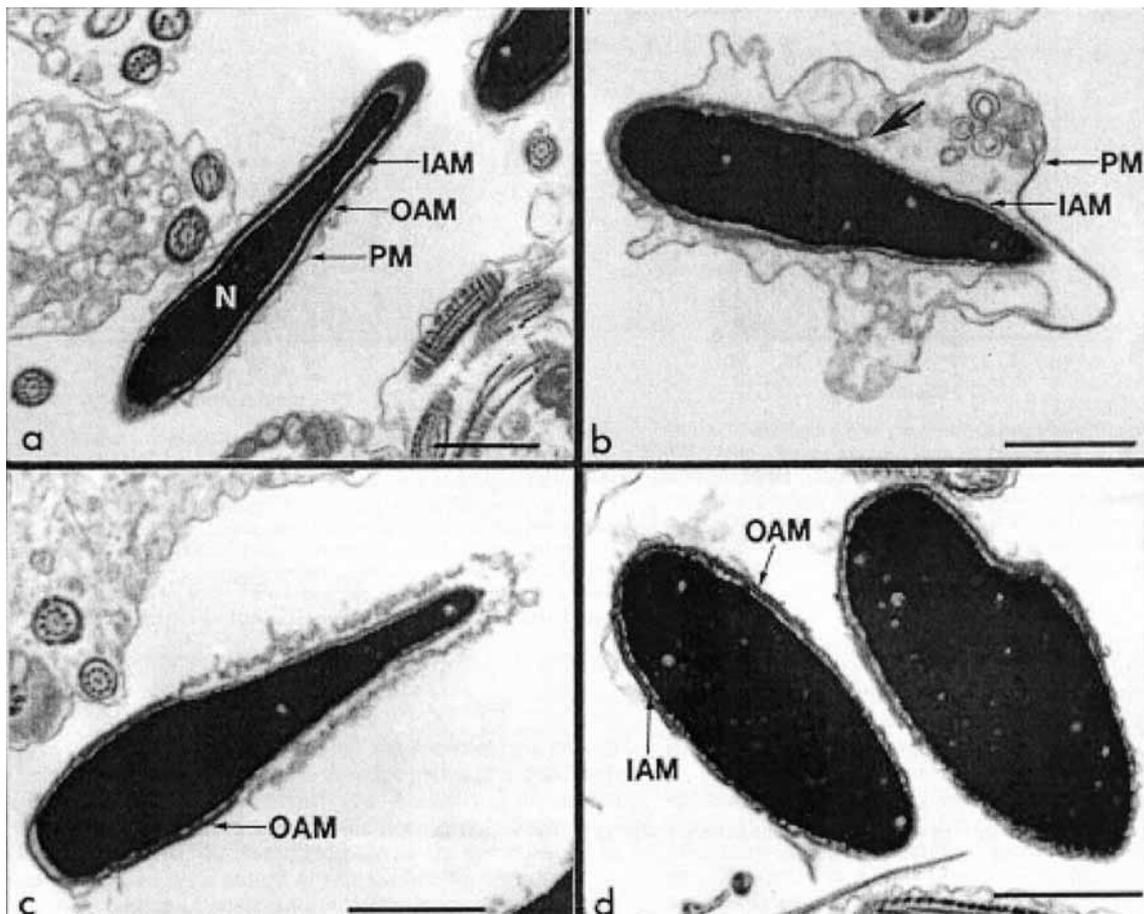
Les acrosomes des spermatozoïdes d'origine épididymaire semblent donc être plus sensibles à la congélation et au réchauffement que les spermatozoïdes éjaculés.

Ces résultats sont à considérer avec précaution car les méthodes d'évaluation de l'intégrité de l'acrosome employées varient d'une étude à l'autre : coloration rapide au vert FCF et rose Bengale [83,129,40], rouge Congo, tanin et bleu de crésyl brillant [58], agglutinine de cacahuète conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine [6], chlorotétracycline [62] et SpermactM [8,97]. De plus, aucune différence de cryotolérance de l'acrosome n'a été significative. Il n'en demeure pas moins que la baisse de mobilité et d'intégrité de l'acrosome sont les facteurs limitant à la congélation du sperme de chat [52].

Une étude [109] plus récente donne des résultats contradictoires. En effet, Tebet *et al.* a montré en 2006 qu'il n'existait pas de différence de statut acrosomial après congélation entre les spermatozoïdes épididymaires et les spermatozoïdes éjaculés. Dans cette étude, l'augmentation des anomalies de l'acrosome après congélation est la même quelque soit l'origine de la semence (19%). On observe cependant, une diminution des anomalies morphologiques des spermatozoïdes épididymaires après congélation. Ceci peut s'expliquer par la perte, pendant la centrifugation à 300g, des gouttelettes cytoplasmiques distales dont nous avons vu qu'elles sont le signe de cellules immatures.

Les anomalies les plus souvent retrouvées, quelque soit l'origine de la semence, sont la distension de la membrane externe de l'acrosome avec ou sans altération de l'acrosome lui-même, l'apparition de vésicule, la fusion des membranes plasmiques et acrosomiale externe ou la perte totale de ces deux membranes (Photo 18) [109].

Photo 18: Examen des dommages acrosomiaux provoqués par le choc thermique ($\times 16\,000$, trait = $1\ \mu\text{m}$) [86]



a : plasma et des membranes acrosomiales intactes (N : noyau ; PM : Plasmalemme ; OAM : membrane acrosomiale externe ; IAM : membrane acrosomiale interne) ; b : plasmalemme intact, mais distendu et plusieurs vésicules internes (flèche : rupture de la membrane acrosomiale externe) ; c : nombreuses vésicules dans l'acrosome et absence complète de plasmalemme ; d : perte totale de la membrane acrosomiale externe et du contenu acrosomial

On peut cependant conclure que le protocole de congélation doit être adapté au mode de prélèvement utilisé. Par exemple, les interactions qui peuvent se produire entre les spermatozoïdes et les facteurs stabilisateurs de membrane potentiellement présents dans le plasma séminal sont à étudier [63].

Le meilleur critère d'évaluation reste le taux de fécondation. Cependant, Zambelli *et al.* [131] ont prouvé l'existence d'une corrélation ($p < 0,05$) entre le SMI (index de mobilité des spermatozoïdes) après réchauffement et le taux de pénétration des ovocytes. On peut donc considérer le SMI comme un critère représentatif du potentiel fécondant des spermatozoïdes après réchauffement.

IV.4.2 Capacité à lier et à pénétrer la zone pellucide

Plusieurs études ont été menées sur des spermatozoïdes d'origine épидидymaire. En effet, il est aisé de transporter les épидидymes réfrigérés au laboratoire pour analyse directement après la stérilisation [37].

Nous avons vu que le refroidissement en lui-même induit une baisse de mobilité. De plus, la morphologie des spermatozoïdes et la viabilité sont conservées. Cependant la pénétration d'ovules d'hamster et la liaison à la zone pellucide d'ovocytes de chatte sont plus fréquentes avec les spermatozoïdes conservés au froid, ce qui montre que les cellules germinales ont subi d'importantes lésions acrosomiales [37]. L'interaction accrue avec la zone pellucide est due à des modifications de la tête comme nous l'avons vu précédemment (capacitation, réaction acrosomiale). Or l'intégrité de l'acrosome est un facteur limitant au potentiel fécondant des spermatozoïdes, une détérioration de celui-ci entraîne donc une baisse du potentiel fécondant.

Dans une autre étude, du sperme d'origine épидидymaire a été congelé dans du diluant Tris avec 20% de jaune d'œuf, 3% de glycérol et différents saccharides (lactose, fructose ou glucose). Après réchauffement, la perte de mobilité variait de 24% pour le sperme congelé directement après prélèvement, à 34% pour le sperme congelé ayant été conservé au préalable 12 heures dans les épидидymes maintenus à 4°C. Les anomalies morphologiques ont augmenté de 17 à 18% et 80% des acrosomes étaient anormaux après réchauffement [40]. De même, la liaison à la zone pellucide était plus forte (>80 spermatozoïdes/cellule) et la pénétration absente.

Dans l'espèce canine, il a été montré que le refroidissement et la congélation, qu'on ajoute ou non du glycérol à 4%, diminuait la pénétration de la zone pellucide [41] : $5,2 \pm 1,1$ spermatozoïdes par ovule pour la semence fraîche contre $2,4 \pm 0,6$ et $3,6 \pm 0,9$ pour la semence congelée refroidie, respectivement, rapidement et lentement.

La congélation augmente la liaison à la zone pellucide par détérioration de l'acrosome et diminue son taux de pénétration pour la même raison.

IV.4.3 Capacitation

Nous avons vu précédemment que la capacitation du sperme de chat est rapide puisqu'elle ne nécessite que 2 heures d'incubation. De plus, il ne semble pas nécessaire de séparer les gamètes du plasma séminal. Il y aurait donc absence de facteurs anti-capacitants. Cependant, chez le Tigre de Sibérie (*Panthera tigris*), la séparation du diluant est une condition nécessaire à la capacitation. De plus, dans cette espèce, le temps d'incubation requis diminue après congélation et réchauffement [18].

Certaines études suggèrent pourtant la présence de facteurs stabilisateurs d'acrosome. En effet, le sperme épидидymaire serait plus sensible au choc thermique par rapport au sperme éjaculé car il ne disposerait pas de ces composés. Les facteurs en question n'ont cependant pas été identifiés dans l'espèce féline comme c'est le cas chez la souris et le lapin [40].

IV.4.4 Taux de fécondation et taux de gestation

Le taux de fécondation reste l'indicateur le plus fiable, cependant, les taux de fécondation *in vitro* et *in vivo* ne sont pas toujours corrélés [93].

Zambelli *et al.* obtinrent un taux de fécondation *in vitro* de 83,8% [131] au 7^{ème} jour d'incubation.

Un taux de gestation de seulement 10% est rapporté par Platz *et al.* en 1978 [79]. Il avait utilisé une semence congelée-réchauffée déposée directement dans le vagin, contrairement à Howard en 1999 [45] qui n'avait obtenu aucun résultat en pratiquant des inséminations vaginales chez des grands félins sauvages.

IV.5 Dose fécondante nécessaire à l'insémination artificielle

On obtient des fécondations *in vitro* avec des doses comprises entre $5 \cdot 10^6$ et $3 \cdot 10^8$ spermatozoïdes/ml (Tableau 21) [102]. En pratique courante, $50 \cdot 10^6$ cellules par dose de 0,1 ou 0,2 ml donnent de bons résultats [101]. Il est conseillé de déposer 50 à $100 \cdot 10^6$ spermatozoïdes mobiles lorsque l'on utilise de la semence congelée. Or des éjaculats prélevés dans un vagin artificiel ou par électro-éjaculation n'en contiennent que 60 et 30 millions respectivement. Par conséquent, il est généralement nécessaire d'ajouter plusieurs éjaculats d'un même reproducteur pour constituer des doses suffisantes. En pratique, cela ne pose pas de grandes difficultés puisque l'on peut prélever 4 voire 5 électro-éjaculats en une séance sur un même chat.

Tableau 21 : Nombre de chattes gestantes en fonction du nombre de spermatozoïdes inséminés d'après Sojka 1970 [102]

Nombre de spermatozoïdes inséminés (.106)	Nombre de chattes inséminées	Nombre de chattes gestantes	Nombre de chatons pas portée
0,5	3	0	-
1,25	3	1	3
5,0	7	3	4
10,0	7	4	3
25,0	6	3	2
50,0	6	4	2

Il faut cependant prendre en compte la technique d'insémination utilisée. En effet, la dose fécondante varie avec la technique pratiquée. Platz *et al.* [79] rapportent une dose de 50 à 100 millions de spermatozoïdes pour l'insémination intra-vaginale. Tanaka *et al.* [108] proposent 80 millions de spermatozoïdes, ce qui correspond à deux éjaculats [107] et Tsutsui *et al.* [113,112,114] conseillent une dose de 8 millions de spermatozoïdes pour l'insémination intra-utérine. Swanson *et al.* inséminent en intra-utérin avec $2 \cdot 10^5$ spermatozoïdes mobiles [106].

On peut conclure que 50 millions de spermatozoïdes mobiles sont nécessaires à la fécondation chez le chat, or nous avons vu qu'un éjaculat moyen n'en contenait que 30 millions. Par conséquent il est nécessaire d'ajouter plusieurs éjaculats avant congélation comme nous l'avons vu précédemment. Cette condition s'avère d'autant plus nécessaire que le processus de congélation amoindrit la qualité de la semence. Dans l'optique de la création d'une banque de sperme de chat, il apparaît donc nécessaire de répéter les prélèvements dans le temps afin d'obtenir un maximum de sperme à congeler surtout si celui-ci est de mauvaise qualité.

Il n'existe pas de protocole de congélation défini pour la semence de chat. En effet, beaucoup de données se contredisent quant aux dommages infligés par le choc thermique surtout, et par le stress oxydatif dans une moindre mesure. La mobilité après congélation est réduite et les anomalies morphologiques sont plus fréquentes. On note une forte proportion de lésions acrosomiales perturbant la capacitation et réduisant le potentiel fécondant. La sensibilité aux solutions hypo-osmotiques est avérée, cependant, aucun diluant type ne s'est encore imposé. Le milieu Tris, le jaune d'œuf, l'acide citrique et des antibiotiques tels que la streptomycine et la pénicilline semblent être le mélange le plus adapté à la dilution de la semence de chat. Certains auteurs lui préfèrent le milieu de Hancock et Gledhill [129,133], le milieu BWB [47,46] ou encore le milieu Ham's F10 [106]. La présence d'énergie sous forme de sucres (glucose, mannose, fructose, lactose) n'est pas nécessaire tout comme l'ajout de composés stimulants (caféine, pentoxiphylline). La supplémentation en antioxydants (vitamine E, sélénium, taurine) est controversée. On procède au « swim-up » pour les éjaculats de chats tératospermiques afin d'augmenter le pourcentage de formes normales. Le lavage s'avère aussi efficace. La centrifugation à 300 ou 500g permet de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal, même si la présence de facteurs anti-capacitants n'a pas été mise en évidence chez le chat. On préférera une vitesse de refroidissement lente jusqu'à +5°C (3°C/minute) afin de minimiser les dommages cellulaires liés au choc thermique. Une période de stabilisation à +5°C d'environ 20 minutes permet au cryoprotecteur faiblement concentré de pénétrer les cellules (glycérol ou DMSO à 4% ou 5%). Le conditionnement de la matière première se fait en « pellets », ampoules ou paillettes. Ce dernier choix s'avère le plus judicieux, puisqu'il fournit les meilleurs résultats. La vitesse d'abaissement de la température pour la congélation est de -10°C par minutes de +5°C à -40°C. Ensuite la semence est plongée dans l'azote liquide et peut être conservée ainsi plusieurs mois, voire plusieurs années. Le réchauffement se fait rapidement dans un bain-marie à 37°C. Le glycérol est alors séparé de la dose d'insémination. Une incubation d'environ 2 heures permet à elle-seule la capacitation des spermatozoïdes. L'ajout de composés capacitants n'est pas nécessaire. L'insémination d'une dose de 50 millions de spermatozoïdes mobiles doit permettre la fécondation. Il faut cependant tenir compte de la méthode d'insémination qui fait varier la dose fécondante.

RapportGratuit.com

Deuxième partie:

Etude expérimentale d'un protocole de prélèvement et de conservation de semence féline

I. Objectifs

Nos objectifs consistent en l'établissement d'un protocole de congélation de semence féline, reproductible et abordable en pratique courante. L'objectif ultime étant la création d'une banque de sperme félin au sein du CERCA, nous avons volontairement simplifié les différentes étapes que nous avons décrites dans la partie bibliographique pour les rendre plus rapides et plus reproductibles. En effet, le spermogramme complet, tel que nous l'avons décrit dans la première partie nécessite l'emploi de techniques coûteuses et longues qu'il est illusoire de vouloir utiliser en routine au CERCA (Chlortétracycline, ionophore calcique, etc.). Notre protocole pourra également être adapté ultérieurement à la conservation de la semence de grands félins sauvages dans le cadre des programmes de sauvegarde dont ils font l'objet.

II. Matériel et méthode

II.2 Animaux

Nous avons prélevé 13 éjaculats sur 7 chats. Nous disposions de 4 chats appartenant à la chatterie du CERCA (type siamois) et âgés de 9 mois à 2 ans et de 3 chats errants, présentés pour stérilisation dans un refuge, d'environ 2 à 5 ans. 3 des chats de laboratoire ont pu être prélevés à trois reprises, le quatrième n'a été prélevé qu'une fois. Les chats errants ont été castrés après l'unique prélèvement. La population des chats prélevés est présentée dans le tableau 22.

Tableau 22 : Individus prélevés (• Les chats ont continué leur croissance au fur et à mesure des différents prélèvements).

Individus	Chat CERCA 1	Chat CERCA 2	Chat CERCA 3	Chat CERCA 4	Chat errant 1	Chat errant 2	Chat errant 3
Origine	CERCA	CERCA	CERCA	CERCA	inconnue	inconnue	inconnue
Age	9 à 11 mois	9 à 11 mois	9 à 11 mois	1 an et 9 à 10 mois	5 ans environ	2 ans environ	2 ans environ
Poids	4,0 à 4,5 Kg•	3,8 à 4,2 Kg•	3,7 à 4,3 Kg•	4,5 Kg	4,0 kg	4,2 kg	3,8 Kg

II.3 Prélèvement du sperme

II.3.1 Protocole opératoire

II.3.1.i Cathétérisme urétral

Nous avons utilisé la méthode de prélèvement par cathétérisme urétral après administration de médétomidine décrite par Zambelli *et al.* [129,130,134]. Nous avons privilégié cette méthode car elle nous a semblé la plus rapide et la plus facile à mettre en place en routine au sein du CERCA. En effet, cette méthode ne requiert qu'un faible niveau de technicité. Nous ne possédons certes pas encore suffisamment de recul sur cette nouvelle méthode, mais celle-ci semble très prometteuse aux vues des résultats publiés par Zambelli *et al.* La médétomidine est injectée par voie intramusculaire à la dose de 140µg/Kg soit 0,15 de

Dexdomitor® par kilo. Nous utilisons un cathéter urétral pour chat de 11 cm de long (Portex Jackson®, dlc, 3 French), sectionné dans sa partie distale à 9 cm de l'autre extrémité. Le cathétérisme s'effectue très rapidement : on introduit le cathéter dans l'urètre après l'avoir éventuellement humidifié avec une goutte de NaCl stérile et on l'en ressort quasi-instantanément. Sur les chats du CERCA cette même technique a été utilisée mais avec un cathéter plus court (de 7cm à 8,5 cm de long) afin d'adapter le cathéter à l'anatomie de plus petite taille de ces jeunes animaux.

II.3.1.ii Electro-éjaculation

Nous avons voulu comparer les résultats obtenus par cette première méthode avec ceux obtenus par électro-éjaculation, qui reste la méthode de choix comme nous l'avons vu précédemment. Seuls 3 chats du CERCA ont été prélevés ainsi.

L'anesthésie est réalisée à l'aide d'un mélange de médétomidine à la dose 80 µg/Kg SC et de kétamine à la dose de 5 mg/Kg administrée par voie intramusculaire.

Le protocole utilisé est celui décrit par Howard [46,28]. Il est rappelé dans le Tableau 23.

Tableau 23 : Protocole d'électro-éjaculation selon Howard et al. [46,28]

	Série 1			Série 2			Série 3	
Stimulations	10	10	10	10	10	10	10	10
Voltage (V)	2	3	4	3	4	5	5	6

On augmente le voltage en 3 secondes, puis on reste au voltage voulu pendant 2 à 3 secondes et on revient à 0V en 3 secondes avant de recommencer la manipulation pour le voltage suivant. On attend 2 à 5 minutes entre chaque série [46].

II.3.1.iii Flush épидидymaire

Nous avons également prélevé de la semence directement dans l'épididyme chez un des animaux castrés au refuge. Après l'exérèse des gonades, l'épididyme est disséqué et flushé (Voir chapitre II.1.3 page 42) à l'aide du milieu de 1^{ère} dilution (Tableau 23).

II.3.2 Fréquence de prélèvement

Les chats du CERCA ont été prélevés à une fréquence ne dépassant pas la récolte hebdomadaire. Les chats CERCA 1, 2 et 3 ont été prélevés le 10 mars et le 9 avril 2008 par cathétérisme urétral et le 18 mars 2008 par électro-éjaculation. Les chats errants et le chat CERCA 4 n'ont pu être prélevés qu'une seule fois (de mars à juin). On ne prélève qu'un seul éjaculat par récolte et par chat.

II.4 Analyse du sperme

L'analyse de la semence se fait immédiatement après sa récolte et dans un second temps, immédiatement après sa décongélation.

On repère macroscopiquement toute discoloration, signe d'une contamination urinaire ou sanguine.

Le volume de l'éjaculat est mesuré selon son occupation dans le cathéter. Les éjaculats collectés par électro-éjaculation sont mesurés à l'aide d'une pipette graduée (100µL).

Avant de procéder au spermogramme, on dilue la semence dans le milieu de 1^{ère} dilution dont la composition est détaillée ci-dessous dans le tableau 24 (qsp 200µL).

La mobilité est évaluée par microscopie optique au grossissement ×40. On calcule le pourcentage de spermatozoïdes fléchants.

La concentration cellulaire est évaluée grossièrement et intuitivement par microscopie optique au grossissement ×40.

On dénombre également le pourcentage de formes anormales.

Afin d'éviter une variation des résultats du fruit de différents manipulateurs, j'ai réalisé moi-même systématiquement ces trois dernières étapes.

II.5 Conservation du sperme

II.5.1. Milieux de conservation

Nous avons utilisé pour la seconde dilution le milieu proposé par Tsutsui *et al.* [113] avec quelques-unes des modifications apportées par Zambelli *et al.* [129,134]. En effet, nous avons vu dans la première partie que la concentration en glycérol utilisée par Tsutsui *et al.* était trop élevée (8%) et possédait des effets néfastes. La composition de ces milieux est rappelée dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Composition des milieux de dilution utilisés

	1 ^{ère} dilution	2 ^{ème} dilution
Acide citrique	1,30 g	idem
Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane	2,40 g	idem
Fructose	1,00 g	idem
Potassium de pénicilline	100 000 U	idem
Sulfate de streptomycine	0,10 g	idem
Glycérol (concentration finale)	-	4-5% soit 8 mL
jaune d'œuf	20 ml	idem
Eau distillée (qsp volume final)	100 ml	idem

II.5.2 1^{ère} dilution

On dilue la semence qsp 200µL dans le milieu de 1^{ère} dilution, immédiatement après la récolte, et ce avant même d'effectuer le spermogramme et/ou le transport de la semence. Cette dilution est effectuée à température ambiante quel que soit le nombre initial de spermatozoïdes.

II.5.3 Transport

Les échantillons prélevés au refuge ont été transportés dans une bouteille thermos à +5°C pendant environ 1 heure avant d'être congelés. Les échantillons prélevés au CERCA n'ont pas été transporté.

II.5.4 Traitement pour améliorer la qualité de la semence : la centrifugation

On centrifuge à 700g (Tour par minute) pendant 8 minutes afin de séparer les spermatozoïdes du plasma séminal.

II.5.5 2^{ème} dilution

On dilue la semence dans le milieu de 2^{ème} dilution (qsp 200µL) à température ambiante. La composition du milieu est reportée dans le tableau 24.

II.5.6 Réfrigération

On abaisse lentement la température du prélèvement jusqu'à +5°C. Les échantillons sont déposés directement dans le réfrigérateur à +5°C (température contrôlée). Une période d'équilibration de 20 minutes à +5°C est respectée [6,60].

II.5.7 Conditionnement et congélation

On conditionne la semence dans des paillettes de 0,25mL.

On suspend les paillettes à 4 cm de l'azote liquide pendant 10 minutes avant de les immerger. La vitesse de congélation est donc d'environ -10°C/min de +5°C à -40°C. Aucun indicateur thermique ne nous permet toutefois de certifier ces données chiffrées : nous nous référons aux données bibliographiques déjà connues. La température de conservation dans l'azote liquide est de -196°C. Les paillettes sont entreposées pendant au maximum 1 mois.

II.5.8 Décongélation

On décongèle les paillettes rapidement par immersion dans un bain-marie à +35°C pendant 30 secondes. On sépare immédiatement le glycérol de la semence par centrifugation à 700g pendant 8 minutes [129,134]. Une paillette a été décongelée le jour même et une autre un mois après. Les résultats obtenus sont les mêmes quelle que soit la durée de congélation.

III. Résultats

Les résultats des spermogrammes avant et après congélation sont regroupés dans les Tableaux 25, 26 et 27.

Tableau 25 : Spermogramme de la semence après prélèvement par cathétérisme urétral (•Contamination urinaire, # non renseigné car semence de trop mauvaise qualité pour être congelée).

	Chat CERCA 1		Chat CERCA 2		Chat CERCA 3		Chat CERCA4	Chat SPA 1	Chat SPA 2	Chat SPA3
	non	oui•	non	oui•	non	oui•	non	non	oui•	non
Volume	#	#	#	#	#	#	#	#	#	0,100mL
% Mobilité	30%	0	-#	0	0	0	0	0	0	80%
Concentration cellulaire	++++	0	0	+/-	+	+++	+	+++	++	++++
% Spermatozoïdes normaux	5-10%	#	#	50%	70%	80%	50%	80%	70%	90%

Tableau 26 : Spermogramme de la semence après prélèvement par électro-éjaculation (# non renseigné car semence de trop mauvaise qualité pour être congelée).

	Chat CERCA 1	Chat CERCA 2	Chat CERCA 3
Discoloration	non	non	non
Volume	#	#	#
% mobilité	10-20%	#	0
Concentration cellulaire	++++	0	+/-
% spermatozoïdes normaux	10%	#	70%

Tableau 27 : Spermogrammes comparés avant et après congélation (prélèvement par cathétérisme urétral).

	Chat SPA 3	
	Avant congélation	Après congélation
Discoloration	non	non
Volume	0,1 mL	Dilué qsp 200 µL
% mobilité	80%	60%
Concentration cellulaire	++++	idem (dilué)
% spermatozoïdes normaux	90%	idem

Sur 10 chats prélevés, 8 ont éjaculé par injection de médétomidine et 3 chats sur 3 ont éjaculé par électro-éjaculation.

1 prélèvement a été effectué par flush épидидymaire après castration (Chat SPA 1). Aucun spermatozoïdes n'a été récupéré par cette dernière technique, pratiquée une heure après le prélèvement par cathétérisme urétral.

4 éjaculats sont contaminés par de l'urine lors de prélèvements par cathétérisme urétral. C'est le cas de 3 chats du CERCA qui sont des jeunes individus de petit format (type siamois).

Devant ces résultats décevants, nous avons fait l'essai de prélever ces jeunes animaux avec un cathéter plus court (de 7 à 8,5 cm). Les résultats ont été similaires.

Nous avons obtenu 4 éjaculats tératospermiques et au total 12 prélèvements sur 13 n'ont pas montré un spermogramme de qualité suffisante pour être congelés (tératospermie, contamination urinaire, % mortalité, etc.). En outre, 4 échantillons sur 13 sont contaminés par de l'urine. Les essais pratiqués avec des cathéters plus courts (7 à 8,5 cm) donnent des résultats similaires en termes de contamination urinaire.

Au total, 1 seul échantillon a été congelé et décongelé avec succès.

En effet, notre but était d'obtenir une dose fécondante par paillette. Après décongélation, la paillette présentait assez de spermatozoïdes mobiles pour permettre le succès d'une insémination artificielle par voie intra-utérine. Cependant, on note que le pourcentage de mobilité passe de 80% avant la congélation à 60% après la décongélation.

IV. Discussion

L'étude du contexte bibliographique actuel nous a permis de mettre en lumière les différents aspects d'ores et déjà maîtrisés en matière de reproduction féline assistée.

On dispose de données anatomiques précises, mais certains points de physiologie restent en suspens. En effet, l'âge de la puberté chez le chat est mal défini et certaines questions quant à la régulation neurochimique de l'érection-éjaculation restent à explorer. En outre, le déterminisme nerveux et multifactoriel de l'érection-éjaculation, ainsi que les particularités anatomiques liées à l'espèce (pénis interné) rendent le prélèvement de sperme difficile.

Il existe cependant plusieurs techniques de prélèvements de semence féline ayant fait leurs preuves. La méthode de choix reste l'électro-éjaculation. Le cathétérisme urétral après injection de médétomidine semble plus rapide et plus aisé, mais nous manquons de recul sur cette nouvelle technique prometteuse pour laquelle nous ne disposons que des publications de Zambelli *et al.* [134,132]. Le flush et l'aspiration épидидymaire restent exploitables dans le cas d'animaux morts ou fraîchement stérilisés.

L'examen de la semence en routine peut s'avérer difficile : certaines techniques sont peu disponibles et/ou très coûteuses et le potentiel fécondant n'est pas toujours corrélé aux résultats fournis par le spermogramme. L'examen de l'éjaculat révèle une semence concentrée, de très faible volume et présentant de grandes proportions de formes anormales. La tératospermie est en effet une affection très répandue au sein de l'espèce féline, ainsi que chez les grands félins sauvages. L'étiologie de cette anomalie reste encore inconnue chez le chat domestique. On soupçonne cependant la diminution de la variabilité génétique due à la consanguinité chez certains félins. En outre, les principales anomalies morphologiques affectent l'acrosome et sont donc susceptibles d'altérer le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

La semence féline est donc relativement difficile à prélever et elle est fréquemment de très mauvaise qualité. De plus, elle semble particulièrement sensible aux chocs osmotique et thermique. Il apparaît donc primordial d'améliorer la qualité de la semence avant tout traitement : dilution, centrifugation, « swim-up » (ce que nous n'avons pas effectué ici)... On préconise un refroidissement lent associé à une période de stabilisation à +5°C. La semence,

conditionnée en paillette de 0,25mL (dose fécondante= 50 millions de spermatozoïdes), sera congelée lentement et décongelée rapidement par immersion dans un bain-marie. Une incubation de 2 heures suffit à provoquer la capacitation.

Cependant, les données présentes dans la littérature ne permettent pas de mettre en évidence un milieu de dilution idéal et aucun consensus n'est atteint en matière de protocole de conservation de la semence.

De manière générale, la principale difficulté rencontrée pendant la durée de ce travail expérimental fut la pénurie d'individus. En effet, il existe peu d'individus mâles entiers disponibles puisque la castration est devenue quasi-systématique entre 5 et 6 mois. C'est pourquoi l'étude ne porte que sur 7 individus.

IV.1 Mauvaise qualité de la semence féline

IV.1.1 Tératospermie

Les différents éjaculats obtenus sont de mauvaise qualité sauf un ! Ce chat était adulte et vivait à l'état semi-sauvage. On peut penser que l'hébergement des chats du CERCA dans un milieu confiné n'est pas joué un rôle favorable à la qualité de la semence. Malgré tout, dans le même temps, le chat CERCA 4 a donné une portée par saillie naturelle sur une chatte du CERCA. Les auteurs cités dans notre première partie ont également rencontré des problèmes quant à la pauvreté de la semence féline. Cependant, il apparaît que nos résultats sont moins bons encore.

Nous pensions que la diversité d'origine des chats errants nous garantirait une semence de meilleure qualité (individus plus âgés, d'origines diverses...) que celle obtenue sur les chats de laboratoire, or ce n'a pas toujours été le cas.

3 chats du CERCA sur 4 avaient moins de 12 mois. L'âge de la puberté est mal défini chez le chat, mais on peut penser que ces individus étaient trop jeunes pour fournir une semence de qualité, même s'ils présentaient tous des spicules sur le pénis. En effet, la tératospermie est plus fréquente chez les jeunes mâles, mais peut disparaître avec l'âge. On essaiera donc de reproduire ce protocole sur ces mêmes animaux plus âgés. On peut cependant s'interroger sur la faisabilité d'une banque de sperme de chat au CERCA : les animaux présentés pour prélèvement de semence avant castration risquent d'être trop jeunes pour fournir un éjaculat de qualité, ce qui restreindrait le panel d'individus candidats aux seuls mâles d'élevage félin. C'est une des principales limites que l'étude a mis en évidence.

On peut cependant appliquer les résultats obtenus à la sauvegarde des grands félins sauvages qui ne présentent pas l'inconvénient d'être trop jeunes. Le modèle de reproduction assistée semble donc réalisable à partir de cette étude.

Il apparaît intéressant de mener de nouvelles études sur l'étiologie de la tératospermie chez le chat domestique. Dans le cas d'une origine génétique, on pourra proposer d'écarter de la reproduction les mâles tératospermiques.

Nos prélèvements ont été réalisés entre la fin de l'hiver et le printemps, ce qui est la période la plus propice à une bonne qualité de semence [50], cependant nous pourrions proposer la

mise en place d'un éclairage artificiel avant prélèvement car la photopériode semble jouer un rôle dans la qualité de la semence.

La pratique systématique d'un « swim-up » lors de semence tératospermique serait également bénéfique dans le but d'améliorer la qualité de la semence avant congélation.

IV.1.2 Contamination urinaire

4 éjaculats sont contaminés par de l'urine lors de prélèvements par cathétérisme urétral. C'est le cas de 3 chats du CERCA qui sont des jeunes individus de petit format (type siamois). Cependant, les résultats étaient similaires avec des cathéters plus courts (7 à 8,5 cm de long), ce qui n'était pas précisé dans les publications de Zambelli *et al.* Les contaminations urinaires ne semblent donc pas dues à une sonde trop longue par rapport à une anatomie de petit format. Le cathéter ne se trouvait donc pas dans la vessie, mais celle-ci s'est probablement contractée. On peut donc utiliser pour tous les animaux, même jeunes ou de petit format, la même longueur de cathéter standardisée de 9 cm.

IV.1.3 Mobilité

La mobilité de 8 éjaculats sur 13 est totalement nulle. Aucun élément ne nous permet d'expliquer cette forte mortalité des spermatozoïdes avec certitude. On peut avancer diverses hypothèses. Le milieu de dilution s'avère peut-être délétère, mais nous avons vu que c'est le milieu offrant les meilleurs résultats dans la littérature. Les animaux sont certainement trop jeunes pour fournir une semence de qualité et la pharmacologie utilisée est peut-être mal adapté.

IV.1.4 Origine probable des mauvais résultats rencontrés

Nous utilisons du Dexdomitor® et non du Domitor® comme l'a décrit Zambelli *et al.* [129,134]. Le ratio entre les deux stéréo-isomères modifie-t-il l'efficacité de la molécule sur l'émission du sperme, les propriétés du plasma séminal et la fréquence de la contamination urinaire ? L'emploi d'un stéréo-isomère moins adapté est une piste d'explication aux moins bons résultats obtenus lors de notre travail expérimental.

Nous n'avons effectué qu'un cathétérisme urétral par récolte. Il semble que la répétition du cathétérisme pendant la même période d'anesthésie nous permette d'obtenir une meilleure qualité de la semence en termes de mobilité et de formes normales (données communiquées par le CERCA, non publiées). Axnèr *et al.* avaient déjà constaté le phénomène lors de prélèvement par électro-éjaculation et l'avaient relié à un phénomène de vieillissement des cellules stockées dans l'épididyme pendant la période d'abstinence [4,5].

Une autre piste d'explication pourrait être notre inexpérience. En effet, la réalisation de ce protocole par un utilisateur novice peut s'avérer difficile. La technique de prélèvement est aisée, cependant la réalisation du spermogramme demande un peu de pratique. Les résultats auraient peut-être été meilleurs avec une période d'entraînement préalable et/ou une aide extérieure supplémentaire. Ceci met en évidence le fait que ce protocole ne sera pas applicable immédiatement en pratique courante et qu'une période d'entraînement sera certainement indiquée. Nous discuterons plus loin des milieux de dilution proposés.

IV.2 Points faibles du protocole expérimental

IV.2.1 Spermogramme

Il serait intéressant d'ajouter le calcul du SMI (voir chapitre II.2.3.i page 50) au spermogramme car nous avons vu que cette donnée était plus significative que le pourcentage de mobilité. Ce calcul est rapidement fait et il reste accessible au vétérinaire praticien courant.

Les analyses ne permettent pas de révéler les anomalies d'acrosome. Nous avons vu que ces anomalies étaient difficilement détectables par le spermogramme de routine. Elles sont cependant très fréquentes et peuvent mettre en péril le pouvoir fécondant du prélèvement. On essaiera d'incorporer à l'examen du sperme une étape avec coloration au rose Bengale et vert FCF comme décrite par Zambelli *et al.* [129,134]. Attention, ce colorant est périssable ; il est nécessaire de refaire le mélange tous les jours. Cependant, cette technique reste simple et rapide et s'inscrit bien dans notre objectif de créer un protocole utilisable en routine au CERCA.

On ne dispose pas non plus des taux de liaison et de pénétration de la zone pellucide. Ce sont pourtant les taux les mieux corrélés au pouvoir fécondant. En effet, les résultats indiqués par le spermogramme à lui seul ne sont pas toujours bien corrélés aux taux de fécondation. Cependant, aucun examen simple ne permet d'obtenir ces critères. Il est donc illusoire de vouloir les appliquer au sein du CERCA.

IV.2.2 Vitesses de refroidissement

Les températures de refroidissement n'ont pas été contrôlées de façon fiable. Or, comme nous l'avons déjà vu, les spermatozoïdes sont très sensibles aux variations rapides de température.

Il serait intéressant de disposer d'un réfrigérateur programmable et de contrôler de façon effective la température lors de la première phase de congélation, lorsque les paillettes se trouvent dans les vapeurs d'azote. Il semble également plus judicieux d'allonger le temps (environ 1h et non 10 minutes) de cette même phase pour garantir une vitesse de congélation suffisamment lente [60,83].

IV.2.3 Milieux de dilution

Le milieu de 2^{ème} dilution utilisé contient du glycérol dosé à 4%. Il est ajouté avant le refroidissement, or nous avons vu qu'il pouvait être responsable de lésions membranaires. Mieux vaut l'incorporer à basse température.

Les deux milieux présentés sont en accord avec les données bibliographiques actuelles. On peut donc penser qu'ils sont adaptés à la semence féline et qu'ils ne sont pas responsables des mauvais résultats du spermogramme. En effet, on dilue la semence avec le premier milieu avant même d'effectuer le premier examen du sperme : on pourrait penser que les caractéristiques de la semence sont modifiées. Cependant, il apparaît impossible d'effectuer le spermogramme avant dilution. Les volumes des éjaculats sont si faibles qu'on sacrifierait la totalité de l'échantillon à son examen, ce qui ne comporte aucun intérêt.

On peut cependant penser que l'ajout d'Equex® à 0,5% comme le décrivent Zambelli *et al.* [129,134] améliorerait la mobilité après décongélation. Une coloration au rose Bengale et vert FCF serait de la plus grande utilité pour visualiser les dommages acrosomiaux post-décongélation comme nous l'avons vu précédemment. Il serait donc intéressant de mener une étude comparative de congélation dans différents milieux (avec ou sans Equex®) associée à une évaluation des lésions acrosomiales par méthode employant la coloration suscitée.

La présence de fructose n'est pas indispensable [35], on peut donc retirer cet élément de nos diluants, mais il n'est rapporté aucun effet délétère de ce composant sur la semence.

On peut également se demander si l'emploi d'un milieu de décongélation est nécessaire afin de diluer le glycérol présent et d'ajouter des stimulants. La centrifugation dans le but de séparer le glycérol comme nous l'avons réalisée n'est peut-être pas suffisante même si elle a permis d'obtenir un éjaculat de qualité après décongélation.

De nouvelles études sur l'efficacité des antioxydants (sélénium, vitamine E, pyruvate, EDTA, Catalase) et les altérations dues à la présence des stimulants pourraient s'avérer précieuses afin d'améliorer encore la composition de nos milieux de dilution.

IV.3 Significativité des résultats

Le temps de conservation (1 mois) de la semence est assez long pour rendre significatifs les résultats obtenus sur l'échantillon congelé, sachant que c'est surtout le refroidissement et le réchauffement qui engendrent le plus de lésions membranaires. Nous pouvons donc dire que cette technique permet la congélation de semence féline, à condition que ses qualités intrinsèques le permettent.

Il reste à mettre à l'épreuve nos résultats en confrontant notre protocole à l'insémination artificielle intra-utérine, afin d'obtenir des données sur les taux de gestation. C'est la condition indispensable à la validité du protocole car nous avons vu que les résultats du spermogramme ne sont pas toujours bien corrélés. En outre, la présence de facteurs anti-capacitants n'est pas confirmée dans cette espèce [18] et un spermatozoïde d'aspect normal au spermogramme peut être ne pas être fécondant si la capacitation intervient trop tôt.

On peut d'ores et déjà mettre en place le projet de banque de sperme féline, mais ses applications seront limitées tant que l'étape de l'insémination artificielle ne sera pas incorporée au protocole. De même, le modèle de reproduction assistée pour les grands félins sauvages n'est pas complet sans cette étape primordiale.

Au bilan,

notre projet était de mettre au point un protocole de prélèvement et de conservation de semence féline. Nous poursuivions un but double : nous souhaitions disposer d'un protocole simple et reproductible, applicable à la mise en place d'une banque de semence féline au CERCA et nous cherchions à établir un modèle de reproduction assistée chez le chat domestique, utilisable au sein du programme de sauvegarde des grands félins sauvages.

Nos expériences se sont heurtées à plusieurs problèmes. En effet, les auteurs ne sont pas unanimes quant à la reproduction du chat domestique : âge de la puberté, milieux de dilution, vitesse de refroidissement, etc.). De plus, nous nous sommes retrouvés confrontés à une pénurie d'individus mâles entiers disponibles. Et surtout, la semence récoltée était de très mauvaise qualité. De nombreux échantillons étaient tératospermiques, contaminés par de l'urine, et/ou présentaient un pourcentage de mobilité très faible. Au final, un seul éjaculat sur treize était de qualité suffisante pour être congelé. Cependant, on peut penser que le protocole de congélation proposé est adapté à la semence féline puisque cet échantillon était également d'assez bonne qualité après décongélation pour être inséminé par voie intra-utérine.

On peut donc retenir les différentes étapes présentées comme une base pour l'avenir, même si le protocole doit être perfectionné avant d'être appliqué à la création d'une banque de sperme féline au CERCA.

On peut suggérer de ne prélever que les mâles de plus d'un an. On préconisera aussi la pratique d'un éclaircissement artificiel avant prélèvement et d'un « swim-up » systématique en cas d'éjaculat tératospermique afin d'améliorer la qualité de la semence. On ajoutera au spermogramme le calcul du SMI et une étape de coloration (rose Bengale et vert FCF ou Spermac®) afin de mieux visualiser les lésions acrosomiales. On préconisera le contrôle rigoureux des températures de refroidissement et un allongement de la période de congélation (1 heure). On ajoutera de l'Equex® à 0,5% dans le milieu de deuxième dilution pour améliorer la mobilité après décongélation et la deuxième dilution se fera préférentiellement juste avant la période de stabilisation à +5°C.

De nouvelles études seraient intéressantes à mener car certaines questions restent en suspens : quelle est l'étiologie de la tératospermie chez le chat domestique ? Le ratio entre stéréo-isomère joue-t-il un rôle dans l'efficacité de la médétomidine dans l'émission du sperme ? L'isomère dextrogyre favorise-t-il la contamination urinaire ? Le milieu proposé est-il délétère pour les spermatozoïdes (% mobilité) ? L'ajout de composés antioxydants est-il efficace ? Quelles corrélations obtient-on entre les résultats du spermogramme et les taux de gestation ?

Quelles que soient les modifications finales apportées au protocole, il s'avère évident qu'il ne pourra être pratiqué que par des personnes habituées à la réalisation du spermogramme.

CONCLUSION

Notre projet était de mettre au point un protocole de prélèvement et de conservation de semence féline. Nous souhaitions aboutir à un protocole simple et reproductible en vue de la création d'une banque de semence féline au CERCA. En effet, nombreuses sont les demandes actuelles concernant la conservation du potentiel reproducteur des chats de propriétaires ou d'élevage. Le deuxième but était d'établir un modèle de reproduction assistée chez le chat domestique, utilisable au sein du programme de sauvegarde des grands félins sauvages. En effet, le sperme des différentes espèces de félins comporte de nombreuses caractéristiques communes et la grande majorité de ces espèces est menacée d'extinction.

Notre travail bibliographique a montré qu'il n'existait pas de protocole de congélation défini et qu'aucun consensus n'était atteint concernant les milieux de dilution. Cependant, plusieurs techniques de prélèvement ont fait leur preuve (électro-éjaculation et cathétérisme urétral) et l'examen des éjaculats révèle une semence concentrée, de très faible volume et présentant de fortes proportions de morphologies anormales (la tératospermie est très répandue au sein de l'espèce). La semence féline est donc relativement difficile à prélever et elle est fréquemment de très mauvaise qualité. De plus, elle est particulièrement sensible aux chocs thermique et hypo-osmotique. Il apparaît donc primordial d'améliorer la qualité de la semence avant congélation (« swim-up », centrifugation, dilution, etc.).

Dans un deuxième temps, notre travail expérimental s'est heurté à plusieurs problèmes. Peu d'individus mâles entiers étaient disponibles et la majorité des échantillons prélevés étaient de très mauvaise qualité (contamination urinaire, tératospermie, faible pourcentage de mobilité, etc.). Un seul éjaculat a pu être congelé et ce, avec succès.

On retiendra donc ce protocole comme une base de référence pour l'avenir. Certaines modifications peuvent d'ores et déjà lui être apportées et de nouvelles études doivent être menées pour élucider les questions restées en suspens, concernant l'influence des composés pharmacologiques utilisés, l'efficacité de l'ajout d'antioxydants et les effets du milieu lui-même sur les caractéristiques du spermogramme.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANZALONE CR *et al.* Chromatin alterations in sperm of teratospermic domestic cats. *Biology of Reproduction*, 1998, **58**, 185.
- [2] AUGER J, JUANNET P. Manuel de laboratoire de l'OMS, Analyse de sperme humain et interaction des spermatozoïdes avec le mucus cervical. Ed : INSERM, 1993, 115-117.
- [3] AXNER E. Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology*, 2006, **66**, 14-24.
- [4] AXNER E, STRÖM B, LINDE-FORSBERG C. Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electro-ejaculated twice during the same period of anesthesia. *Theriogenology*, 1997, **47**, 929-934.
- [5] AXNER E, HOLST BS, LINDE-FORBERG C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electro-ejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology*, 1998, **50**, 973-979.
- [6] AXNER E, HERMANSSON U, LINDE-FORSBERG C. The effect of Equex STM Paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 2004, **84**, 179-191.
- [7] BADER H. Case studies in stallions with fertility problems: endocrine and spermatological aspects. *In: Proceeding of the 11th international congress of animal reproduction and artificial insemination*. 1988, **3**, 367.
- [8] BARAN SW. Freezing of cat semen in straws with different glycerol levels containing Tris extender. *Turkish journal of veterinarian Animal Science*, 2004, **28**, 545-552.
- [9] BARONE R. Anatomie comparée des mammifères domestiques, Tome 3^{ème} : Splanchnologie et ses annexes, Fascicule II. 1978, 128-259.
- [10] BALLACHEY BE, HONENBOKEN WD, EVENSON DP. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biology of Reproduction*, 1987, **36**, 915-935.
- [11] BEARDSLEY A, O'DONNELL L. Characterization of normal spermiation and spermiation failure induced by hormone suppression in adults rats. *Biology of Reproduction*, 2003, **68**, 1299-1307.
- [12] BILODEAU JF, BLANCHETTE S, CORMIER N *et al.* Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg-yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, 2002, **57**, 1105-1122.
- [13] BLANCO-RODRIGUEZ J. DNA Replication and germ cell apoptosis during spermatogenesis in the cat. *Journal of Andrology*, 2002, **23**(4), 484-490.
- [14] BOWEN RA. Fertilization *in vitro* of feline ova by spermatozoa from the ductus deferens. *Biology of Reproduction*, 1977, **17**, 144-147.

- [15] BRACKETT BG, OLIPHANT G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro* . *Biology of Reproduction*, 1975, **12**, 260-274.
- [16] BROWN JL, BUSH M, PACKER C *et al.* Developmental changes in pituitary-gonadal function in free-ranging lions (*Panthera leo leo*) of the Serengi plains and Ngorongoto crater. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1991, **91**, 29-40.
- [17] BUFF S, DONZE A, GUERIN P *et al.* Taurine and hypotaurine in spermatozoa and epididymal fluid of cats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 2001, **57**, 93-95.
- [18] BYERS AP, HUNTER AG, SEAL US *et al.* In-vitro induction of capacitation of fresh semen and frozen spermatozoa of the Siberian tiger (*Panthera tigris*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 1989, **86**, 599-607.
- [19] CANVIN AT, BUHR MM. Effect of temperature on the fluidity of boar sperm membranes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1989, **85**, 533-540.
- [20] CARD CE, MANNING ST, BOWMAN P *et al.* Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in a disabled stallion. *Can. Vet. J.*, 1997, **38**, 171-174.
- [21] CARRO-RUANEZ M, RODRIGUEZ-MANZO G. The spinal pattern generator for ejaculation. *Brain Research Revue*, 2008, **58**(1), 106-120.
- [22] CHATDARONG K, LOHACCHIT C, PONGLOWHAPAN S *et al.* Transcervical catheterization and cervical patency during the oestrous cycle in domestic cats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 2001, **57**, 353-356.
- [23] CHENG WTK, MOOR RM, POLGE C. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vitro* and *in vivo* . *Theriogenology*, 1986, **25**, 146.
- [24] COX HU, HOSDKINS JD, NEWMAN SS *et al.* Distribution of staphylococcal on clinically healthy cats. *Am. Vet. Res.*, 1985, **46**(9), 1824-1828.
- [25] DAVIS NS, ROTHMANN SA, TAN M *et al.* Effect of catheter composition on sperm quality. *Journal of Andrology*, 1993, **14**(1), 66-69.
- [26] DOOLEY MP, PINEDA MH. Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat. *Am. Vet. Res.*, 1986, **47**(2), 286-292.
- [27] DOOLEY MP, PINEDA MH, HOPPER JG *et al.* Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of dogs during ejaculation or after sedation with xylazine. *Am. Vet. Res.*, 1990, **51**(10), 1574-1579.
- [28] DOOLEY MP, PINEDA MH, HOPPER JG *et al.* Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of cats during electro-ejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**(5), 687-691.
- [29] FARTSATD W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Animal Reproduction Science*, 2000, **60-61**, 375-387.
- [30] FELDMAN EC, NELSON RW. Canine and feline endocrinology and reproduction. Ed: W.B. Saunders, 1985, **75**, 145-152.

- [31] FRANCA LR, GODINHO CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, 2003, **68**, 1554-1561.
- [32] FRASER LR. Mechanism controlling mammalian fertilization. *Oxford Review of reproductive biology*, 1984, **6**, 174-225.
- [33] GETTY R. The anatomy of the domestic animals. 5th ed. WB Saunders, 1975, 320p.
- [34] GILMORE JA, MCGANN LE, ASHWORTH E. Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. *Animal Reproduction Science*, 1998, **53**, 277-297.
- [35] GLOVER TE, WATSON PF, BONNEY RC. Observation on viability in LH release and fertility during oestrus in the domestic cat (*Felis catus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 1985, **75**, 145-152.
- [36] GOODROWE KL, HOWARD JG, SCHMIDT PM *et al.* Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and *in vitro* fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1989, **39**, 73-90.
- [37] GOODROWE KL, HAY M. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 1993, **40**(5), 967-975.
- [38] HAMNER CE, JENNINGS LL, SOJKA NJ. Cat (*Felis catus* L.) spermatozoa require capacitation. *Journal of reproduction and fertility*, 1970, **23**(3), 477-480.
- [39] HARRIS RF, POPE CE, GOMEZ MC *et al.* Storage of domestic cat spermatozoa for extended periods at 4°C. *Theriogenology*, 2001, **55**, 308.
- [40] HAY MA, GOODROWE KL. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymis and vasa deferencia of the domestic cat. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993, **47**, 297-305.
- [41] HAY MA, KING WA, GARTLEY CJ *et al.* Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1997, **51**, 99-108.
- [42] HERMANSSON U, AXNER E. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4°C. *Theriogenology*, 2007, **67**, 1239-1248.
- [43] HERRON MA. Feline physiology and reproduction. In: *Small Animal Reproduction and Infertility (a clinical approach to diagnosis and treatment)*. THJ Buke, 1986, Lea and febinger, 205-207.
- [44] HOWARD JG. Semen collection, analysis and cryopreservation in non domestic mammals. In: *Current therapy in theriogenology*, Morrow DA, 2nd Ed., Philadelphia: WB Saunders, 1986, 1047-1053.
- [45] HOWARD JG. Assisted reproduction techniques in carnivores. In: *Zoo and wild animal medicine IV*, Ed ME Fawler and RE Miller, Philadelphia : WS Saunders CO, 1999, 449-457.

- [46] HOWARD JG, BROWN L, BUSH M *et al.* Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *Journal of Andrology*, 1990, **11**(3), 204-215.
- [47] HOWARD JG, BUSH M, WILDT DE. Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. *Journal of Andrology*, 1991, **12**(1), 36-45.
- [48] HOWARD JG, DONOGHUE AM, JOHNSTON LA *et al.* Zona Pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats. *Biology of Reproduction*, 1993, **49**, 131-139.
- [49] JOHNSTON SD, ROOT MV, OLSON PNS. Ovarian and testicular function in the domestic cat: clinical management of spontaneous reproductive disease. *Animal Reproduction Science*, 1996, **42**, 261-274.
- [50] JOHNSTONE I. Electro-ejaculation in the domestic cat. *Australian Veterinary Journal*, 1984, **61**(5), 155-158.
- [51] JOHNSTONE SM, OSBORNE CA, LIPOWITCH A. Characterisation of seminal plasma, prostatic fluid, and bulbourethral gland secretion in the domestic cat. In: *Proceeding of the 11th international congress on animal reproduction and artificial insemination*. Dublin, Ireland, 1988, **4**, 560-562.
- [52] KASHIWAZAKI N, YAMAGUCHI R, UESUGI R *et al.* Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. *Journal of Reproduction and Development*, 2005, **51**, 735-739.
- [53] KHOLKUTE SD, MEHERJI P, PURI CP. Capacitation and the acrosome reaction in sperm from men with various semen profiles monitored chlortetracycline fluorescence assay. *International Journal of Andrology*, 1992, **15**, 43-53.
- [54] KIRKPATRICK LK, Seasonal testosterone levels, testosterone clearance and testicular weights in male domestic cats. *Canadian Journal of Zoology*, 1985, **63**, 1285-1287.
- [55] KUMI-DIAKA J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, 1993, **39**, 1279-1289.
- [56] LARSSON LI. Occurrence of nerves containing vasoactive intestinal neuropeptide immunoreactivity in the male genital tract. *Life sciences*, 1977, **21**, 503-508.
- [57] LEONI S. *Refrigerazione del seme epididymale felino in diversi diluenti*. Thèse mèd. Vèt., Milan, 1999, 110p.
- [58] LENGWINAT T, BLOTTNER S. *In vitro* fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 1994, **35**, 291-301.

- [59] LEYTON L, LEGUEN P, BUNCH D *et al.* Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase. In: *Proceeding national academy of science, USA*, 1992, **89**, 11692-11695.
- [60] LIEGE P. *Techniques de reproduction artificielle chez le chat domestique*. Thèse mèd. vèt., Alfort, 1991, n°48, 120p.
- [61] LONG AJ, WILDT DE, WOLF BA *et al.* Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. *Biology of Reproduction*, 1996, **54**, 638-646.
- [62] LUVONI GC. Effect of taurine containing diluent for cryopreservation of domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 2002, **57**, 361-793.
- [63] LUVONI GC. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology*, 2006, **66**, 101-111.
- [64] LUVONI GC, KALCHSCHMIDT E, MARINONI G. Conservation of feline semen, Part I: Cooling and freezing protocols. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2003, **5**, 203-208.
- [65] LUVONI GC, KALCHSCHMIDT E, MARINONI G. Conservation of feline semen, Part II: Cold-induced damages on spermatozoal fertilizing ability. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2003, **5**, 257-263.
- [66] McLAUGHLIN KC, HAMNER CE. A demonstration of cat seminal plasma anti-fertility activity. In: *Proceeding of the society for experimental biology and medicine*, 1974, **145**(1), 103-104.
- [67] MARKS SL, DUPUIS J, MICKELSEN D *et al.* Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *J. Am. Vet. Med. Anim.*, 1994, **204**, n°10, 1639-1640.
- [68] MEIZEL S. Taurine and hypotaurine: Their effects on motility, capacitation and acrosome reaction of hamster sperm *in vitro* and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Development growth difference*, 1980, **22**, 483-494.
- [69] NELSON KL, CRICHTON EG, DOTY L, VOLENEC DE *et al.* Heterologous and homologous fertilizing capacity of cryopreserved felid sperm: a model for endangered species. *Theriogenology*, 1999, **51**, 290.
- [70] NEUBAUER K, JEWGENOW K, BLOTTNER S *et al.* Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, 2004, **71**, 1517-1524.
- [71] NIWA K, OHARA K, HOSOI Y *et al.* Early events of in-vitro fertilization of cats eggs by epididymal spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1985, **74**, 657-660.
- [72] OEHNINGER S, BLACKMORE P, MORSHEDI M *et al.* Defective calcium influx and acrosome reaction (spontaneous and progesterone induced) in spermatozoa of fertile men with severe teratozoospermia. *Fertility and Sterility*, 1994, **61**, 349-354.

- [73] OLSON GE, WINFREY VP, HILL KE *et al.* Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats. *Reproduction*, 2004, **127**, 335-342.
- [74] PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH J, WINER MA *et al.* Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, 1988, **38**, 1171-1180.
- [75] PENA FJ, JOHANNISON A, WALLGREEN M *et al.* Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, 2003, **78**, 85-98.
- [76] PINEDA MH, DOOLEY MP, Effects of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of electro-ejaculates of the domestic cat. *Am. Vet. Res.*, 1983, **45**(8), 1520-1525.
- [77] PINEDA MH, DOOLEY MP. Surgical and chemical vasectomy in the cat. *American Journal of Veterinarian Research*, 1984, **45**(2), 291-300.
- [78] PINEDA MH, DOOLEY MP, MARTIN PA. Long-term study on the effect of electro-ejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. *Am. J. Vet. Res.*, 1984, **45**(5), 1038-1041.
- [79] PLATZ CC, WILDT DE, SEAGER SWJ. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 1978, **52**, 279-282.
- [80] PLATZ CC, SEAGER SWJ. Semen Collection by Electro-ejaculation in the Domestic Cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1978, **173**, 1353-1355.
- [81] PONGLOWHAPAN S, CHATDARONG K. Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology*, 2008, **69**(6), 666-672.
- [82] POPE CE. Semen storage in the domestic felid: a conjugaison of cryopreservation methods and storage temperature. *Biology of Reproduction*, 1991, **44**, Suppl.1, 117.
- [83] POPE CE, ZHANG YZ, DRESSER BL. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 1991, **22**(1), 87-95.
- [84] PUKAZHENTI BS. Gene expression in the testis of normospermic versus teratospermic domestic cat using human cDNA microarray analyses. *Biology of Reproduction*, 2003, **68**, 191-192.
- [85] PUKAZHENTI BS, WILDT DE, OTTINGER MA *et al.* Compromised sperm protein phosphorylation after capacitation, swim-up, and zona-pellucida exposure in teratospermic domestic cats. *Journal of Andrology*, 1996, **17**(4), 409-419.
- [86] PUKAZHENTI BS, PELICAN K, WILDT D *et al.* sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-Induced acrosomal damage. *Biology of Reproduction*, 1999, **61**, 135-141.
- [87] PUKAZHENTI BS, NOILES E, PELICAN K *et al.* Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology*, 2000, **40**, 139-150.

- [88] PUKAZHENTHI BS, WILDT DE, HOWARD JG. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 2001, **57**, 423-433.
- [89] PUKAZHENTHI BS, NEUBAUER K, JEWGENOW K *et al.* The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology*, 2006, **66**, 112-121.
- [90] PUKAZHENTHI BS, LAROE D, CROSIER A *et al.* Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa. *Theriogenology*, 2006, **66**, 1790-1796.
- [91] ROTA A, STRÖM B, LINDE-FORSBERG C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, 1995, **44**, 885-900.
- [92] ROTA A, STRÖM B, LINDE-FORSBERG C *et al.* Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during *in vitro* incubation at 38°C. *Theriogenology*, 1997, **47**, 1093-1101.
- [93] RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. *Reprod. Dom. Anim.*, 2003, **38**, 312-318.
- [94] ROTH TL, HOWARD GJ, WILDT DE. Zona pellucida piercing enhances zona penetration from normospermic and teratospermic domestic cats. *Journal of Andrology*, 1994, **15**(2), 165-173.
- [95] ROTH TL, SWANSON WF, COLLINS *et al.* Snow leopard (*panthera uncia*) spermatozoa are sensitive to alkaline pH, but motility *in vitro* is not influenced by protein or energy supplements. *Journal of Andrology*, 1996, **17**(5), 558-566.
- [96] SALSON O. *Récolte et conservation du sperme chez les félins: Etude bibliographique.* Thèse mèd. Vét., Alfort, 2008, n°78, 189p.
- [97] SCHÄFER S, HOLZMANN A. The use of transmigration and SpermacTM stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 2000, **59**, 201-211.
- [98] SCOTT PP. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. In: *Hafez, ESE*, Lea and Febinger, Philadelphia, 1970, 193-207.
- [99] SEEMANS JH, LANGWORTHY OR. Observations on the neurophysiology of sexual function in the male cat. *Journal of Urology*, 1938, **40**, 836.
- [100] SIKKA SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology*, 2004, **25**(1), 5-18.
- [101] SOJKA NJ. Management of artificial breeding in cats. In: *Current therapy in theriogenology*, Ed WS. Saunders DA Morrow, 1986, 805-806.
- [102] SOJKA NJ, JENNINGS LL, HAMNER CE. Artificial Insemination in the Cat (*Felis catus*). *Lab. Anim. Care*, 1970, **20**, 198-204.
- [103] STACHEKI JJ, GINSBURG KA, ARMANT DR. Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxiphilline, and 2'-deoxyadenosine. *Journal of Andrology*, 1994, **15**, 157-164.

- [104] SWANSON WF, ROTH TL, BLUMER E *et al.* Comparative cryopreservation and functionality of spermatozoa from the normospermic jaguar (*Panthera onca*) and teratospermic cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Theriogenology*, 1996, **45**, 241.
- [105] SWANSON WF, PENFOLD LM, WILDT DE. Developmental capacity of IVF derived domestic cat embryos following transfer to naturally-oestral, GnRH treated recipient. *Theriogenology*, 1998, **49**, 267.
- [106] SWANSON WF, McRAE MA, WILDT DE *et al.* Cryoprotectant toxicity and cryopreservation success in IVF derived domestic cat embryo after embryo transfer. *Theriogenology*, 1999, **91**, 174.
- [107] TANAKA A, TAKAGI Y, NAKAGAWA K *et al.* Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats. *J. Vet. Med. Sci.* 2000, **62**(11), 1163-1167.
- [108] TANAKA A, KUWABARA S, TAKAGI Y *et al.* Effect of ejaculation intervals on semen quality in cats. *J. Vet. Sci.*, 2000, **62**(11), 1157-1161.
- [109] TEBET JM, MARTINS MIM, CHIRINEA VH *et al.* Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electro-ejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, 2006, **66**, 1629-1632.
- [110] TIRET L. *Physiologie de l'appareil reproducteur, mécanismes généraux, particularités d'espèces. Cours DCEV1.* Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité de Physiologie. Document non publié, 2000-2001, 88.
- [111] TRAMER F, ROCCO F, MICALI F *et al.* Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 1998, **59**, 753-758.
- [112] TSUTSUI T. Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology*, 2006, **66**, 122-125.
- [113] TSUTSUI T, TANAKA A, TAKAGI Y *et al.* Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats. *J. Vet. Med. Sci.*, 2000, **62**(12), 1241-1245.
- [114] TSUTSUI T, TANAKA A, TAKAGI Y *et al.* Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *J. Vet. Med. Sci.* 2000, **62**(12), 1247-1251.
- [115] TSUTSUI T, WADA M, ANZAI M *et al.* Artificial Insemination with frozen epididymal sperm in Cats. *J. Vet. Med. Sci.*, 2003, **65**(3), 397-399.
- [116] TURNER RMO, McDONNELL SM, HAWKINS JF. Use of pharmacologically induced ejaculation to obtain semen from a stallion with a fractured radius. *J. Am. Vet. Med. Anim.*, 1995, **206**(12), 1906-1908.
- [117] UEDA Y. Human sperm acrosome reaction induced by Ca ionophore A23187 reflects fertilizing ability *in vitro* and *in vivo* . In: *7th international symposium of spermatology*, 1994.
- [118] VAISSAIRE JP. Sexualité et reproduction de mammifères domestiques et de laboratoire. Paris, Maloine, 1977, 122p.
- [119] VUILLERMOZ I. *Electro-éjaculation et examen de la semence chez le chat domestique.* Thèse mèd. Vét., Nantes, n°73, 1996, 76p.

- [120] WILDT DE, BUSH M, HOWARD JG *et al.* Unique seminal quality in the South African Cheetah and comparative evaluation in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, 1983, **29**, 1019-1025.
- [121] WILDT DE, HOWARD JG, HALL LL *et al.* Reproductive physiology of the clouded leopard: I. Electro-ejaculate contains high proportion of pleiomorphic spermatozoa throughout the year. *Biology of Reproduction*, 1986, **34**, 937-947.
- [122] WILDT DE, O'BRIEN SJ, HOWARD JG *et al.* Similarity in ejaculate-endocrine characteristics in captive versus free-ranging cheetahs of two subspecies. *Biology of Reproduction*, 1987, **36**, 351-360.
- [123] WILDT DE, BUSH M, GOODROWE KL *et al.* Reproductive and genetic consequences of founding isolated loin populations. *Nature*, 1987, **329**, 328-331.
- [124] WOOD TC, SWANSON WF, DAVIS RM *et al.* Functionality of sperm from normo versus teratospermic domestic cats cryopreserved in pellets or straws container. *Theriogenology*, 1993, **39**, 342.
- [125] YAMADA S. Maturation, fertilization and development of dog oocytes *in vitro* biology reproduction *in vitro* . *Biology of Reproduction*. 1992, **46**, 853-858.
- [126] YANAGIMACHI R. The physiology of reproduction. New York (Raverfress) itd, 1988, 135-185.
- [127] YU I, LEIBO SP. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymes stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology*, 2002, **57**, 1179-1190.
- [128] ZAMBELLI D. Tecniche per la valutazione, congelio e cane. In: Atti congresso SISVET XLVII, Roccione 29 Settembre-2 ottobre, 1993, 279-283.
- [129] ZAMBELLI D, CANEPPE B, CASTAGNETTI C *et al.* Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod. Dom. Anim.*, 2002, **37**, 310-313.
- [130] ZAMBELLI D, CUNTO M. Transcervical artificial insemination in the cat. *Theriogenology*, 2005, **64**, 698-705.
- [131] ZAMBELLI D, MERLO B, IOCONO E *et al.* Fertilizing ability of electro-ejaculate cryopreserved semen in the domestic cat. *Reprod. Dom. Anim.*, 2006, **41**, 137-141.
- [132] ZAMBELLI D, CUNTO M. Semen collection in cats: Techniques and analysis. *Theriogenology*, 2006, **66**, 159-165.
- [133] ZAMBELLI D, CUNTO M, PRATI F *et al.* Effect of Ketamine and medetomidine administration on quality of electro-ejaculated sperm and sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology*, 2007, **68**, 796-803.
- [134] ZAMBELLI D, PRATTI F, CUNTO M *et al.* Quality and *in vitro* fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, 2008, **69**(4), 485-490.

[135] ZUKERMAN Z, SAGIV M. A high proportion of double headed and double tailed sperm in semen of human male, a case report. *Andrologia*, 1986, **18**, 495-501.

Annexes

Annexe 1 : Prélèvement de semence féline par vagin artificiel [80,103,120,133,28]	135
Annexe 2 : Prélèvement de semence féline par électro-éjaculation [46,120,26,81,79,133,27,109,28].....	137
Annexe 3 : Prélèvement de semence féline par cathétérisme urétral après injection de médétomidine [134]	139
Annexe 4 : Spermogramme et caractéristiques de la semence féline selon le mode de prélèvement [120,81,50,103,26,64,46,135,84,65]	141
Annexe 5 : Le « Swim-up » ou migration ascendante (Adaptation à la semence féline de la technique décrite chez le chien [2]) [114,46,135,37]	143
Annexe 6 : Conservation de la semence féline réfrigérée ou à température ambiante [135,130,114,36,35,82].....	145
Annexe 7 : Congélation de semence féline [130,2,132,135,6,60,69]	147

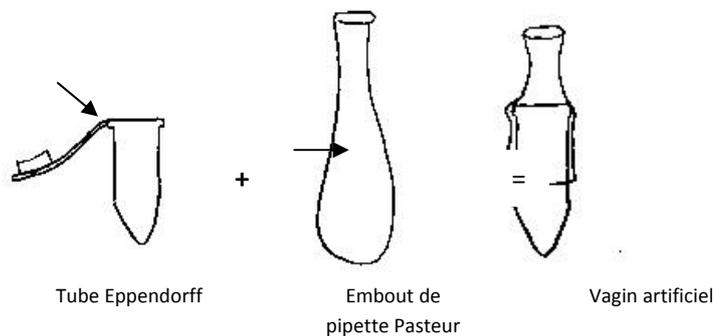
Annexe 1: Prélèvement de semence féline par vagin artificiel [79,102,119,132,28]

- **Animaux**

- Mâle : Habituer l'animal le plus tôt possible et le prélever quotidiennement pendant au moins deux semaines. Choisir des individus de bon caractère.
- Femelle : Elle doit être présentée au mâle en période d'œstrus.

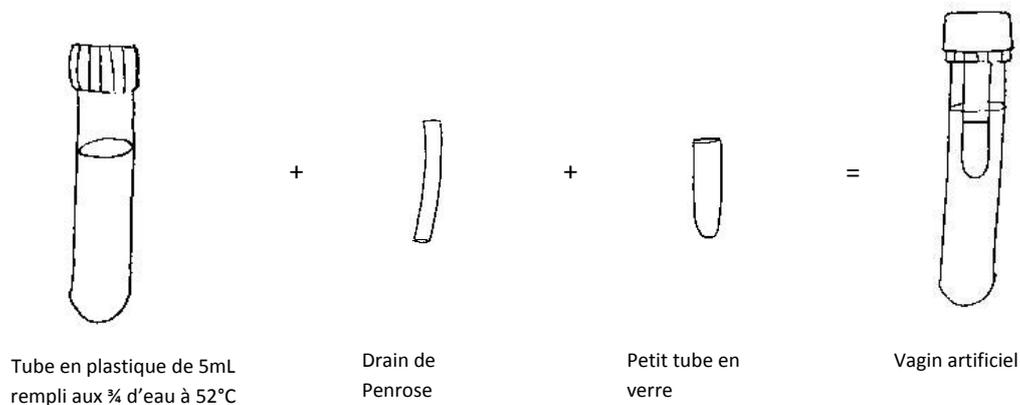
- **Matériel nécessaire**

- Soit un tube Eppendorff et un embout à pipette pasteur



(Section pratiquée au niveau de la flèche →)

- Soit un tube en plastique de 5mL rempli d'eau à 52°C, un drain de Penrose et un petit tube en verre.



- **Méthode**

- Présenter la femelle en œstrus au mâle.
- Dévier le pénis en érection dans le vagin artificiel au moment de l'accouplement.
- Récolte possible 3 fois par semaine maximum.
- Un seul manipulateur nécessaire.

Annexe 2 : Prélèvement de semence féline par électro-éjaculation [46,119,26,80,79,132,27,108,28]

- **Animaux**

Tout individu mâle pouvant être anesthésié.

- **Matériel**

- Electro-éjaculateur : amplitude de 0 à 20 V et de 0 à 500 mA, oscillations de 10 à 100 Hz.
- Sonde rectale cylindrique bipolaire de 1 à 1,5 cm de diamètre et de 12 à 14 cm de long avec 3 à 5 électrodes longitudinales (5 à 8,5 cm de long).
- Un tube Eppendorff.

- **Anesthésie générale**

Injection de kétamine à la dose de 5 mg/Kg et de médétomidine à la dose de 80 µg/Kg par voie intramusculaire.

- **Méthode**

- Décubitus latéral
- Electrodes positionnées en regard de la prostate et maintenues par une pression ventrale douce. Le bon positionnement de la sonde est indiqué par l'extension symétrique des deux membres postérieurs et la protrusion de leurs griffes lors de la stimulation.
- Récolte de la semence directement dans le tube Eppendorff, à l'extrémité du pénis en érection maintenu décalotté par le manipulateur.



Tableau : Protocole d'électro-éjaculation selon Howard [46,28]

	Série 1			Série 2			Série 3	
Stimulations	10	10	10	10	10	10	10	10
Voltage (V)	2	3	4	3	4	5	5	6

On augmente le voltage en 3 secondes, puis on reste au voltage voulu pendant 2 à 3 secondes et on revient à 0V en 3 secondes avant de recommencer la manipulation pour le voltage suivant. On attend 2 à 5 minutes entre les séries.

- Nécessité de la présence de 2 ou 3 manipulateurs.

Récolte possible tous les 2-3 jours.

Annexe 3 : Prélèvement de semence féline par cathétérisme urétral après injection de médétomidine [133]

- **Animaux**

Tout animal pouvant être anesthésié.

- **Matériel**

- Un cathéter urétral félin (Portex jackson®, dlc) 3 French de 11 cm de long, sectionné dans sa partie distale à 9 cm à la lame froide.
- Un tube Eppendorff
- Une seringue de 1mL

- **Anesthésie générale**

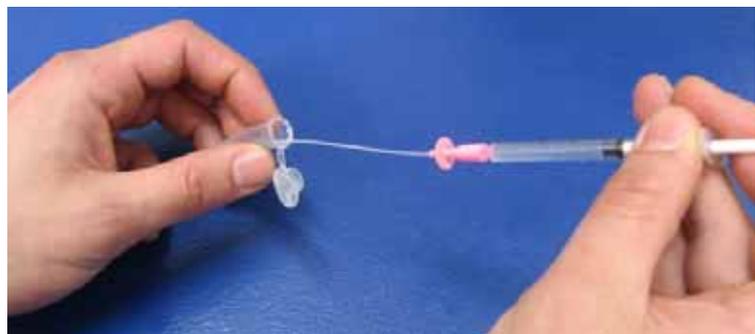
Injection de médétomidine à la dose de 140 µg/Kg par voie intra-musculaire (soit 0,15 mL/Kg).

- **Méthode**

- Décubitus latéral.
- Décalottage du pénis flasque.



- Sondage urétral : lorsqu'un quart de la sonde est inséré dans l'urètre, faire rentrer le pénis dans le fourreau. Exercer une traction sur le prépuce ventralement et cranialement tout en continuant le sondage jusqu'à enfoncer la sonde dans sa totalité.



- Ressortir aussitôt la sonde de l'urètre.
- Pousser l'air contenu dans la seringue afin de chasser la semence du cathéter jusque dans le tube Eppendorff.
- Recommencer si nécessaire le sondage.
- La présence d'un seul manipulateur est nécessaire.
- Récolte possible tous les 2-3 jours.

Annexe 4 : Spermogramme et caractéristiques de la semence féline selon le mode de prélèvement [119,80,50,102,26,64,46,134,83,65]

- **Spermogramme de routine**

- Examen macroscopique

- Aspect : blanc laiteux.
 - Discolorations : urine, sang, pus...
 - pH : mesuré à l'aide d'un pHmètre ou de papier pH.
 - Osmolarité

- Examen microscopique

- Mobilité :
 - % de mobilité : observée au microscope optique (opérateur dépendant)
 - Echelle de mobilité : de 0 à 5 (opérateur dépendant)
 - SMI = $0,5 \times [(mobilité\ progressive \times 20) + \% \text{ mobilité}]$
 - Nombre : hémacytomètre ou différentes cellules
 - Intégrité acrosomiale :
 - Coloration au rose Bengale et vert FCF : visualisation des anomalies acrosomiales (mélange périssable).
 - Chlortétracycline : visualisation de la capacitation par réaction fluorescente.

- **Caractéristiques de la semence féline selon le mode de prélèvement**

	VA	EE	CU
Volume moyen d'un éjaculat	0,04 mL	0,27 mL	0,11 mL
pH	7,4	8,61	7,0
Osmolarité	290 à 320 mOsm/Kg		
% Motilité	> 60% (environ 78% sauf tératospermique)		
Motilité progressive	> 4,5		
SMI	= 84,4		
Nombre de spermatozoïde par éjaculat	60.106 soit 100 à 200 spermatozoïdes par champ au grossissement x40 (semence non diluée)		
Concentration	1,73.109/mL	0,54.109/mL	1,87.109/mL
Volume testiculaire	4,3 cm ³		
% Spermatozoïdes normaux	71,6% (Chats normospermiques)		

VA : Vagin artificiel

EE : Electro-éjaculation

CU : Cathétérisme urétral après injection de médétomidine

Annexe 5 : Le « Swim-up » ou migration ascendante (Adaptation à la semence féline de la technique décrite chez le chien [2]) [113,46,134,37]

Cette technique est réservée aux éjaculats tératospermiques.

- Diluer au goutte-à-goutte, à température ambiante, l'éjaculat avec le milieu (qsp 200 µL) dans un tube stérile à fond conique de 5 mL.

Choisir un milieu adapté au sperme félin : le milieu de Tsutsui par exemple.

Composition du milieu de Tsutsui *et al.* [113] et modifications envisageables:

Tableau : Composition du milieu utilisé par Tsutsui *et al.* [113] pour la dilution de la semence de chat et modifications envisageables

	Tsutsui <i>et al.</i> [113]	Modifications envisageables
Acide citrique	1,30 g	Idem
Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane	2,40 g	Ou Test
Fructose	1,00 g	Pas nécessaire
Potassium de pénicilline	100 000 U	Idem
Sulfate de streptomycine	0,10 g	Idem
Jaune d'œuf	20 ml	Ou DMSO
Eau distillée (qsp volume final)	100 ml	idem

- Maintenir le tube à 45°.
- Laisser incuber à température ambiante pendant 30 minutes.
- Remettre le tube en position verticale.
- Récupérer 100 µL de la couche supérieure.
- Diluer 4 fois cette fraction contenant les spermatozoïdes mobiles dans le milieu utilisé précédemment.
- Centrifuger à 300-700g pendant 5 à 8 minutes.
- Suspendre à nouveau le culot dans 100 µL du même milieu.

Annexe 6 : Conservation de la semence féline réfrigérée ou à température ambiante [134,129,113,36,35,81]

- **Conservation de semence à température ambiante**
 - Centrifugation à 300-700g pendant 5-8 minutes, retrait du plasma séminal.
 - « Swim-up » en cas d'éjaculat tératospermique (cf fiche technique).
 - Dilution de l'éjaculat au goutte-à-goutte dans le milieu de 1^{ère} dilution qsp 200µL.
 - La durée de vie des spermatozoïdes est d'environ une heure (-50% de mobilité au bout d'une heure).

- **Conservation de semence réfrigérée (à+5°C)**
 - Centrifugation, « swim-up » et dilution si nécessaire à température ambiante comme décrit ci-dessus.
 - Deuxième dilution dans le milieu de réfrigération (qsp 200µL).
 - Refroidissement jusqu'à +5°C à la vitesse de -0,5°C/min (3-4°C/min maximum).

La durée de vie des spermatozoïdes est de 24 heures environ. Les estimations varient cependant fortement dans la littérature et s'étalent de 12 heures à 1 semaine...

Tableau : Composition des milieux utilisés pour les dilutions avant conservation à température ambiante [113] ou à +5°C [135,130].

	1 ^{ère} dilution		2 ^{ème} dilution
	Tsutsui <i>et al.</i> [113]	Modifications	(avant refroidissement) Zambelli [135,130]
Acide citrique	1,30 g	Idem	idem
Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane	2,40 g	Ou Test	idem
Fructose	1,00 g	Pas nécessaire	idem
Potassium de pénicilline	100 000 U	Idem	idem
Sulfate de streptomycine	0,10 g	Idem	idem
Glycérol (concentration finale)	-	-	4-5% soit 8 mL
jaune d'œuf	20 ml	Ou DMSO	idem
Equex®	-	-	0,5%
Eau distillée (qsp volume final)	100 ml	Idem	idem

Annexe 7 : Congélation de semence féline [129,2,131,134,6,60,69]

Eviter au maximum de congeler des éjaculats tératospermiques ou peu mobiles. Etant donnée la pauvreté de la semence féline, aucun seuil de référence de mobilité (ou autre critère) n'est disponible dans la littérature.

- **Traitements réalisés avant congélation (à température ambiante)**

- Centrifuger à 300-700g pendant 5 à 8 minutes, retrait du plasma séminal.
- Effectuer un « swim-up » si l'éjaculat est tératospermique (cf fiche technique).
- Diluer la semence au goutte-à-goutte dans le milieu de 1^{ère} puis 2^{ème} dilution (à chaque dilution : qsp 200µL).

Tableau : Composition du milieu utilisé par Tsutsui *et al.* [113], modifié selon Zambelli [130,135] *et al.* pour la congélation de semence de chat.

	1 ^{ère} dilution		2 ^{ème} dilution
	Tsutsui <i>et al.</i> [113]	Modifications	(avant refroidissement) Zambelli [130,135]
Acide citrique	1,30 g	idem	idem
Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane	2,40 g	Ou Test	idem
Fructose	1,00 g	Pas nécessaire	idem
Potassium de pénicilline	100 000 U	idem	idem
Sulfate de streptomycine	0,10 g	idem	idem
Glycérol (concentration finale)	-	-	4-5% soit 8 mL
jaune d'œuf	20 ml	Ou DMSO	idem
Equex®	-	-	0,5%
Eau distillée (qsp volume final)	100 ml	idem	idem

- **Refroidissement**

- De la température ambiante à +5°C, la vitesse de refroidissement idéale est de -0,5°C/min (-3-4°C/min maximum).
- Stabilisation à +5°C pendant 20 min.
- Conditionner en paillettes de 0,25mL.

- **Congélation**
 - De -5°C à -40°C, la vitesse de refroidissement idéale est de -3,85°C/min (-10°C/min maximum), ce qui correspond à une exposition de la semence pendant 10 minutes à 4-5 cm au dessus de l'azote liquide.
 - Immersion des paillettes dans l'azote liquide (-196°C).

- **Décongélation**
 - Elle s'effectue rapidement, dans un bain marie à 35°C.
 - Séparer immédiatement le glycérol par centrifugation.

- **Capacitation**
 - Elle est spontanée. La semence féline ne nécessite aucun traitement capacitant.

LA CONGELATION DE LA SEMENCE DE CHAT DOMESTIQUE:

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET EXPERIMENTALE

NOM et Prénom : GAULIARD Laure

Résumé :

Dans le but de mettre en place une banque de semence féline au CERCA et afin d'établir un modèle de reproduction assistée applicable aux grands félins en voie d'extinction, nous avons rassemblé les données bibliographiques concernant les protocoles de prélèvement, d'analyse et de conservation du sperme félin. La semence de chat (*Felis catus*) s'avère fréquemment de très mauvaise qualité (tératospermie, contamination urinaire) et elle est relativement sensible aux stress osmotique et thermique. De plus, aucun consensus n'est établi en matière de technique de congélation chez le chat, c'est pourquoi nous proposons un protocole de congélation expérimental que nous mettons à l'épreuve. Ce protocole simple et reproductible au sein du CERCA n'a pas permis d'obtenir systématiquement une qualité de semence suffisante pour l'insémination artificielle. Cependant, on retiendra le protocole proposé comme une base de référence pour l'avenir. En effet, certaines modifications peuvent d'ors et déjà lui être apportées et de nouvelles études devront être menées afin de l'améliorer.

Mots clés :

SPERME, CONGELATION, SEMENCE, CONSERVATION DU SPERME, MAITRISE DE LA REPRODUCTION, BIOTECHNOLOGIE, CARNIVORE, CHAT

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. Alain Fontbonne

Assesseur : Pr. Jean-François Courreau

Adresse de l'auteur :

M^{elle} Laure Gauliard,

16, Boulevard de Lesseps, 78000 Versailles

FREEZING OF DOMESTIC CAT SEMEN: BIBLIOGRAPHY AND EXPERIMENTAL STUDY

SURNAME: GAULIARD

Given name: Laure

Summary:

With the intention of setting up a bank of feline semen in the CERCA and to establish a model of assisted reproduction applicable to the endangered feline species, we gathered the bibliographic data concerning the protocols of sample, analysis and conservation of cat spermatozoa. Cat's semen (*Felis catus*) is very often of poor quality (teratospermia, urinary pollution) and sensitive to osmotic and thermal stresses. Besides, no general agreement is established in technology of freezing of cat semen, that's why we offer a protocol of freezing that we experimented. This simple and reproducible protocol did not allow us to acquire a systematically sufficient quality of semen for artificial fertilization. However, we will keep the protocol offered as a reference foundation for the future. Certain modifications can already be brought and new studies will have to be led to ameliorate it.

Keywords:

SPERM, FREEZING, SEMEN, SPERM CONSERVATION, ASSISTED REPRODUCTION
TECHNOLOGY, BIOTECHNOLOGY, CARNIVOROUS, CAT

Jury :

President : Pr.

Director : Pr. Alain Fontbonne

Assessor : Pr. Jean-François Courreau

Author's address:

M^{elle} Laure Gauliard

16, Boulevard de Lesseps, 78000 Versailles