

II.L'électroéjaculation : matériel de prélèvement du sperme de félin, examen et caractéristiques de la semence féline

Elle a été décrite pour la première fois par Hafez [32] et s'impose comme la méthode de choix pour le prélèvement du sperme de félins. L'électroéjaculation par sonde intra-rectale consiste à stimuler toutes les structures nerveuses locales responsables de l'émission séminale, grâce à une sonde introduite dans la filière anale.

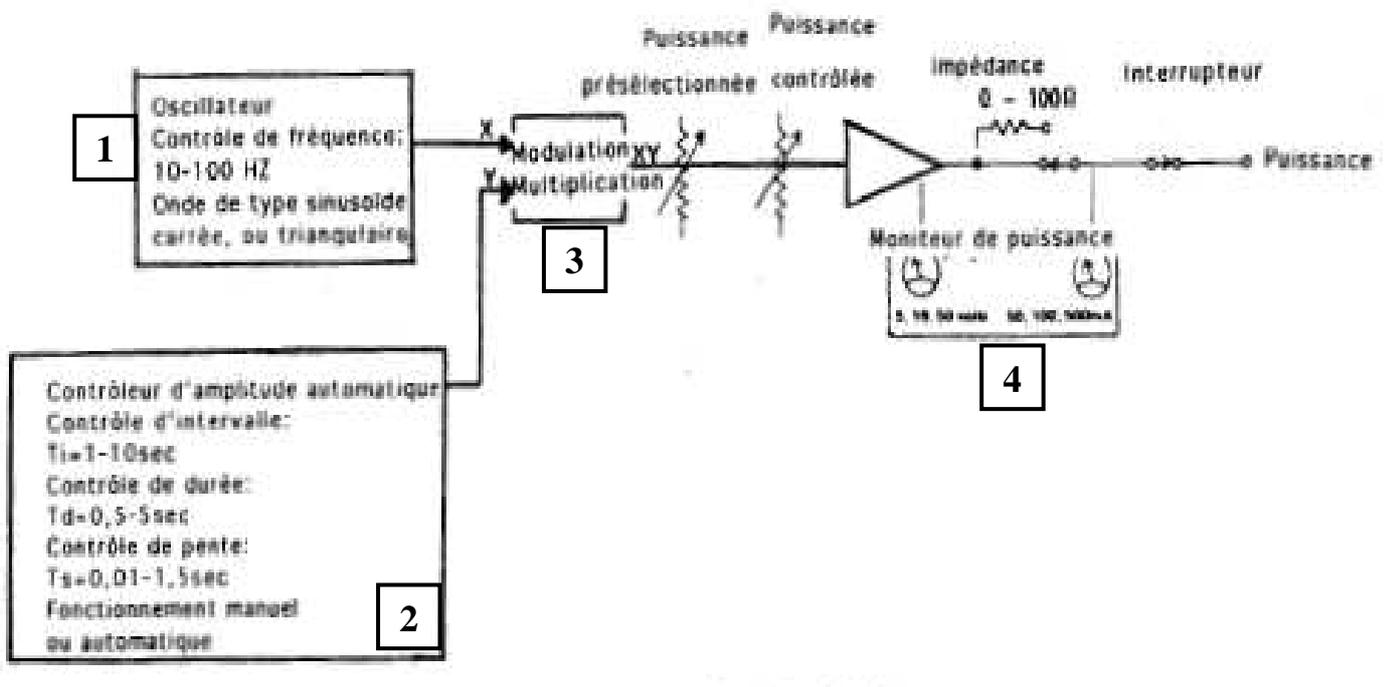
II.1. Matériels d'électroéjaculation

Le matériel nécessaire comprend un stimulateur électrique et une sonde rectale métallique en téflon de différentes longueurs selon l'espèce féline prélevée avec trois électrodes longitudinales en étain (pour le chat domestique par exemple : 3,75 cm de long sur 2,6 mm de large [37]).

II.1.1 Le générateur

L'électro-éjaculateur comprend quatre unités (figure 9 et photo 3) [26] :

Figure 9 : Diagramme de l'électro-éjaculateur et représentation graphique du courant électrique [73].



- l'oscillateur (1) : son amplitude varie de 0 à 20 V et la fréquence des oscillations est ajustable entre 10 et 100 Hz.

- le contrôleur d'amplitude automatique (2) : 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 0 V et le voltage désiré ainsi que l'intervalle entre ce même voltage et le retour à 0 V. L'électro-éjaculateur peut ainsi être préréglé, laissant les mains du manipulateur libres.
- l'amplificateur de puissance (3) : il multiplie le signal en provenance de l'oscillateur et du contrôleur d'amplitude pour le réattribuer à la sonde rectale.
- le moniteur de puissance (4) : le voltage et l'ampérage peuvent être réglés sur trois échelles (0-5 V, 0-10 V, 0-50 V et 0-50 mA, 0-100 mA, 0-500 mA).

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



II.1.2 Les sondes bipolaires

La sonde rectale est cylindrique et bipolaire (figure 10 et photo 4). Elle est constituée de plastique, de téflon, d'un alliage de nickel et d'argent, de polyester et de résine époxy [42, 53-55]. Les dimensions varient selon les auteurs : diamètre de 1 [42, 55] à 1,5 cm et longueur de 12 [55] à 25 cm [42]. Elle contient un nombre variable d'électrodes (3 à 5 [42, 55]), 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 en exerçant une pression ventrale douce durant toute la séance. L'ensemble des auteurs utilisent préférentiellement des électrodes longitudinales plutôt que des électrodes annulaires. Ces dernières sont en acier inoxydable et leur longueur est de 5 à 8,5 cm [55]. Elles sont parallèles entre elles à l'intérieur de la sonde [73].

Figure 10 : Sonde rectale pour félins [73].

1 : gaine de protection des fils électriques ; 2 : connexion électrique aux électrodes en téflon ; 3 : électrodes.

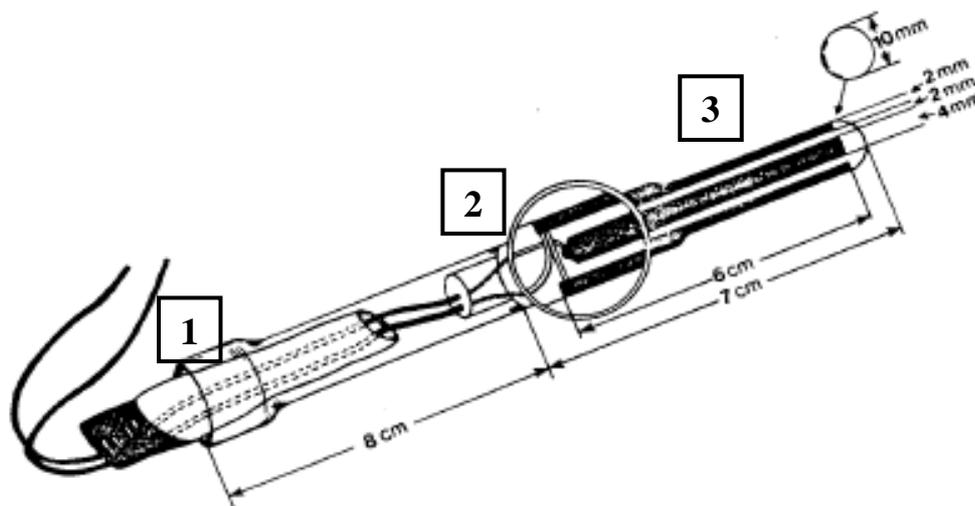


Photo 4 : Sondes rectales pour chat (12cm), guépard (20cm) et lion (25cm) du haut vers le bas respectivement [64] (CERCA).



II.1.3 Protocoles de stimulation

La fréquence utilisée varie de 25 Hz [42] à 30 Hz [19, 20, 53, 54], ce qui correspond aux fréquences ayant donné les meilleurs résultats (les différents protocoles décrits dans la littérature pour les félidés sauvages sont regroupés dans l'annexe 6).

Tous les auteurs utilisent une onde de type sinusoïde. La tension maximale du courant est choisie soit arbitrairement (identiques pour tous les individus) [20, 53-55], soit en sélectionnant une

valeur minimale suffisante à provoquer l'extension des membres postérieurs et la protrusion des griffes (photo 5) [42].

Ceci correspond à une tension de 5 à 10 V. Quelle que soit la méthode employée, il existe un voltage seuil pour la production de plasma séminal (0 à 1 V), pour l'obtention d'un nombre maximal de spermatozoïdes (entre 2 et 8 V) et pour l'éjaculation d'un volume séminal convenable (1 à 8 V) [53].

L'érection est généralement obtenue entre 2 et 4 V [55]. **Aucun consensus n'est cependant 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.* [53, 78]. Pineda et Dooley [19], rapportent au contraire un effet du voltage à la fois sur le nombre de spermatozoïdes, le volume total de la semence et son osmolarité. Le volume et la concentration obtenus à 1 V serait inférieurs à ceux éjaculés à 2, 4 ou 6 V. D'après ces auteurs, Il apparaît que c'est surtout le nombre de stimulations infligées qui influe sur le volume.

Pineda *et al.* [54] l'expliquent par une sensibilité des glandes sexuelles accessoires plus forte aux stimulations. La production de plasma séminal est maximale vers 1 à 2 V.

L'éjaculation est obtenue de façon inconstante avec des stimuli entre 2 et 8 V et 5 et 220 mA. L'éjaculation sans érection est possible. Nous détaillerons plus loin le protocole de choix [20, 37]. On note que l'éjaculation se produit le plus souvent entre 4 et 8 V et les spermatozoïdes recueillis proviennent de l'épididyme et du *vasa deferens*. De plus, la composition d'un éjaculat recueilli à 6 V s'apparente à celle de la semence obtenue avec un vagin artificiel [19, 54]. La viabilité et la mobilité des spermatozoïdes n'est influencée ni par le voltage, ni par l'intervalle entre deux collections [19, 78]. L'éjaculat le plus concentré semble être celui obtenu à la deuxième éjaculation [53, 54].

Howard *et al.* [37] ont déterminé des séries de stimulations électriques utilisables chez les félins (tableau 2), permettant d'éviter la contamination urinaire (voir page 62) et d'obtenir un éjaculat de qualité.

Tableau 2 : Protocole d'électro-éjaculation chez les félins [20, 37].

	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

Le voltage est augmenté en 3 secondes, puis on reste au voltage voulu pendant 2 à 3 secondes et on revient à 0 V en 3 secondes avant de recommencer la manipulation pour le voltage suivant. Les délais peuvent être plus rapides 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. Au moins 60 stimulations électriques sont nécessaires à l'éjaculation.

Il existe d'autres protocoles mis au point par Johnstone [42] et Platz et Seager [55], donnant des résultats approchants.

Les auteurs font varier la force du courant de 0 V à un maximum de voltage correspondant à la valeur minimale provoquant l'extension des membres postérieurs et la protrusion des griffes.

Pour les grands félins, afin d'améliorer la quantité de l'éjaculat, un massage de la zone périnéale est parfois effectué en fin de chaque série de stimuli (Fontbonne, communication personnelle). La production de liquide prostatique et l'émission de sperme par la contraction des conduits déférents sont effectivement stimulées par ce massage.

Photo 5 : Positionnement optimal de la sonde avec extension symétrique des postérieurs et extrusion des griffes chez le chat (CERCA).



Platz et Seager [55] réalisent une séance comprenant 3 séries de 60 stimuli chacune entre lesquelles une période de repos de 5 minutes est respectée (tableau 3).

Tableau 3 : Protocole d'électro-éjaculation pour l'espèce féline [55].

	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

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

Le premier protocole étant plus simple d'utilisation et aboutissant aux mêmes résultats, c'est celui-ci que nous choisirons d'utiliser ultérieurement.

II.1.4 Avantages et inconvénients

C'est une méthode facile d'emploi, pour peu que l'on dispose du matériel nécessaire, et indiquée dans le cadre d'interventions sur des animaux sauvages. 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 même éjaculat peut être alors utilisé pour inséminer plusieurs femelles.

Pineda *et al* [54] 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 [78]. Aucune des études citées n'a fait part d'effets néfastes dus à l'électro-éjaculation lorsque les prélèvements sont réalisés à 2 ou 3 jours d'intervalle.

La contamination urinaire s'ajoute enfin aux inconvénients majeurs rencontrés ; nous en reparlerons ensuite, page 62.

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

Nous développerons dans cette partie le spermogramme à proprement parler. Celui-ci ne constitue qu'une approche, une évaluation du pouvoir fécondant du sperme des félinés sauvages.

Le spermogramme est un examen médical au cours duquel on analyse le sperme. Il vise à quantifier les spermatozoïdes et décrit entre autre le volume de l'éjaculat, son pH, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes.

Les éjaculats sont très variables selon les individus en volume, pH, osmolarité et concentration en spermatozoïdes [19, 42, 54, 78]. Les prélèvements sur un même félin peuvent également subir de grandes variations, c'est pourquoi 5 prélèvements et spermogrammes semblent nécessaires pour juger du potentiel reproducteur d'un mâle [54] (Sojka *et al.* [67] n'en recommandent 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 [42].

La semence de félinés sauvages n'a fait l'objet que d'un petit nombre de publications, mais qui donnent des résultats relativement similaires.

II.2.1 Intérêt de l'analyse de la semence [56, 80]

Le spermogramme est un excellent recours lors de problèmes de fertilité avérés. Cet examen de routine peut être mis en relation avec des informations essentielles concernant aussi bien le mâle que la femelle, comme la fréquence des saillies, la libido, le comportement sexuel et les moyens de reproduction assistée déjà employés ainsi que leurs résultats. Le spermogramme reste le meilleur moyen d'évaluer le potentiel reproducteur d'un mâle.

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.

Il existe évidemment des différences intraspécifiques en ce qui concerne la fonction de reproduction des félinés sauvages, comme l'atteste l'étude de Moray *et al.* (annexe 4). Chez trois félinés sauvages que sont l'ocelot, le margay ou chat-tigre et l'oncille, des prélèvements sanguins, des mesures d'organes (testicules, prostate) et des récoltes de semence par électroéjaculation ont été mises en œuvre par l'équipe de chercheurs sur une période de quatorze mois [48]. Il en ressort que l'ocelot est le félin qui a la plus haute mobilité des spermatozoïdes et le plus grand nombre de formes normales. La concentration de testostérone sérique est à peu près identique pour les trois espèces. La production de sperme est plus importante quantitativement en été pour chaque espèce sans exception.

II.2.2 Examen macroscopique

Les paramètres d'analyses qui vont être présentés dans ce paragraphe sont ceux utilisés lors d'études de terrain (étude sans moyens de laboratoire élaborés comme un compteur CASA, la cytométrie de flux, une coloration de Diff-Quick,...). Cette étude s'est voulue spécifique de l'application expérimentale qui lui fait suite.

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 [73].

II.2.2.ii Aspect

La semence féline a un aspect lactescent. Elle est homogène, mais trouble. Elle peut être de couleur anormale, signe d'une contamination par l'urine (jaune), par du sang (rouge ou brun), ou par du pus (vert). Le volume de l'éjaculat étant très faible, il est parfois difficile de distinguer les décolorations [73].

II.2.2.iii Volume

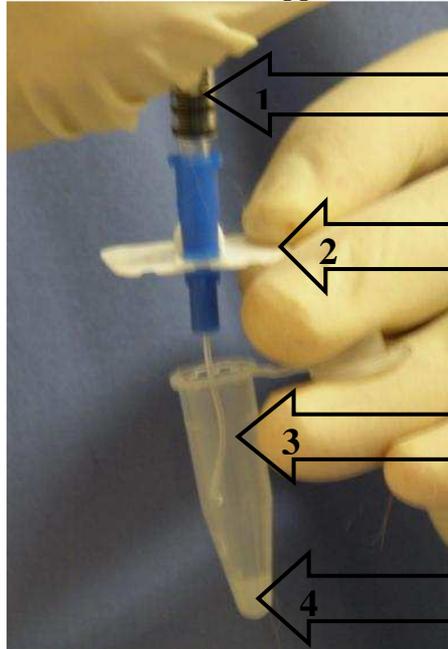
On mesure le volume à l'aide d'une pipette graduée de 100 μ L ou d'une pipette à volume variable [55]. Les différentes quantités récoltées au cours de diverses études expérimentales sont répertoriées en annexe 7.

Le chat domestique libère, en moyenne à chaque éjaculation 0,04 ml de sperme, obtenu de façon spontanée. Le faible volume (photo 6) des éjaculats de félinés de petits gabarits 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. En effet, en raison du faible volume récolté chez les félinés, les techniques habituellement utilisées dans les autres espèces, comme chez le chien, ne sont pas directement transposables [78].

De plus, l'utilisation de la semence passe généralement par le regroupement de plusieurs éjaculats en un échantillon unique. Le volume d'un éjaculat obtenu par électro-éjaculation est nettement supérieur (0,27 mL en moyenne). 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 paragraphe précédent [42].

Photo 6 : Récolte de semence de chat domestique après électroéjaculation (CERCA).

1 : seringue de 1 mL ; 2 : cathéter de 20 G ; 3 : eppendorf de récolte ; 4 : éjaculat.



II.2.2.iv pH

Le pH de la semence est rarement mesuré et semble varier de 7,4 selon Sojka *et al.* [67] à 8,61 selon Dooley et Pineda [19]. Ces derniers auteurs affirment que la semence récoltée par électro-éjaculation est plus alcaline (pH=8,61). 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'électroéjaculation étant un protocole demandant à peu près une demi-heure de manipulation avant de pouvoir commencer les analyses.

II.2.3 Examen microscopique de la semence

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 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 avec une solution saline chaude à 0,9%

ou une solution de citrate de sodium tiédi à 2,9 % facilite cette évaluation. On peut toutefois estimer la mobilité sur sperme non dilué [78]. Il est également possible depuis peu d'utiliser un analyseur de mobilité, comme ce fut le cas pour l'analyse de la semence de léopards [40].

Si la semence est gardée à 23°C après éjaculation, les spermatozoïdes vont rester mobiles pendant un certain 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 dû à l'accumulation rapide de métabolites toxiques. De même, si la température devient inférieure à 30°C, la mobilité des spermatozoïdes diminue en même temps que le métabolisme [26].

II.2.3.ii 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 [35, 55].

La mobilité est optimale 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 du flagelle correspondant à une rotation autour de l'axe longitudinal, de telle sorte que leur progression est rectiligne [35, 55].

II.2.3.iii Echelles de mobilité

Une autre alternative consiste en une estimation subjective de la mobilité par l'utilisation de l'échelle de Watson [26] qui va de 0 à + 5, telle qu'elle est décrite dans le tableau 4.

Tableau 4 : Echelle de mobilité des spermatozoïdes [26].

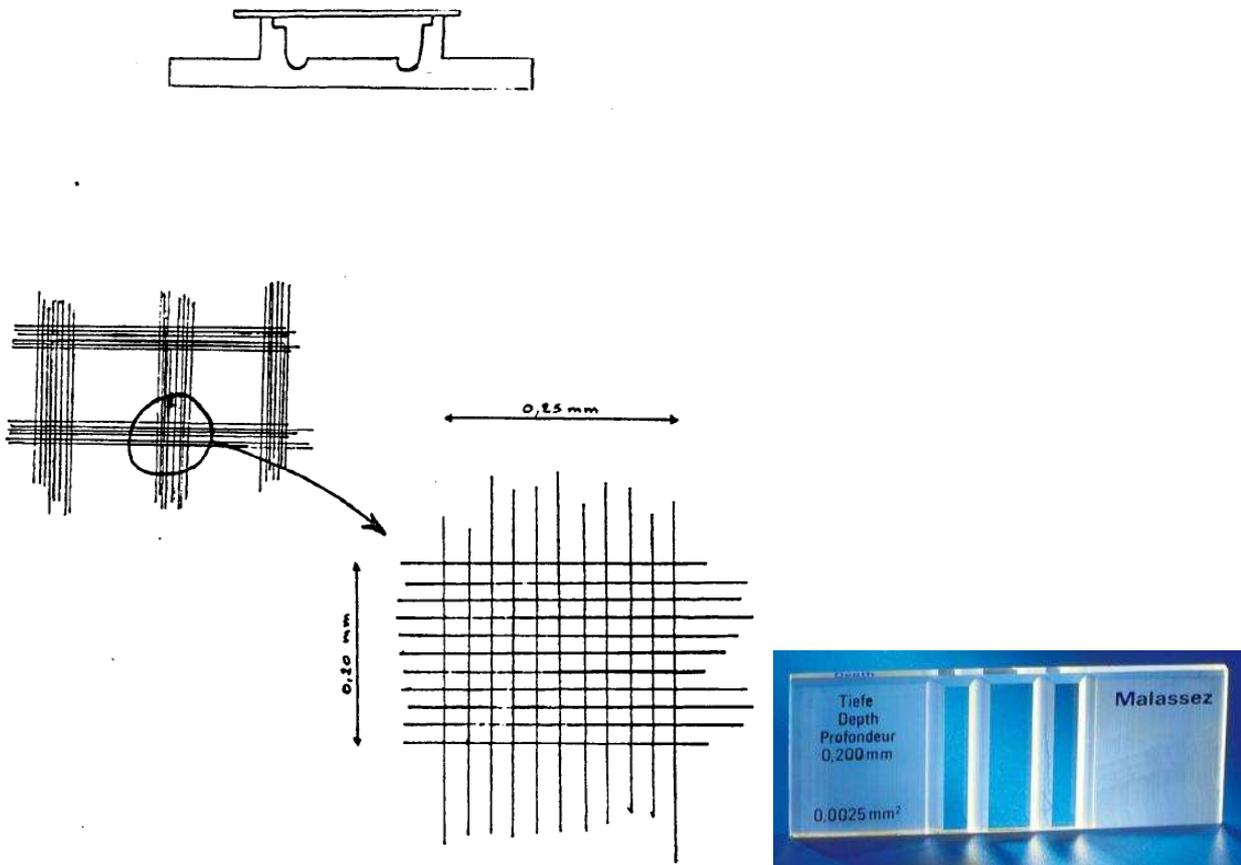
Notes	% de spermatozoïdes à progression rapide
0	Aucun mouvement
1	20
2	40
3	60
4	80
5	100

II.2.3.iv Le nombre de spermatozoïdes

Des estimations précises de 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. 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 [37].

Le dénombrement des spermatozoïdes est ensuite effectué à l'aide d'une cellule de Thoma ou de Malassez (photo 7).

Photo 7 : Cellule de Malassez, Dutscher®, Brumath, France, utilisée au CERCA.



II.2.4 Caractéristiques de la semence

II.2.4.i Ultrastructure et intégrité membranaire des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes de félins ont une tête allongée, ovale, qui présente deux niveaux de symétrie : une symétrie axiale et une symétrie plane latérale.

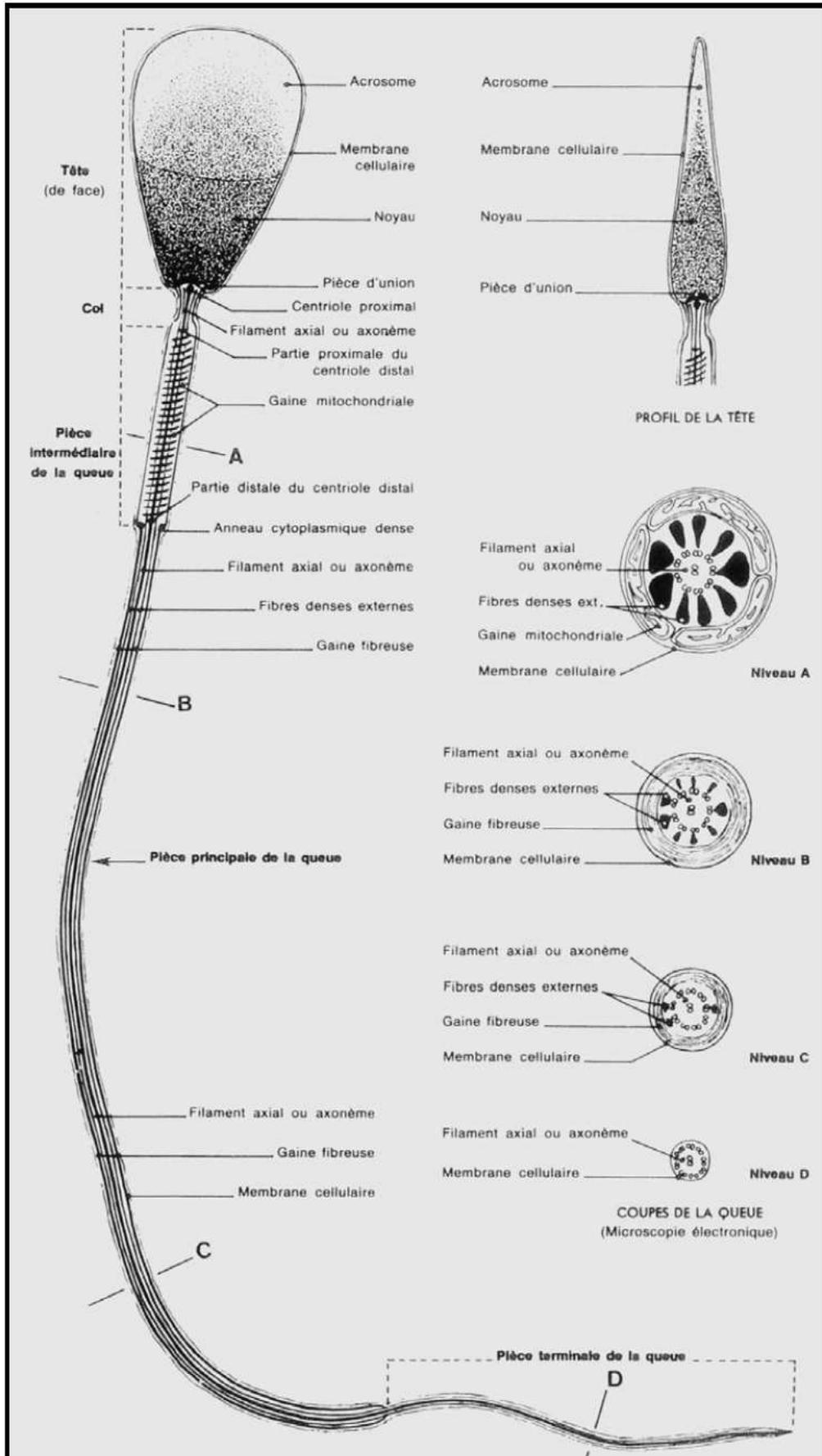
La tête comprend un acrosome qui entoure presque complètement le noyau très condensé. La région du cou présente un petit rétrécissement et contient des mitochondries qui s'enroulent autour du complexe axonémal formant le flagelle.

La structure axonémale se simplifie et permet le prolongement du flagelle qui comprend dans toute sa longueur, un complexe microtubulaire formé d'une partie centrale et de neuf paires périphériques surmontées de neuf fibres denses.

Dans la pièce intermédiaire, on observe des mitochondries disposées en cercle 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 microtubulaire 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 11 représente un spermatozoïde félin vu en microscopie électronique.

Figure 11 : Ultra-structure d'un spermatozoïde de félin [70].



II.2.4.ii Caractéristiques de la semence récoltée par électroéjaculation [23, 67, 74, 83, 96]

Les volumes de sperme obtenus dans les différentes études pour les diverses espèces s'échelonnent de 0,042 mL à 27,4 mL par éjaculat, toute espèce confondues, et le nombre de spermatozoïdes de 0,09 à 153.10^6 par éjaculat (tableau 5 et annexe 7). Il existe donc une grande variabilité des résultats obtenus par électro-éjaculation.

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 [19, 78]. 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 [55]. On obtient donc un éjaculat d'un plus grand volume et moins concentré [19, 78]. Des pourcentages plus élevés de formes anormales sont rapportées parfois [55], 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 [60, 68]. De plus, les anomalies sont présentes dans les mêmes proportions au niveau de l'épididyme caudal avant et après électro-éjaculation [3].

Ayant décrit les principales caractéristiques de la semence de félinés et la technique d'électroéjaculation, nous allons nous pencher sur la qualité de la semence féline et mettre en lumière les différents facteurs l'influençant.