

## TABLE DES MATIERES

<b><u>FIGURES</u></b> .....	<b>5</b>
<b><u>PHOTOS</u></b> .....	<b>6</b>
<b><u>TABLEAUX</u></b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>9</b>
<b>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>11</b>
.1 RAPPELS D'ANATOMIE ET DE PHYSIOLOGIE .....	13
<i>.1.1 Anatomie</i> .....	13
.1.1.1 Pénis.....	13
.1.1.2 Testicules et épидидyme.....	14
.1.1.3 Urètre .....	14
.1.1.4 Les glandes annexes.....	14
.1.1.5 Innervation .....	17
<i>.1.2 Physiologie</i> .....	17
.1.2.1 Puberté et saison sexuelle .....	17
.1.2.2 La spermatogénèse.....	19
.1.2.3 Erection .....	21
.1.2.4 Ejaculation .....	23
.1.2.5 Accouplement .....	25
.2 TECHNIQUES DE PRELEVEMENT DU MALE.....	27
<i>.2.1 Vagin artificiel</i> .....	27
.2.1.1 Environnement requis .....	27
.2.1.2 Technique.....	27
<i>.2.2 Electroéjaculation</i> .....	28
.2.2.1 La contention .....	28
.2.2.2 Techniques décrites dans la littérature .....	29
.2.2.3 Ejaculation rétrograde.....	31
<i>.2.3 Dissection de l'épididyme</i> .....	31
.2.3.1 L'épididyme est le lieu de maturation et de stockage des spermatozoïdes.....	31
.2.3.2 Technique.....	32

.3	SPERMOGRAMME .....	32
.3.1	<i>Etude macroscopique</i> .....	33
.3.1.1	Volume.....	33
.3.1.2	Concentration.....	33
.3.1.3	Caractères physico-chimiques .....	33
.3.1.4	Plasma séminal.....	34
.3.2	<i>Etude microscopique</i> .....	34
.3.2.1	Morphologie des spermatozoïdes .....	34
.3.2.2	Mobilité.....	36
.3.2.3	Numération .....	37
.3.2.4	Pourcentage de spermatozoïdes vivants.....	38
.3.2.5	Anomalies : le spermocytogramme .....	38
.3.2.6	Intégrité de l'acrosome .....	40
.3.2.7	Intégrité plasmatique : test hypo-osmotique .....	42
.3.2.8	Condensation de la chromatine.....	42
.3.2.9	La transmigration membranaire.....	43
.3.3	<i>Anomalies de la semence</i> .....	43
.3.3.1	Anomalies primaires .....	44
.3.3.1.1	Anomalies liée à une cause anatomique.....	44
.3.3.1.2	Anomalies liées à des troubles hormonaux .....	44
.3.3.1.3	Anomalies liées au patrimoine génétique.....	44
.3.3.1.4	Anomalies liées à l'âge.....	45
.3.3.2	Anomalies secondaires.....	45
.3.3.2.1	Anomalies liées aux glandes annexes .....	45
.3.3.2.2	Anomalies liées à une pathologie urinaire .....	45
.3.3.2.3	Anomalies liées à un agent infectieux.....	45
.3.3.2.4	Anomalies liées à des affections de l'organisme.....	45
.3.3.2.5	Anomalies iatrogènes .....	46
.3.3.2.6	Anomalies idiopathiques .....	46
.3.4	<i>Caractéristiques de la semence obtenue dans la littérature selon la technique de récolte utilisée</i> .....	46
.3.4.1	Caractéristiques moyennes de la semence obtenue par vagin artificiel dans la littérature .....	46
.3.4.2	Caractéristiques moyennes de la semence obtenue par électroéjaculation dans la littérature .....	47

.3.4.3	Caractéristiques moyennes de la semence obtenue par dissection de l'épididyme dans la littérature.....	48
.4	CRYOCONSERVATION DE LA SEMENCE DE CHAT ET INSEMINATION ARTIFICIELLE.....	50
.4.1	<i>Dilueur</i> .....	50
.4.1.1	Généralités : altérations induites par la congélation .....	50
.4.1.2	Composition du dilueur.....	51
.4.2	<i>Techniques de cryoconservation de la semence des carnivores utilisées dans la littérature et au Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores (C.E.R.C.A.)</i> .....	53
.4.3	<i>Décongélation</i> .....	55
.4.4	<i>Insémination artificielle chez le Chat</i> .....	55
	<b>DEUXIEME PARTIE : ETUDE PERSONNELLE.....</b>	<b>57</b>
.1	MATERIELS ET METHODES .....	59
.1.1	<i>Animaux</i> .....	59
.1.2	<i>Récolte du sperme</i> .....	59
.1.2.1	Electroéjaculation .....	59
.1.2.2	Récolte du sperme épидидymaire.....	62
.1.3	<i>Conservation du sperme</i> .....	62
.1.3.1	Préparation du dilueur.....	62
.1.3.2	Dilution du prélèvement avec le dilueur.....	63
.1.3.3	Congélation des paillettes .....	65
.1.4	<i>Décongélation</i> .....	65
.1.5	<i>Tests de comparaison : le spermogramme</i> .....	67
.1.5.1	Mobilité.....	67
.1.5.2	Numération .....	67
.1.5.3	Pourcentage de spermatozoïdes vivants.....	70
.1.5.4	Anomalies .....	71
.1.5.5	Intégrité de l'acrosome .....	72
.2	RESULTATS .....	73
.2.1	<i>Qualité de la semence avant congélation</i> .....	73
.2.1.1	Semence récoltée par électroéjaculation.....	73
.2.1.2	Semence récoltée par dissection de l'épididyme .....	73
.2.2	<i>Qualité de la semence après décongélation</i> .....	76

.2.2.1	Aptitude à la congélation de la semence récoltée par électroéjaculation.....	76
.2.2.2	Aptitude à la congélation de la semence récoltée par dissection de l'épididyme... ..	77
.3	DISCUSSION.....	78
.3.1	<i>Les difficultés rencontrées</i> .....	78
.3.1.1	Au niveau de l'échantillonnage .....	78
.3.1.2	Au niveau de l'environnement.....	79
.3.1.3	Au niveau de la cryoconservation.....	80
.3.2	<i>Interprétation des résultats</i> .....	80
.3.2.1	Caractéristiques de la semence obtenue par électroéjaculation .....	80
.3.2.2	Caractéristiques de la semence obtenue par dissection de l'épididyme .....	81
.3.2.3	Comparaison des deux méthodes.....	81
.3.2.4	Caractéristiques de la semence de Chat obtenues après sa cryoconservation ..	82
.3.3	<i>Les perspectives</i> .....	82
.3.3.1	La cryoconservation.....	82
.3.3.2	L'insémination artificielle.....	83
.3.3.3	Le diagnostic d'infertilité.....	85
	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>87</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>89</b>

## **FIGURES**

<b>Figure 1 :</b> Schéma de l'appareil génital mâle	14
<b>Figure 2 :</b> Testicule et épидидyme gauches de chat	16
<b>Figure 3 :</b> Innervation de l'appareil génital mâle	18
<b>Figure 4 :</b> La spermatogenèse	20
<b>Figure 5 :</b> Schéma simplifié du déterminisme de l'érection	22
<b>Figure 6 :</b> Schéma simplifié du déterminisme de l'éjaculation	24
<b>Figure 7 :</b> Déroulement d'une saillie naturelle	26
<b>Figure 8 :</b> Sonde rectale d'un électroéjaculateur	30
<b>Figure 9 :</b> Schématisation d'un spermatozoïde	35
<b>Figure 10 :</b> Anomalies des spermatozoïdes chez le Taureau	39
<b>Figure 11 :</b> Dissection des épидидymes et récolte du sperme épидидymaire	64
<b>Figure 12 :</b> Comptage cellulaire à l'aide d'une cellule de Thoma	69

## PHOTOS

<b>Photo 1 :</b> Pénis de Chat en érection	16
<b>Photo 2 :</b> Electroéjaculateur utilisé dans notre étude personnelle	30
<b>Photo 3 :</b> Spermatozoïde normal et vivant de Chat coloré à l'éosine-nigrosine	36
<b>Photo 4 :</b> Cellule de Thoma	38
<b>Photo 5 :</b> Récolte du sperme électroéjaculé par capillarité dans un corps de seringue à Insuline	61
<b>Photo 6 :</b> Extension des postérieurs et protusion des griffes lors de l'électroéjaculation	61
<b>Photo 7 :</b> Paillettes et visotube utilisés pour la cryoconservation de la semence de Chat	66
<b>Photo 8 :</b> Cuve à azote liquide pour conserver les paillettes	66
<b>Photo 9 :</b> Cellule de Thoma observée au microscope au grossissement x100	68
<b>Photo 10 :</b> Cellule de Thoma observée au microscope au grossissement x400	68
<b>Photo 11 :</b> Spermatozoïde mort et spermatozoïde vivant suite à la coloration vitale à l'éosine-nigrosine	70
<b>Photo 12 :</b> Spermatozoïde mort macrocéphale à côté d'un spermatozoïde vivant après coloration à l'éosine-nigrosine	71
<b>Photo 13 :</b> Spermatozoïde dont l'acrosome est intact et spermatozoïde dont l'acrosome est endommagé après coloration au vert rapide	72

*Photos Posière/Malandain, UMES/ENVA*

## TABLEAUX

<b>Tableau I :</b> Caractéristiques moyennes de la semence de Chat récoltée par vagin artificiel relevées dans la littérature	47
<b>Tableau II :</b> Caractéristiques moyennes de la semence de Chat recueillie par électroéjaculation relevées dans la littérature	48
<b>Tableau III :</b> Caractéristiques moyennes de la semence de Chat prélevée par dissection de l'épididyme relevées dans la littérature	49
<b>Tableau IV :</b> Composition des dilueurs utilisés dans la littérature pour la cryoconservation de la semence de Chat.	52
<b>Tableau V :</b> Description des techniques utilisées dans la littérature pour la cryoconservation de la semence de Chat.	54
<b>Tableau VI :</b> Caractéristiques de la semence de Chat obtenue par électroéjaculation	74
<b>Tableau VII :</b> Caractéristiques de la semence de Chat obtenue par dissection de l'épididyme	75
<b>Tableaux VIII :</b> Caractéristiques de la semence de Chat prélevée par électroéjaculation après décongélation	77
<b>Tableau IX :</b> Caractéristiques de la semence de Chat prélevée par dissection de l'épididyme après décongélation	78



## INTRODUCTION

Avec un peu plus de 8 millions de représentants en France [44], le Chat est l'animal de compagnie préféré des français. Bien qu'une minorité des chats soit de race pure, l'élevage félin est en expansion. Les éleveurs félins étant pour la plupart des amateurs qui élèvent des chats en plus de leur profession, ils doivent pouvoir compter sur les vétérinaires pour les informer et optimiser cette croissance.

La maîtrise de l'élevage passe par une bonne maîtrise de la reproduction et implique pour les vétérinaires une bonne connaissance des moyens d'investigation en cas de pathologie de la sphère génitale. Celle-ci comprend également la connaissance des moyens de substitution à la saillie naturelle.

Les étalons sont rarement utilisés au maximum de leur potentiel de reproduction dans un élevage. En effet, un mâle excellent en concours a une carrière reproductrice d'une dizaine d'années, ensuite sa qualité de semence diminue. Les petits élevages amateurs sont même souvent contraints de castrer leur étalon avant ses 10 ans car les désagréments qu'il procure leur sont insoutenables (odeur, comportement). La possibilité de collecter du sperme et de le conserver dans l'azote liquide leur permettrait de conserver le potentiel génétique de ces étalons et de pouvoir l'utiliser par la suite même si les étalons ne sont plus fertiles (castration, décès).

De plus, la récolte et la cryoconservation de la semence de Chat permettraient de diffuser le potentiel génétique des étalons hors pairs en faisant voyager leur semence et en réalisant des inséminations artificielles. Cette technique de reproduction assistée permettrait par ailleurs de limiter les risques infectieux encourus par l'étalon s'il devait sortir de l'élevage.

Les étapes clés de l'insémination artificielle sont la production de semence, la bonne conservation de cette semence, l'appréciation de la bonne période de fécondité de la femelle puis l'insémination proprement dite [11]. Nous avons choisi de nous intéresser aux deux premières étapes en comparant deux techniques de récolte de la semence de Chat facilement réalisables par le vétérinaire : l'électroéjaculation et la dissection de l'épididyme, puis nous avons tenté de congeler la semence obtenue par la technique employée chez le Chien au

Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores (C.E.R.C.A.) de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Dans une première partie, des rappels de l'anatomie et la physiologie de l'appareil reproducteur du mâle permettront d'expliquer les trois moyens de prélèvements réalisables sur l'étalon : la récolte par vagin artificiel, l'électro-éjaculation et la récolte du sperme épидидymaire. La cryoconservation de la semence sera abordée.

Dans la deuxième partie expérimentale, des essais d'électroéjaculation, de récolte de sperme épидидymaire et de cryoconservation seront réalisés.

## **PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



## **.1 Rappels d'anatomie et de physiologie**

L'anatomie et la physiologie de l'appareil reproducteur mâle du Chat permettent d'expliquer certaines caractéristiques de la semence et de comprendre la façon dont on peut réaliser des prélèvements dans cette espèce.

### **.1.1 Anatomie [5], [57], [24]**

Les organes génitaux externes du chat sont situés en région périnéale haute. L'appareil génital du Chat est simplifié par rapport aux autres mammifères (figure 1). Il comprend des testicules protégés dans leur scrotum. Ceux-ci sont prolongés par l'épididyme et le canal déférent jusque l'urètre où viennent s'aboucher les glandes annexes. Puis l'urètre se termine dans le pénis. Le tout est sous l'innervation provenant de la moelle épinière, parfois consciente mais le plus souvent réflexe.

#### **.1.1.1 Pénis**

Le pénis du chat est conique, de petite taille (8 à 10mm) et est dirigé caudalement au repos [78]. Lors de l'érection (photo 1), il se dirige plutôt ventralement que crânialement [78]. La racine du pénis est entourée des muscles ischio-caverneux et se poursuit du corps constitué de l'urètre entouré par les corps spongieux, des muscles bulbo-spongieux puis des corps caverneux séparés par un septum.

Le pénis contient un petit os pénien de 0.5 cm, s'ossifiant tardivement, qui soutient le gland [30].

La muqueuse du gland est recouverte de papilles kératinisées androgéno-dépendantes (100 à 200) qui disparaissent lors de la castration. Le gland est recouvert du prépuce. Au repos, le pénis est complètement dans son fourreau [35], [56].

Le pénis du chat ne comprend pas de bulbes érectiles contrairement au pénis du chien [78].

### *.1.1.2 Testicules et épидидyme*

Le scrotum se situe juste sous l'anus et est recouvert de poils. Le muscle crémaster est grêle et le cordon spermatique, horizontal, est beaucoup plus long en proportion que celui du chien.

Les testicules sont globuleux et mesurent de 1,2 à 2,0 cm en longueur pour 0,7 à 1,7 cm en largeur [78]. Chaque testicule disséqué pèse 1 à 1.5g [56]. Leur grand axe est orienté ventralement et crânialement. L'épididyme et le testicule sont recouverts par une tunique albuginée puis par la tunique vaginale et enfin par les fascias internes (figure 2) et externes sous le tégument scrotal. L'épididyme est rattachée à la paroi scrotale par le ligament de la queue de l'épididyme.

L'épididyme est constituée de trois parties : la tête qui est crâniale et ventrale par rapport au testicule, le corps qui est ventral et la queue qui est caudale au testicule. Le conduit épидидymaire est fortement spiralé [30] . Il se continue par le canal déférent très contourné qui va pénétrer dans le cordon spermatique ensuite.

### *.1.1.3 Urètre*

L'urètre poursuit le col de la vessie, qui est cylindrique et très étiré, en commençant juste en avant de la prostate. Il se différencie de la vessie car il présente des muscles striés. Les canaux déférents s'y abouchent dorsalement au niveau du colliculus seminalis se situant sous la prostate. La partie pelvienne de l'urètre est relativement longue (5cm) et se poursuit par la partie spongieuse en région dorsale du corps du pénis.

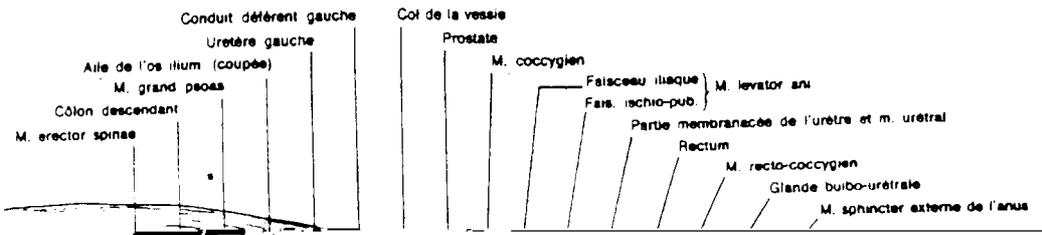
### *.1.1.4 Les glandes annexes*

Tout comme chez le chien, l'appareil génital du chat est dépourvu de vésicules séminales et ses conduits déférents sont dépourvus de glandes et d'ampoules [78].

La prostate est petite (1cm). Elle est composée de plusieurs lobules isolés disséminés dorsalement, le long de l'urètre [35], [1].

Les glandes bulbo-urétrales se situent au niveau de l'arcade ischiale et sont écrasées dorso-ventralement. Elles sont reliées par le muscle bulbo-urétral et par du tissu conjonctif. Elles ont un diamètre de 5 à 6 mm. Leur conduit excréteur unique est court et débouche dorsalement à l'urètre. Elles synthétisent la plus grande partie du plasma séminal [43].

**FIGURE 1 : SCHEMA DE L'APPAREIL GENITAL MALE ( D'APRES BARONE [5])**

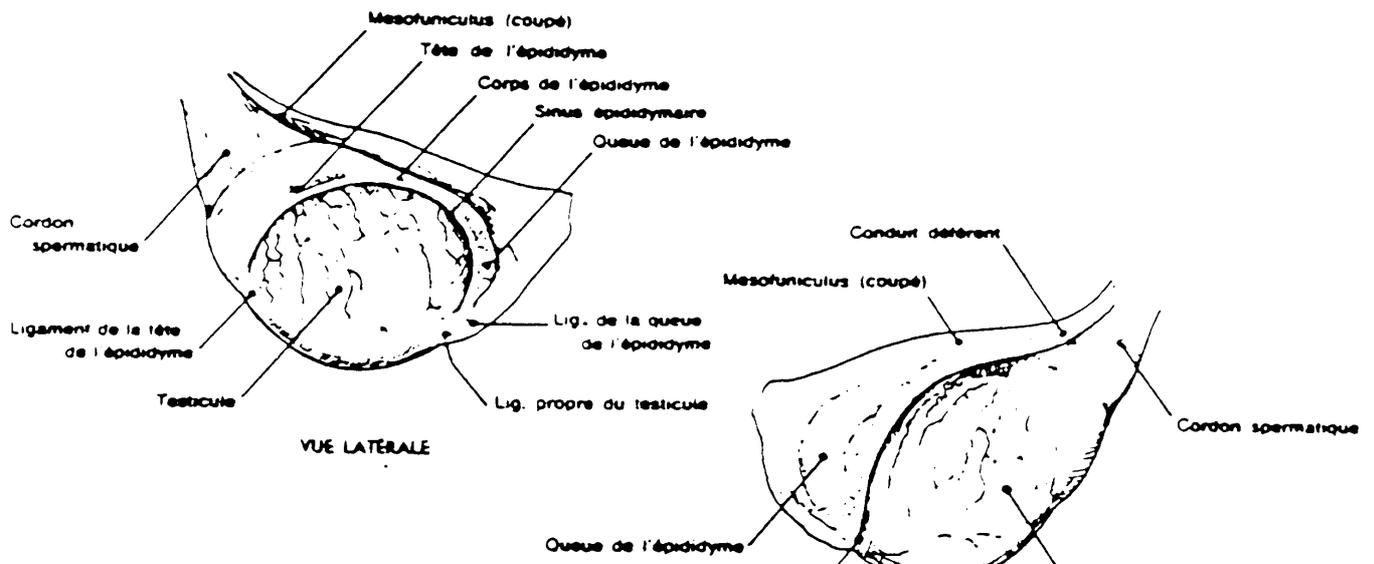


## PHOTO 1 : PENIS DE CHAT EN ERECTION



FIGURE 2 : TESTICULE ET EPIDIDYMES GAUCHE DE CHAT ( D'APRES BARONE

[5])



### .1.1.5 Innervation [73]

L'appareil génital mâle est innervé par plusieurs groupes de fibres nerveuses (figure 3) :

\_des fibres appartenant au système nerveux autonome : des fibres orthosympathiques, provenant de la chaîne sympathique thoraco-lombaire et des plexus abdominaux, formant le nerf hypogastrique et des fibres parasympathiques, issues des racines médullaires sacrées S1, S2 et S3, formant le *nervus erigens*. Le nerf hypogastrique et le *nervus erigens* se rejoignent pour former le plexus hypogastrique.

\_des fibres somatiques, issues de S1 et de S2, formant le nerf honteux interne qui innerve les muscles striés tels que le muscle bulbocaverneux, le muscle ischiocaverneux et la musculature périnéale.

Au niveau périphérique, ces innervations se rejoignent et suivent les mêmes trajets. Seemans et Langworthy distinguent trois regroupements du plexus hypogastrique autour des organes génito-urinaires :

\_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 ;

\_un groupe caudal qui innerve le pénis et le rectum. Une des branches rectales s'anastomose avec le nerf honteux interne.

## .1.2 Physiologie

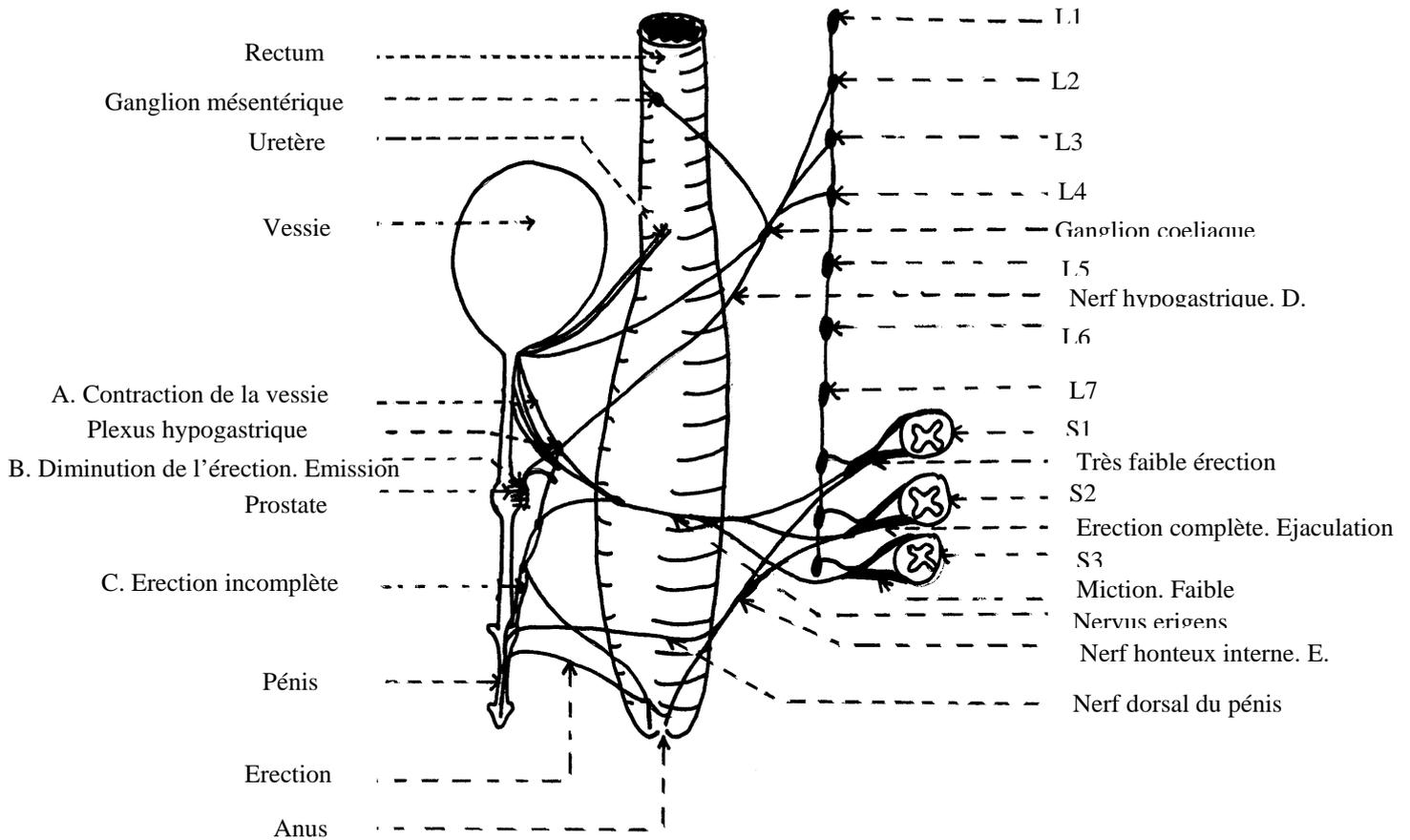
### .1.2.1 Puberté et saison sexuelle

Les testicules sont descendus à la naissance et sont palpables dans les scrotums. Ils deviennent facilement palpables vers 3-5 mois [35].

La puberté survient entre 5 et 10 mois d'âge. Le poids des testicules est alors d'au moins un gramme [7]. Les premiers éjaculats sont peu concentrés et contiennent beaucoup de formes anormales. La vie de reproduction des mâles dure environ 8 à 10 ans puis la fertilité décroît [10], [23].

**FIGURE 3 : INNERVATION DE L'APPAREIL GENITAL MALE (D'APRES SEEMANS**

[73])



A : Groupe supérieur du plexus hypogastrique.

B : Groupe moyen du plexus hypogastrique.

C : Groupe inférieur du plexus hypogastrique

D : Diminution de l'érection. Contraction du rétracteur du pénis et des conduits déférents. Emission

E : Diminution de l'érection. Contraction du rétracteur du pénis. Ejaculation.

Chez le Chien, un étalon resté abstinent sur une longue période (plusieurs mois) voit la qualité de sa semence diminuer [22]. Chez le Chat, ce constat n'a pas été décrit mais pourrait être vérifié également. Solliciter régulièrement les étalons pourrait optimiser leur fertilité. Les chats mâles peuvent éjaculer 2 à 3 fois par semaine sans voir leur libido, ni la concentration de leur éjaculat en spermatozoïdes diminuer [77]. Un étalon en bonne santé peut s'accoupler trois fois par semaine sans voir la qualité de sa semence décroître [35].

La qualité de la semence varie énormément pour un même individu. Ainsi faut-il réaliser plusieurs spermogrammes avant de la juger (voir 3. Examen de la semence).

Les caractéristiques morphologiques de la semence et les fonctions de la membrane cellulaire des spermatozoïdes sont fortement hérissables. [27]

Bien que la Chatte soit une espèce à reproduction saisonnière, le Chat ne présente pas de variation dans la qualité de sa semence épидидymaire au cours de l'année [81]. Cependant, la présence de femelles en chaleurs à proximité peut stimuler le mâle et permettre d'obtenir ainsi une semence de meilleure qualité [50]. Les chats connaissent un accroissement de l'activité de recherche des femelles dès la fin du raccourcissement des jours (à partir de Noël) [56] et le volume de leur semence tend à s'accroître pendant cette période [42].

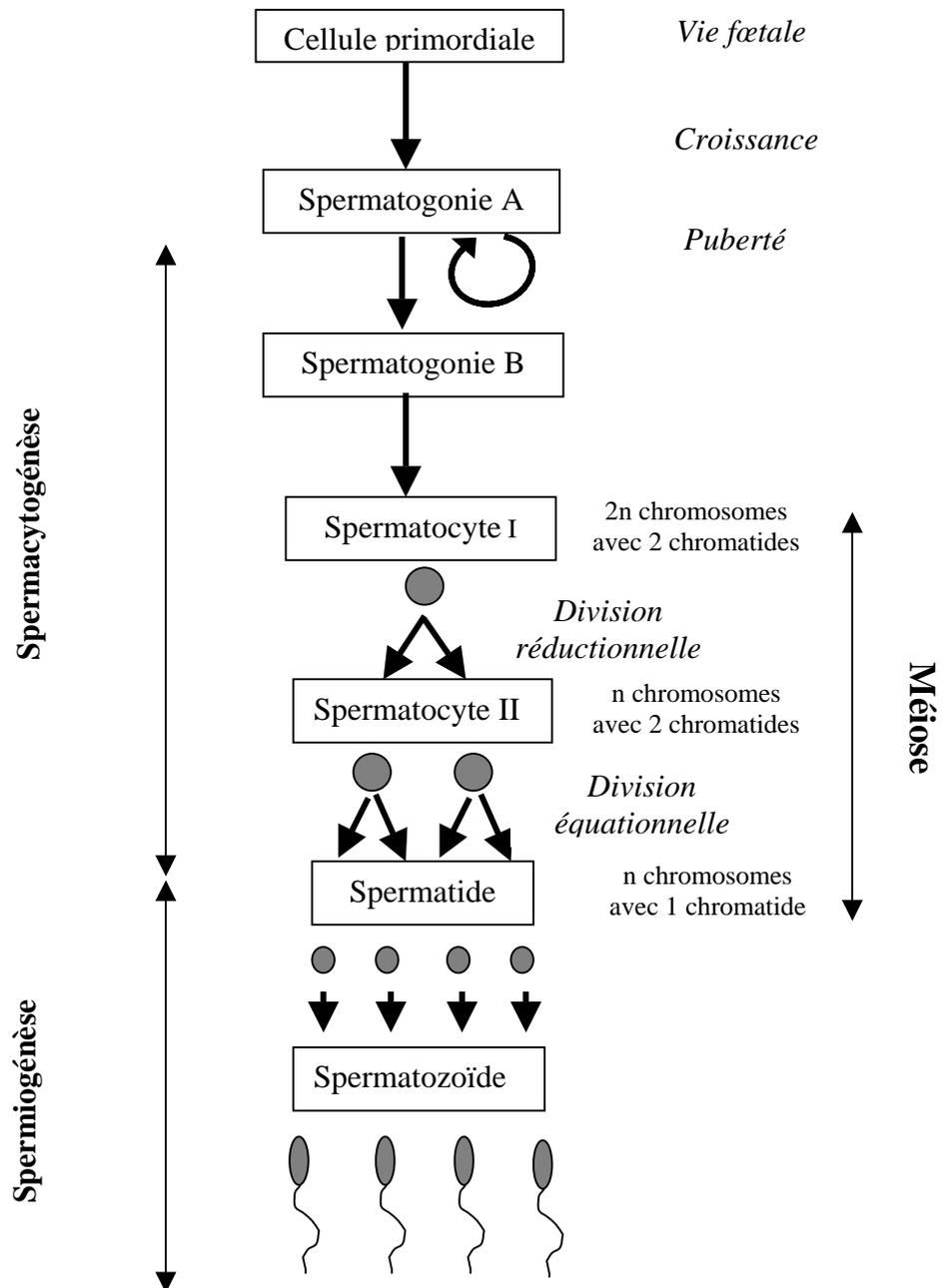
### .1.2.2 La spermatogénèse

[45] , (figure 4)

La spermatogénèse est le processus de différenciation des cellules souches en spermatozoïdes. Elle se déroule dans les tubes séminifères [56]. Chez le chat européen, la spermatogénèse débute vers 5 mois mais les spermatozoïdes ne sont présents dans les tubes séminifères qu'à partir de 7 à 9 mois [7]. Les cellules primordiales sont les gonocytes. Pendant la croissance, ces gonocytes vont se transformer en spermatogonies qui vont proliférer au moment de la puberté de façon massive et continue. On distingue les spermatogonies A qui se multiplient mais ne se différencient pas et les spermatogonies B qui vont subir l'évolution suivante : la spermatogénèse.

Les spermatogonies B donnent en se multipliant les spermatocytes I à l'origine des spermatocytes II après la première division de méiose et des spermatozoïdes après la seconde.

**FIGURE 4 : LA SPERMATOGENESE [45]**



Les spermatides sont donc haploïdes et ne contiennent qu'une seule chromatide. Ce sont eux qui vont subir la spermiogénèse. Ils vont subir des transformations pour aboutir aux spermatozoïdes qui se répartissent en plusieurs phases :

\_la phase golgienne où les granules proacrosomiaux fusionnent pour former la vésicule acrosomale et où le centriole migre étant à l'origine de la formation du flagelle ;

\_la phase capitale où la vésicule acrosomienne s'étend et le flagelle s'épaissit ;

\_la phase acrosomale où la chromatine se condense et où l'acrosome devient plus dense ;

\_la phase de maturation où le spermatozoïde prend sa forme définitive avec formation du corps résiduel à partir du cytoplasme ;

Enfin, la spermiation correspond à la libération des spermatozoïdes. Le corps résiduel est phagocyté par les cellules de Sertoli et seule une gouttelette proximale persiste sur le spermatozoïde.

Le spermatozoïde est alors composé d'une tête contenant l'ADN condensé protégé par l'acrosome dans sa région proximale, d'une pièce intermédiaire contenant les mitochondries nécessaires à l'énergie et d'un flagelle assurant la mobilité.

Les spermatozoïdes immobiles sont transportés dans le rete testis via les sécrétions des cellules de Sertoli, des glandes du rete testis, et des glandes annexes. Ils acquièrent leur mobilité et leur pouvoir fécondant au cours de leur trajet dans l'épididyme où ils perdent leur gouttelette protoplasmique.

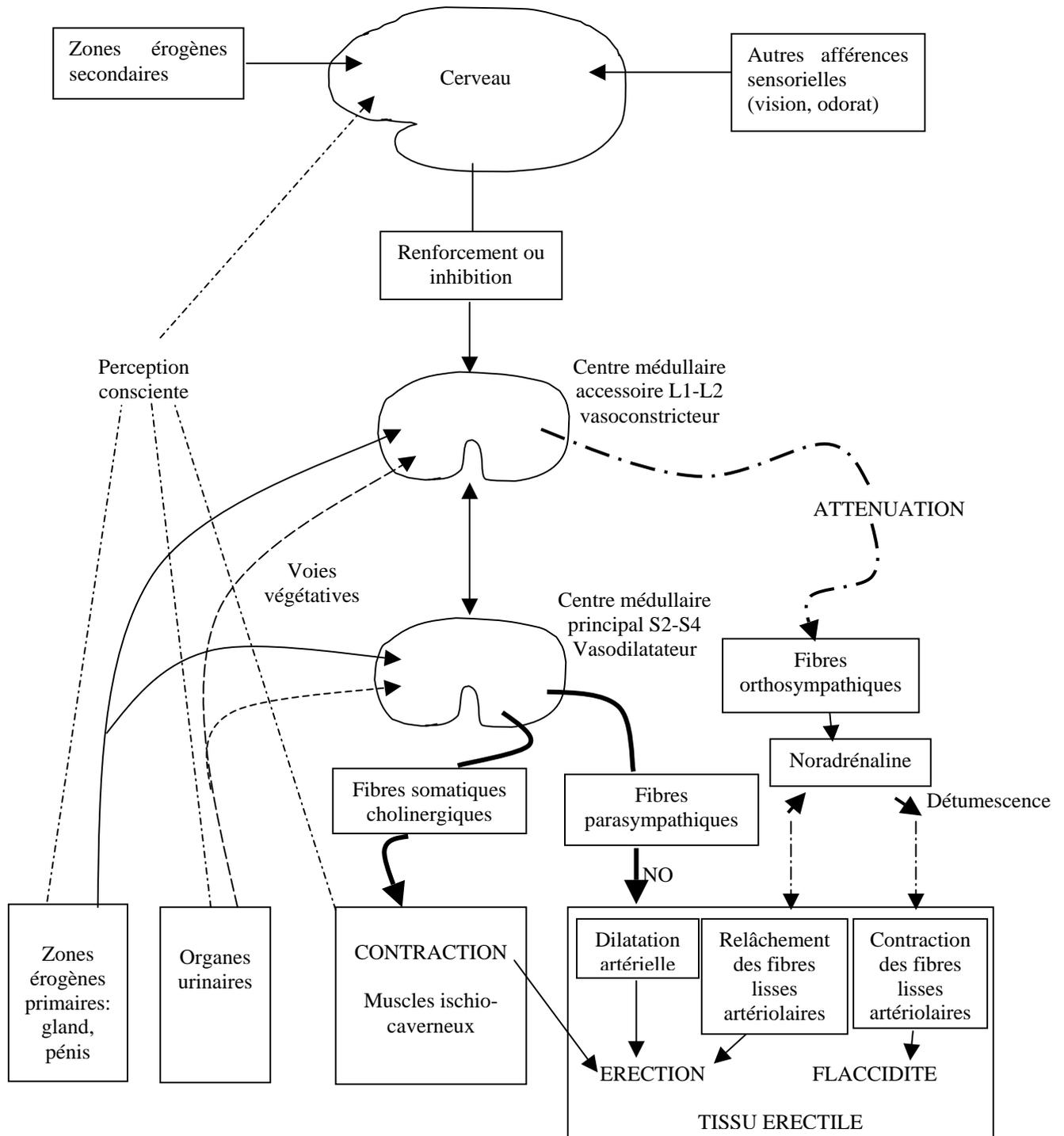
### .1.2.3 *Erection*

[45] , [76], (figure 5)

L'érection est le phénomène de rigidification et d'allongement du pénis permettant son intromission dans les voies génitales de la femelle. Elle est indispensable à l'accomplissement de la fonction reproductrice, notamment à l'éjaculation.

Chez le Chat, comme chez le Chien, la rigidité est permise par l'existence de l'os pénien et par le gonflement des tissus érectiles. Le mécanisme est essentiellement vasculaire. La contraction des muscles ischiocaverneux provoque une compression du corps caverneux en bloquant le retour veineux. Les shunts artério-veineux entre les corps caverneux et spongieux sont fermés, les artères hélicoïdales se dilatent et se déploient. Le tout provoque l'érection : le pénis devient rigide. Caché au repos dans son fourreau, il s'allonge et s'en dégage.

**FIGURE 5 : SCHEMA SIMPLIFIE DU DETERMINISME DE L'ERECTION (D'APRES LEFRANÇOIS [45])**



L'érection est un phénomène réflexe. Elle est contrôlée par le système nerveux parasympathique qui intègre des afférences sensorielles centrales (hypothalamus et cortex) et périphériques (gland, organes génitaux et région périnéale essentiellement). Les nerfs érecteurs principaux proviennent des nerfs honteux internes. Les centres médullaires sont situés entre S2 et S4. Leur stimulation produit la vasodilatation initiale suite à la synthèse par l'endothélium vasculaire excité du monoxyde d'azote (NO) qui a une action de relâchement des fibres musculaires lisses artériolaires. La stimulation du système nerveux parasympathique par stimulation des nerfs pelviens dans la zone lombo-sacrée provoque l'érection par stimulus tactile et psychique alors que la stimulation thoracique basse des fibres orthosympathiques (T13-L3) est responsable d'une érection par stimulus psychique uniquement.

Chez le chat, la stimulation du nerf hypogastrique provoque un retour à l'état de repos du pénis en érection par constriction des artères du pénis [73]. L'injection intra-pénienne de noradrénaline induit une détumescence, propriété pouvant être utilisée dans certaines formes de priapisme. De part son déterminisme essentiellement réflexe, certains anesthésiques peuvent empêcher l'érection.

L'acétylcholine n'est pas le neuromédiateur fondamental de l'érection, c'est le VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide) [73].

#### *.1.2.4 Ejaculation*

[45] , (figure 6)

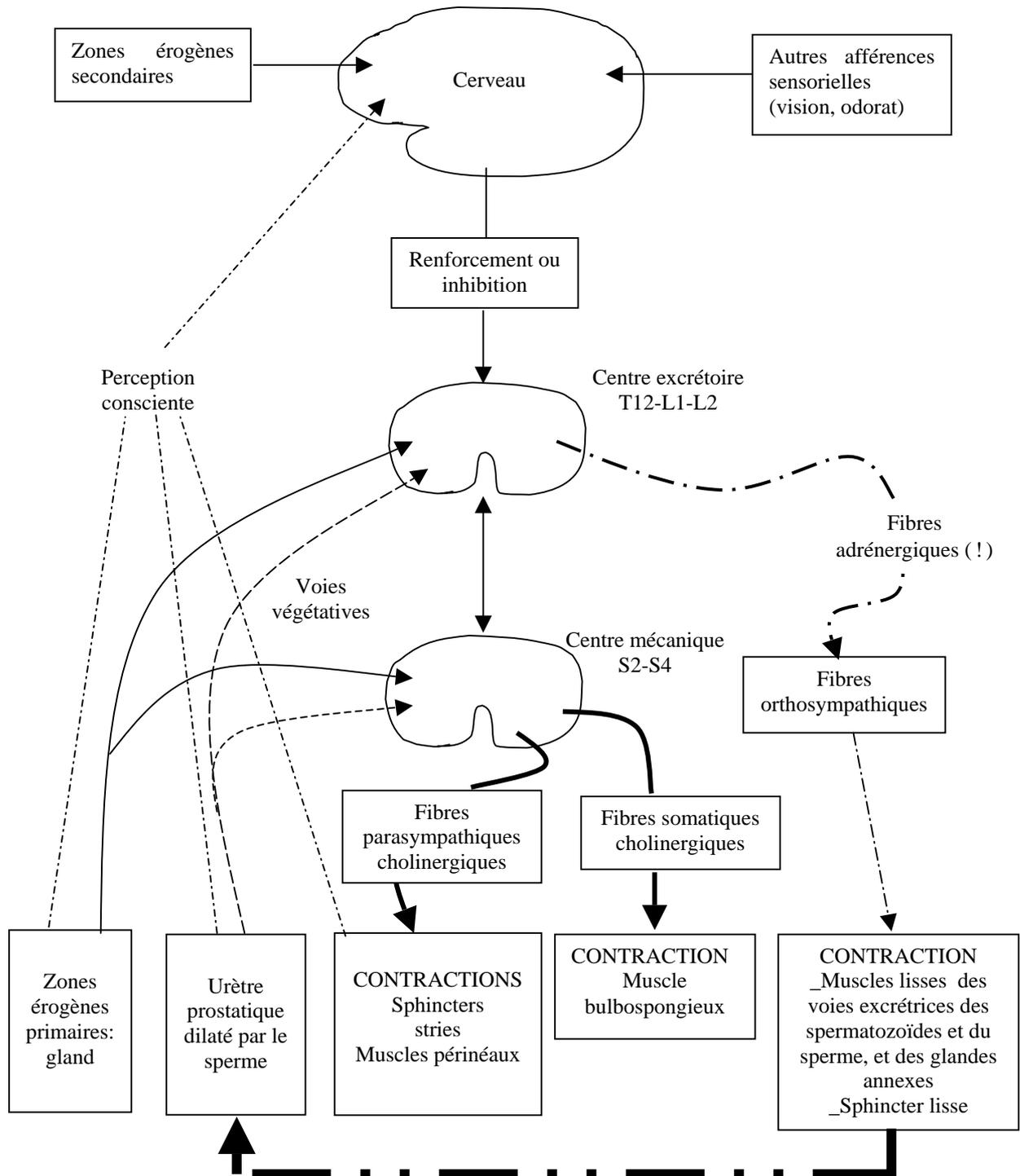
L'éjaculation est l'expulsion du sperme par l'urètre.

Le sperme est mis sous pression dans la portion terminale des canaux déférents. Cette mise sous pression résulte de vagues de contractions des fibres lisses. Dans la phase paroxystique du coït, les contractions s'amplifient et conduisent à l'éjection des spermatozoïdes, puis du sperme (spermatozoïdes et sécrétions des glandes annexes). L'éjaculation se produit alors en deux phases :

\_l'émission qui correspond à l'expulsion du liquide séminal dans la partie pelvienne de l'urètre. (conduits déférents, prostate) ;

\_l'éjaculation proprement dite qui correspond au passage du liquide séminal dans l'urètre et à l'expulsion par le méat urétral.

**FIGURE 6 : SCHEMA SIMPLIFIE DU DETERMINISME DE L' EJACULATION**  
**(D' APRES LEFRANÇOIS [45])**



Il s'agit là aussi d'un phénomène réflexe mais elle est sous le contrôle du nerf hypogastrique qui appartient au système nerveux sympathique. Les zones sensibles sont plus restreintes que pour l'érection. Seule la région du gland est réflexogène par l'intermédiaire du nerf dorsal du pénis. Toute lésion de ce nerf empêche donc l'éjaculation. Les stimulus sont mécaniques et thermiques.

Ces deux phases sont sous le contrôle médullaire : une stimulation de la zone T12-L2 provoque l'émission, une stimulation de la zone S2-S3-S4 provoque l'éjaculation.

### *.1.2.5 Accouplement*

L'accouplement est une étape indispensable. C'est lui qui conditionne le rapprochement des gamètes.

Lors d'un accouplement, le mâle prend contact avec la femelle en lui flairant le nez puis la région génitale [7]. Il adopte un comportement de flehmen lorsque la femelle est bien en œstrus [88].

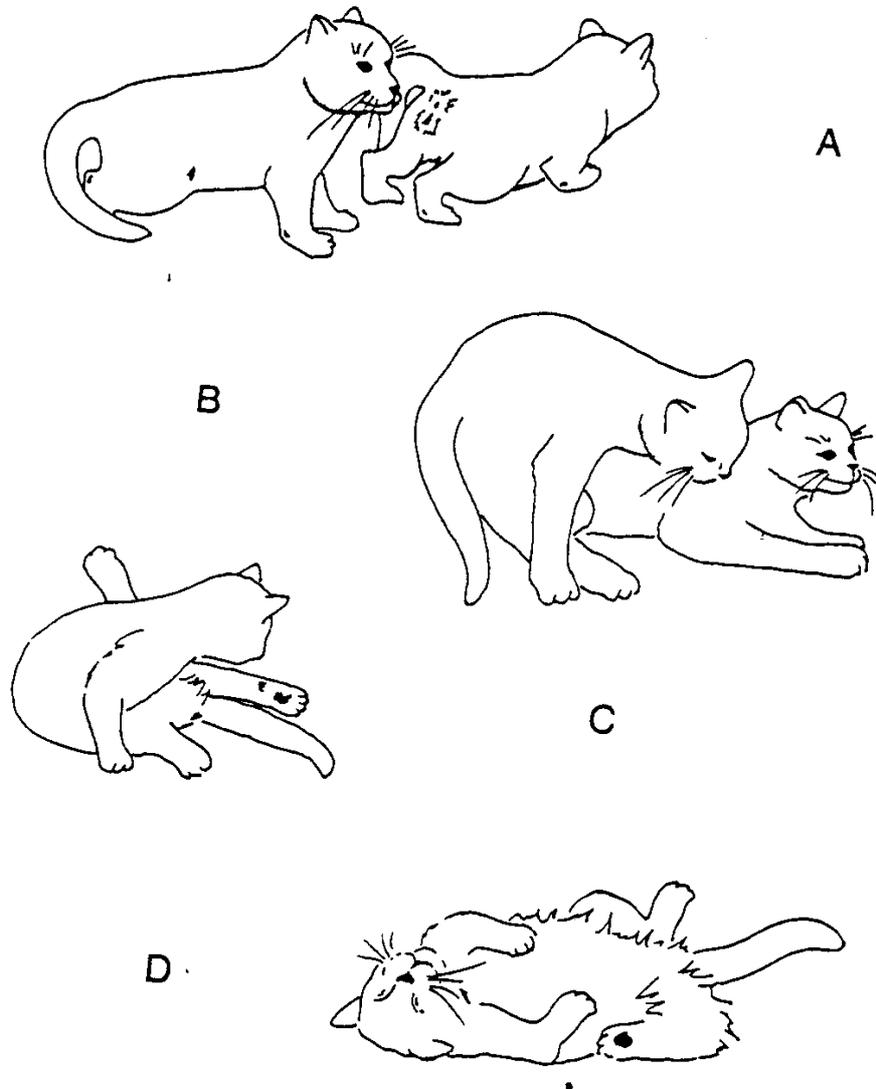
La femelle se met alors en lordose présentant sa région génitale au mâle et dévie la queue d'un côté. Le mâle la chevauche, la « bloque » en l'attrapant au cou et la pénètre [7].

L'accouplement ne dure que quelques secondes et se manifeste par des séries de mouvements pelviens rapides.

La femelle rejette ensuite le mâle violemment et reste en période réfractaire pendant 10 à 20 minutes. Pendant cette période réfractaire la femelle est agressive, se roule par terre et fait sa toilette [35], (figure7).

Cette phase est importante à observer car elle signifie que la copulation a bien eu lieu et qu'elle a conduit au réflexe post-coïtal [7]. Lors de l'accouplement, c'est la stimulation du vagin antérieur qui déclenche le réflexe post-coïtal amenant à l'ovulation [50].

**FIGURE 7 : DEROULEMENT D'UNE SAILLIE NATURELLE (D'APRES HART [33])**



A : Elévation du bassin, piétinement des membres postérieurs, déviation de la queue chez la femelle. Flehmen chez le mâle

B : Le mâle chevauche la femelle en la « bloquant » (prise au cou)

C et D : Réaction post-coïtale, la femelle se lèche la vulve et se roule sur le dos. Elle est agressive pendant toute cette période réfractaire.

## **.2 Techniques de prélèvement du mâle**

Le chat n'est pas un animal facile à prélever manuellement contrairement au chien. Des techniques particulières sont donc utilisées bien qu'étant plus contraignantes car nécessitant une anesthésie générale pour la plupart.

### **.2.1 Vagin artificiel**

#### *.2.1.1 Environnement requis*

Cette méthode peut être utilisée chez les chats de caractère facile. Les chats doivent en général être habitués dès leur jeune âge à la stimulation manuelle [61].

Les mâles doivent être entraînés pendant deux ou trois semaines pour donner un éjaculat significatif. Environ trois étalons sur cinq sont réceptifs à cette méthode [72].

D'après Sojka, les mâles ayant une bonne libido et un caractère malléable peuvent se laisser prélever au bout de 4 à 5 jours et 3 chats sur 5 répondent en 7 à 10 jours [77], [79].

Dans le cadre d'une récolte de semence par vagin artificiel, le succès de la collecte dépend de la stimulation générée par la femelle présente. La détection de l'œstrus chez cette femelle (agitation, recherche du mâle, vocalisations, réflexe de lordose) revêt une importance fondamentale [45].

#### *.2.1.2 Technique*

La femelle en chaleurs est présentée au mâle qui éjacule dans un vagin artificiel suite à une stimulation manuelle de la région génitale.

Une poire pour pipette pasteur de 2 mL coupée à son extrémité la plus large forme la partie du vagin artificiel en contact avec le pénis [76]. L'autre extrémité est reliée à un tube en plastique.

Le chevauchement est indispensable pour obtenir l'éjaculation [45].

Les mâles peuvent être récoltés trois fois par semaine par cette technique [79], [80].

Les mâles les plus coopératifs peuvent se laisser prélever sans femelle, en chevauchant le bras de l'opérateur [77].

## **.2.2 Electroéjaculation**

L'électroéjaculation consiste à obtenir l'éjaculation par stimulation électrique des nerfs sympathiques éjaculatoires et est réalisée chez le chat sous anesthésie [45]. Elle apparaît être la méthode de choix pour récolter la semence de chat dans la plupart des situations : en vue de conservation, d'insémination ou à visée diagnostique [18].

### *.2.2.1 La contention*

La contention des étalons pour l'électroéjaculation passe inmanquablement par l'anesthésie. Une anesthésie avec des parasymphicolytiques (Atropine, glucopyrrolate, scopolamine) provoque un relâchement vésical qui peut également amener à sa vidange. De plus leur action parasymphicolytique entrave l'érection qui est nécessaire à l'éjaculation. [69], [74]. Les tranquillisants et les sédatifs (Acepromazine, Zolazepam, Xylazine, Pentobarbital) peuvent, par contre, être utilisés. Cependant, une dose trop élevée provoque une augmentation de la production d'urine. Il faut donc, là encore, éviter une contamination du prélèvement par miction liée à l'anesthésie. [25]. Les anesthésiques dissociatifs tels que la Kétamine peuvent être utilisés pour l'électroéjaculation. [75], [72], [62]. L'anesthésie peut être maintenue à l'aide d'un anesthésique volatile tel que l'isoflurane [62].

Les anesthésies et les stimulations répétées n'altèrent pas la capacité du chat à éjaculer [59]. Seager prémédique les chats avec l'acepromazine à 2 mg/kg puis les anesthésie à la kétamine à 7 mg/kg [72]. Herron prémédique lui avec du glycopyrrolate à 0.01 mg/kg puis anesthésie à la kétamine hydrochloride à 30 mg/kg [36].

### *.2.2.2 Techniques décrites dans la littérature*

Une fois l'étalon anesthésié, le pénis est devaginé par une pression manuelle et un tube en plastique est placé à son extrémité pour récolter la semence. Une alternative consiste à sonder l'urètre sur 5 cm à l'aide d'une sonde urinaire d'un millimètre de diamètre reliée à un corps de seringue à insuline dont le piston a été retiré [36]. La semence monte alors dans le corps de seringue par capillarité.

Une sonde rectale en téflon (figure 8) de 12 cm de long pour 1 cm de large, portant trois électrodes, est introduite dans le rectum sur environ 9 cm selon Platz [61], sur 6 à 7 cm selon Herron [36], après avoir été lubrifiée à l'aide de gel pour échographie. Quelques mouvements de va-et-vient permettent de nettoyer le rectum des matières fécales pouvant gêner la propagation des ondes électriques. La sonde est retirée, nettoyée et remise en place. Les électrodes sont positionnées ventralement [18]. Le gel produit une bonne source d'électrolytes à la surface des électrodes et favorise la propagation de l'onde électrique [18].

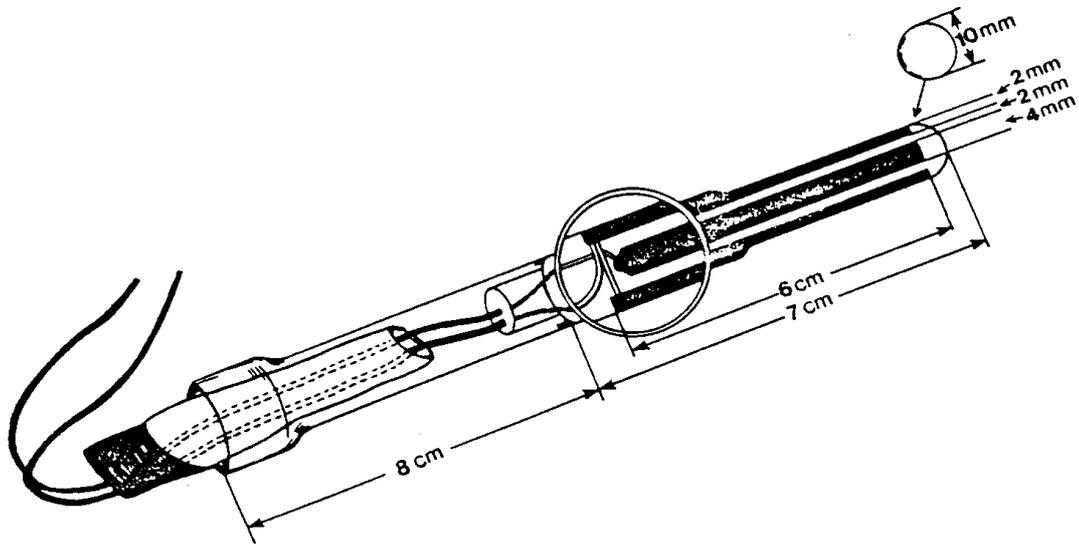
L'électroéjaculateur (photo 2) contient un générateur ajustable qui permet le contrôle précis du stimulus électrique appliqué à l'animal [18]. Le voltage et l'ampérage utilisés pendant l'électroéjaculation varient respectivement de 2 à 6V et de 5 à 220 mA. Après 2 ou 3 stimulations de 4V, l'érection est obtenue. L'éjaculation ne tarde pas à se produire aux stimulations suivantes [72]. Un stimulus électrique de 6V permet d'obtenir une semence comparable à celle obtenue par vagin artificiel [19] sans pour autant recueillir d'urine dans le prélèvement [58]. Lors d'une séance d'électroéjaculation, le deuxième éjaculat obtenu est plus riche en spermatozoïdes que ne le sont le premier, le troisième ou même le quatrième [58].

Un chat peut être récolté une fois par semaine. Le volume de l'éjaculat augmente avec le nombre de prélèvement [59]. Il ne faut donc pas se fier aux résultats obtenus lors de la première électroéjaculation. L'éjaculat peut être dilué dans du PBS et être conservé pendant une nuit à 2°C [63]. Les anesthésies à la kétamine et les électroéjaculations répétées ne semblent pas altérer la capacité des Chats à éjaculer à long terme [59].

Dans notre étude personnelle, nous avons choisi d'employer une technique sensiblement différente. Cette technique est celle utilisée au Centre de Recherche en Reproduction des Carnivores de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Elle se base sur l'obtention de l'extension des postérieurs avec la protusion des griffes et non sur un stimulus électrique constant comme décrit dans la littérature. Le voltage varie alors selon l'individu (voir deuxième partie 1.1.1. Electroéjaculation).

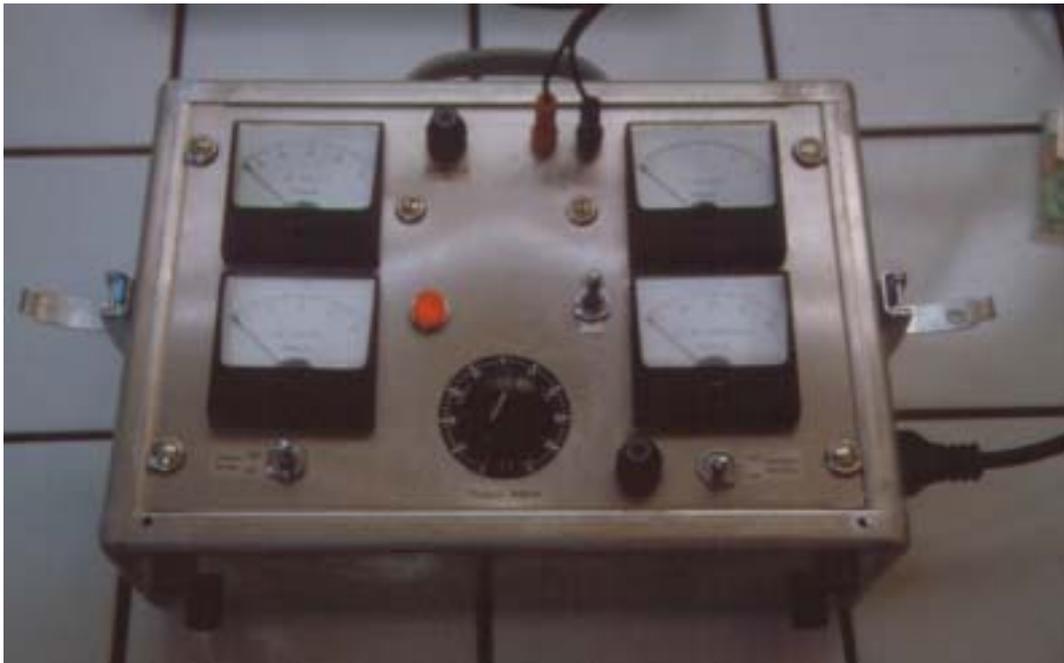
**FIGURE 8 : SONDE RECTALE D'UN ELECTROEJACULATEUR (D'APRES DOOLEY**

[18])



**PHOTO 2 : ELECTROEJACULATEUR UTILISE DANS NOTRE ETUDE PERSONNELLE**

(MODEL 304 ELECTROEJACULATOR 220 VAC. P-T ELECTRONICS. BORING/ OREGON.)



### *.2.2.3 Ejaculation rétrograde*

Le voltage doit être contrôlé car un excès peut provoquer la vidange vésicale et souiller le prélèvement [69]. Dooley et Pineda ont montré qu'un flux rétrograde de semence dans la vessie se produisait lors des électroéjaculations de mâles anesthésiés avec de la kétamine [20], [58]. Dooley a recueilli l'urine avant et après électroéjaculation. Sa concentration en spermatozoïdes passe de 0 à  $0,05 \cdot 10^6/\text{mL}$  avant à  $0,03 \cdot 10^6$  à  $11,71 \cdot 10^6/\text{mL}$  après l'électroéjaculation [20]. La quantité refluee peut atteindre les deux tiers du prélèvement total estimé. Le flux rétrograde est induit par les stimulations électriques du plexus hypogastrique qui innerve le pénis et la vessie.

Ce phénomène explique la moindre réussite de l'électroéjaculation par rapport au prélèvement par vagin artificiel [20], [61]. Il est intéressant de réaliser une cystocentèse avant et après l'électroéjaculation pour évaluer l'électroéjaculation rétrograde.

Toutefois, l'éjaculation rétrograde n'est pas due à l'anesthésie à la Kétamine puisque lors de récolte par vagin artificiel ou lors d'accouplement naturel, des spermatozoïdes peuvent être recueillis dans la vessie. L'éjaculation rétrograde semble être une composante de l'éjaculation chez le chat [21].

## **.2.3 Dissection de l'épididyme**

### *.2.3.1 L'épididyme est le lieu de maturation et de stockage des spermatozoïdes.*

L'épididyme assure non seulement la maturation des spermatozoïdes (capacitation rendue possible, condensation de la chromatine [29]) mais est aussi le lieu essentiel de leur stockage. Pendant que les spermatozoïdes transitent dans l'épididyme, ils acquièrent leur capacité à se lier à la zone pellucide [29] et subissent plusieurs transformations. Axner a montré que c'est dans la quatrième région, si l'épididyme est divisée en 6 régions, que les transformations sont les plus nombreuses et les plus importantes [3].

Le temps de survie des spermatozoïdes prélevés sur organe mort est d'au moins 5 jours sans conservateurs. Le mieux est de récupérer les spermatozoïdes épидидymaires moins de deux heures après castration [84] car le potentiel de fécondation est diminué lors d'une longue

conservation [29].

Il est donc intéressant de récolter les spermatozoïdes épидидymaires à condition de ne récolter que les spermatozoïdes contenus dans la queue de l'épididyme pour qu'ils soient matures.

### *.2.3.2 Technique*

Différentes techniques peuvent être adoptées pour récupérer le sperme épидидymaire.

Après anesthésie de l'étalon au dropéridol (0.1 mg/kg) et à la kétamine (20 mg/kg), Niwa castré les étalons. Il dissèque la queue de l'épididyme et le canal déférent puis les place dans une boîte de Pétri contenant un milieu de culture à incubation à 37°C. Niwa flusche les épидидymes avec 0.15 à 0.20 mL de milieu pour récolter les spermatozoïdes [53].

Par une méthode similaire, Hingst a obtenu une mobilité moyenne d'environ 60%.

Une autre méthode consiste à disséquer l'épididyme, à l'inciser en plusieurs pièces de 2 mm et à les laisser incuber dans un milieu contenant de la sérum albumine bovine à 38°C pendant 30 minutes [29], [81], [8]. Le prélèvement est ensuite centrifugé à 300g et le surnageant est écarté. Dans notre étude, nous avons utilisé cette technique qui nous paraissait la plus facile à réaliser.

## **.3 Spermogramme [22]**

Le spermogramme permet d'évaluer la qualité de la semence au niveau macroscopique et microscopique. La qualité de la semence est fortement corrélée à sa fécondance, sa résistance dans les voies génitales femelles et sa résistance aux différentes techniques de conservation dont la cryoconservation.

Un spermogramme est donc réalisé avant et après toute congélation. Sa réalisation est aussi indispensable pour diagnostiquer les cas d'infertilité.

### **.3.1 Etude macroscopique**

#### *.3.1.1 Volume*

Il s'agit de la première étape à réaliser.

Le volume de l'éjaculat, sa couleur et son aspect permettent de juger de la qualité de la semence.

Le volume de l'éjaculat est faible, 0.005 à 0.8mL [41] et une moyenne de 0.05 mL [68], [77]. Les techniques d'examen doivent donc être sensibles tout en nécessitant une faible quantité de semence pour en conserver le plus possible.

Un sperme de bonne qualité a un volume moyen de 0.2mL, une coloration blanchâtre et est inodore [22]. Une couleur rosée ou verdâtre est pathologique tout comme une odeur anormale.

#### *.3.1.2 Concentration*

L'éjaculat de Chat renferme en moyenne  $60 \cdot 10^6$  spermatozoïdes et sa concentration est en moyenne de  $1,73 \cdot 10^9$ /mL [77].

#### *.3.1.3 Caractères physico-chimiques*

La mesure du pH apporte également des renseignements non négligeables puisque toute variation du pH par rapport au pH optimum va avoir une répercussion néfaste sur les spermatozoïdes.

Le pH de la semence de Chat est d'environ 7,4. L'osmolarité serait de 320 à 343.5 mOsm/kg selon Glover et Watson [26]. Johnston a observé un pH moyen de 6.6 et une osmolarité moyenne de 325 mOsm/L [41].

### *.3.1.4 Plasma séminal*

Le plasma séminal du chat a un pH de 6,6. Sa densité est d'environ 1,007 [41].

La fraction de la semence provenant des testicules et de l'épididyme est riche en phosphatases alcalines dont la concentration moyenne est de 160 000 U.L<sup>-1</sup> [41].

Le dosage des phosphatases alcalines permet d'orienter le diagnostic des infertilités. En effet, les phosphatases alcalines sont des marqueurs épидидymaires, c'est à dire qu'elles sont sécrétées au niveau de l'épididyme. Si un éjaculat, qui ne contient pas de spermatozoïdes, a un taux nul en phosphatase alcaline, cela signifie que la fraction spermatique n'a pas été éjaculée. Ce phénomène peut se rencontrer lors d'obstruction par exemple. Par contre, si le taux de phosphatase alcaline est normal, cela signifie que la phase spermatique a bien été éjaculée et que le problème se situe au niveau de la spermatogenèse [22].

## **.3.2 Etude microscopique**

### *.3.2.1 Morphologie des spermatozoïdes*

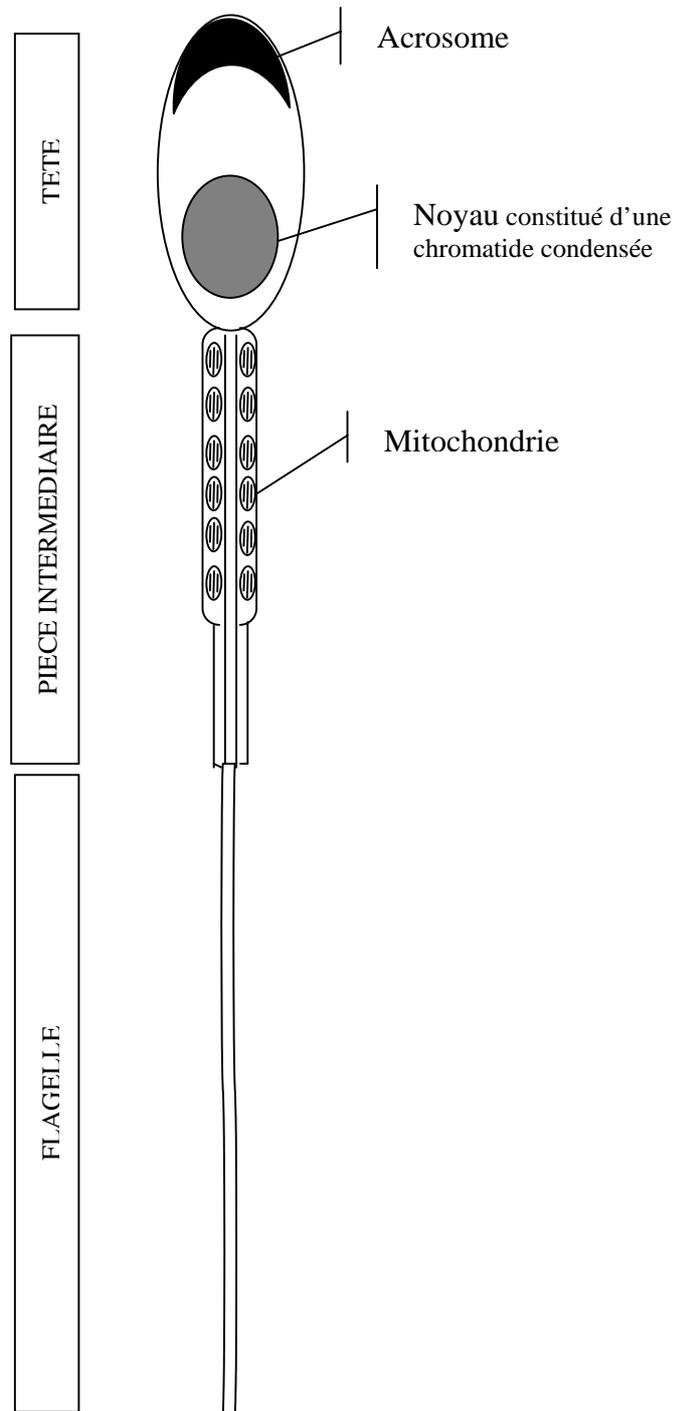
Le spermatozoïde est le gamète mâle fécond (photo 3). Il est constitué de trois parties distinctes d'un point de vue morphologique comme fonctionnel (figure 9):

\_La tête, allongée et ovale, comporte deux plans de symétrie (longitudinal et latéral) [71]. Elle contient une chromatine condensée. Cette condensation lui confère sa résistance aux altérations. Le cytoplasme est recouvert d'un acrosome ;

\_La partie intermédiaire contient des microtubules et des mitochondries qui assurent la fabrication d'ATP nécessaire à la survie, au déplacement et à la fonction de fécondation du spermatozoïde [71] ;

\_Enfin, le flagelle est composé de microtubules permettant son ondulation et ainsi le déplacement du spermatozoïde et l'accomplissement de la fécondation [71].

**FIGURE 9 : SCHEMATISATION D'UN SPERMATOZOÏDE**



**PHOTO 3 : SPERMATOZOÏDE NORMAL ET VIVANT DE CHAT COLORE A  
L'EOSINE-NIGROSINE**



**.3.2.2 Mobilité**

Il s'agit de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles dans le prélèvement. Cet examen est dynamique. Un microscope avec une platine chauffante à 37°C permet de reproduire in vitro les conditions que rencontreraient les spermatozoïdes in vivo.

Au faible grossissement, le sperme de bonne qualité a un aspect tourbillonnant évoluant par vagues.

Au fort grossissement, les mouvements des spermatozoïdes sont notés de 0 à 5 selon la grille de notation suivante [60] :

0=immobile.

1=petits mouvements sur place, de côté, sans progression.

2=mouvements sur place, rapides, sans progression encore.

3=mouvements, sur place, rapides. Progression intermittente, par à-coups.

4=nette progression mais lente.

5=progression franche et rapide.

Chez l'Homme, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) propose la classification suivante :

\_type a : spermatozoïdes mobiles et progressifs dits fléchants ;

\_type b : spermatozoïdes mobiles progressifs inefficaces dits lents ;

\_type c : spermatozoïdes mobiles non progressifs ;

\_type d : spermatozoïdes immobiles ;

\_type e : spermatozoïdes hyperactifs.

Une bonne corrélation a été démontrée entre la morphologie et les mouvements des spermatozoïdes [84].

La semence du chat contient plus de 60% de spermatozoïdes mobiles en moyenne et la motilité moyenne est de 4,5 [60].

Une semence normale de chat a une mobilité de 78% [76].

### *.3.2.3 Numération*

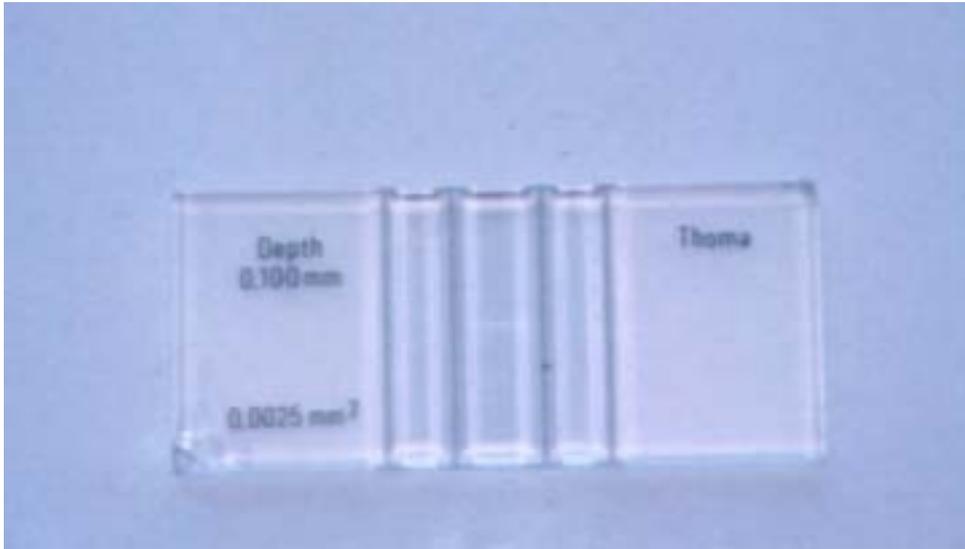
Après dilution, l'utilisation d'une cellule de Thoma (photo 4) permet de compter le nombre de spermatozoïdes contenus dans l'éjaculat.

Ce nombre peut, ou non, être compatible avec la fécondation d'une femelle.

C'est la quantité de spermatozoïdes vivants et normaux qui conditionne le volume de dilueur à rajouter pour la cryoconservation et donc le nombre de paillettes. Il est important de préciser, au propriétaire des paillettes, le nombre de doses fécondantes (nombre d'inséminations réalisables avec les paillettes) permises par ces paillettes.

Une bonne semence de chat contient environ 57 millions de spermatozoïdes [76].

#### PHOTO 4 : CELLULE DE THOMA



##### *.3.2.4 Pourcentage de spermatozoïdes vivants*

Une coloration vitale à l'éosine-nigrosine permet de classer les spermatozoïdes en mort ou vivant [17]. Les spermatozoïdes morts ont leur membrane perméable et prennent une coloration rosée. Les spermatozoïdes vivants ont une membrane imperméable et apparaissent donc incolores [9].

Cet examen est toujours corrélé à la mobilité observée macroscopiquement.

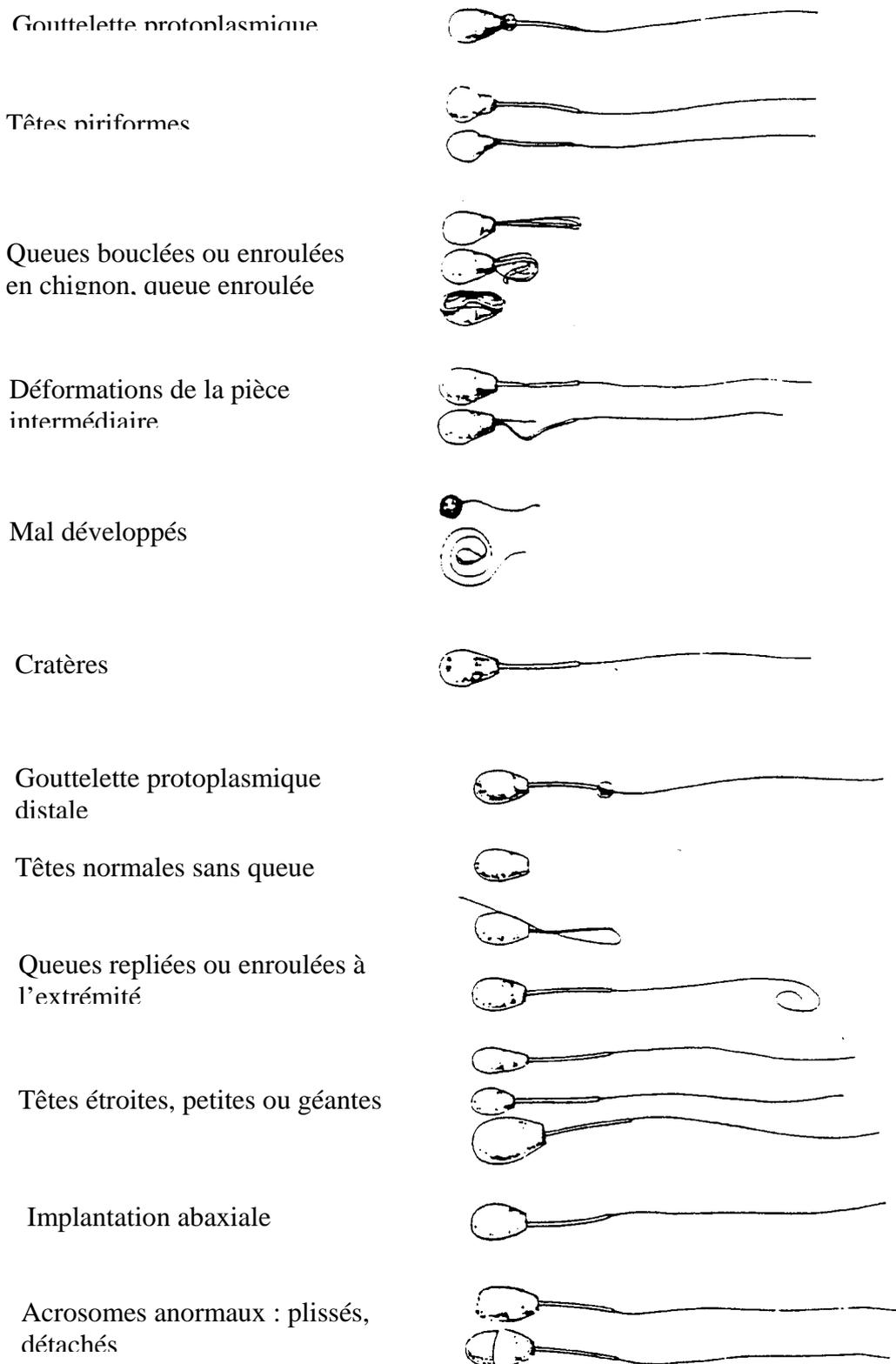
##### *.3.2.5 Anomalies : le spermocytogramme*

La même coloration à l'éosine-nigrosine permet de classer les spermatozoïdes selon les catégories suivantes [55],(figure 10):

\_normaux ;

\_anomalies de tête (malposition, tête piriforme ou ronde, allongée ou étroite, microcéphalique ou macrocéphalique, tête double, acrosome anormal) ;

**FIGURE 10 : ANOMALIES DES SPERMATOZOÏDES CHEZ LE TAUREAU (D'APRES OTT [55])**



- \_décapités ;
- \_anomalies de la pièce intermédiaire (coudée, double, inexistante) ;
- \_anomalies du flagelle (enroulé, double, inexistant) ;
- \_gouttelettes protoplasmiques (proximales, distales) ;
- \_présence de cellules autres (cristaux de spermine, cellules épithéliales, leucocytes, érythrocytes, cellules spermiogéniques).

Autrefois, une classification permettait de distinguer les anomalies primaires (anomalies de tête, de pièce intermédiaire), liées à un problème lors de la fabrication du spermatozoïde, des anomalies secondaires (anomalies de flagelles, décapités, gouttelettes protoplasmiques), liées à un problème lors de leur maturation [38]. Blom a ensuite suggéré, en 1973, d'utiliser la terminologie de majeures et mineures pour désigner les anomalies selon leur aptitude à refléter l'état physiopathologique du testicule [55].

La présence de cellules autres en grande quantité permet de suspecter un problème infectieux ou métabolique.

Un nombre trop important de spermatozoïdes anormaux, la présence de cellules anormales en trop grande quantité (hématie, leucocyte) compromettent la cryoconservation de la semence. Les spermatozoïdes anormaux mettent plus de temps à capaciter et à mener leur réaction acrosomique que les spermatozoïdes normaux. Les acrosomes anormaux sont d'ailleurs plus fréquents chez les spermatozoïdes anormaux [47]. Les ovules fécondés par des spermatozoïdes anormaux sont également moins aptes à mener à bien leur première division [39].

Une bonne semence de chat contient moins de 4% d'anomalies [76].

### *.3.2.6 Intégrité de l'acrosome*

L'acrosome est une vésicule dérivant de l'appareil de Golgi qui coiffe le spermatozoïde [14]. Il doit rester intact pour permettre au spermatozoïde de rester fécondant. La réaction acrosomique est nécessaire à la pénétration du spermatozoïde dans la zone pellucide et à sa fusion avec l'ovocyte. Elle se produit in vivo au cours du stade terminal de migration des

spermatozoïdes vers le lieu de fécondation après la capacitation [31], [14]. La capacitation se produit également dans les voies génitales de la femelle et permet les influx de  $Ca^{2+}$  nécessaires à la réaction acrosomique ainsi qu'une hyperactivation du flagelle des spermatozoïdes [6].

In vitro, elle peut se produire également en faveur de facteurs variables tels qu'une osmolarité trop élevée du milieu, un stockage à basse température dans un tampon Tris contenant du jaune d'œuf, la présence de cumulus oophorus ou de fluide folliculaire. Lorsque la réaction acrosomique a lieu in vitro, les spermatozoïdes ne peuvent plus être utilisés en insémination car ils ne survivent pas longtemps.

La chute brutale de température est responsable d'une augmentation de l'atteinte acrosomale. La cryoconservation favorise la capacitation. Un pourcentage élevé de spermatozoïdes anormaux favorise les dommages acrosomaux [66]. Le pourcentage le plus élevé de perte de l'acrosome lors d'une conservation à 4°C se produit au cours des 24 premières heures [62], ensuite le taux diminue plus doucement de l'ordre de 6 à 9% par jour. Lorsque le spermatozoïde meurt, il perd son acrosome [14].

L'acrosome est difficile à observer chez le chat même avec un microscope de contraste à gros grossissement. L'emploi d'un colorant adapté est donc nécessaire.

Une coloration rapide avec un colorant vert rapide contenant du fast green et du rose bengal permet de classer les spermatozoïdes selon les catégories suivantes [62] :

\_Acrosome intact : il prend alors une coloration bleu-violet en région antérieure de la tête du spermatozoïde.

\_Réaction acrosomale dans les premiers stades : la région antérieure de la tête du spermatozoïde prend une coloration plus discrète à l'exception d'un point.

\_Réaction acrosomale dans un stade avancé : il prend alors une coloration rose pâle presque incolore.

Nous avons utilisé ce colorant dans notre étude personnelle.

Cet examen est réalisé chez le chien avec une coloration au Spermac<sup>ND</sup> [70]. Cette coloration donne d'ailleurs de meilleurs résultats car elle est plus pratique d'utilisation et plus facile à interpréter.

Chez le chat, elle donne également de bons résultats. Elle peut également être utilisée à la place de l'éosine-nigrosine pour réaliser un spermocytogramme mais elle ne colore pas toutes les gouttelettes cytoplasmiques. Chez le chat, les gouttelettes cytoplasmiques sont fréquentes surtout si la semence provient de l'épididyme. La coloration au Spermac<sup>ND</sup> pour réaliser les spermocytogrammes n'est donc pas utilisée en routine.

### *.3.2.7 Intégrité plasmatique : test hypo-osmotique*

Les spermatozoïdes normaux ont une membrane qui a une bonne capacité de déformation notamment en milieu hypo-osmotique. Cette souplesse membranaire est nécessaire à la fécondation lors de la fusion avec l'ovocyte.

Le test hypo-osmotique permet d'évaluer cette capacité à la déformation. En plongeant les spermatozoïdes dans un milieu hypo-osmotique, on observe leur capacité à se déformer. Les spermatozoïdes normaux prennent un aspect recourbé voire enroulé alors que les anormaux ne se déforment pas et restent longilignes [22].

### *.3.2.8 Condensation de la chromatine*

La compétence des spermatozoïdes met en jeu une bonne condensation de la chromatine pendant la spermiogenèse, sa bonne stabilisation pendant la maturation épидидymaire et une décondensation rapide après la fusion avec l'ovocyte. La stabilisation de la chromatine est obtenue par l'interaction de protamines avec l'ADN. Ces protamines prennent la place des histones lors de la spermiogenèse. La condensation est stabilisée par l'oxydation des protamines et la formation de ponts dissulfides lors de la maturation dans l'épididyme [37].

Le pourcentage de spermatozoïdes colorés au bleu d'aniline (marquant la présence d'histone) décroît de la tête (31.8%) à la queue de l'épididyme (7.8%) [37]. Une coloration avec l'acridine orange fluorescente montre que 86,5% des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme ont leur chromatine bien condensée, c'est à dire résistante à la dénaturation par l'acide.

Le pourcentage de bonne condensation de la chromatine ne peut pas être relié à d'autres critères de la semence comme le nombre de spermatozoïdes ou la mobilité. Il n'est pas non plus en relation avec l'âge des chats. [37].

L'évaluation de la chromatine permet d'apprécier la qualité de la semence et d'évaluer la spermatogenèse et la maturation dans l'épididyme, souvent défectueuses chez le Chat.

### *.3.2.9 La transmigration membranaire [70]*

Cet examen permet d'évaluer le pourcentage de spermatozoïdes capables de traverser une membrane unipore en étant soumis à un contre-courant pendant une unité de temps. Le pourcentage, noté TMR, est donné directement par l'appareil de migration qui a été inventé en 1986 par Holzmann. L'appareil d'Holzmann est constitué d'une chambre d'essai et d'une chambre cible séparée par une membrane unipore. Le tout est porté à 38°C. Pour sa réalisation, 100µL de semence sont placés dans la chambre d'essai. Les pores de la membranes mesurent 8µm et le contre-courant a une vitesse de 5 mL.h<sup>-1</sup>. Après trois minutes de migration, le contenu de la chambre cible est analysé et les spermatozoïdes ayant migré qu'il contient sont dénombrés. Le rapport est alors fait avec le nombre de spermatozoïdes que contenaient les 100µL de semence du départ.

Schäffer et Holzmann ont trouvé une moyenne de TMR égale à 76% dans leurs essais sur sperme épидидymaire de chat.

### **.3.3 Anomalies de la semence [23]**

La semence peut présenter diverses anomalies :

- \_l'absence totale de spermatozoïdes nommée l'azoospermie ;
- \_l'absence de sperme nommée l'aspermie ;
- \_la faible quantité de spermatozoïdes nommée l'oligozoospermie ;
- \_la faible quantité de semence nommée l'oligospermie ;
- \_la forte proportion de spermatozoïdes anormaux nommée la tératozoospermie ;
- \_le manque de mobilité des spermatozoïdes nommée l'asthénospermie ;

\_dans les cas les plus graves, l'oligozoospermie côtoie la térazoospermie et l'asthénozoospermie, on parle alors d'AOT.

Ces différentes anomalies peuvent avoir diverses origines : primaires et secondaires [10].

### *.3.3.1 Anomalies primaires*

#### *.3.3.1.1 Anomalies liée à une cause anatomique*

Chez certains individus, les testicules ne sont pas développés, c'est l'hypoplasie testiculaire qui est responsable d'aspermie ou d'azoospermie. Une mauvaise descente des testicules dans les scrotum (ectopie testiculaire : cryptorchidie, monorchidie) peut également être à l'origine de désordres au niveau de la semence. Une agénésie des conduits déférents, des anomalies du pénis, des glandes annexes ou de l'os pénien peuvent être à l'origine d'infertilité chez le mâle avec aspermie ou azoospermie.

Une anomalie au niveau de la fermeture du col vésical peut permettre une éjaculation rétrograde dans la vessie et donner une pseudo-aspermie.

#### *.3.3.1.2 Anomalies liées à des troubles hormonaux*

Tout dysfonctionnement hormonal ( central :GnRH, FSH, LH ; gonadique ou périphérique : thyroïde, surrénales) a des répercussions sur la spermatogénèse et est responsable de modifications au niveau de la semence.

#### *.3.3.1.3 Anomalies liées au patrimoine génétique*

Une anomalie du caryotype ou une anomalie chromosomique peut aussi altérer la qualité du sperme.

La qualité de la semence est un caractère génétique fortement héritable qu'il ne faut donc pas négliger dans les programmes de sélection et d'amélioration des races [27].

#### .3.3.1.4 Anomalies liées à l'âge

Un animal trop jeune ou trop vieux aura une qualité de semence défectueuse. La fertilité diminue avec l'âge comme chez toutes les espèces.

### .3.3.2 *Anomalies secondaires*

#### .3.3.2.1 Anomalies liées aux glandes annexes

Une anomalie des glandes bulbo-urétrales ou de la prostate peut interférer avec la qualité de la semence.

Ces anomalies peuvent être congénitales ou acquises lors d'infection.

#### .3.3.2.2 Anomalies liées à une pathologie urinaire

Une infection du tractus urinaire a des répercussions sur la qualité de la semence en altérant le pH du plasma séminal (alcalinisation).

#### .3.3.2.3 Anomalies liées à un agent infectieux

Toute infection du tractus génital ou de l'appareil génital altère la qualité de la semence. De même, toute maladie générale a également des effets néfastes sur la qualité de la semence.

#### .3.3.2.4 Anomalies liées à des affections de l'organisme

Les maladies auto-immunes, les affections organiques (insuffisance rénale ou hépatique, diabète, etc.) sont responsables d'un affaiblissement de l'organisme se reflétant au niveau de la qualité de la semence.

#### .3.3.2.5 Anomalies iatrogènes

Certains médicaments ont un effet néfaste sur la spermatogénèse. C'est le cas notamment des anabolisants, des antiandrogènes, des corticoïdes, de certains antibiotiques, du kétoconazole et autres. Il est donc recommandé de vérifier l'innocuité de tout médicament utilisé chez un mâle reproducteur.

#### .3.3.2.6 Anomalies idiopathiques

Dans la plupart des cas d'infertilité, il est encore difficile de déterminer la cause. Le spermogramme permet d'identifier les anomalies responsables de l'infertilité au niveau de la semence et d'orienter le diagnostic.

### **.3.4 Caractéristiques de la semence obtenue dans la littérature selon la technique de récolte utilisée**

#### *.3.4.1 Caractéristiques moyennes de la semence obtenue par vagin artificiel dans la littérature*

(Tableau I).

D'après Pope, cette méthode permet d'obtenir de la semence avec une mobilité avoisinant les 90%, un volume d'environ 0,3 mL et une concentration d'environ  $550 \cdot 10^6$ /mL [62]. Sojka a obtenu un volume de 0.04ml avec  $57 \cdot 10^6$  spermatozoïdes [79]. Platz a obtenu quant à lui un nombre moyen de spermatozoïdes de  $60 \cdot 10^6$  avec une mobilité de 82% [61].

La semence récoltée par vagin artificiel est moins volumineuse mais contient plus de spermatozoïdes que celle récoltée par électroéjaculation [19].

**TABLEAU I : CARACTERISTIQUES MOYENNES DE LA SEMENCE DE CHAT  
PRELEVEE PAR VAGIN ARTIFICIEL RELEVES DANS LA LITTERATURE**

<b>Auteur</b>	Sojka [80]	Seager [72]	Platz [60]	Dooley [19]	Pope [62]
<b>Mobilité (%)</b>	78	60 à 95	82.5	58	
<b>Motilité</b>		4.5 à 5			
<b>Volume (mL)</b>	0.04	0.02 à 0.12	0.04	0.06	0.38
<b>Concentration (10<sup>8</sup>/mL)</b>	17.3				5.41
<b>Total par éjaculat</b>	57.10 <sup>6</sup>	15 à 130.10 <sup>6</sup>	60,7.10 <sup>6</sup>	60,97.10 <sup>6</sup>	
<b>Spermatozoïdes normaux (%)</b>					
<b>Viabilité (%)</b>				67	90.1
<b>Acrosomes normaux (%)</b>					80 à 96
<b>pH</b>	7.4			8.32	

*.3.4.2 Caractéristiques moyennes de la semence obtenue par électroéjaculation dans la littérature*

(tableau II)

La mobilité moyenne du sperme récolté par cette méthode est de 79% et le pourcentage de spermatozoïdes vivants est de 95% [32]. Le volume recueilli varie entre 0.014 et 0.5 mL [63]. Il est plus important que celui recueilli par vagin artificiel car la prostate est stimulée lors de l'électroéjaculation. Le nombre de spermatozoïdes recueillis moyen est de  $5 \times 10^6$  [36].

Axner a montré que lorsque deux électroéjaculations sont réalisées sur le même chat à 10 minutes d'intervalle, le deuxième prélèvement contient moins de formes anormales que le premier [2].

**TABLEAU II : CARACTERISTIQUES MOYENNES DE LA SEMENCE DE CHAT  
PRELEVEE PAR ELECTROEJACULATION RELEVÉE DANS LA LITTERATURE**

<b>Auteur</b>	Seager [72]	Platz [60]	Dooley [19]	Herron [36]	Roth [67]	Long [47]	Harris [32]
<b>Mobilité (%)</b>	60 à 95	60	65		80	82.1	66.2
<b>Motilité</b>	4.5 à 5	4.9				4.1	
<b>Volume (mL)</b>	0.1 à 0.5	0.233	0.26	0.019 à 0.284		0.245	
<b>Concentration (/mL)</b>					307.10 <sup>6</sup>	22.3.10 <sup>6</sup>	
<b>Total par éjaculat</b>	15 à 130.10 <sup>6</sup>	28.10 <sup>6</sup>	42.7.10 <sup>6</sup>	0.32 à 49.6.10 <sup>6</sup>			
<b>Spermatozoïdes normaux (%)</b>					69	77.7	
<b>Viabilité (%)</b>			73				91
<b>Acrosomes normaux (%)</b>							92.3
<b>pH</b>			8.61				

*.3.4.3 Caractéristiques moyennes de la semence obtenue par dissection de l'épididyme dans la littérature*

(tableau III)

Goodrowe a obtenu une mobilité moyenne de 52% avec 65 à 75 % de spermatozoïdes normaux et une concentration moyenne de 80 x 10<sup>6</sup>/mL [28].

Les anomalies les plus souvent rencontrées sont les anomalies de pièce intermédiaire (environ 6% d'après Stachecki), de flagelle (environ 4% d'après Stachecki) et des gouttelettes

cytoplasmiques (environ 5% d'après Stachecki) [84].

Bowen et Niwa ont montré que le sperme épидидymaire pouvait féconder un ovule in vitro sans capacitation préalable. Le temps de capacitation est très court que ce soit pour le sperme obtenu par électroéjaculation ou pour le sperme épидидymaire [8], [53].

Cependant, les spermatozoïdes épидидymaires montrent un taux élevé de réaction acrosomique spontanée surtout après cryoconservation ce qui les rend impropres à la fécondation [46].

**TABLEAU III : CARACTERISTIQUES MOYENNES DE LA SEMENCE DE CHAT PRELEVEE PAR DISSECTION DE L'EPIDIDYME RELEVES DANS LA LITTERATURE.**

<b>Auteur</b>	Goodrowe [29]	Harris [32]	Hingst [37]	Spindler [81]
<b>Mobilité (%)</b>	51.9	79.3	63.8	57.3
<b>Motilité</b>	3.1			2.8
<b>Volume (mL)</b>				
<b>Concentration (/mL)</b>	80.3.10 <sup>6</sup>			
<b>Total</b>			95.5.10 <sup>6</sup> par testicule	5.4.10 <sup>6</sup> /g d'épididyme
<b>Spermatozoïdes normaux (%)</b>	51		64.3	25.4
<b>Viabilité (%)</b>		95.2		77.4
<b>Acrosomes normaux (%)</b>		92.3		92.5
<b>pH</b>				

## **.4 Cryoconservation de la semence de Chat et insémination artificielle**

### **.4.1 Dilueur**

#### *.4.1.1 Généralités : altérations induites par la congélation*

Une cellule peut souffrir de différents types d'altérations :

\_la rupture des membranes plasmiques liée à l'augmentation du volume cellulaire si le milieu est hypotonique. Les spermatozoïdes anormaux sont alors les plus sensibles [65]. Les spermatozoïdes sont d'autant plus sensibles que la variation est soudaine [26] ;

\_une déchirure lors de variations rapides de la surface de la cellule ;

\_une déshydratation cellulaire si le milieu est hypertonique. Les spermatozoïdes des chats sont cependant plus résistants à un choc hyper-osmotique qu'à un choc hypoosmotique [65] ;

\_l'apparition de cristaux intra-cellulaires.

Les deux dernières altérations sont celles rencontrées lors de la congélation.

Selon le modèle de Mazur, la transformation en glace de l'eau contenue dans le dilueur, provoque sa concentration. Le milieu devient donc hypertonique et est à l'origine de la déshydratation des cellules. Toutefois, si la baisse de température est trop rapide, les cellules n'ont pas le temps de se déshydrater et l'eau intra-cellulaire se transforme à son tour en glace entraînant la formation de cristaux intra-cellulaires, néfastes pour la cellule.

Ces altérations varient selon le milieu, selon la vitesse de congélation (si elle est lente, les cellules se déshydratent avant congélation et il n'y a pas de cristaux intracellulaires, si elle est rapide, les cellules n'ont pas le temps de se déshydrater et il y a alors formation de cristaux intra cellulaires). La chute de température doit permettre d'atteindre un compromis entre ces 2 altérations.

Elles varient aussi selon la profondeur du congelat. Les cellules normales sont à la périphérie de la paillette pour le dilueur riche en lait. Pour un dilueur qui contient moins d'eau tels que les dilueurs riches en jaunes d'œuf, on obtient un anneau de cellules normales avec en

périphérie des cellules déshydratées et au centre des cellules avec des cristaux intracellulaires.

L'intérêt du dilueur est donc de limiter ses altérations. Il est toutefois important de ne pas perturber l'osmolarité du milieu dans lequel baignent les spermatozoïdes. Suite à une variation de l'osmolarité, la mobilité des spermatozoïdes décroît plus rapidement que leur membrane s'altère [65]. Un retour abrupt à l'isotonie après un choc hyperosmotique provoque de nombreux dommages membranaires aux spermatozoïdes [65]. Cependant, les dilueurs hypertoniques protègent plus les spermatozoïdes que les dilueurs isotoniques lors la cryoconservation [26]. Il est donc important d'ajouter celui-ci au goutte à goutte pour éviter les variations brutales d'osmolarité et de vérifier la mobilité après l'ajout de dilueur.

L'ajout d'un cryoprotecteur permet de diminuer la température à laquelle se forme le premier cristal de glace et permet ainsi d'obtenir une congélation homogène c'est à dire avec un seul type de cristal. Une quantité de dilueur trop importante entraîne une cristallisation hétérogène qui est néfaste pour la congélation de la semence [13].

L'ajout d'antioxydants, tels que la superoxyde dismutase, la catalase, le cytochrome c ou la glutathion peroxydase, permet d'améliorer la mobilité et de préserver l'intégrité de l'acrosome [52].

#### *.4.1.2 Composition du dilueur*

Plusieurs types de dilueurs ont déjà été testés dans la littérature (tableau IV).

Chez le Tigre, Donoghue a utilisé un dilueur constitué de 20% de jaune d'œuf, 11% de lactose et 4% de glycérol et a obtenu de bons résultats avec une mobilité égale à environ 86% de la mobilité obtenue sur la semence avant congélation [16].

**TABLEAU IV : COMPOSITION DES DILUEURS UTILISES DANS LA LITTERATURE  
POUR LA CRYOCONSERVATION DE LA SEMENCE DE CHAT.**

<b>AUTEUR</b>	<b>COMPOSITION DU DILUEUR POUR LA CRYOCONSERVATION DU SPERME DE CHAT</b>
Platz 1978[61]	20% de jaune d'œuf, 1% de lactose, 4% de glycérine dans de l'eau déionisée avec 1000µg/mL de streptomycine sulfate et 1000UI/mL de pénicilline G sodium.
Hay 1993[34]	<i>Dilueur 1</i> : 2.42g de TRIS, 1.38g d'acide citrique monohydrate, 1g de fructose, 20% de jaune d'œuf et 3% de glycérol <i>Dilueur 2</i> : 2.42g de TRIS, 1.26g d'acide citrique monohydrae, 1g de glucose, 20% de jaune d'œuf et 3% de glycérol <i>Dilueur 3</i> : 11g de lactose, 20% de jaune d'œuf et 3% de glycérol Les dilueurs 1 et 2 procurant une meilleur protection que le dilueur 3.
Stachecki 1994[83]	Tes-TRIS avec jaune d'œuf contenant 10% de glycérol
Lengwinat 1994[46]	Tes-TRIS avec 15% de jaune d'œuf et 7.5% de glycérol
Jewgenow 1997[40]	Tes-TRIS avec 15% de jaune d'œuf et 7.5% de glycérol
Tsutsui 2000[87]	<i>Dilueur 1</i> : Tris avec jaune d'œuf, fructose, acide citrique et 7% de glycérol <i>Dilueur 2</i> : Solution de citrate de sodium avec jaune d'œuf et 7% de glycérol Le dilueur 1 procurant une meilleur protection que le dilueur 2.
Zambelli 2001[89]	TRIS avec 20% de jaune d'œuf et 8% de glycérol

Olar, pour la semence de Chien, et Hay, pour la semence de Chat ont montré que le glucose ou le fructose comme source d'énergie donnent de meilleurs résultats que le lactose, certainement à cause de la différence d'osmolarité du dilueur obtenu [54], [34]. Le lactose donne une osmolarité plus élevée que le glucose ou le fructose.

Stachecki a étudié l'ajout de stimulants sur la mobilité après décongélation. La Caféine, la pentoxyfilline ou la 2'-deoxyadenosine, pourrait être intéressantes pour augmenter la fertilité des spermatozoïdes de Chat cryoconservés en augmentant leur mobilité et en provoquant une hyperactivation sans avoir d'effet sur leur survie à long terme [83], [82].

Nous avons choisi de tester un dilueur canin dans notre étude personnelle car nous en disposions au C.E.R.C.A de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort et que sa composition se rapproche de celle des dilueurs félines décrits dans la littérature (voir deuxième partie 1.2.1. Préparation du dilueur).

#### **.4.2 Techniques de cryoconservation de la semence des carnivores utilisées dans la littérature et au Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores (C.E.R.C.A.)**

Plusieurs techniques ont été utilisées dans la littérature pour congeler de la semence de Chat (tableau V).

Chez le Chien, la technique employée est proche de celles utilisées dans la littérature pour la semence de Chat :

Le prélèvement dilué doit être réfrigéré pendant une heure pour obtenir une température homogène de 4°C. Après dilution au goutte à goutte avec un dilueur adapté, la semence est conditionnée en paillettes de 0.25ml scellées [54]. Ce conditionnement est le plus efficace pour lutter contre les effets néfastes de la congélation car la température reste toujours quasi-homogène dans tout le prélèvement [89]. Les paillettes sont au préalable identifiées (nom de l'animal, tatouage, date de congélation). Elles sont remplies à 4°C et gardées à cette température pendant une dizaine de minutes pour ré-homogénéiser la température de la semence. Elles sont ensuite placées dans les vapeurs d'azote pendant 15 minutes avant d'être plongées, dans des visotubes pour faciliter le repérage, dans l'azote liquide à -196°C.

Le taux de descente en température lors de la cryoconservation de sperme de Chat est importante à prendre en compte. Zambelli a testé différents taux de descente en température. Une perte de 3.85°C/min permet d'obtenir la meilleure mobilité et le meilleur pourcentage d'acrosomes normaux [89].

Comme nous ne disposions pas de congélateur programmable pour appliquer la technique utilisée par Zambelli, nous avons choisi d'appliquer la technique employée chez le chien au C.E.R.C.A. dans notre étude personnelle (voir deuxième partie 1.2.3. Congélation des paillettes). Cette technique est proche de celle utilisée par Hay [34].

**TABLEAU V : DESCRIPTION DES TECHNIQUES UTILISEES DANS LA LITTERATURE  
POUR LA CRYOCONSERVATION DE LA SEMENCE DE CHAT.**

<b>AUTEUR</b>	<b>TECHNIQUE DE CRYOCONSERVATION UTILISEE POUR LA SEMENCE DE CHAT</b>
Platz 1978 [61]	Dilution au ratio 1:1 avec le dilueur, équilibration à 5°C pendant 20 minutes (-1°C/min), mise en palletes de la semence et congélation dans la glace carbonique puis dans l'azote liquide à -196°C.
Hay 1993 [34]	Équilibration à 5°C pendant deux heures, dilution avec le dilueur contenant du glycérol, équilibration à 5°C pendant 30 minutes, transfert de la semence dans des paillettes de 0.5mL, congélation horizontale dans les vapeurs d'azote à -120°C pendant 15 minutes puis immersion dans l'azote liquide à -196°C.
Stachecki 1994 [83]	Concentration de la semence à $100.10^6$ spermatozoïdes/mL, transfert dans des cryotubes de 1.5mL, congélation dans les vapeurs d'azote pendant 12 minutes puis immersion dans l'azote liquide.
Lengwinat 1994 [46]	Echantillons de semence conservés à 4°C pendant 3 heures puis congélation à l'aide d'un congélateur programmable : -1°C/min jusqu'à -25°C puis -30°C/min jusqu'à -100°C puis immersion dans l'azote liquide.
Jewgenow 1997 [40]	Utilisation d'un congélateur programmable
Tsutsui 2000 [87]	Concentration de la semence à $1.10^8$ spermatozoïdes/mL, transfert dans des paillettes de 0.25mL puis congélation dans un congélateur programmable.
Zambelli 2001 [89]	Semence répartie en doses de 200µL contenant $40.10^6$ spermatozoïdes, transfert dans des paillettes de 0.25mL, équilibration de la température à 5°C pendant 25 minutes puis congélation dans un congélateur programmable à un taux de -3.85°C/min.

### **.4.3 Décongélation**

La décongélation doit être rapide pour limiter les lésions de la membrane et ne pas affecter la mobilité des spermatozoïdes [4]. Les paillettes sont donc plongées directement dans un bain-marie à 37°C pendant 30 secondes [89]. La mobilité de la semence est ensuite évaluée. La semence peut alors être inséminée dans les voies génitales de la femelle que ce soit à l'aide d'une sonde urinaire de 1 mm de diamètre directement dans le vagin [50] ou dans l'utérus lors d'une laparotomie [28].

Le sperme récolté par vagin artificiel résiste mieux à la cryoconservation que celui obtenu par électroéjaculation ou que le sperme épидидymaire [61].

En 1992, d'après Goodrowe, la mobilité observée après congélation est diminuée de 30 à 40% par rapport à la mobilité observée avant congélation. Le taux d'acrosome intact est de moins de 20% et le taux de fécondation obtenu est de moins de 2% [28]. Le taux de réaction acrosomique spontané est élevé [46]. Hay a observé une chute de 67% d'acrosomes normaux avant congélation à 18% après décongélation [34]. La stabilité de la chromatine est également réduite [40].

Jewgenow a montré qu'en moyenne, le pourcentage de mobilité du sperme de chat chute à 53% alors qu'il est de 75% pour le sperme frais [40]. Tsutsui a obtenu une semence dont la mobilité moyenne après décongélation est de 30% [87].

La cryoconservation altère le pouvoir de fécondance des spermatozoïdes. Le taux de fusion des zygotes obtenus par des spermatozoïdes cryoconservés est significativement plus bas que celui obtenu par des spermatozoïdes frais [46].

### **.4.4 Insémination artificielle chez le Chat**

Une concentration de  $5 \times 10^6$  à  $3 \times 10^8$  spermatozoïdes dans 0.1 à 0.2 mL de semence (plus ou moins diluée) [77] permet d'inséminer une femelle, 48 heures après avoir déclenché l'ovulation par injection de hCG (50 UI/kg IM) [28], [48], [79]. L'ovulation se produit 25.5 à 26 heures après l'injection d'hGG [31]. La semence peut être recueillie par vagin artificiel, électroéjaculation ou par dissection de l'épididyme. Cependant les meilleurs résultats sont obtenus avec de la semence fraîche collectée par vagin artificiel et comprenant au moins

$80.10^6$  spermatozoïdes [85]. Pope a montré qu'une concentration de  $218 \# 54.10^8$  spermatozoïdes par mL avec 70% de mobilité donne des bons taux de réussite en insémination artificielle [63]. Donoghue montre, quant à lui, qu'une dilution de la semence fraîche avec un milieu KRB pour obtenir une concentration de  $2.10^5$  spermatozoïdes par mL avec une mobilité de 75% donne des bons taux de fécondation [15].

La semence est déposée directement dans le vagin à l'aide d'une sonde urinaire de 1mm de diamètre [50], [85]. Depuis le lieu de dépôt, les spermatozoïdes vont alors gagner l'oviducte par leur mobilité propre mais aussi et surtout par les contractions rétrogrades du tractus génital femelle. L'acidité vaginale est néfaste aux spermatozoïdes. Les sécrétions des glandes annexes (bulbo-urétrale et prostatique) permettent de neutraliser cette acidité et donc d'assurer la survie des spermatozoïdes dans les voies génitales de la femelle [45].

Bien qu'ayant subi une première maturation lors de leur trajet dans l'épididyme, les spermatozoïdes qui arrivent dans le tractus génital de la femelle ne sont pas encore fécondants. Pour le devenir, ils doivent subir la capacitation [31]. C'est alors qu'ils pourront enchaîner leur réaction acrosomale pour fusionner avec le gamète femelle et le féconder [45].

Tsutsui a obtenu un taux de fécondation de 57.1% lors d'insémination intrautérine unilatérale avec de la semence de chat congelée [87]. Zambelli a obtenu des embryons de bonne qualité chez deux chatte inséminées en intrautérine avec de la semence de Chat congelée [89].

Rapport-Gratuit.com

**DEUXIEME PARTIE : ETUDE PERSONNELLE.**



Dans cette partie, la semence sera récoltée soit par électroéjaculation, soit par dissection de l'épididyme d'une façon simple, réalisable en clinique vétérinaire. Nous verrons quelle est sa qualité en réalisant un spermogramme et testerons sa résistance à la cryoconservation.

## **.1 Matériels et Méthodes**

### **.1.1 Animaux**

Nous avons électroéjaculé 8 chats mâles adultes âgés de plus d'un an : 2 provenant de la Société Protectrice des Animaux d'Ile de France, 4 provenant d'éleveurs et 2 provenant de la chatterie du service de reproduction de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort et nous avons récolté le sperme épидидymaire de 15 chats mâles présentés en consultation à l'Ecole Vétérinaire de Maisons-Alfort pour castration, ceux-ci étant le plus souvent âgés de moins d'un an.

### **.1.2 . Récolte du sperme**

#### *.1.2.1 Electroéjaculation*

La technique que nous avons utilisée est légèrement différente de celle décrite dans la littérature. Nous avons choisi cette technique car c'est celle utilisée au Centre d'Etude en Reproduction Assistée des Carnivores et qu'elle a déjà donné des résultats satisfaisants.

Pour réaliser une électroéjaculation, le chat doit être au préalable anesthésié.

Nous avons donc anesthésié les étalons avec de la kétamine : (5mg/kg IV soit 0.05mL/kg d'Imalgène 1000<sup>ND</sup> ou 10mg/kg IM soit 0.1mL/kg d'Imalgène 1000<sup>ND</sup>) et du midazolam (0.3 mg/kg soit 0.06mL/kg IM d'Hypnovel<sup>ND</sup> en ampoule de 5mg pour 1mL).

Après avoir sondé le chat à l'aide d'une sonde urinaire de diamètre 1mm (Canule de Jackson pour Chat ; 1,0mm OD x 11.0cm ; REF 303/825/030 ; SIM S Trademarks) enfoncée sur environ 5cm, nous y avons raccordé un corps de seringue à insuline pour éviter de perdre de la semence si toutefois la quantité était trop importante par rapport au volume de la sonde. Nous avons retiré le piston de la seringue car son caoutchouc est spermicide. La semence monte dans le corps de la seringue par capillarité (photo 5) [51].

Nous avons ensuite vidé le rectum à l'aide de la sonde rectale de l'électroéjaculateur lubrifiée avec du gel échographique. Puis nous l'avons réinsérée dans le rectum sur une longueur de 8 cm, les électrodes étant orientées ventralement [18].

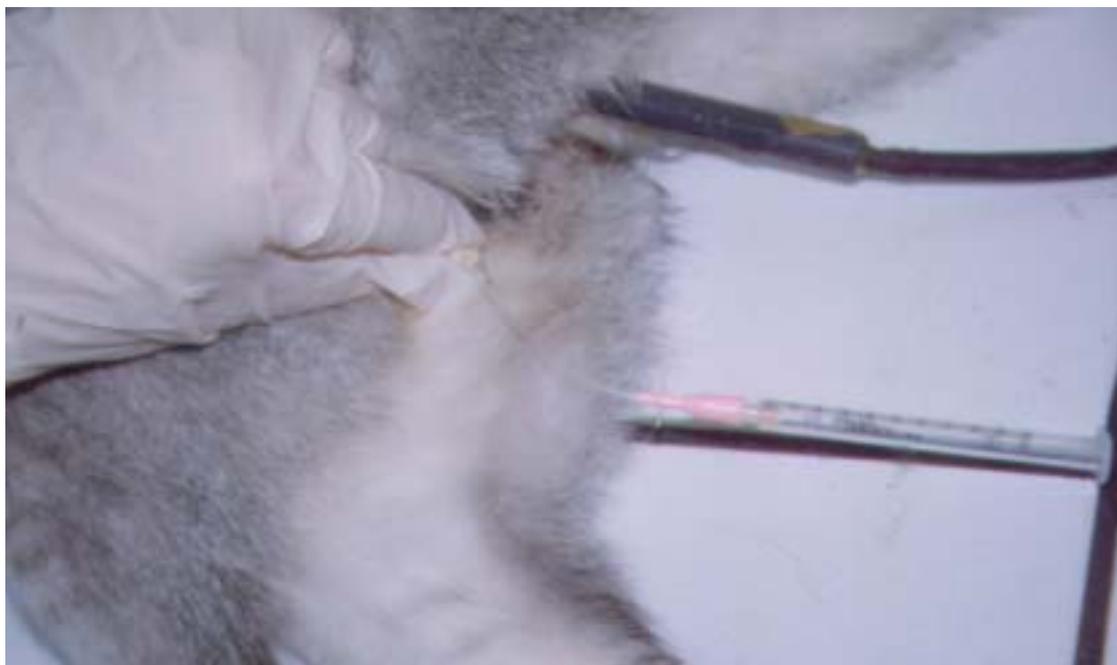
Pour chaque électroéjaculation, nous avons réalisé cinq cycles de la manière suivante [51] :

- Nous avons monté le voltage en 2s jusqu'à l'extension des postérieurs et la protusion des griffes (photo 6). Le voltage ne devant pas dépasser 6V pour ne pas provoquer la miction [51] ;
- Nous avons maintenu le voltage maximum pendant 3s ;
- Nous avons redescendu le voltage rapidement ;
- Nous avons marqué un repos de 4s ;
- Après avoir répété une dizaine de fois les quatre premières étapes, nous avons maintenu le voltage maximal pendant quelques secondes et nous avons réalisé des mouvements de va et vient dans le rectum avec la sonde.

Après chaque cycle, nous avons recueilli le sperme contenu dans la sonde urinaire dans un tube Eppendorf de 0.5mL.

NB : le prélèvement pourra être centrifugé et/ou dilué dans du PBS afin d'homogénéiser au maximum les concentrations des prélèvements dans les paillettes.

**PHOTO 5 : RECOLTE DU SPERME ELECTROEJACULE PAR CAPILLARITE DANS UN  
CORPS DE SERINGUE A INSULINE**



**PHOTO 6 : EXTENSION DES POSTERIEURS ET PROTUSION DES GRIFFES LORS DE  
L'ELECTROEJACULATION**



### *.1.2.2 Récolte du sperme épидидymaire*

Nous avons choisi la technique de récolte du sperme épидидymaire par dissection, incision et incubation des épидидymes car elle nous semblait la plus facile à mettre en œuvre.

Après castration, nous avons disséqué les testicules pour ne récupérer que les épидидymes. Nous les avons placées dans une boîte de Pétri contenant du milieu PBS (solution saline tamponnée au phosphate contenant 0.3% de sérum de veau foetal ; 100cc milieu de collecte d'embryons tampon phosphate concentré 10x ; 00250 ZT156 ; Instruments de Médecine Vétérinaire ; L'Aigle) [34]. Celle-ci peut être conservée au réfrigérateur (5°C) pendant 12h.

Nous avons disséqué les queues des épидидymes sur 4mm et les avons placées dans une boîte de Pétri contenant 300µL de PBS. A l'aide d'une lame de scalpel n°15, nous avons incisé les épидидymes sur toute leur longueur pour libérer les spermatozoïdes (figure 11).

Cette libération des spermatozoïdes nécessite une incubation à 38°C à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 30min. [81]. Nous avons ensuite écarté le tissu épидидymaire. Nous avons centrifugé le milieu ainsi obtenu pendant 8min à 300g. Nous avons écarté le surnageant et avons remis le culot en suspension dans 200µL de PBS dans un tube Eppendorf de 0,5 mL.

NB : la quantité de dilueur à rajouter était variable toujours dans le souci d'homogénéiser la concentration des différents prélèvements dans les paillettes.

## **.1.3 Conservation du sperme**

### *.1.3.1 Préparation du dilueur*

Nous avons dilué le sperme récolté avec du dilueur utilisé pour la congélation du sperme de chien contenant du glycérol et du jaune d'œuf :

\_Le dilueur initial est composé de :

Tampon tris : 6.052g

Acide citrique monoOH : 3.4g

Fructose : 2.5g

Pénicilline : 200 000 UI

Dihydrostreptomycine : 0.2g

Glycérol : 12mL

Eau distillée : QSP 200mL

\_Le dilueur final est obtenu en mélangeant 8 dixièmes de dilueur initial contenant du glycérol avec 2 dixièmes de jaune d'œuf.

Le dilueur a été conservé au réfrigérateur à température positive et a été sorti une heure avant son utilisation pour être utilisé à température ambiante.

### *.1.3.2 Dilution du prélèvement avec le dilueur*

Après avoir évalué la qualité de la semence, nous avons dilué le prélèvement.

Un éjaculat de 5 millions de spermatozoïdes permet de féconder une chatte [79], [10]. La mobilité moyenne du sperme de chat attendue est de 70% pour le sperme éjaculé et de 50% pour le sperme épидидymaire [32]. Pour assurer la fécondation, nous avons donc plutôt cherché à obtenir une paillette de 0,25 mL contenant 10 millions de spermatozoïdes en complétant avec du dilueur selon le schéma suivant :

Prenons un échantillon contenant A spermatozoïdes dans B mL. Le volume de dilueur à rajouter a été calculé par l'équation suivante :

A divisé par 10 millions nous a donné le nombre C de paillettes de 0.25 mL.

$C \times 0.25$  nous a donné le volume total D à obtenir.

Le volume de dilueur à rajouter était alors de  $D - B$ .

Exemple :

Si nous récoltons un éjaculat de 0.3 mL contenant 30 millions de spermatozoïdes.

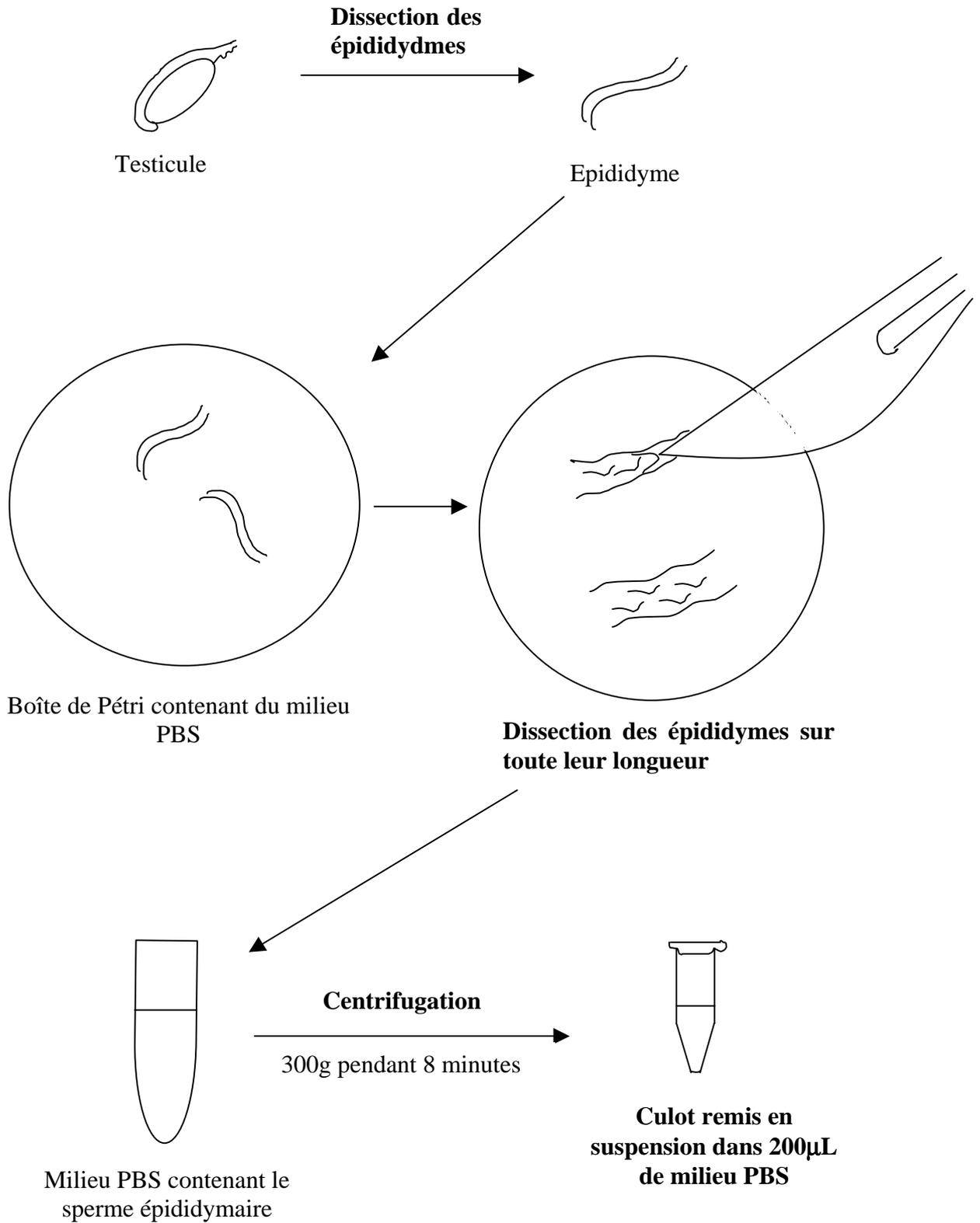
Il faudra  $30/10 = 3$  paillettes de 0.25mL soit un volume total de  $3 \times 0.25 = 0.75$  mL.

Il faut donc rajouter  $0.75 - 0.3 = 0.4$  mL de dilueur.

Le dilueur a été rajouté délicatement dans le prélèvement au goutte à goutte pour éviter un choc osmotique.

**FIGURE 11 : DISSECTION DES EPIDIDYMES ET RECOLTE DU SPERME**

**EPIDIDYMAIRE**



### *.1.3.3 Congélation des paillettes*

La technique utilisée est celle utilisée couramment chez le chien au Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores de l'Unité de Médecine de l'Elevage et du Sport à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort.

Le prélèvement dilué a été réfrigéré pendant une heure pour obtenir une température homogène de 4°C.

Les paillettes ont été préalablement identifiées (nom du chat, tatouage, date de congélation) sont ensuite remplies à 4°C et scellées mécaniquement toujours à 4°C (photo 7).

Nous les avons alors placées dans les vapeurs d'azote à -70°C pendant 15 minutes (congélation horizontale) avant de les plonger dans l'azote liquide à -196°C, dans des visotubes pour faciliter leur repérage dans la cuve (photo 8).

### **.1.4 Décongélation**

Après 2 jours de conservation dans l'azote liquide, la qualité du prélèvement ne varie plus et on peut décongeler une paillette pour évaluer la dégradation survenue suite à la congélation.

La décongélation a été réalisée rapidement. Nous avons placé les paillettes directement de l'azote liquide dans un bain-marie à 37°C. Une décongélation rapide n'affecte pas la mobilité de la semence [4].

Nous avons alors réalisé un spermogramme pour évaluer la mobilité immédiate et à 1H30 de la semence décongelée, ainsi que l'atteinte portée aux acrosomes.

NB : en vue d'une insémination, le prélèvement est décongelé de la même manière et est inséminé en intra-vaginal. 48 heures auparavant, l'ovulation aura été provoquée par une injection de 50 UI/kg d'hCG [48]. La semence de plusieurs paillettes peut être centrifugée et le culot remis en suspension dans 0.2mL pour contenir plus de  $5.10^9$  spermatozoïdes viables. Une quantité plus élevée de semence inséminée chez une chatte provoque immanquablement du reflux [49].

**PHOTO 7 : PAILLETES ET VISOTUBES UTILISES POUR LA CRYOCONSERVATION  
DE LA SEMENCE DE CHAT**



**PHOTO 8 : CUVE A AZOTE LIQUIDE POUR CONSERVER LES PAILLETTES**



## **.1.5 Tests de comparaison : le spermogramme**

L'examen du sperme est réalisé selon les critères envisagés dans notre première partie sur une quantité de 20µL de semence avant et après congélation. La congélation peut, en effet, altérer considérablement la semence [27]. Il est alors intéressant d'estimer la résistance de la semence.

### *.1.5.1 Mobilité*

Il s'agit de déterminer le pourcentage de spermatozoïdes mobiles dans le prélèvement. Nous avons placé 5µL de semence entre lame et lamelle sous microscope à platine chauffante à 37°C au grossissement x 200 puis au grossissement x 400.

Nous avons apprécié le pourcentage de mobilité en comptant les spermatozoïdes immobiles sur le fond de la lame par rapport aux spermatozoïdes mobiles évoluant à côté [76].

Ce paramètre est bien entendu subjectif et a été pondéré lors de la comparaison des résultats.

### *.1.5.2 Numération*

A l'aide de pipettes Eppendorf, nous avons dilué 5µL de semence dans 45µL de solution de NaCl à 3% pour obtenir une dilution au dixième. La concentration est mesurée en utilisant une cellule de Thoma (photos 9 et 10) de la manière suivante :

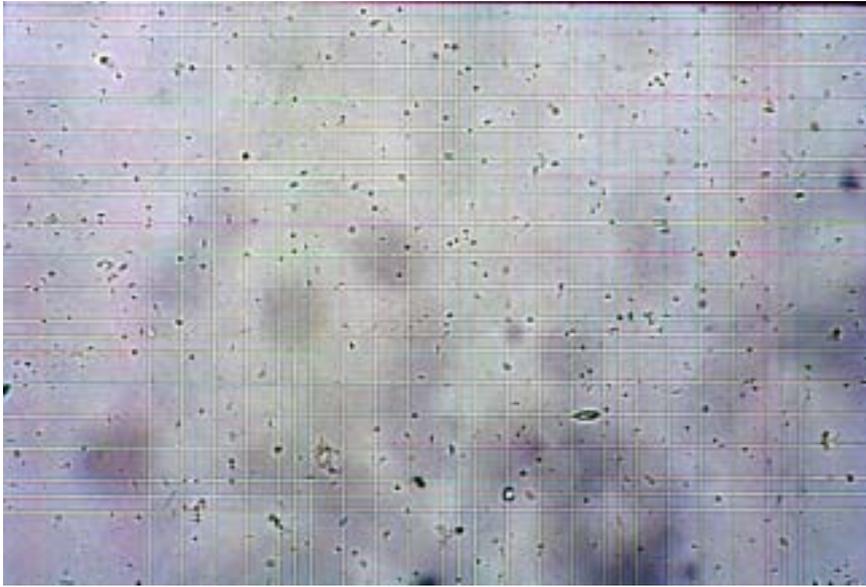
\_Nous avons additionné le nombre de spermatozoïdes contenus dans 5 grands carreaux de la grille pour obtenir le nombre A (figure 12).

\_En divisant A par le volume des cinq grands carreaux ( $1/250 \text{ mm}^3 \times 5$ ) et en multipliant par la dilution (10), nous avons obtenu  $B = A \times 500$  qui est la concentration en spermatozoïdes par  $\text{mm}^3$ .

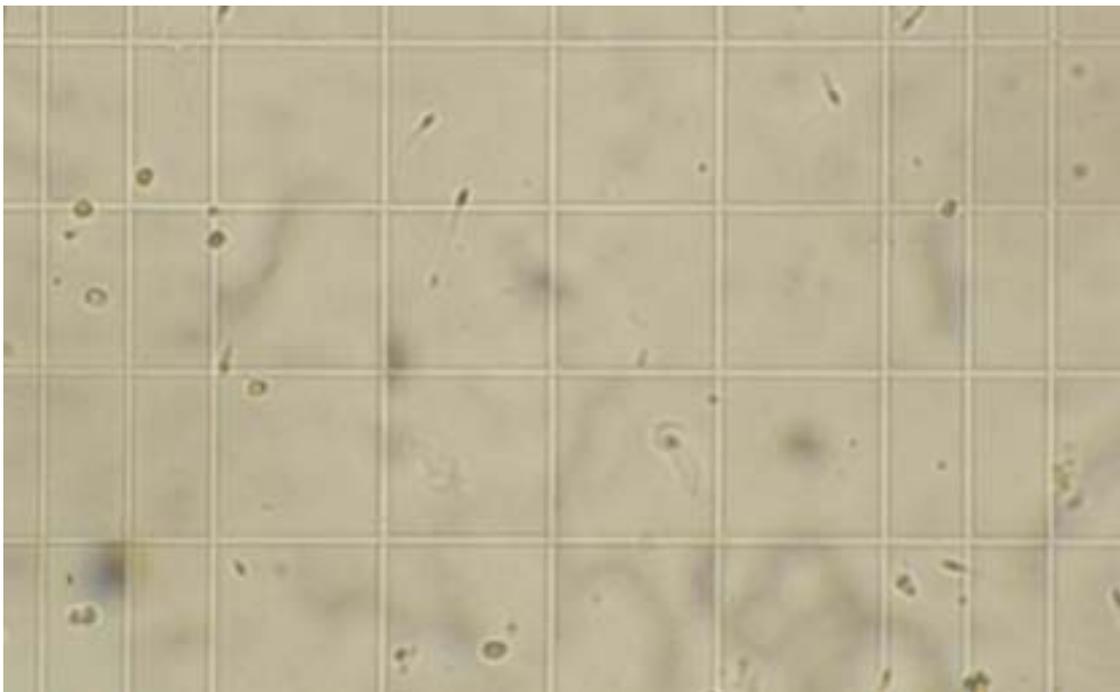
\_Enfin, nous avons obtenu le nombre C de spermatozoïdes totaux contenus dans le prélèvement par l'opération suivante :  $B \times 1000 \times \text{volume recueilli en mL}$ .

Nous avons visualisés les spermatozoïdes au grossissement x 400 du microscope.

**PHOTO 9 : CELLULE DE THOMA OBSERVEE AU MICROSCOPE AU  
GROSSISSEMENT X100**

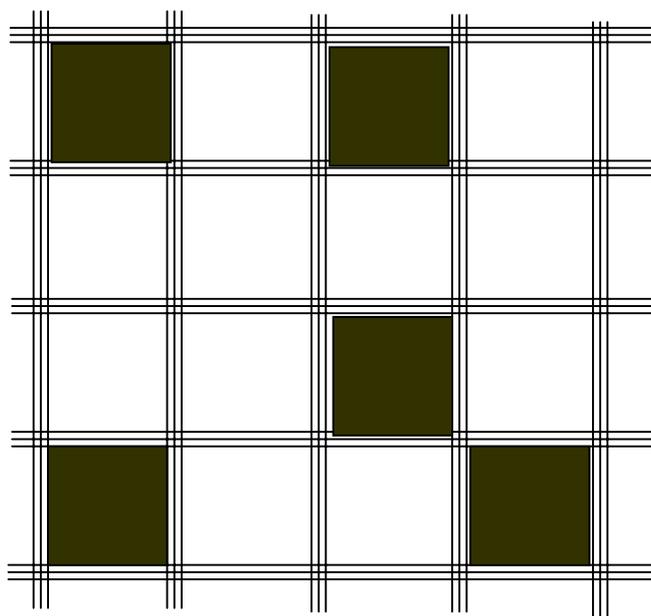


**PHOTO 10 : CELLULE DE THOMA OBSERVEE AU MICROSCOPE AU  
GROSSISSEMENT X400**

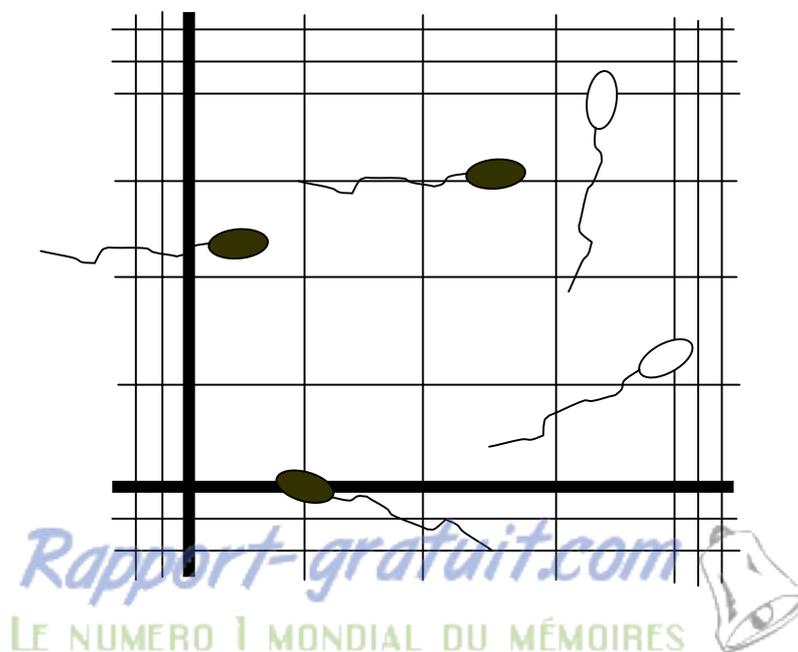


## FIGURE 12 : COMPTAGE CELLULAIRE A L'AIDE D'UNE CELLULE DE THOMA [12]

La cellule de Thoma présente 16 grands carreaux. A est obtenu en additionnant le nombre de spermatozoïdes contenus dans 5 grands carreaux.



Les spermatozoïdes situés à cheval sur les côtés du grand carré doivent n'être comptés que sur deux côtés (toujours les mêmes) pour éviter de les comptabiliser deux fois. Ici, en choisissant le côté vertical gauche et le côté horizontal le plus bas, seuls les spermatozoïdes coloriés en noir sont comptabilisés :



### .1.5.3 Pourcentage de spermatozoïdes vivants

Nous avons mélangé 5 $\mu$ L de prélèvement avec 5 $\mu$ L d'éosine-nigrosine pendant 1 minute. Puis nous avons étalé le mélange étalé sur une lame délicatement et nous l'avons séché.

Au microscope à immersion au grossissement x 1000, nous avons compté 100 spermatozoïdes en les classant en mort ou vivant : les spermatozoïdes morts ont leur membrane perméable et prennent une coloration rosée alors que les spermatozoïdes vivants ont une membrane imperméable et apparaissent donc incolores (photo 11).

Nous avons converti les chiffres obtenus en pourcentages.

#### **PHOTO 11 : SPERMATOZOÏDE MORT ET SPERMATOZOÏDE VIVANT APRES COLORATION VITALE A L'EOSINE-NIGROSINE**



#### .1.5.4 Anomalies

Nous avons utilisé la même lame que pour le dénombrement des spermatozoïdes vivants et nous avons compté 100 spermatozoïdes sous microscope à immersion au grossissement x 1000 [76]. Nous les avons classés selon les catégories suivantes :

\_normaux ;

\_anomalies de tête (malposition, tête piriforme ou ronde, allongée ou étroite, microcéphalique ou macrocéphalique (photo 12), tête double, acrosome anormal) ;

\_décapités ;

\_anomalies de la pièce intermédiaire (coudée, double, inexistante) ;

\_anomalies du flagelle (enroulé, double, inexistant) ;

\_gouttelettes protoplasmiques (proximales, distales) ;

\_présence de cellules autres (cristaux de spermine, cellules épithéliales, leucocytes, érythrocytes, cellules spermiogéniques).

Là encore, nous avons converti les chiffres obtenus en pourcentage.

La présence de cellules autres en grande quantité permettant de suspecter un problème infectieux ou métabolique est notée.

#### **PHOTO 12 : SPERMATOZOÏDE MORT MACROCEPHALE A COTE D'UN SPERMATOZOÏDE VIVANT NORMAL APRES COLORATION A L'EOSINE-NIGROSINE**



### .1.5.5 Intégrité de l'acrosome

Nous avons mélangé 5 $\mu$ L de semence avec 5 $\mu$ L de colorant rapide de l'acrosome (1% fast green FCF, 1% rose bengal, 40% éthanol dans 0.1M d'acide citrique et 0.2M de tampon phosphate dissodique) [62]. Après avoir laissé agir à température ambiante pendant 70 secondes, nous avons étalé le mélange sur une lame et l'avons séché. Nous avons observé la lame au microscope à immersion au grossissement x 1000.

De nouveau, nous avons compté 100 spermatozoïdes et les avons classés selon les catégories suivantes (photo 13) :

\_Acrosome intact : il prend alors une coloration bleu-violet en région antérieure de la tête du spermatozoïde.

\_Acrosome endommagé : il prend alors une coloration hétérogène ou rose pâle presque incolore.

L'acrosome doit rester intact pour permettre au sperme de rester fécondant. La réaction acrosomique doit intervenir juste avant la fécondation lors de la fusion avec l'ovocyte pour permettre l'entrée du noyau du spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte.

**PHOTO 13 : SPERMATOZOÏDE DONT L'ACROSOME EST INTACT ET SPERMATOZOÏDE DONT L'ACROSOME EST ENDOMMAGE APRES COLORATION AU VERT RAPIDE**



## **.2 Résultats**

### **.2.1 Qualité de la semence avant congélation**

Nous avons réalisé un spermogramme avant toute congélation. Nous avons décidé de ne pas réaliser de comparaison statistique des deux méthodes du fait de la grande différence des deux populations de chats concernés (voir §3.2.3 P78)

#### *.2.1.1 Semence récoltée par électroéjaculation*

Les résultats des spermogrammes réalisés sur le sperme obtenu par électro-éjaculation avant congélation sont donnés dans le tableau VI. Les chats 7 et 8 n'ont pas été pris en compte car ils étaient présentés pour infertilité.

Nous avons obtenu une mobilité moyenne de 58%. Le volume moyen a été de 0.19 mL. Le nombre moyen de spermatozoïdes a été de  $31,18.10^6$ . Le pourcentage de spermatozoïdes normaux moyen a été de 58% et le pourcentage d'acrosomes normaux a été de 81%.

Pour un éjaculat moyen, nous avons donc obtenu  $18,08.10^6$  spermatozoïdes normaux. 5 millions de spermatozoïdes suffisent à féconder une chatte [80]. Le sperme obtenu par électro-éjaculation peut donc suffire à inséminer une chatte en semence fraîche.

Les anomalies que nous avons le plus souvent rencontrées sont les anomalies de flagelle (19%) et les spermatozoïdes décapités (9%). Ce sont des anomalies dites secondaires car se produisant après la spermatogenèse. Ces anomalies pourraient être imputées à la méthode de prélèvement.

#### *.2.1.2 Semence récoltée par dissection de l'épididyme*

Les résultats des spermogrammes réalisés sur le sperme récolté par dissection de l'épididyme sont notés dans le tableau VII. Sur les 15 paires d'épididymes prélevés, seulement 9 contenaient des spermatozoïdes. Nous n'avons retenu que ces 9 prélèvements.

Nous avons obtenu une mobilité moyenne de 67%. Le nombre de spermatozoïdes moyen obtenu a été de  $10,5.10^6$  et le pourcentage moyen de spermatozoïdes normaux a été de 52%. Là encore, le nombre moyen de spermatozoïdes normaux est compatible avec une insémination puisqu'il est de  $5,5.10^6$ , supérieur à 5 millions [80].

**TABLEAU VI : CARACTERISTIQUES DE LA SEMENCE DE CHAT OBTENUE PAR ELECTROEJACULATION**

Chat	Mobilité en pourcentage de spermatozoïdes mobiles	Volume en mL	Concentration en spermatozoïde par mm <sup>3</sup>	Nombre total de spermatozoïde dans l'éjaculat	Pourcentage de spermatozoïdes vivants	Pourcentage de spermatozoïdes normaux
<b>1</b>	40	0,16	16 000	2 560 000	41	46
<b>2</b>	0	0,12	7 000	560 000	0	69
<b>3</b>	90	0,2	710 000	142 000 000	85	49
<b>4</b>	70	0,15	175 000	26 250 000	65	63
<b>5</b>	80	0,15	800	120 000		
<b>6</b>	70	0,35	44 500	15 575 000	87	62
<b>moyenne</b>	<b>58</b>	<b>0,19</b>	<b>158 883</b>	<b>31 177 500</b>	<b>56</b>	<b>58</b>
<b>écart-type</b>	33	0,08	277 686	55 263 561	36	10
<b>Intervalle de confiance (! = 0.5)</b>	9	0,02	76 463	15 217 349	10	3

Chat	Pourcentage de spermatozoïdes présentant une anomalie					Pourcentage de spermatozoïdes présentant un acrosome intact	pH
	De tête	décapités	De pièce intermédiaire	De flagelle	De gouttelette protoplasmique		
<b>1</b>	1	24	1	27	1	78	
<b>2</b>	0	19	0	12	0	75	
<b>3</b>	0	1	22	10	18	95	
<b>4</b>	1	1	2	32	1	78	8,6
<b>5</b>						70	7,6
<b>6</b>	2	1	14	13	8	87	
<b>moyenne</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>19</b>	<b>6</b>	<b>81</b>	<b>8,1</b>
<b>écart-type</b>	1	11	10	10	8	9	0,7
<b>Intervalle de confiance (! = 0.5)</b>	0	3	3	3	2	2	0,2

**TABLEAU VII : CARACTERISTIQUES DE LA SEMENCE DE CHAT OBTENUE PAR DISSECTION DE L'EPIDIDYME**

Chat	Mobilité en pourcentage de spermatozoïdes mobiles	Volume en mL	Concentration en spermatozoïde par mm <sup>3</sup>	Nombre total de spermatozoïde dans l'éjaculat	Pourcentage de spermatozoïdes vivants	Pourcentage de spermatozoïdes normaux
A	50	1,3	19 500	25 350 000	68	44
B	60	0,3	65 000	19 500 000	77	33
C	60	0,3	51 500	15 450 000	50	50
D	70	0,3	2 000	600 000	62	42
E	80	0,4	5 000	2 000 000	60	70
F	60	0,1	35 000	3 500 000	48	62
G	60	0,18	31 000	5 580 000	60	48
H	70	0,2	49 000	9 800 000	61	61
I	90	0,2	66 500	13 300 000	77	60
<b>moyenne</b>	<b>67</b>	<b>0,36</b>	<b>36 056</b>	<b>10 564 444</b>	<b>63</b>	<b>52</b>
<b>écart-type</b>	12	0,36	23 968	8 498 412	10	12
<b>Intervalle de confiance (! = 0.5)</b>	3	0,08	5 389	1 910 699	2	3

Chat	Pourcentage de spermatozoïdes présentant une anomalie					Pourcentage de spermatozoïdes présentant un acrosome intact
	De tête	décapités	De pièce intermédiaire	De flagelle	De gouttelette protoplasmique	
A	0	1	17	20	18	82
B	5	1	5	55	1	84
C	0	17	11	22	0	91
D	0	29	0	21	8	90
E	10	10	0	10	0	80
F	2	12	2	10	12	74
G	6	10	5	23	9	80
H	4	4	12	16	3	84
I	0	2	11	11	16	92
<b>moyenne</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>21</b>	<b>7</b>	<b>84</b>
<b>écart-type</b>	4	9	6	14	7	6
<b>Intervalle de confiance (! = 0.5)</b>	1	2	1	3	2	1

Le pourcentage moyen d'acrosomes normaux a été de 84%. Les anomalies que nous avons le plus souvent rencontrées sont les anomalies de flagelle (21%), de spermatozoïdes décapités (10%). Les anomalies de flagelle et de spermatozoïdes décapités sont des anomalies primaires pouvant être imputées à la méthode de récolte du sperme. Les gouttelettes protoplasmiques (7%), bien qu'anomalies primaires, peuvent également être imputées à la méthode de prélèvement puisque la récolte est réalisée au niveau du lieu de maturation des spermatozoïdes.

## **.2.2 Qualité de la semence après décongélation**

Nous avons décongelé les paillettes 2 jours après leur réalisation.

Le principal critère que nous avons retenu pour apprécier la qualité de la semence après ce traitement thermique est la mobilité immédiate.

La mobilité à 1H30 après décongélation est également importante car elle donne un aperçu de la résistance des spermatozoïdes en vue d'une insémination dans les voies génitales de la femelle.

Les acrosomes peuvent être endommagés par la congélation et être ainsi responsables d'une moins bonne fécondance de la semence. Nous avons donc apprécié le pourcentage d'acrosomes normaux pour chaque échantillon décongelé.

### *.2.2.1 Aptitude à la congélation de la semence récoltée par électroéjaculation*

Les spermogrammes réalisés sur le sperme récolté par électroéjaculation après cryoconservation sont donnés dans le tableau VIII. La semence du chat 3 n'a pas été congelée car elle était de trop mauvaise qualité.

La mobilité est passée de 56% à 19% après décongélation. La mobilité à 1h30 moyenne a été de 16%. Le pourcentage d'acrosomes normaux moyen est passé de 80 à 42%. Sur les  $34.10^6$  spermatozoïdes recueillis, seulement  $6.10^6$  ont résisté. Ce nombre reste cependant compatible avec une insémination.

**TABLEAU VIII : CARACTERISTIQUES DE LA SEMENCE DE CHAT PRELEVEE PAR ELECTROEJACULATION APRES DECONGELATION**

Chat	Mobilité à t0 en pourcentage de spermatozoïdes mobiles	Mobilité à t1h30 en pourcentage de spermatozoïdes mobiles	Pourcentage de spermatozoïdes présentant un acrosome intact
1	10	0	68
2	30	40	60
4	35	30	60
5	1	0	0
6	20	10	24
<b>moyenne</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>42</b>
<b>écart-type</b>	14	18	29
<b>Intervalle de confiance (! = 0.5)</b>	4	5	9

*.2.2.2 Aptitude à la congélation de la semence récoltée par dissection de l'épididyme*

Les résultats du spermogramme réalisé après cryoconservation du sperme épидидymaire sont donnés dans le tableau IX.

La mobilité immédiate obtenue a chuté de 67 à 19%, la mobilité moyenne à 1h30 est de 17%. Le pourcentage moyen d'acrosomes normaux est passé de 84% à 44%. Sur les  $10,5 \cdot 10^6$  spermatozoïdes recueillis, seulement  $2 \cdot 10^6$  ont résisté à la cryoconservation. Cette quantité ne correspond pas à une dose inséminante.

**TABLEAU IX : CARACTERISTIQUES DE LA SEMENCE DE CHAT PRELEVEE PAR  
DISSECTION DE L'EPIDIDYME APRES DECONGELATION**

<b>Chat</b>	<b>Mobilité à t0 en pourcentage de spermatozoïdes mobiles</b>	<b>Mobilité à t1h30 en pourcentage de spermatozoïdes mobiles</b>	<b>Pourcentage de spermatozoïdes présentant un acrosome intact</b>
<b>A</b>	30	30	64
<b>B</b>	40	30	74
<b>C</b>	30	30	58
<b>D</b>	10	10	60
<b>E</b>	50	50	70
<b>F</b>	0	0	16
<b>G</b>	0	0	18
<b>H</b>	10	5	20
<b>I</b>	0	0	14
<b>moyenne</b>	<b>19</b>	<b>17</b>	<b>44</b>
<b>écart-type</b>	19	18	26
<b>Intervalle de confiance ( ! = 0.5)</b>	4	4	6

### **.3 Discussion**

#### **.3.1 Les difficultés rencontrées**

##### *.3.1.1 Au niveau de l'échantillonnage*

La difficulté a été de trouver des chats mâles âgés de plus d'un an, c'est à dire parfaitement matures. En effet, les chats bénéficient d'une reproduction adaptée à la prédation. L'ovulation provoquée par le coït et la durée extrêmement courte de ce dernier en font une espèce sans problème de reproduction en général. Au contraire, les chats mâles, comme les femelles, sont

la plupart du temps stérilisés avant leur puberté pour éviter les désagréments liés à cette reproduction (comportement, odeur, bagarres, surpopulation).

Pour l'électroéjaculation, nous avons bénéficié de deux chats provenant de la Société Protectrice des Animaux d'Ile de France, de 4 chats d'éleveurs et de deux chats de la chatterie du service de Reproduction de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Seuls les mâles de la chatterie auraient pu être prélevés plusieurs fois (manque de place dans la chatterie pour héberger les autres mâles extérieurs) Tous les mâles n'ont donc été prélevés qu'une seule fois pour pouvoir comparer les semences obtenues.

Pour la dissection de l'épididyme par contre, nous avons récupéré les testicules de 15 chats mâles présentés pour castration à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. 6 chats étaient immatures. Nous n'avons donc retenu que les testicules dont la taille était compatible avec la maturité sexuelle du mâle (plus d'un cm de longueur et de largeur [78]).

Pour pouvoir comparer statistiquement les résultats obtenus, les échantillons de population doivent être homogènes. L'idéal aurait été d'électroéjaculer une dizaine de mâles adultes 3 à 5 fois puis de les castrer pour comparer la qualité du sperme obtenu par électroéjaculation à celle du sperme obtenu ensuite par dissection de l'épididyme sur les mêmes chats.

### *.3.1.2 Au niveau de l'environnement*

Nous avons prélevé les chats en pleine saison sexuelle (de février à mai 2001) pour s'affranchir des variations saisonnières de la qualité du sperme. Cependant l'étude a porté sur des chats provenant pour la plupart de l'extérieur (21 chats sur les 24 prélevés) et nous n'avons donc aucune emprise sur les autres facteurs de variation : alimentation, présence d'autres congénères, présence de femelles en châteaux, nombre de reproduction déjà effectuée, environnement.

Là encore, pour pouvoir comparer statistiquement les résultats obtenus, il aurait fallu disposer de chats élevés en chatterie dans les mêmes conditions pour s'affranchir de l'effet de l'environnement.

### *.3.1.3 Au niveau de la cryoconservation*

La technique employée a été celle utilisée chez le chien. Cette technique donne de très bons résultats avec la semence de chien et laissait espérer des résultats comparables avec la semence de chat. Cependant, la semence de chien est moins sensible au choc thermique que la semence de nombreuses autres espèces [76].

La semence de chat est beaucoup moins concentrée que celle du chien et le pourcentage de spermatozoïdes anormaux est beaucoup plus élevé. Chez le chien, un pourcentage de spermatozoïdes normaux et mobiles inférieur à 70% est une contre-indication à la cryoconservation. Or, la semence du chat a une mobilité moyenne de 60% [60] et possède beaucoup de formes anormales (Roth a obtenu 30% d'anomalies sur du sperme électroéjaculé [67] et Hingst a obtenu 40% d'anomalies sur du sperme épидидymaire [37]). La technique est donc à améliorer en vue des différences entre ces deux espèces.

La courbe de température, la composition du dilueur et la dilution de la semence influencent les résultats obtenus après cryoconservation. Leur étude permettra d'améliorer les résultats.

## **.3.2 Interprétation des résultats**

Les deux méthodes de récolte que nous avons utilisées, l'électroéjaculation et la dissection de l'épididyme, ont permis de récolter du sperme en quantité et qualité suffisantes pour inséminer et féconder une chatte d'après les données de la littérature concernant cette espèce.

### *.3.2.1 Caractéristiques de la semence obtenue par électroéjaculation*

Les résultats que nous avons obtenus sont moins bons que ceux décrits dans la littérature. La mobilité que nous avons obtenue de 58% est inférieure aux 79% décrits par Harris [32]. Le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat est aussi plus faible :  $31.10^6$  au lieu des  $60.10^6$  décrits par Dooley [19].

La semence que nous avons obtenue reste cependant suffisante pour une insémination selon la littérature.

La moins bonne qualité peut s'expliquer par le manque de prélèvements sur un même mâle. En effet, les premiers éjaculats obtenus par électroéjaculation ne sont jamais les meilleurs. D'après Pineda, il faut au moins réaliser 3 électroéjaculations pour obtenir un éjaculat représentatif de la fertilité du mâle [59]. Dans l'étude, nous n'avons prélevé les étalons qu'une seule fois car ils n'étaient pas à notre disposition. On peut donc espérer de meilleurs résultats en routine sur un même étalon.

### *.3.2.2 Caractéristiques de la semence obtenue par dissection de l'épididyme*

Les résultats que nous avons obtenus sont moins bons que ceux décrits dans la littérature mais tous les chats prélevés étaient âgés de moins d'un an. La quantité de sperme recueillie est cependant compatible avec une insémination artificielle selon la littérature.

Ils sont encourageants puisqu'ils montrent qu'avec des techniques aussi simples que celles utilisées, les vétérinaires praticiens pourront proposer des inséminations artificielles aux éleveurs félins.

Nous avons obtenu du sperme épидидymaire contenant 7 % de gouttelette protoplasmique. Ces anomalies de gouttelette protoplasmique s'expliquent par le lieu même du prélèvement, l'épididyme étant le lieu de maturation des spermatozoïdes. Le sperme épидидymaire présente cependant une bonne proportion de spermatozoïdes normaux (52%).

### *.3.2.3 Comparaison des deux méthodes*

Dans notre étude, la dissection de l'épididyme a donné des résultats un peu moins satisfaisants que ceux obtenus avec l'électroéjaculation mais les chats que nous avons prélevés étaient tous âgés de moins d'un an et donc pas forcément matures. Ces résultats ne sont donc pas comparables à ceux que nous avons obtenus par électroéjaculation d'étalons de plus d'un an.

Toutefois, une meilleure qualité du sperme électroéjaculé par rapport au sperme épидидymaire peut s'expliquer par la maturation insuffisante de ce dernier.

#### *.3.2.4 Caractéristiques de la semence de Chat obtenues après sa cryoconservation*

La congélation dans l'azote liquide a par contre montré ses limites. Avec une chute de la mobilité de plus de 50%, la technique utilisée chez le chien n'est pas adaptée à la semence du chat, aussi bien pour la semence récoltée par électroéjaculation que pour la semence récoltée par dissection de l'épididyme.

Le problème se situe surtout au niveau de l'acrosome avec près de 60% d'acrosomes endommagés dans les deux cas. Les dommages aux acrosomes sont plus fréquents pour le sperme épидидymaire comme décrit par Hay [34]. Les acrosomes endommagés témoignent de la souffrance engendrée par le choc thermique lors de la cryoconservation.

Les proportions de spermatozoïdes anormaux (42% pour le sperme récolté par électroéjaculation et 48% pour le sperme épидидymaire) expliquent cette moindre résistance à la cryoconservation par rapport à la semence de chien chez qui on ne congèle que des semences contenant au moins 70% de spermatozoïdes normaux. En effet, les spermatozoïdes anormaux sont plus sensibles à la cryoconservation de part leur acrosome plus fragile [66].

Les mêmes prélèvements réalisés sur des chats matures dans de bonnes conditions (testicule pesant plus de 1g pour la semence récoltée par dissection de l'épididyme, plusieurs électroéjaculations réalisées sur un même mâle) auraient été de bien meilleure qualité et auraient certainement mieux résistés à la cryoconservation.

### **.3.3 Les perspectives**

#### *.3.3.1 La cryoconservation*

Des études pourront être menées pour évaluer la concentration en glycérol du dilueur, la dilution du prélèvement et la courbe de descente en température optimales pour la cryoconservation de la semence de Chat.

Des études récentes ont montré la réussite de la cryoconservation chez le chat comme chez les félidés sauvages [61], [40].

Tsutsui a obtenu une mobilité moyenne de 30% après cryoconservation. En inséminant directement dans les cornes utérines, il a obtenu un taux de gestation de 57% [87]. Zambelli a réussi à inséminer deux chattes en semence congelée et a obtenu des embryons de bonne qualité en inséminant directement dans l'utérus [89].

Une meilleure appréhension du dilueur, de la technique de congélation et de la technique d'insémination peut donc amener à pratiquer des inséminations artificielles en semence congelée en routine chez le chat.

Le dilueur pourrait contenir des substances destinées à protéger les spermatozoïdes et à les stimuler. Maxwell et Stojanov ont montré l'intérêt des antioxydants dans le stockage des spermatozoïdes. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la superoxyde dismutase et la catalase[52]. Tramer a montré le rôle de ces antioxydants, et notamment de la vitamine E, dans la tête de l'épididyme chez le Rat [86]. L'ajout de stimulants de la mobilité (caféine, pentoxifylline ou 2'-désoxyadenosine) permet d'accroître la fécondance du sperme de Chat, cryoconservé en augmentant la mobilité des spermatozoïdes et en les hyperactivant sans diminuer leur survie à long terme [83], [82]. Ces techniques pourraient être étudiées et être mises en place dans le cadre des inséminations en semence congelée.

Une fois la technique de cryoconservation maîtrisée, le C.E.R.C.A. pourra proposer des cryoconservations pour les chats comme il le fait déjà pour les chiens. Les éleveurs pourront donc conserver la semence de leurs meilleurs étalons et réaliser des inséminations artificielles même si le mâle n'est plus disponible.

La technique d'insémination artificielle restera néanmoins moins évidente que pour le chien car l'ovulation doit être provoquée chez la chatte contrairement à la chienne.

### *.3.3.2 L'insémination artificielle*

Les résultats obtenus sont encourageants en vue d'insémination en semence fraîche.

Une insémination artificielle intra-vaginale en semence congelée a été tentée avec le chat 06 pour lequel la mobilité post-cryoconservation était de 35%. Cette insémination n'a pas abouti.

Le fait de renouveler l'insémination 24 heures après permet d'augmenter les chances de réussite [80]. L'insémination intra-utérine par laparoscopie pourrait être une alternative pour améliorer les taux de réussite.

Des inséminations artificielles chez le chat font souvent suite aux échecs de saillie qui peuvent être environnementaux (femelle agressive, stress, mâle inexpérimenté...), physique (gingivite gênant la prise au cou par le mâle, strangulation par les poils, lithiase...) ou suite à une chute de libido (mâle trop âgé ou trop jeune, carence, excès pondéral...) [49], [51].

Les éleveurs félines réalisent leur programme de sélection en utilisant, la plupart du temps, uniquement leurs reproducteurs car l'élevage félin est soumis à une forte pression infectieuse et parasitaire. Ils ne veulent pas prendre le risque de soumettre leurs meilleurs reproducteurs à celle-ci. L'insémination artificielle pourrait être une alternative pour utiliser les meilleurs étalons sans les déplacer et sans risquer de contamination dans un autre élevage. Il convient alors d'éviter les débordements et de prendre en compte la fonction de reproduction dans le programme de sélection pour ne pas obtenir des races de chat incapables de se reproduire autrement que par reproduction assistée comme il en existe chez le chien.

Le développement de la reproduction assistée chez le chat progresse grâce aux recherches effectuées pour les félinidés sauvages en voie de disparition. L'insémination intra-utérine par laparoscopie, 30 à 50 heures après le déclenchement de l'ovulation a donné un taux de réussite de 50% selon Goodrowe. Cette technique pourrait donc être employée lors des inséminations en semence congelée pour améliorer le taux de réussite en éliminant les obstacles que sont le col et la remontée des cornes utérines [28]. Zambelli a d'ailleurs réussi à obtenir des embryons de bonne qualité sur deux chattes inséminées dans les cornes utérines avec de la semence congelée [89].

La FIV (fécondation in vitro) et l'ICSI (IntraCyttoplasmic Sperm Injection) ont aussi été réalisées avec succès chez le chat [46], [64]. Mais ces techniques ne peuvent pas être utilisées en routine dans une clinique vétérinaire. Elles sont surtout étudiées pour la reproduction des grands félinidés en voie de disparition.

### *.3.3.3 Le diagnostic d'infertilité*

L'électroéjaculation est facilement réalisable en clientèle et permet de réaliser un spermogramme en cas d'infertilité pour en appréhender la cause.

Les anomalies de la semence ont été décrites dans la première partie et permettent de diagnostiquer plus ou moins finement la cause de l'infertilité et de proposer un traitement dans la mesure du possible.

L'azoospermie ne peut être confirmée par l'absence de sperme lors d'une électroéjaculation. Il faut renouveler les prélèvements et réaliser une cystocentèse avant et après la collecte pour mettre en évidence une possible électroéjaculation rétrograde [41]. D'après Johnstone, au moins cinq prélèvements sont nécessaires pour évaluer la fertilité d'un mâle [42].

Une concentration en phosphatase alcaline élevée lors d'une récolte de semence sans spermatozoïde permet de confirmer l'azoospermie [41].



## CONCLUSION

Pour récolter la semence de Chat, l'électroéjaculation et la dissection de l'épididyme ont donné des résultats prometteurs, compatibles avec l'insémination artificielle d'après la littérature. Elle font appel à des techniques simples, réalisables par le vétérinaire.

D'une part, l'électroéjaculation est une technique simple, relativement sans danger pour le mâle, qui permet de réaliser un spermogramme pour apprécier la qualité de sa semence ou de récolter de la semence en vue d'une insémination, après ou non conservation, avec une moyenne obtenue de 31 millions de spermatozoïdes par éjaculat.

D'autre part, la dissection de l'épididyme est également une technique simple que l'on peut utiliser lorsque l'éleveur vient faire stériliser son étalon. Les 10 millions de spermatozoïdes obtenus en moyenne lors de notre étude par cette méthode sont compatibles avec la réalisation d'une insémination artificielle d'après la littérature. De plus, couplée à l'électroéjaculation, elle permet de récupérer tout le sperme fertile contenu dans l'épididyme. Cette méthode est alors intéressante pour récolter la semence des étalons lors de leur castration.

Les études menées auparavant servaient d'exemples pour appliquer ces méthodes aux grands félinés sauvages en voie de disparition. Elles peuvent être proposées aux éleveurs félinés pour améliorer leur programme de sélection.

Cependant, les essais de cryoconservation de la semence de Chat en utilisant le dilueur et la technique utilisés chez le Chien au Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort se sont révélés peu satisfaisants (seuls 6 millions de spermatozoïdes ont résisté au processus de congélation-décongélation en moyenne). Un dilueur et une technique spécifique à la semence de Chat restent donc à mettre au point. D'ailleurs, les résultats décrits dans la littérature récente sont encourageants.

La récolte de la semence de Chat par électroéjaculation et (ou) par dissection de l'épididyme couplée à la cryoconservation permettra à la félinotechnie de faire un grand pas.



## BIBLIOGRAPHIE

1. AUGHEY E. The ultrastructure of the prostate gland in the cat. *J. Reprod. Fert.*,1973, **33** , 351-352.
2. AXNER E, HOLST BS, LINDE-FORSBERG C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electroejaculation and a comparison with electroejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology*,1998, **50** (6), 973-979.
3. AXNER E, LINDE-FORSBERG C, EINARSSON S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology*,1999, **52** (5), 767-778.
4. BAMBA K, CRAN DG. Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology. *J. Reprod. Fert.*,1985, **75** , 133-138.
5. BARONE R. . In :*Anatomie comparée des animaux domestiques*. tome 3, fascicule 2, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon: Laboratoire d'Anatomie, 1978, 128-259.
6. BEDFORD JM. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.*,1983, **28** , 108-120.
7. BOSSE P, CHAFFAUX S, KRETZ C. Eléments de maîtrise de la physiologie sexuelle chez le chat domestique en vue d'améliorer sa reproduction. *Rec. Méd. Vét.*,1990, **166** (6/7), 573-591.
8. BOWEN RA. Fertilization in vitro of feline ova by spermatozoa from the ductus deferens. *Biol. Reprod.*,1977, **17** , 144-147.
9. CAMPBELL RC, DOTT HM, GLOVER TD. Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J. Agr. Sci.*,1956, **48** (1), 1-8.
10. CHAFFAUX S. La pathologie de la reproduction féline. *Rec. Méd. Vét. spécial Chat*,1990, **166** (6/7), 699-709.
11. CHEMINEAU Ph: Pourquoi faire de l'insémination artificielle? *Production et conservation de la semence pour l'insémination artificielle*, INRA, Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly, 28 novembre 2000.
12. COT S: Examen du mâle. *Travaux Pratiques T1 Pro UMES*, ENVA, 2000-2001. Document non publié.
13. COURTENS JL, RETY JM: Modélisation des processus de congélation de la semence. *Production et conservation de la semence pour l'insémination artificielle*, INRA, Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly, 28 novembre 2000.

14. CROSS NL, MEIZEL S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.*,1989, **41** , 635-641.
15. DONOGHUE AM, JOHNSTON LA, GOODROWE KL, O'BRIEN SJ, WILDT DE. Influence of day of oestrus on egg viability and comparative efficiency of in vitro fertilization in domestic cats in natural or gonadotrophin-induced oestrus. *J. Reprod. Fert.*,1993, **98** , 85-90.
16. DONOGHUE AM, JOHNSTON LA, SEAL US, et al. Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.*,1992, **96** , 555-564.
17. DOOLEY MP, AUEN KL, BROWN GG. A dye exclusion assay for the determination of cat (*Felis Catus*) sperm viability. *Fert. Ster.*,1980, **33** , 226.
18. DOOLEY MP, MURASE K, PINEDA MH. An electroejaculator for the collection of semen from the domestic cat. *Theriogenology*,1983, **20** (3), 297-310.
19. DOOLEY MP, PINEDA MH. Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat. *Am. J. Vet. Res.*,1986, **47** (2), 286-292.
20. DOOLEY MP, PINEDA MH, HOPPER JG, HSU WH. Retrograde flow of semen caused by electroejaculation in the domestic cat. *Theriogenology*,1983, **20** (3), 297-310.
21. DOOLEY MP, PINEDA MH, HOPPER JG, HSU WH. Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of cats during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. *Am. J. Vet. Res.*,1991, **52** (5), 687-691.
22. FONTBONNE A. Infécondité du chien mâle. In :*Encyclopédie Vétérinaire. Pathologie de la reproduction*, 1900, Paris: Elsevier, 1999, 1-13.
23. FONTBONNE A, GARNIER F. Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce féline. *Point Vét.*,1998, **29** (195), 1107-1112.
24. GETTY R. *The anatomy of the domestic animals*. Philadelphia: W.B. SAUNDERS C., Firth Ed, 1975, 884 p.
25. GLEED R. Tranquilizers and Sedatives. In :*Principles and Practice of Veterinary Anesthesia.*, Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1987, 16-27.
26. GLOVER TE, WATSON PF. The effect of buffer osmolality on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa at 5°C. *Theriogenology*,1985, **24** (4), 449-456.
27. GOODROWE K, WALKER S, al. e. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. *An. Reprod. Sci.*,2000 Jul 2., **60-61** , 389-403.
28. GOODROWE KL. Feline reproduction and artificial breeding technologies. *An. Reprod. Sci.*,1992, **28** , 389-397.

29. GOODROWE KL, HAY M. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*,1993, **40** , 967-975.
30. GRAU H, WALTER P. *Précis d'histologie et d'anatomie microscopique des animaux domestiques*. Paris: Vigot Frères Editeurs, , 1975, 188 p.
31. HAMNER CE, JENNINGS LL, SOJKA NJ. Cat (Felis catus L.) spermatozoa require capacitation. *J. Reprod. Fert.*,1970, **23** , 477-480.
32. HARRIS RF, POPE CE, GOMEZ MC, LEIBO SP, DRESSER BL. Storage of domestic cat spermatozoa for extended periods at 4°C. *Theriogenology*,2001, **55** (1), 308.
33. HART BL, HART LA. *Canine and feline behavioural therapy*. Philadelphia: Lea et Febiger, , 1985, 275 p.
34. HAY MA, GOODROWE KL. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *J. Reprod. Fert. Suppl.*,1993, **47** , 297-305.
35. HERRON MA. Feline Physiology of Reproduction. In :*Small Animal Reproduction and Infertility*.: Burke, 1986, 205-207.
36. HERRON MA, BARTON CL, APPLGATE B. A modified technique for semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *Theriogenology*,1986, **26** (3), 357-364.
37. HINGST O, BLOTTNER S, FRANZ C. Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. *Andrologia*,1995, **27** , 275-279.
38. HOWARD JG, BUSH M, HALL LL, WILDT DE: Morphological abnormalities in spermatozoa of 28 species of non-domestic felids. *Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Urbana\_Champaigne, Abstract 57. 1984.
39. HOWARD JG, DONOGHUE AM, JOHNSTON LA, WILDT DE. Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats. *Biol. Reprod.*,1993, **49** , 131-139.
40. JEWGENOW K, BLOTTNER S, LENGWINAT T, MEYER HHD. New methods for gamete rescue from gonads of nondomestic felids. *J. Reprod. Fert.*,1997, **suppl. 51** , 33-39.
41. JOHNSTON SD, al. e. Testicular function in the tom. *An. Reprod. Sci.*,1996, **42** , 261-274.
42. JOHNSTONE I. Electroejaculation in the domestic cat. *Aust. Vet. J.*,1984, **61** (5), 155-158.

43. JOHNSTONE SD, OSBORNE CA, LIPOWITZ AJ: Characterization of seminal plasma, prostatic fluid, and bulbourethral gland secretions in the domestic cat. *Proceedings 11<sup>o</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.*, Dublin, Ireland, 1988.
44. LECOMTE C, CHAUX JJ. Statistiques chiens-chats-NAC. In :*Le guide pratique du vétérinaire Bourgelat*. Ile de France 99, Nanterre: Bourgelat, 1999, 122.
45. LEFRANCOIS T, TIRET L: Physiologie de l'appareil reproducteur. Mécanismes généraux. Particularités d'espèces. *Cours DCEV-1*, ENVA, 2000-2001. Document non publié.
46. LENGWINAT T, BLOTTNER S. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *An. Reprod. Sci.*,1994, **35** , 291-301.
47. LONG JA, WILDT DE, WOLFE BA, CRITSER JK, DEROSI RV, HOWARD J. Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. *Biol. Reprod.*,1996, **54** , 638-646.
48. MALANDAIN E: Maîtrise de la reproduction en espèce féline. *Cours TIPro UMES*, ENVA, novembre 2000. Document non publié.
49. MALANDAIN E: Pathologie de la reproduction en espèce féline. *Cours TIPro UMES*, ENVA, novembre 2000. Document non publié.
50. MALANDAIN E: Physiologie de la reproduction en espèce féline. *Cours TIPro UMES*, ENVA, novembre 2000. Document non publié.
51. MALANDAIN E, PETIT-ETIENNE G, FONTBONNE A. Insémination artificielle chez une chatte. *Vet Repro*,2000, **2** , 60-62.
52. MAXWELL WMC, STOJANOV T. Liquid storage of Ram Semen in the Absence or Presence of Some Antioxydants. *Reprod. Fertil. Dev.*,1996, **8** , 1013-1020.
53. NIWA K, OHARA K, HOSOI Y, IRITANI A. Early events of in-vitro fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*,1985, **74** , 657-660.
54. OLAR TT, BOWEN RA, PICKETT BW. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*,1989, **31** , 451-461.
55. OTT RS, GOFFAUX M, THIBIER M. Examen morphologique des spermatozoïdes. *Elevage Insém.*,1987, **221** , 15-20.
56. PARAGON P-M, MALANDAIN E, KRETZ C. *Guide pratique de l'élevage félin*. Paris: Royal Canin, , 2000, 296 p.
57. PIERARD J. *Anatomie appliquée du chien et du chat*. Paris: Maloine, 1<sup>o</sup> Ed, 1972, 228-230.

- 58.** PINEDA MH, DOOLEY MP. Effects of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of electroejaculates of the domestic cat. *Am. J. Vet. Res.*,1984, **45** (8), 1520-1525.
- 59.** PINEDA MH, DOOLEY MP, MARTIN PA. Long-term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. *Am. J. Vet. Res.*,1984, **45** (5), 1038-1041.
- 60.** PLATZ C, SEAGER S. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*,1978, **173** (10), 1353-5.
- 61.** PLATZ C, WILDT D, SEAGER S. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*,1978, **52** , 279-282.
- 62.** POPE C, YONG P, ZHANG Z, DRESSER M, DRESSER B. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *J. Zoo Wildlife Med.*,1991, **22** (1), 87-95.
- 63.** POPE CE, GELWICKS EJ, WACHS KB, KELLER GL, DRESSER BL. In vitro fertilization in the domestic cat (*Felis catus*): a comparison between freshly collected and cooled semen. *Theriogenology*,1989, **31** (1), 241.
- 64.** POPE CE, JOHNSON CA, McRAE MA, KELLER GL, DRESSER BL. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *An. Reprod. Sci.*,1998, **53** , 221-236.
- 65.** PUKAZHENTHI B, NOILES E, PELICAN K, DONOGHUE A, WILDT D, HOWARD J. Osmotics effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology*,2000, **40** (2), 139-150.
- 66.** PUKAZHENTHI B, PELICAN K, WILDT D, HOWARD J. Sensitivity of Domestic Cat (*Felis Catus*) Sperm from Normospermic versus Teratospermic Donors to Cold-Induced Acrosomal Damage. *Biol. Reprod.*,1999, **61** , 135-141.
- 67.** ROTH TL, HOWARD J, WILDT DE. Zona Pellucida Piercing Enhances Zona Penetration by Spermatozoa from Normospermic and Teratospermic Domestic Cats. *Journal of Andrology*,1994, **15** (2), 165-173.
- 68.** RUCKEBUSCH, PHANEUF, DUNLOP. Copulation and Fertilization. *In :Physiology of small and large Animals.*, Philadelphia Halmilton: B.C. Decker, Inc, 1991, 581-584.
- 69.** RUCKEBUSCH., PHANEUF., DUNLOP. The urinary collecting and voiding system. *In :Physiology of small and large animals.*, Philadelphia Hamilton: B.C. Decker, Inc, 1991, 184-188.

- 70.** SCHAFFER S, HOLZMANN A. The use of transmigration and Spermac<sup>TM</sup> stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *An. Reprod. Sci.*,2000, **59** , 201-211.
- 71.** SCHMEHL ML, GRAHAM EF. Ultrastructure of the domestic tom cat (*Felis catus*) and Tiger (*Panthera tigris altaica*) spermatozoa. *Theriogenology*,1989, **31** , 861-874.
- 72.** SEAGER SWJ. Semen collection, evaluation and artificial insemination of the domestic cat. In :*Current Veterinary Therapy VI.*, 1977, 1252-1254.
- 73.** SEEMANS JH, LANGWORTHY OR. Observations on the neurophysiology of sexual function in the male cat. *Journal of Urology*,1938, **40** , 836-846.
- 74.** SHORT C. Anticholinergics. In :*Principles and Practice of Veterinary Anesthesia.*, Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1987, 8-15.
- 75.** SHORT C. Dissociative Anesthesia. In :*Principles and Practices of Veterinary Anesthesia.*, Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1987, 158-169.
- 76.** SMITH FO. Examining male dogs and cats for breeding soundness. *Veterinary Medicine*,1989, **84** (6), 594-603.
- 77.** SOJKA N. Feline Semen Collection, Evaluation and Artificial Insemination. In :*Current Therapy in Theriogenology I.*, 1980, 848-850.
- 78.** SOJKA NJ. The male reproductive system. In :*Current therapy in theriogenology.*: Saunders, 1980, 844-845.
- 79.** SOJKA NJ, JENNINGS LL. Collection and utilization of cat semen for artificial insemination. *J.A.V.M.A.*,1970, **156** , 1250-1251.
- 80.** SOJKA NJ, JENNINGS LL, HAMNER CE. Artificial insemination in the cat (*Felis catus* L.). *Lab. An. Care*,1970, **20** (2), 198-204.
- 81.** SPINDLER RE, WILDT DE. Circannual Variations in Intraovarian Oocyte but Not Epididymal Sperm Quality in the Domestic Cat. *Biol. Reprod.*,1999, **61** , 188-194.
- 82.** STACHECKI JJ, DRESSER BL, POPE CE, ARMANT DR. Stimulation of ejaculated domestic cat sperm motility with caffeine, pentoxifylline, and 2'-deoxyadenosine. *Archives of Andrology*,1995, **34** , 63-68.
- 83.** STACHECKI JJ, GINSBURG KA, ARMANT DR. Stimulation of Cryopreserved Epididymal Spermatozoa of the Domestic Cat Using the Motility Stimulants Caffeine, Pentoxifylline, and 2'-Deoxyadenosine. *J. Androl.*,1994, **15** (2), 157-164.
- 84.** STACHECKI JJ, GINSBURG KA, LEACH RE, ARMANT DR. Computer-assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. *Journal of Andrology*,1993, **14** (1), 60--65.

- 85.** TANAKA A, TAKAGI Y. Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats. *J. Vet. Med. Sci.*,2000, **62** (11), 1163-7.
- 86.** TRAMER F, ROCCO F, MICALI F, SANDRI G, PANFILI E. Antioxydant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.*,1998, **59** (4), 753-758.
- 87.** TSUTSUI T, TANAKA A. Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *J. Vet. Med. Sci.*,2000, **62** (12), 1247-1251.
- 88.** VOITH VL. Male reproductive behavior. In :*Current therapy in theriogenology.*: Saunders, 1980, 845-848.
- 89.** ZAMBELLI D, CANEPPELE B, CASTAGNETTI C, BELLUZZI S: Freezing used for long term preservation of cat semen. *EVSSAR Symposium*, Milano, 1 mars 2001.

# RECOLTE DE LA SEMENCE DE CHAT (*Felis catus*) PAR ELECTROEJACULATION ET PAR DISSECTION DE L'EPIDIDYME.

## *Comparaison des méthodes Essai de cryoconservation avec un dilueur canin*

---

**POSIERE STEPHANIE, CYRIANE**

### **RESUME :**

Dans l'élevage félin, la carrière des étalons est souvent courte à cause des désagréments que procure un mâle non castré (comportement, odeur). La récolte de leur semence puis sa cryoconservation permettrait d'optimiser le potentiel génétique des meilleurs étalons.

Nous avons récolté la semence de 8 mâles âgés de plus d'un an par électroéjaculation et de 15 jeunes mâles âgés de moins d'un an par dissection de l'épididyme. Nous avons alors conservé les semences obtenues dans l'azote liquide en utilisant la méthode utilisée chez le chien en réalisant des spermogrammes avant et après cryoconservation.

Le sperme récolté par électroéjaculation contenait en moyenne 31 millions de spermatozoïdes avec une mobilité moyenne de 58%, 42% d'anomalies et 81% d'acrosomes intacts. Le sperme récolté par dissection de l'épididyme contenait en moyenne 10 millions de spermatozoïdes avec une mobilité moyenne de 67%, 48% d'anomalies et 84% d'acrosomes intacts. Après la cryoconservation, la mobilité moyenne a chuté à 19% pour les deux types de prélèvements et le pourcentage d'acrosomes intacts a chuté à 42% pour le sperme que nous avons récolté par électroéjaculation et à 44% pour le sperme épидидymaire.

Les méthodes de prélèvements se sont révélées efficaces en vue d'insémination en semence fraîche. La méthode que nous avons utilisée pour la cryoconservation est par contre inadaptée pour le Chat. Cet échec peut s'expliquer par la plus faible concentration et le plus grand nombre de spermatozoïdes anormaux chez le Chat que chez le Chien.

L'emploi d'un dilueur adapté, avec antioxydants et stimulants de la mobilité, d'une dilution adéquate et d'une descente en température spécifique permettrons à l'avenir de cryoconserver la semence de Chat.

**MOTS-CLES :** Sperme épидидymaire, Chat, Electroéjaculation, Cryoconservation

### **JURY :**

Président : Pr

Directeur : Dr Fontbonne

Assesseur : Pr Mouthon

Posière Cyriane,  
1 rue de Barenton sur Serre  
02270 Chalandry

**COLLECTION OF CAT (*Felis catus*) SEMEN BY  
ELECTROEJACULATION and BY EPIDIDYMAL DISSECTION.  
*Comparison of the two methods  
Cryoconservation essay with a diluent for dog***

---

**NAME :** POSIERE Stéphanie, Cyriane

**SUMMARY :**

In feline breeding, male carrier is often short because of the unpleasantness he procures (behavior, odour). The previous collection by electroejaculation or by epididymal dissection then semen preservation could optimised the genetic potential of best mâles.

We collected 8 males of more than one year old by electroejaculation and 15 males of less than one year old by epididymal dissection. We stored semen we obtained in liquid azote by the method used with dogs semen and we realized spermogram before and after cryopreservation.

Semen collected by electroejaculation contained an average of 31 millions of spermatozoa with an average of 58% of motility, 42% of morphologic abnormalities and 84% of non endommaged acrosomes. Semen collected by epididymal dissection contained an average of 10 millions of spermatozoa with an average of 67% of motility, 48% of morphologic abnormalities and 84% of non endommaged acrosomes. After cryopreservation, motility fall down 19% for the two kind of collection and the pourcentage of non endommaged acrosomes fall down 42% for the semen collected by electroejaculation and down 44% for the epididymal semen.

The two kind of collection were efficients to inseminate in fresh semen. But, the dog cryopreservation method is unadapted to cat semen. It could be explained by the less concentration and the higher number of abnormal forms in Cat than in Dog semen.

The use of a specific diluent, with antioxydants and motility stimulants, of a specific dilution and of a specific cooled rate will permit in future to cryopreserved Cat semen.

**KEY WORDS :** Epididymal sperm, Cat, Electroejaculation, Cryopreservation

**JURY :**

President :

Director : Dr. Fontbonne

Assessor : Pr Mouthon

**Author's address :**

Posière Cyriane

1, rue de Barenton sur Serre

02270 Chalandry