

LA REPRODUCTION DU GUEPARD ET DU LION

Introduction

Première Partie :

Le Guépard (*Acinonyx jubatus*) et Le Lion (*Panthera leo*) :
Deux espèces en danger

1. Taxinomie.....	p9
2. Caractéristiques générales.....	p10
2.1 Le Guépard (<i>A. jubatus</i>).....	p10
2.1.1 Morphologie.....	p10
2.1.1.1 Le guépard commun.....	p10
2.1.1.2 Le guépard royal.....	p10
2.1.2 Habitat.....	p12
2.1.3 Organisation sociale.....	p12
2.2 Le Lion (<i>P. leo</i>).....	p13
1.2.1 Morphologie.....	p13
1.2.2 Habitat.....	p16
1.2.3 Organisation sociale.....	p16
3. Répartition géographique et Statut.....	p18
3.1 Le guépard.....	p18
3.1.1 Historique, répartition géographique et effectifs.....	p18
3.1.2 Statut.....	p20
3.2 Le lion.....	p21
3.2.1 Historique, répartition géographique et effectifs.....	p21
3.2.2 Statut.....	p23

Deuxième Partie :

La Physiologie Sexuelle du Guépard et du Lion.

1. Les femelles.....	p25
1.1 Anatomie de l'appareil génital femelle.....	p25
1.1.1 La femelle guépard.....	p25
1.1.2 La lionne.....	p26
1.2 Puberté et maturité sexuelle.....	p27
1.2.1 La femelle guépard.....	p27
1.2.1 La lionne.....	p27
1.3 Saisonnalité de la reproduction.....	p27
1.4 Cycle oestral.....	p28
1.4.1 La phase folliculaire.....	p28
1.4.2 L'ovulation.....	p28
1.4.3 La phase lutéale.....	p29
1.5 Détection de l'œstrus et de l'ovulation.....	p30
1.5.1 Les observations comportementales.....	p30
1.5.2 La cytologie vaginale.....	p31
1.5.3 Le dosage hormonal.....	p34
1.5.3.1 Dans le sang.....	p34
1.5.3.2 Dans les fécès et l'urine.....	p34
1.5.4 La laparotomie.....	p36
1.5.5 L'échographie.....	p38
1.6 Accouplement.....	p38
1.7 Gestation, mise-bas et élevage des jeunes.....	p40
1.7.1 La gestation.....	p40
1.7.2 La mise bas.....	p40
1.7.3 L'élevage des jeunes.....	p40

2. Les mâles.....	p43
2.1 Anatomie de l'appareil reproducteur mâle.....	p43
2.2 Spermatogenèse.....	p44
2.3 Puberté et maturité sexuelle.....	p44
2.3.1 Le guépard.....	p44
2.3.2 Le lion.....	p45
2.4 Succès reproducteur.....	p45
2.5 Evaluation de la fertilité.....	p47
2.5.1 L'examen externe des organes reproducteurs.....	p47
2.5.2 Les caractéristiques de l'éjaculat.....	p47
2.5.2.1 Techniques de récolte.....	p47
2.5.2.1.1 La collection post-mortem.....	p47
2.5.2.1.2 Le massage rectal des glandes accessoires.....	p47
2.5.2.1.3 La récolte de semence après le coït.....	p47
2.5.2.1.4 L'électroéjaculation.....	p48
2.5.2.2 Analyse de la semence.....	p51
2.5.2.1.5 Analyse descriptive.....	p51
2.5.2.1.6 Analyse de la fonction spermatique.....	p55
2.5.3 Biopsie.....	p57
2.6 La recherche des cause de tératospermie chez les félinés sauvages.....	p59
2.6.1 Le stress.....	p59
2.6.2 L'origine génétique.....	p59
2.5.2.1.1 Les lions.....	p59
2.5.2.1.2 Les guépards.....	p60
2.6.3 L'origine hormonale.....	p60

Troisième Partie :

Reproduction Assistée

1. Programmes de reproduction en captivité.....p64

1.1 Le guépard.....	p64
1.1.1 La nourriture.....	p64
1.1.2 L'état sanitaire.....	p65
1.1.3 La gestion de la reproduction.....	p65
1.1.3.1 Surveillance du poids.....	p65
1.1.3.2 Choix des reproducteurs.....	p65
1.1.3.3 Mise en contact.....	p66
1.1.4 L'évaluation de la qualité de l'environnement.....	p67
1.2 Le lion.....	p67

2. Reproduction assistée au sens strict.....p68

2.1 L'insémination artificielle.....	p68
2.1.1 L'induction de l'ovulation.....	p68
2.1.1.1 Protocoles utilisés chez le guépard.....	p68
2.1.1.2 Protocoles utilisés chez le lion.....	p69
2.1.2 L'importance du lieu et du temps d'insémination.....	p70
2.1.3 Les différents types d'utilisation de la semence.....	p71
2.1.3.1 Utilisation en semence fraîche.....	p71
2.1.3.2. Utilisation en semence réfrigérée.....	p72
2.1.3.3 Utilisation en semence congelée.....	p73
2.1.4. Les techniques d'insémination.....	p76
2.1.4.1 Insémination intracervicale.....	p76
2.1.4.2 Insémination intrautérine.....	p77

2.2 La fécondation <i>in vitro</i>	p79
2.2.1 La récolte des gamètes.....	p79
2.2.1.1 Récolte de follicules pré-antraux.....	p80
2.2.1.2 Récolte d'ovocytes.....	p81
2.2.2 La maturation ovocytaire.....	p82
2.2.3 La capacitation des spermatozoïdes.....	p83
2.2.4 La fécondation <i>in vitro</i> (ss).....	p83
2.2.5 La culture des embryons.....	p84
2.2.6 Les résultats chez le guépard et le lion.....	p85
2.3 Le transfert d'embryons.....	p85
2.4 La congélation d'embryons.....	p86
2.5 Les nouvelles technologies.....	p87
Discussion sur les techniques évoquées.....	p88
Conclusion.....	p89
Bibliographie.....	p90
Annexes.....	p100

Table des illustrations

Figure 1 :	Place du guépard et du lion dans la classification.....	p9
Figure 2 :	Guépard adulte et jeune.....	p11
Figure 3 :	Guépard royal.....	p11
Figure 4 :	Lion africain.....	p13
Figure 5 :	Lionne et jeune.....	p13
Figure 6 :	Lion au pelage blanc.....	p14
Figure 7 :	Lion asiatique.....	p15
Figure 8 :	Distribution actuelle du guépard en Afrique sub-saharienne.....	p18
Figure 9 :	Distribution actuelle du guépard en Afrique du Nord et en Asie du Sud.....	p19
Figure 10 :	Distribution actuelle du lion en Afrique du Nord et en Asie du Sud.....	p21
Figure 11 :	Distribution actuelle du lion en Afrique sub-saharienne.....	p22
Figure 12 :	Appareil génital de la chatte.....	p25
Figure 13 :	Dessin de l'appareil génital de la lionne.....	p26
Figure 14 :	Cycle oestral de la femelle guépard (en jours).....	p29
Figure 15 :	Cycle oestral de la lionne (en jours).....	p29
Figure 16 :	Cycle avec gestation de la femelle guépard (en jours).....	p29
Figure 17 :	Cycle avec gestation de la lionne (en jours).....	p29
Figure 18 :	Cycle avec pseudogestation de la femelle guépard (en jours).....	p30
Figure 19 :	Cycle avec pseudogestation de la lionne (en jours).....	p30
Figure 20 :	Principales cellules reconnaissables sur les frottis vaginaux.....	p32
Figure 21 :	Profil cytologique de gestation chez des femelles guépard.....	p33
Figure 22 :	Profil hormonaux (œstrogène et progestérone) chez des femelles guépard.....	p35
Figure 23 :	Ovaire de femelle guépard observée par laparoscopie présentant 4 follicules après traitement FSH.....	p37
Figure 24 :	Ovaire de femelle guépard observé par laparoscopie présentant des corps lutéaux après stimulation hormonale.....	p37
Figure 25 :	Ovaire de femelle guépard observé par laparoscopie présentant 3 corps hémorragiques après injection d'hCG.....	p37
Figure 26 :	Illustration du déroulement de l'accouplement chez les lions.....	p39
Figure 27 :	Appareil génital du chat mâle.....	p43
Figure 28 :	Photomicrographie de testicules de lions du cratère de Ngorongoro et des plaines du Serengeti.....	p44
Figure 29 :	Photo du matériel d'électroéjaculation.....	p53
Figure 30 :	Morphologie normale d'un spermatozoïde.....	p54
Figure 31 :	Diverses anomalies morphologiques rencontrées chez les spermatozoïdes de guépards.....	p56
Figure 32 :	Ovule de chatte domestique conservée par le chlorure de sodium et co-incubée avec des spermatozoïdes de guépard.....	p58
Figure 33 :	La technique d'insémination artificielle intrautérine par laparoscopie.....	p78
Figure 34 :	Pénétration conspécifique d'ovocytes par des spermatozoïdes de guépard.....	p84
Tableau 1 :	Récapitulatif des protocoles d'induction de l'ovulation chez le guépard.....	p68
Tableau 2 :	Récapitulatif des protocoles d'induction de l'ovulation chez le lion.....	p70

Introduction

Le lion (*Panthera leo*) et le guépard (*Acinonyx jubatus*) sont deux espèces de félinés sauvages dont le déclin est réel. Classés « vulnérable » pour le guépard et « menacé d'extinction » pour le lion d'Asie par l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature et de ses ressources), la situation est réellement préoccupante.

C'est pourquoi la nécessité d'apporter une aide à la reproduction de ces deux espèces est aujourd'hui indéniable.

C'est dans cette optique que l'association CRESAM (Centre de Reproduction des Espèces Sauvages Africaines Menacées) s'est constituée.

Celle-ci a comme projet d'évaluer l'intérêt du développement sur le terrain de techniques de reproduction assistée (insémination artificielle) et la réintroduction de ces espèces dans quelques réserves notamment d'Afrique du Sud desquelles ils ont disparu et la réintroduction possible de ces animaux dans leur milieu naturel.

L'objectif de cet ouvrage est alors d'apporter un support bibliographique à cette entreprise en faisant le point sur les connaissances dont nous disposons à l'heure actuelle sur la reproduction de ces deux espèces ainsi que sur les stratégies d'aide à la reproduction utilisées jusqu'à présent et celles envisageables dans un futur proche.

Nous allons alors étudier dans cet ouvrage dans un premier temps les raisons qui font que le guépard et le lion sont considérés comme des espèces en danger, puis nous nous intéresserons à la physiologie sexuelle de ces deux espèces et enfin nous verrons les différentes techniques de reproduction assistée utilisables dans le but de leur sauvegarde.

Première Partie :

**Le guépard (*Acinonyx jubatus*) et le lion (*Panthera leo*) :
2 espèces en danger.**

1. Taxinomie

Le guépard et le lion font tous les 2 partie de la grande famille des félidés (36 espèces).

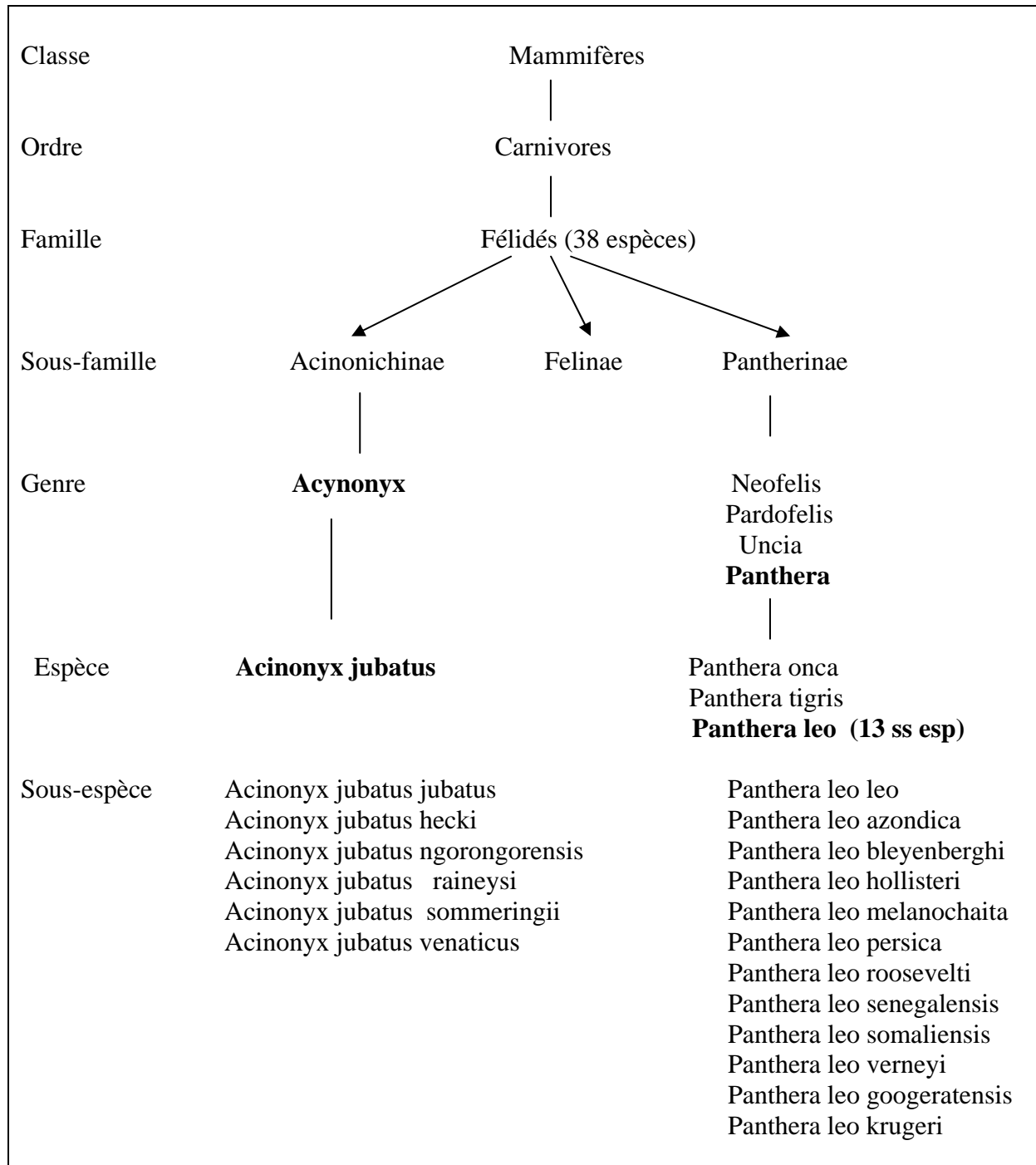


Figure 1 : Place du guépard et du lion dans la classification. D'après [137].

Selon la plupart des auteurs 5 à 7 sous-espèces de guépard sont reconnues et définies selon leur distribution d'origine (Afrique du sud, de l'est, Kenya, Nigeria, Asie). Mais cette diversité est de nos jours fréquemment remise en question car le guépards semblent être étonnamment semblables génétiquement. Les différentes sous-espèces de lion ne subissent pas la même controverse, même si certaines ont probablement disparu. Nous nous attarderont pour cette espèce sur deux sous-espèces représentatives : le lion d'Afrique (*Panthera leo leo*) et le lion d'Asie (*Panthera leo persica*).

2. Caractéristiques générales

2.1 Le guépard

2.1.1 Morphologie

2.1.1.1 Le guépard commun

Une des caractéristiques typiques du guépard est l'adaptation de sa constitution à la course : ses membres sont longs et fins, son corps élancé (79 cm de haut et 110 à 160 cm de long en moyenne), sa queue longue et fine (65-90 cm) utilisée comme balancier pendant la course [86;138].

Ses griffes non rétractiles, ses pieds larges dont la sole est recouverte de coussinets rugueux et écailleux lui permettent de mieux agripper le sol pendant sa course.

De plus sa colonne vertébrale et ses articulations flexibles lui procurent une grande habileté au saut (environ 6 mètres en un seul bond) ainsi qu'aux virages serrés pour chasser ses proies ou esquiver ses prédateurs [143].

Ces caractéristiques en font probablement l'animal le plus rapide (environ 90 km/h) en vitesse de pointe. [86].

Néanmoins il ne peut courir à cette vitesse que sur environ 400m avant que la température de son corps n'augmente trop (peut monter jusqu'à 41°C, température fatale) et que ses muscles ne se fatiguent et produisent de l'acide lactique [145].

Les guépards ont un pelage jaune pâle couvert de petites taches noires circulaires (*Figure 2*). Ils se distinguent des autres espèces tachetées par leur « tear lines » qui sont d'épaisses lignes noires progressant du coin intérieur de l'œil au coin extérieur de la bouche [86]. Quelques guépards noirs ou albinos ont été observés [86].

2.1.1.2 Le guépard royal

On peut également noter le cas particulier du guépard royal qui présente un patron de pelage différent du guépard habituel : il est plus large que les autres, porte trois longues raies noires le long de son dos et présente des taches particulières moins circulaires et formant un motif de pelage particulier (*Figure 3*).

Découvert en 1926, il fut d'abord doté d'un nom propre, *Acinonyx rex* puisque déterminé comme étant une nouvelle espèce. Il a été également suggéré qu'il soit un hybride léopard/guépard. Puis dans les années 80, l'obtention d'un guépard royal issu de deux guépards « normaux » au centre DeWildt [143] a montré qu'il était le résultat d'une mutation génétique. Cette disposition particulière serait due à un allèle récessif du gène « tigré », déjà connu chez le chat [18 ;145].

Cette mutation est, pour certains un espoir de regain de diversité génétique dans cette espèce uniforme [86].



Figure 2 : Guépard adulte et jeune.[147].

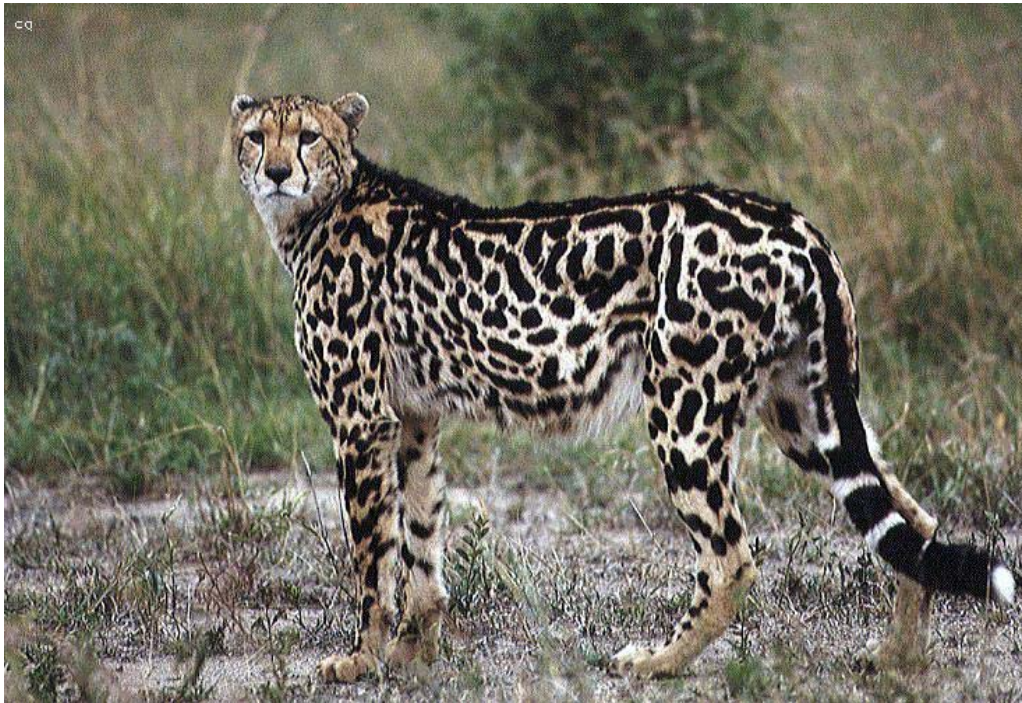


Figure 3 : guépard royal [143]

2.1.2 Habitat

Les guépards choisissent en priorité les régions les plus sèches d'Afrique sub-saharienne, ils sont habitués à vivre dans un environnement aride et peuvent faire plus de 80 km pour trouver une source d'eau. On les retrouve rarement dans les habitats forestiers [86].

Ils affectionnent plus particulièrement les plaines ouvertes [109] et utilisent intensivement la brousse, les buissons, la broussaille et les régions boisées ouvertes. Leur habitat se constitue alors d'une mosaïque de régions boisées et de prairies comme la région du Serengeti [18]. Leur préférence pour les prairies les rapproche des fermes ce qui favorise les problèmes de cohabitation avec l'homme.

2.1.3 Organisation sociale

Le guépard est un animal solitaire et diurne par nature mais reste néanmoins plus social que la plupart des autres espèces de félidés excepté le lion [86]. Le fait d'être diurne évite le contact avec ses ennemis et rivaux principaux : les lions et les hyènes [18].

Il existe une grande variabilité dans la composition sociale des guépards : chez les adultes non accompagnés par des jeunes, 27% sont solitaires, 34 % appartiennent à un groupe de 2, 19% à un groupe de 3 et 20% à un groupe de 4 à 12 [18].

Bien souvent on considère que la femelle sans jeune vit seule et que les mâles vivent en coalition de 2 à 5 membres ou seuls.

Les femelles et les mâles d'une même portée ont tendance à rester ensemble environ 6 mois après l'indépendance qui a lieu entre 13 et 20 mois [86].

Les femelles se séparent des mâles à la maturité sexuelle soit entre 17 et 27 mois [18 ;85 ;141].

Les mâles restent en coalition pour défendre leur territoire. Ils peuvent également s'associer à des mâles non apparentés pour former des trios dans environ 15% des cas dans le Serengeti [16].

Les mâles en coalition ont un avantage certain sur leur territoire et un accès facilité aux femelles par rapport aux nomades non territoriaux [16].

Parfois des groupes de 14 à 19 animaux (dont les jeunes) sont observés en Afrique de l'est et Afrique du Sud.

2.2 Le lion

2.2.1 Morphologie

Le lion est un animal de stature imposante. Les mâles adultes pèsent en moyenne 190 kg et mesurent 1,20 m de haut et environ 3 m de long, les femelles adultes pèsent en moyenne 125 kg et mesurent 1,10 m de haut, les subadultes (2 à 4 ans) pèsent entre 100 et 150 kg et les plus jeunes (environ 2 ans) 60 à 80 kg [86]..

Le dimorphisme sexuel est plus important chez le lion que chez les autres espèces de félidés : la femelle est plus fine et pèse 20 à 50% de moins que le mâle[23], ce qui la rend plus apte à la chasse. De plus le mâle est le seul à disposer d'une crinière et d'une queue touffue. La crinière commence à pousser vers 2 ans. Elle est maximale en taille à l'âge de 5-6 ans et peut mesurer jusqu'à 24 cm mais seuls quelques individus disposent d'une crinière très imposante [23].



Figure 4 : Lion africain [147]



Figure 5 : lionne avec un jeune [147]

Il semble que la crinière ait avant tout un rôle de protection pendant les combats intraspécifiques mais aussi de reconnaissance entre congénères car repérable à distance et un indicateur de la forme physique de l'individu[109].

Ce caractère est probablement lié au système social atypique du lion et son développement influencé par la testostérone[23].

Le pelage du lion est souvent de couleur sable ou fauve mais il peut varier de perle à noire et est rarement complètement uniforme.

On peut noter l'existence d'un pelage blanc inhabituel (*figure 6*) avec les yeux et la peau pigmentée (différent de l'albinisme) observé seulement dans le parc national Kruger et dans la réserve Umfolozi Game en Afrique du Sud [86].



Figure 6 : Lion au pelage blanc [144]

D'autre part, la stature du lion est adaptée à son style de vie de prédateur : la tête est grosse, presque rectangulaire, terminée par un museau large et arrondi ; les mâchoires sont puissantes, les canines longues et pointues.

Les pattes massives et puissantes, les griffes rétractiles lui permettent de maintenir les proies et l'escalade des arbres, surtout pour les femelles et les lionceaux les plus légers.

Les coussinets sont lisses et doux ce qui lui permet d'approcher ses proies sans être entendu mais le rend également vulnérables aux épines [23].

La queue se termine par un toupet de poils noirs et fournis ce qui limite l'invasion des mouches et augmente l'expression de colère.

Le lion asiatique (*figure 7*) se différencie légèrement du lion africain sur plusieurs aspects : il présente un plis de peau tout le long du ventre, il est un peu plus petit (le mâle pèse de 160 à 190 kg), la crinière est de taille plus modérée sur le haut de la tête, les oreilles sont bien visibles. Elle est aussi fréquemment de couleur brune[86].



Figure 7 : lion asiatique [147]

2.2.2 Habitat

Le lion a une grande préférence pour les savanes ouvertes mais on le trouve aussi dans des zones semi-arides et à plus de 500 m d'altitude. Ses seuls impératifs sont que l'eau soit disponible et qu'il trouve des abris adéquats pour qu'il puisse de se protéger de l'insolation et mettre ses jeunes à l'abri.

De plus on le trouve souvent où la chasse est facile c'est dire où le nombre d'herbivores est important donc où il y a de la végétation.

Les plaines du Serengeti en Tanzanie reflètent ce type de milieu avec des plaines et de collines au sommet garnis de pierres et de rochers, des arbres clairsemés, des buissons et des acacias épineux. L'altitude oscille entre 1500 et 2000 m, la température y est modérée.

Les plaines du Serengeti sont l'exemple type de l'habitat optimal du lion : savane ouverte, épais buisson, brousse, herbes multiples [110].

On peut néanmoins rencontrer les lions dans des milieux différents comme le cratère du Ngorongoro qui, situé au Nord de la Tanzanie sur les bords du volcan éteint, est constitué d'une forêt dense au nord, au sud et à l'est et d'une zone aride à l'ouest. Il apporte une combinaison de terre riche, des chutes de pluie importantes et les inondations de la saison des pluies maintient une abondance d'herbivores non migratoires [44].

2.2.3 Organisation sociale

L'unité sociale du lion est la troupe, constituée d'un noyau de 4 à 12 femelles en âge de reproduire, de 1 à 7 mâles et de lionceaux de tous âges.

Tous les membres d'une même troupe se rencontrent souvent mais évoluent la plupart du temps en petits groupes [7 ; 23 ; 63 ; 86 ; 109].

Les territoires s'étendent environ de 15 à 500 km, la taille dépendant du type d'habitat, de la présence d'eau, de l'abondance des proies. Ils peuvent être stables sur des décennies mais les limites ne sont pas bien définies, plusieurs territoires peuvent se chevaucher [7 ; 63 ; 23].

Les femelles forment le noyau dur de la troupe, elles sont apparentées entre elles et de toutes classes d'âge.

A l'âge 3 ans les femelle sont soit recrutées soit exclues de la troupe. Elles ont plus de chance d'être acceptée lorsque la troupe comporte peu de femelles adultes [23 ; 63].

Si elles sont exclues elles deviennent nomades et elles ne se reproduisent pas aussi bien que les femelles sédentaires, ont des portées plus petites et ne vivent pas aussi longtemps [109].

Une femelle étrangère à la troupe ne peut pas intégrer de nouvelle troupe, en revanche une femelle initialement exclue peut réintégrer sa troupe natale quand le nombre de femelle a diminué ou que de nouveaux mâles viennent de s'installer[23].

Il n'y a pas de hiérarchie entre les femelles d'une même troupe[96], celles-ci dispensent beaucoup de marques d'affection (salut, toilette) et font preuve d'une forte coopération dans l'élevage des jeunes [23].

A part l'éducation des jeunes leur rôle est essentiellement la chasse car elles sont plus agiles et plus rapides que les mâles : les mâles échouent dans 96% de leur chasse [86] et ne chassent que quand il ne peuvent pas faire autrement [32 ; 63].

Les lionnes résidentes défendent leur territoires de chasse, leurs sites de mise-bas et les trous d'eau contre les femelles des alentours. Certaines ont alors plus un rôle de protection des jeunes, d'autres de chasseresse.

Les proies principales des lions en Afrique du Sud, de l'Est et Centrale sont les buffles, les zèbres et toute la majeure partie des grands ongulés [86].

Les mâles quittent la troupe à 3 ans, tous ensemble, volontairement ou chassés. Ils restent ensemble 2 ans en moyenne et trouvent ensuite une troupe de laquelle ils peuvent prendre le pouvoir à l'âge de 5-6 ans, soit parce qu'ils sont plus jeunes et forts que les mâles résidents et la troupe est alors le lieu de violents affrontements, soit parce que les mâles précédents sont déjà décédés et la place est libre. Ils reviennent rarement dans leur troupe d'origine et sont donc rarement apparentés aux femelles.

Les mâles forment en général des coalitions pour prendre le pouvoir d'une troupe : 42 % des coalitions comprennent au moins un membre non apparenté : c'est le cas de 2/3 des paires et de 50% des trios [7 ; 109]. Ce phénomène est plus rare pour les coalition de plus de 4 individus qui sont souvent issus de la même troupe, mais pas forcément de la même mère [94].

Les grandes coalitions ont de nombreux avantages par rapport aux petites : prise de pouvoir plus efficace, tenue de la troupe plus longue (en moyenne 2,5 ans), meilleure reproduction [38].

Leur rôle essentiel est la tenue et la protection de la troupe. Ils revendiquent leur statut de propriétaires par le rugissement (marquage sonore) que les différents membres de la troupe reconnaissent [39 ; 78].

Ces rugissements ainsi que des marquages odorants sont utilisés pour réduire le nombre d'affrontements : bien souvent cela suffit et l'intrus passe son chemin.

Aussi bien entre les mâles qu'entre les femelles d'une même troupe la coopération nécessaire entre lions reflète la complexité de la structure sociale de cette espèce [47 ; 111].

Dans les troupes de lions asiatiques, les troupes sont plus petites, formées de 2 à 5 femelles. Bien souvent les mâles ne s'associent avec la troupe de femelles que lors des accouplements, le degré de sociabilité est moindre. Celui-ci dépendrait de la disponibilité des proies [86].

<p>Le lion et le guépard semblent donc être deux espèces de félidés parfaitement adaptées à leur environnement et avec une organisation sociale bien définie.</p> <p>Néanmoins leurs répartitions géographique et numéraire sont la preuve d'une menace certaine pour leur survie.</p>
--

3. Répartition géographique et statut

3.1 Le guépard

3.1.1 Historique, répartition géographique et effectifs

Il y a plus de 5000 ans déjà de l'Afrique du Nord au sud-est de l'Asie et même en Europe les guépards étaient capturés et entraînés à la chasse par les Sumériens [86]. Ils furent également utilisés pour la chasse par les égyptiens et les Minoens .

En Inde, l'empereur mongol, Akbar était réputé pour garder captifs environ 1000 guépards pour la chasse [117].

Puis ils ont toujours été utilisés à cet effet, que ce soit par les princes russes aux X^{ème} et XII^{ème} siècles, pendant la renaissance en Italie ou en France à l'initiative de Louis XI au XV^{ème} siècle.

Les guépards étaient alors largement distribués dans toute l'Afrique et le Moyen-Orient du Tadjikistan au nord à l'Inde au sud-est.

Ils étaient encore largement présents en Inde au XVIII^{ème} siècle mais leur utilisation intensive pour la chasse et d'ores et déjà leur manque de reproduction en captivité, ont fait qu'ils sont devenus plus rares au XIX^{ème} siècle et sont déclarés éteints en Inde en 1952.

Dans les années 70, ils sont évalués à environ 200 individus restant dans les zones arides du Turkménistan, au nord/est de l'Afghanistan et à l'est de l'Iran.

L'évolution mondiale est caractéristique de ce déclin annoncé : en 1800, leur population est estimée à environ 100000 individus, elle n'est plus que de 25000 en 1984 [86], puis de 9000 à 12000 en 1991 [76 ; 86] et est finalement estimée à 12500 en 2001 [138].

Aujourd'hui ils sont considérés comme quasiment éteints sauf en Afrique, avec une relique d'individus survivant sur le continent asiatique [146].

Les 2 plus grandes populations à l'heure actuelle se situent d'une part à l'est de l'Afrique, au Kenya et en Tanzanie et d'autre part au sud de l'Afrique, en Namibie, au Botswana, au Zimbabwe et en Zambie [117] (Figure 8). En Namibie sa population a été évaluée à 2500 individus [64], à environ 1000 en Tanzanie [42], à 9000 au maximum au Kenya [40].

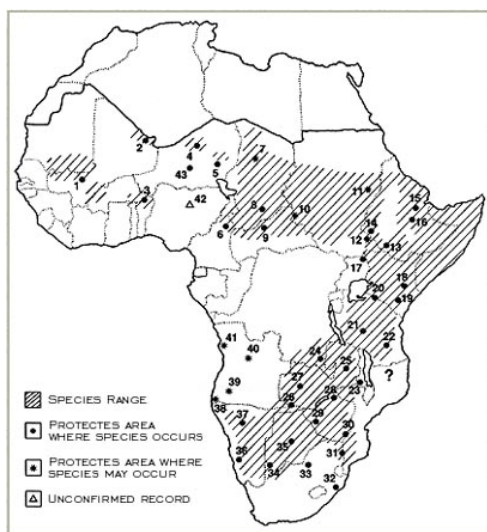



Figure 8 :
Distribution actuelle du guépard en Afrique sub-saharienne.

D'après Nowell et Jackson [86]

Légende :

-  Habitat naturel
- Aires protégées où on trouve des guépards
- * Aires protégées les guépards peuvent être observés.
- △ Enregistrement non confirmé

De petites populations survivent toujours dans le sud de l'Algérie et le nord du Niger mais de façon extrêmement fragmentée [40] et elle se résume à moins de 60 individus en Iran [110] (figure 9) , moins de 500 en Afrique du Sud [75] et de 40 à 295 en Uganda [41].

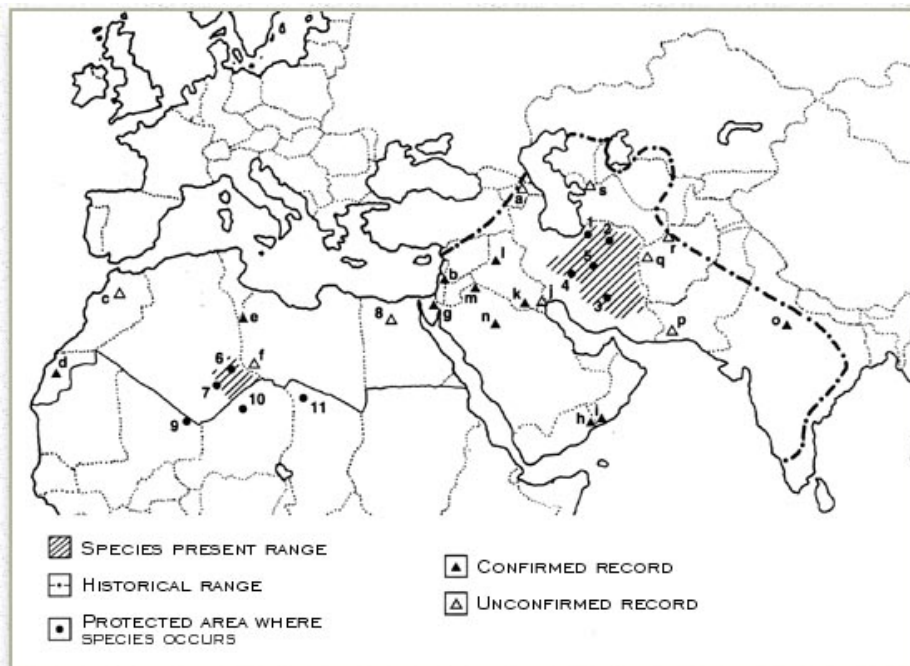


Figure 9 : Distribution actuelle du guépard en Afrique du Nord et en Asie du Sud
D'après Nowell et Jackson [86]

Légende :



Habitat naturel



Aires protégée où on trouve des guépards



Aires protégées les guépards peuvent être observés.



Enregistrement non confirmé

Ils peuvent être considérés comme éteints en Afghanistan, en Algérie, en Iraq, en Libye, au Maroc et au Sénégal.

La densité dans tous ces territoires est difficile à évaluer de part l'organisation sociale particulière et instable du guépard. Il semble que la densité idéale pour le guépard soit d'environ 1 sur 100-125 km² [101].

Le déclin de la population du guépard est donc bien une réalité aujourd'hui et ce malgré la présence de nombreuses aires protégées en Afrique. En effet il se trouve que le guépard évolue davantage dans les aires non protégées que dans les réserves dans lesquelles se trouvent ses principaux prédateurs, à savoir les lions et les hyènes. Ce phénomène le confronte alors au problème de l'expansion humaine et de la destruction de son habitat et à ses rapports conflictuels avec les fermiers alentours.

3.1.2 Statut

Le guépard est une des nombreuses espèces inscrites à la liste rouge de l' UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature et des ses ressources)[148].

Les objectifs de cette liste sont d'identifier les espèces qui ont le plus besoin de surveillance pour leur conservation et de déterminer un index global du statut de dégradation de la biodiversité.

Pour atteindre ce but le programme de liste rouge a pour objectifs d'évaluer à long terme le statut des espèces sélectionnées, d'établir une ligne de base pour mesurer le statut des espèces, de fournir un contexte global pour l'établissement des priorités de conservation à une échelle locale et de mesurer le statut d'une sélection d'espèces représentatives (comme des indicateur de biodiversité) qui couvrent la majeure partie des écosystèmes du monde.

Les différentes catégories sont exposées en annexe 1.

Dans ce cadre, le guépard est classé comme « Vulnérable critère C2a(i) » c'est à dire que la population est estimée à moins de 10000 individus matures et présentant un déclin continu, constaté, prévu ou déduit du nombre d'individus matures et qu'aucune sous-population est estimée à plus de 1000 individus matures. Il est donc confronté à un risque d'extinction extrêmement élevé à l'état sauvage.

De ce fait le guépard est une espèce protégée et il est l'objet d'une législation stricte établie par la CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), chargée de régir le commerce international des espèces animales et végétale.

Selon cette convention, le guépard figure dans l'annexe I, c'est à dire celle des espèces animales et végétales dont la survie est la plus compromise.

Son commerce ne peut être autorisé que dans certains cas particuliers comme la recherche scientifique par exemple et fait l'objet de délivrance d'autorisation spéciale et exceptionnelle [142].

Dans le cas du guépard, la CITES a fixé en 1992 des quotas pour les trophées de chasse en Namibie (150/an), au Zimbabwe (50/an), et au Botswana (5/an). La chasse est interdite dans la plupart des autres pays [101] : Angola, Bénin, Botswana, Burkina Faso, Cameroun, République d'Afrique Centrale, Ethiopie, Ghana, Kenya, Malawi, Mali, Mauritanie, Mozambique, Namibie, Niger, Nigeria, Rwanda, Sénégal, Afrique du Sud, Soudan, Tanzanie, Togo, Uganda et Zaïre.

Ainsi de nombreux programmes de sauvegarde se développent aujourd'hui par des essais de « réconciliation » entre l'homme et l'animal qui constituent l'objectif principal de la CCF : Cheetah Conservation Foundation.

Cette démarche met l'accent sur la sensibilisation des fermiers au comportement particulier du guépard et sur l'utilisation du chien de Berger comme protection à la place de pièges.

Dans la mesure du possible, les fermiers sont également encouragés à avertir la CCF à la vue d'un guépard au lieu d'en entreprendre la chasse.

Le guépard est donc une espèce dont tout commerce est très réglementé et dont de nombreux programmes de réhabilitation sont en cours.

3.2 Le lion

3.2.1 Historique, répartition géographique et effectifs

Le lion était primitivement distribué largement dans toute l'Afrique, jusqu'au Sud-est de l'Asie et en Europe de l'Est. Il semble qu'il ait totalement disparu d'Europe il y a 2000 ans, de Palestine au temps des croisades et de Turquie au XIX^{ème} siècle. En Iraq, le dernier lion a été rapporté en 1918 et en 1942 en Iran [86]

Les premières données concernant le lion d'Asie nous viennent d'Aristote qui écrivait que des lions étaient présents dans les Balkans au milieu du dernier millénaire avant JC. On suppose que le lion a disparu de Grèce vers les années 80-100 après JC.

Il était présent dans toute la superficie de l'Azerbaïdjan au X^{ème} siècle. Il aurait disparu de la côte marocaine au milieu du XIX^{ème} siècle.

Il aurait pu survivre dans les montagnes de l'Atlas jusqu' en 1940. Le dernier lion tué en Algérie en 1893, en Tunisie en 1891 et en Turquie en 1870.

En Inde où il était initialement très répandu, sa population a subi une sévère diminution en Inde au XIX^{ème} siècle par la chasse. Il a été sauvé de l'extinction par le nabab de Junagarh qui s'employa à la protection de l'espèce dans la forêt de Gir [81].

Cette petite population a été préservée et compte aujourd'hui environ 250 individus [65] (figure 10).

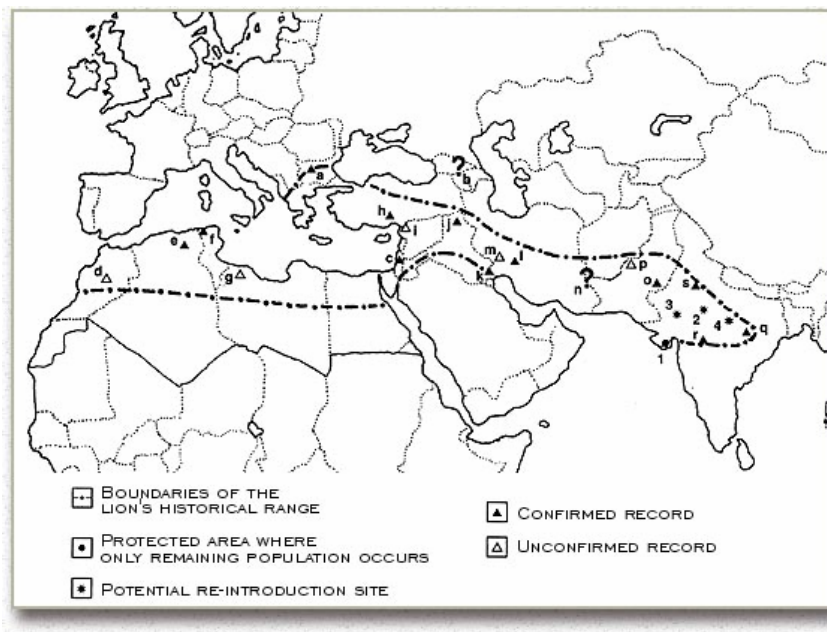


Figure 10 : Distribution actuelle du lion (*P. leo*) en Afrique du Nord et en Asie du Sud D'après Nowell et Jackson [86]

Légende :

- • — habitat naturel historique
- Aires protégées où on trouve des lions
- * Site de réintroduction potentielle du lion
- ▲ Enregistrement confirmé .
- Δ Enregistrement non confirmé

La population du lion d'Afrique était quant à elle estimée entre 30000 et 100000 individus il y a une dizaine d'années [118] et serait plutôt de l'ordre de 18000 à 27000 aujourd'hui [5].

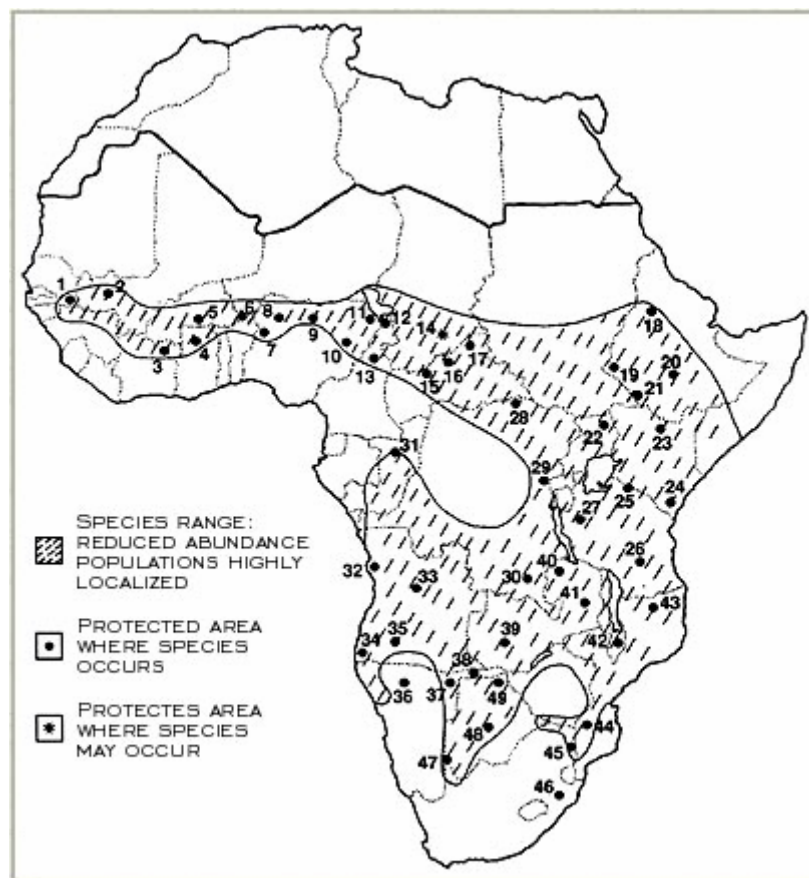
Le lion semble être relativement fréquent au Botswana, en République d'Afrique Centrale, en Ethiopie, au Kenya, en Tanzanie, au Zaïre et en Zambie (*figure 11*).

Les populations sont bien définies mais isolées et centrées sur les aires protégées comme en Namibie (environ 600 individus dans les réserves) et au Zimbabwe (environ 1000 lions dans les réserves).

On compte environ 1200 à 2700 lions en Afrique Centrale et Afrique de l'Ouest [5].

Sa distribution est plus sporadique et restreinte aux réserves dans les autres pays d'Afrique.

L'espèce est considérée comme éteinte à Djibouti, au Gabon, à Lesotho, en Mauritanie et au Togo [86].



**Figure 11 : Distribution actuelle du lion (*P. leo*) en Afrique sub-saharienne
D'après Nowell et Jackson [86]**

Légende :



Habitat naturel



Aires protégées où on trouve des guépards



Aires protégées les guépards peuvent être observés.

Suite à ce déclin important le lion a été déclaré espèce en danger.

3.2.2 Statut

L'UICN a considéré différemment les populations d'Afrique et d'Asie [148] .

Le lion d'Afrique, malgré son récent déclin n'est pas encore sur la liste rouge de l'UICN.

Le lion d'Asie est lui classé comme « en danger d'extinction » c'est à dire qu'il répond à au moins l'un ou plusieurs des critères suivant :

Estimation d'une réduction de la taille de la population supérieure à 50% sur les 10 dernières années ou 3 générations.

Suspicion d'une réduction de la taille de la population supérieure à 50% dans les 10 prochaines années ou les 3 générations à venir.

Occupation géographique de moins de 5000 km²

Taille de la population inférieure à 250 individus matures.

Probabilité d'extinction dans la nature d'au moins 20% dans 20 ans ou dans les 5 prochaines génération.

Il fait également partie des espèces classées par la CITES [142] : comme le guépard, le lion d'Asie fait partie de l'annexe 1. La chasse et le commerce excepté pour des raisons scientifiques sont interdites. L'espèce est complètement protégée en Inde.

Le lion d'Afrique est quand à lui cité sur l'annexe 2 de la CITES c'est à dire celle des espèces, qui bien que n'étant pas menacées actuellement d'extinction imminente, pourraient le devenir si le commerce de leurs spécimens n'étaient pas étroitement contrôlé.

La chasse doit être réduite exclusivement aux animaux « à problèmes ».

Ainsi la chasse est complètement interdite en Angola, au Cameroun, au Congo , au Gabon au Ghana, à Malawi, en Mauritanie, au Niger, au Nigeria et au Rwanda.

Les trophées de chasse sont permis au Botswana, en Namibie, en Afrique du Sud, en Tanzanie, en Zambie et au Zimbabwe.

La chasse est régulée et réduite aux animaux à problèmes et dangereux dans la plus part des autres pays du continent.

<p>Le lion et le guépard sont donc deux espèces dont la survie est menacée. Les problèmes principaux rencontrés par ces félidés sont majoritairement liés à l'homme (expansion, destruction de l'habitat, chasse). Il semble alors important aujourd'hui d'apporter une aide au développement et à la reproduction de ces espèces menacées.</p>

Pour cela il est d'abord nécessaire de bien connaître les divers paramètres de la reproduction de ces espèces puis nous pourrons alors envisager quelques solutions d'aide à la reproduction.

Deuxième Partie :

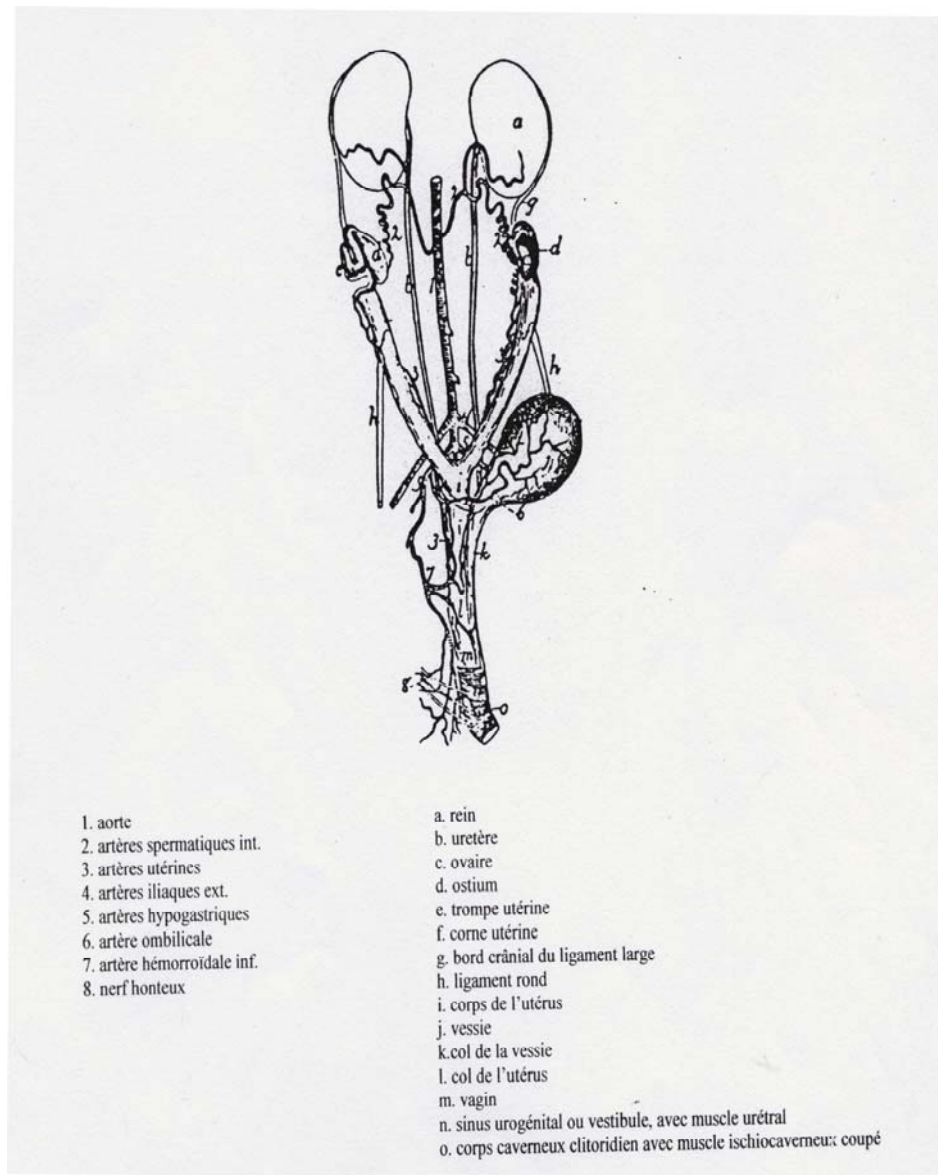
Physiologie sexuelle du guépard et du lion

1. Les femelles

1.1 Anatomie de l'appareil reproducteur femelle

1.1.1 La femelle guépard

Le tractus génital des femelles guépard a souvent été considéré comme étant superposable à celui de la chatte domestique [90, 101] (Figure 12), aucune planche anatomique ni description complète n'ayant été trouvée dans la littérature malgré des recherches approfondies et des prises de contact avec des spécialistes reconnus de cette espèce.



**Figure 12 : Appareil génital de la chatte
D'après Reighard et Jennings (Perrin 2003 [101])**

Il n'a été que brièvement décrit dans l'étude menée par Wildt et son équipe en 1993 [133]: les cornes utérines semblent mesurer en moyenne 8.4mm de diamètre et l'oviducte 3.8 mm sur toute sa longueur.

Chez les différentes femelles examinées la plupart des ovaires (60%) avaient une forme d'œuf oblong, bien arrondi à la fois médialement et latéralement.

Une particularité de l'appareil reproducteur génital femelle de la guépard a cependant été remarquée : la présence très fréquente de kystes paraovariens ayant l'apparence de plusieurs poches remplies de liquide et localisées dans le tissu de la fimbria ovarienne, latéralement au côté proximal de l'ovaire et souvent adjacent ou très proche de l'oviducte.

Ces kystes ne sembleraient avoir aucune incidence sur la fonction reproductrice de la femelle [133].

1.1.2 La lionne

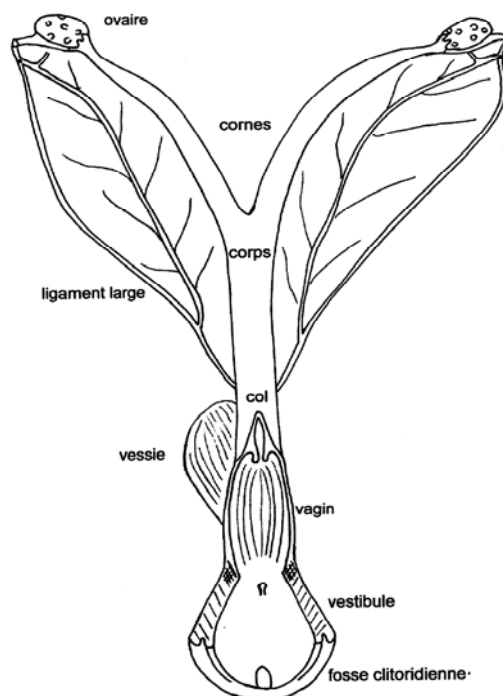
L'appareil génital de la lionne a été récemment décrit par Séverine Morin en 2001[81] suite à une ovario-hystérectomie pratiquée au Parc Zoologique de Vincennes (*figure 13*).

Les ovaires sont logés partiellement dans une bourse ovarique non graisseuse formée par la partie antérieure du ligament large.

Comme chez la femelle guépard ils sont de forme oblongue et arrondis.

Le cornes utérines sont minces et non sinueuse et mesurent environ 16 cm de long et ont un diamètre de 1.5 cm . Le corps utérin mesure 12 cm avec un diamètre de 2 à 2.5 cm. La vulve est placée 5 cm ventralement à l'an.

La lionne adulte est également pourvue d'un os clitoridien formé par un osselet allongé et effilé aux extrémités.



**Figure 13 : Dessin de l'appareil génital de la lionne
D'après Morin [81]**

1.2 Puberté et maturité sexuelle

1.2.1 La femelle guépard

Chez la femelle guépard il a été relevé la présence de follicules sur les ovaires chez 5 femelles sur 11 avant 26 mois dans une étude menée par le Dr Wildt et son équipe dans 18 institutions américaines regroupant 128 guépards en 1993 [135].

De 16 à 20 mois, des follicules sont présents mais de petite taille c'est à dire inférieure à 2mm qui sont considérés comme des signes de faible reproduction lorsqu'ils sont trouvés sur des animaux âgés de 5 ans et plus.

La moment de la puberté est finalement estimé à l'apparition des premières chaleurs et se situerait entre 647 et 760 jours soit vers 1.5- 2 ans [68 ; 109] et correspond et environ à l'époque à laquelle les femelles quittent leur fratrie pour évoluer seules.

La réelle maturité sexuelle est estimée grâce à la première gestation (capacité de la femelle à reproduire).

Celle-ci a lieu en moyenne chez la femelle guépard à l'âge de 3 ans.

1.2.2 La lionne

Chez la lionne, le déclenchement de la cyclicité est évalué entre 24 et 28 mois et considéré comme réellement effectif (premières chaleurs) à 3 ans [109].

Il semble être légèrement plus tardif chez les animaux en liberté chez lesquels il est estimé à 3.5 ans.

La première gestation a lieu en moyenne à 4 ans [86].

1.3 Saisonnalité de la reproduction

La reproduction à la fois de la femelle guépard et de la lionne n'est pas saisonnière, elle peut avoir lieu tout au long de l'année [86].

Néanmoins dans les deux cas on peut observer des pics de naissance, en général pendant la saison des pluies et ceci du à l'augmentation de la disponibilité des proies mais variable d'une année sur l'autre.

Pour la femelle guépard les pics de naissance ont lieu de novembre à mai dans le parc du Serengeti, en Tanzanie [68] et de juillet à septembre en Namibie [86].

Pour la lionne ces pics s'observent généralement de mars à juillet dans le parc Kruger en Afrique du Sud [93] et de novembre à mars dans le parc du Serengeti, en Tanzanie [109].

1.4 Cycle oestral

La femelle guépard et la lionne sont comme la chatte des espèces polyoestriennes à ovulation provoquée [17 ; 68 ; 113 ; 133].

Le schéma de base sera donc le même pour ces 2 espèces :

1.4.1 La phase folliculaire

La phase folliculaire est la phase du cycle pendant laquelle se déroule la maturation des follicules qui entourent l'ovocyte et qui sécrètent alors des oestrogènes [97 ; 122].

Le déroulement de cette phase chez la femelle guépard et la lionne est identique aux autres espèces de mammifères : sous l'influence des hormones FSH (responsable de la croissance folliculaire) et LH (responsable de la stimulation de la thèque interne et des cellules interstitielles) les follicules se développent jusqu'à l'obtention de follicules pré-ovulatoires dont la sécrétion d'oestrogènes est maximale et correspond à l'apparition du comportement des chaleurs.

Les modifications physiologiques en période de chaleur préparent l'animal à la fécondation : les trompes se développent, les glandes sécrètent un mucus ayant pour rôle de faciliter la progression de l'ovocyte au site de fécondation et leur apportent les nutriments nécessaires à sa survie. L'utérus quant à lui est sujet à une augmentation de ses sécrétions destinées à nourrir les futurs œufs fécondés.

Chez la femelle guépard, la phase folliculaire semble durer en moyenne 12-13 jours [2 ; 13 ; 68] incluant l'œstrus qui correspond à la phase d'acceptation de l'accouplement et dure 3-4 jours [2 ; 13].

Chez la lionne, la phase folliculaire est comprise entre 1 et 22 jours avec une moyenne de 16 jours [109], l'œstrus étant évalué à une moyenne de 4 jours, variant de 2 à 6 jours [91].

1.4.2 L'ovulation

Dans le cas de ces espèces à ovulation provoquée telles la lionne et la femelle guépard celle-ci ne se déclenche qu'à l'accouplement ou par un stimulus équivalent aboutissant à la décharge suffisante de la LH (Luteinising Hormone) par réflexe neurogène. Un nombre important de saillies est alors souvent nécessaire pour déclencher l'ovulation : on en dénombre en moyenne une cinquantaine par 24h.

L'ovulation de la femelle guépard est estimée comme ayant lieu environ 40 heures après le déclenchement [58] et celle de la lionne environ 24h après l'accouplement [1].

Il a cependant été observé chez la lionne qu'une stimulation mécanique du vagin n'est pas toujours nécessaire à l'ovulation. En effet dans certains cas il semblerait qu'un comportement accentué lors de l'œstrus tel le chevauchement de ses congénères provoque également le déclenchement de l'ovulation [113]. Ce phénomène n'a jamais été décrit chez la femelle guépard.

1.4.3 La phase lutéale

La phase lutéale fait suite à la phase folliculaire et peut alors se présenter sous trois formes:

- pas d'ovulation : l'imprégnation oestrogénique se termine et un nouveau cycle redémarre après une période temps variable appelée interœstrus.

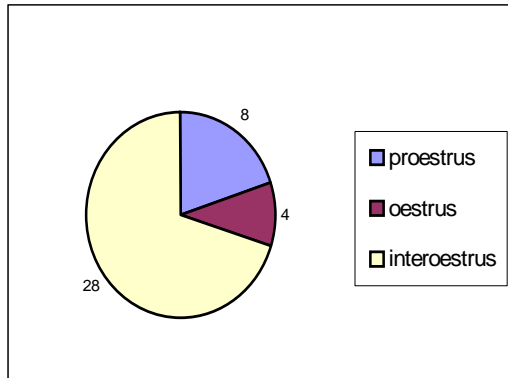


Figure 14 :

Cycle oestral de la femelle guépard (en jours)

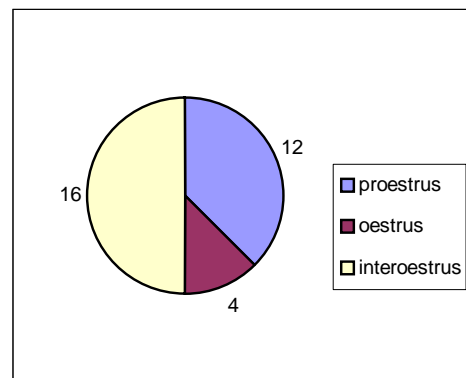


Figure 15 :

Cycle oestral de la lionne (en jours)

Chez la femelle guépard l'interœstrus dure environ 3 à 4 semaines (*figure 14*) mais cet intervalle est très irrégulier et dépend à la fois de l'individu et de conditions environnementales telles que la disponibilité des proies ou le stress [22].

Des périodes d'anoestrus peuvent également avoir lieu et sont très variables selon les individus et les saisons, elles peuvent durer de 2 à 5 mois.

Chez la lionne l'interœstrus est plus court et est évalué à 16 jours environ [112] (*figure 15*).

- S'il y a eu à la fois ovulation et fécondation, les follicules ayant libéré leur ovocyte deviennent des corps jaunes qui sécrètent de la progestérone dont le rôle est de maintenir la gestation jusqu'au terme.

La gestation de la femelle guépard dure en moyenne 95 jours [13] (*figure 16*), celle de la lionne est plus longue et dure environ 110 jours [112] (*figure 17*), la période d'anoestrus correspondant ici à la période d'élevage des jeunes jusqu'à leur indépendance.

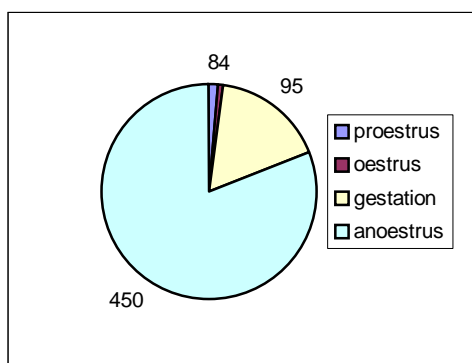


Figure 16 :

**Cycle avec gestation
chez la femelle guépard (en jours)**

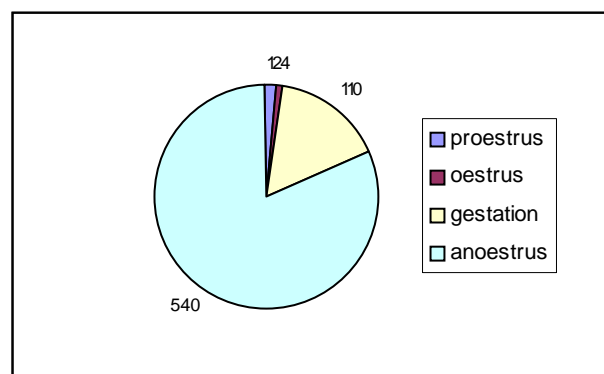


Figure 17 :

**Cycle avec gestation
chez la lionne (en jours)**

- S'il y a eu ovulation sans fécondation, il y a également formation de corps jaunes sécrétant de la progestérone mais celle-ci est sécrétée pendant un laps de temps moindre par rapport à la gestation et variable en fonction des espèces. Ce phénomène est appelé pseudo-gestation.

Chez la femelle guépard, la sécrétion de progestérone est maintenue pendant 51 jours en moyenne [13] (figure 18) et 2 à 6 semaines chez la lionne [112] (figure 19).

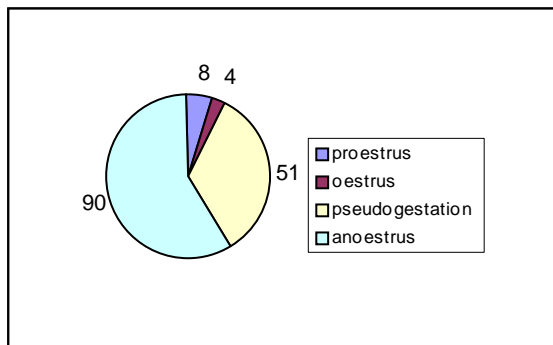


Figure 18 :
Cycle avec pseudo-gestation
chez la femelle guépard

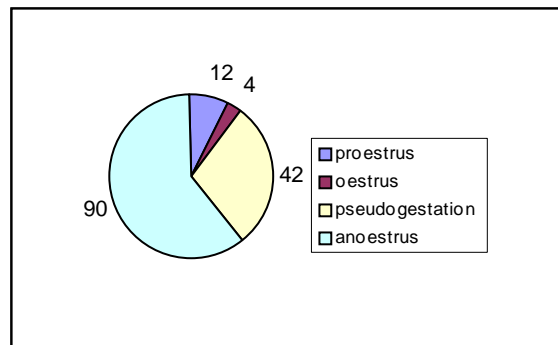


Figure 19 :
Cycle avec pseudo-gestation
chez la lionne

1.5 Détection de l'œstrus et de l'ovulation

1.5.1 Les observations comportementales

Le comportement des femelles guépard et lion subit des changements important quand elles sont en chaleur sous l'influence de la sécrétion d'œstrogènes, le but étant d'attirer les mâles afin de s'accoupler.

Les signes principaux d'œstrus observés en captivité incluent des frottements contre les clôtures ou barrières les séparant des mâles, des roulades et un port de la queue relevée sur le côté.[79].

De nombreux autres comportements ont également été relevés.

Les plus courant sont les roulades, le reniflement de tous les objets présents, des sons mélangeant miaulements et gazouillements et le marquage par l'urine.

Des comportements moins fréquents ont été également associés à l'œstrus tels que des vocalisations d'intensité plus importante, des allées et venues incessantes dans l'enclos, une activité locomotrice plus développée que d'habitude, un besoin de contact plus grand avec ses congénères tels qu'une augmentation du nettoyage mutuel ou même solitaire [125].

On retrouve ces comportements typiques à la fois chez la femelle guépard et la lionne.

Cependant chez la lionne on constate également une plus grande activité dans les jeux avec ses congénères de la même troupe, ceci étant probablement dû à la sociabilité plus poussée chez les lions [109].

De plus la lionne recherche plus activement son partenaire et elle recherche immédiatement un autre partenaire si le premier l'abandonne. Celui-ci pourra alors faire partie soit de la troupe soit être un nomade évoluant à proximité du territoire [109].

Cette méthode permet de détecter les chaleurs si les femelles expriment le comportement typique, ce qui n'est pas toujours le cas chez les femelles guépard maintenues en captivité [135] mais ne permet pas en revanche de déterminer le moment de l'ovulation.

1.5.2 La cytologie vaginale

Comme chez la chienne et la chatte, la récupération et coloration de cellules vaginales à différents stades du cycle oestral permet d'apprécier l'imprégnation oestrogénique.

L'exemple que nous prendrons est celui de la femelle guépard chez laquelle cette technique a été explorée en 1992 [2].

Un premier inconvénient chez ces espèces sauvages et qui n'existe pas chez les domestiques est qu'il est nécessaire de procéder à une immobilisation chimique avant de prélever ces cellules.

L'anesthésie est réalisée avec les substances suivantes seules ou en association : xylazine, kétamine, tilétamine/zolazépam, diazépam, médazolam et parfois l'anesthésie gazeuse est nécessaire à l'aide d'halothane ou d'isoflurane [2].

Des frottis vaginaux sont alors ensuite réalisés par la méthode suivante : on réalise un nettoyage de l'aire vulvaire avec un tampon de gaze humidifié de solution saline.

Un écouvillon stérile humidifié avec une solution saline stérile est introduit dans le vagin à une profondeur de 2.4 à 4 cm puis tourné à 360°, retiré et immédiatement étalé sur une lame de verre.

L'étalement est ensuite fixé à l'aide d'un cytofixateur puis la lame est colorée avec une coloration rapide (Diff Quick ®).

Une centaine de cellules sont observées au microscope, les cellules superficielles nucléées et anucléées, les cellules intermédiaires et les cellules parabasales sont comptées (*figure 20*).

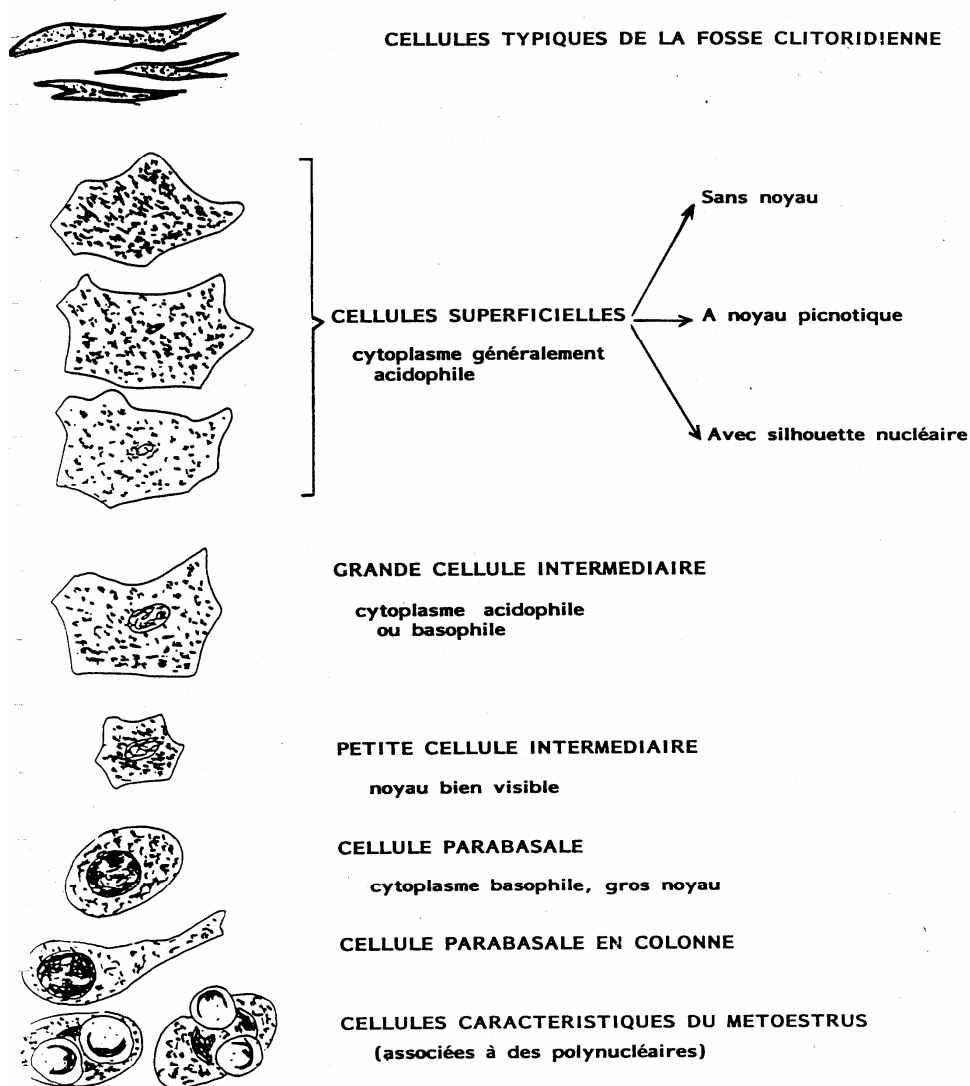


Figure 20 :

Principales cellules de l'épithélium vaginal reconnaissables sur les frottis vaginaux.

Lors des chaleurs, l'épithélium vaginal subit des changements dus à l'augmentation du taux d'œstrogènes circulant : les cellules épithéliales s'agrandissent et leur noyau se condense et disparaît parfois.

Quand le taux d'œstrogène diminue, des leucocytes s'infiltrant dans le vagin. L'observation des changements cellulaires permet alors une mesure indirecte du taux d'œstrogènes.

Le cycle classique d'une femelle non gestante consiste alors en une augmentation du nombre de cellules superficielles jusqu'à un maximum (40 à 60% des cellules) au moment de l'œstrus puis par une infusion de leucocytes en grand nombre à la fin des chaleurs et signe le début de la phase lutéale. Lors de cette phase on observe également souvent des cellules parabasales puis des cellules intermédiaires à l'approche des chaleurs suivantes.

On peut également remarquer que ces observations correspondent au comportement observé lors des chaleurs et décrit précédemment [125].

D'autre part lors de la gestation, on peut observer de nombreuses augmentations successives du nombre de cellules superficielles anucléées non suivies d'augmentation du nombre de leucocytes (*Figure 21*).

Ceci est typique de la gestation et participe donc à son diagnostic. De plus on peut remarquer que le dernier pic de leucocytes observé est associé à la conception et donc autorise une évaluation du moment de conception et donc une prédiction du moment de parturition [125].

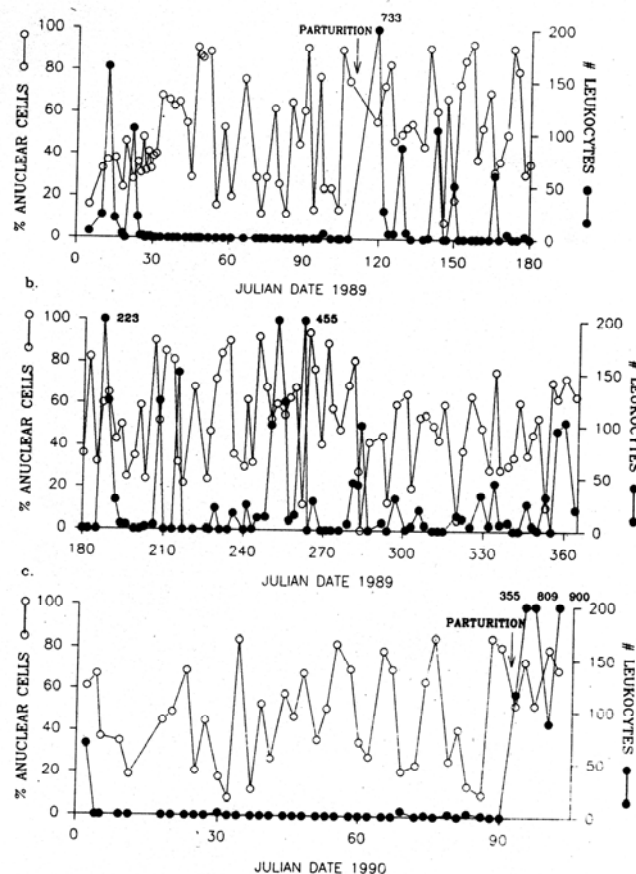


Figure 21 :
Profil cytologique de deux gestations chez une femelle guépard (a et c) séparées
d'environ 8 mois de non gestation (a et b)
D'après Asa 92[2].

La cytologie vaginale, bien qu'imprécise et de mise en œuvre contraignante en matière de suivi (anesthésie) se révèle être un bon indicateur du moment de l'œstrus mais surtout de la gestation.

1.5.3 Les dosages hormonaux

Nous avons vu plus haut qu'en fonction des différents stades du cycle oestral, différentes hormones sont sécrétées.

Ainsi, à partir des dosages d'œstrogènes et de progestérone, on peut établir les profils hormonaux correspondant à chaque période du cycle (*figure 22*).

Pour cela, deux méthodes principales ont été retenues : d'un part le dosage des hormones dans le sang et d'autre part le dosage des hormones dans les fécès ou dans l'urine.

1.5.3.1 Dosage dans le sang

L'inconvénient de cette méthode est une fois de plus que l'animal doit être anesthésié.

On utilisera principalement des flèches contenant de la xylazine et de la kétamine [112].

Ensuite deux méthodes peuvent être utilisées afin de suivre l'évolution des taux d'hormone : soit des prises de sang quotidiennes tout au long du cycle soit des prises de sang suivant des injections d'hormones (GnRH, ou eCG suivi ou non d' hCG) ce qui permet de déclencher le cycle et d'évaluer les fonctions ovariennes mais aussi hypothalamo-hypophysaire.

Dans les deux cas on réalise une prise de sang sur animal anesthésié à la veine fémorale [112], saphène [129 ; 133] ou caudale [24].

Les échantillons de sang sont ensuite centrifugés et le sérum est conservé à -5 °C jusqu'à l'analyse.

Les stéroïdes sont ensuite séparés et purifiés par chromatographie [112] et ensuite mesurés par radio-immunologie [24 ; 130 ; 133]

Dans les deux méthodes utilisées indépendamment chez la lionne et la femelle guépard, le profil hormonal est le même : on remarque un pic d'œstradiol en fin de phase folliculaire ou à la suite d'une injection de eCG puis une augmentation de progestérone immédiatement après l'ovulation provoquée soit par le coït soit par une injection d'hCG et ce sur une dizaine de jours [13, 112].

1.5.3.2 Dosage dans les fécès et dans l'urine

Cette méthode est de plus en plus utilisée chez les espèces sauvages[124] comme le lion et le guépard car elle présente plusieurs avantages en comparaison du dosage sanguin.

L'urine et les fécès étant des voies d'excrétion naturelle des oestrogènes et de la progestérone, cette méthode permet de déterminer le statut reproducteur et permet donc une gestion de la reproduction naturelle et assistée.

Cette méthode permet de s'affranchir de toute anesthésie qui peut être stressante pour l'animal et peut également modifier les paramètres hormonaux (influence sur l'ovulation), limite le risque pour l'opérateur puisqu'il n'y a pas de contact direct avec l'animal, autorise des prélèvements répétés qui ne sont pas toujours possibles dans ce espèces et elle permet d'étudier à la fois les différentes phases du cycle, la gestation, les avortements, la puberté, le comportement reproducteur et la saisonnalité [114].

D'autre part on peut signaler que cette technique a l'avantage de permettre des protocoles de collection s'étalant sur des périodes prolongées sans manipulation ni stress des animaux. Les concentrations en métabolites sont de plus 2 à 4 fois plus importantes que les stéroïdes parents dans le sang, ce qui permet une automatisation plus facile [66 ; 67]. Il faut néanmoins noter que la récolte de fèces est plus facile que l'urine, celle-ci est souvent souillée et parfois difficilement récoltable. [114].

La technique d'analyse est présentée en annexe 2 [12 ; 22].

Pour l'urine les méthodes d'extraction sont similaires bien que plus difficilement applicables [67].

Les résultats obtenus avec cette méthode sont très proches de ceux obtenus par dosage sanguins et sont représentés par la (figure 22).

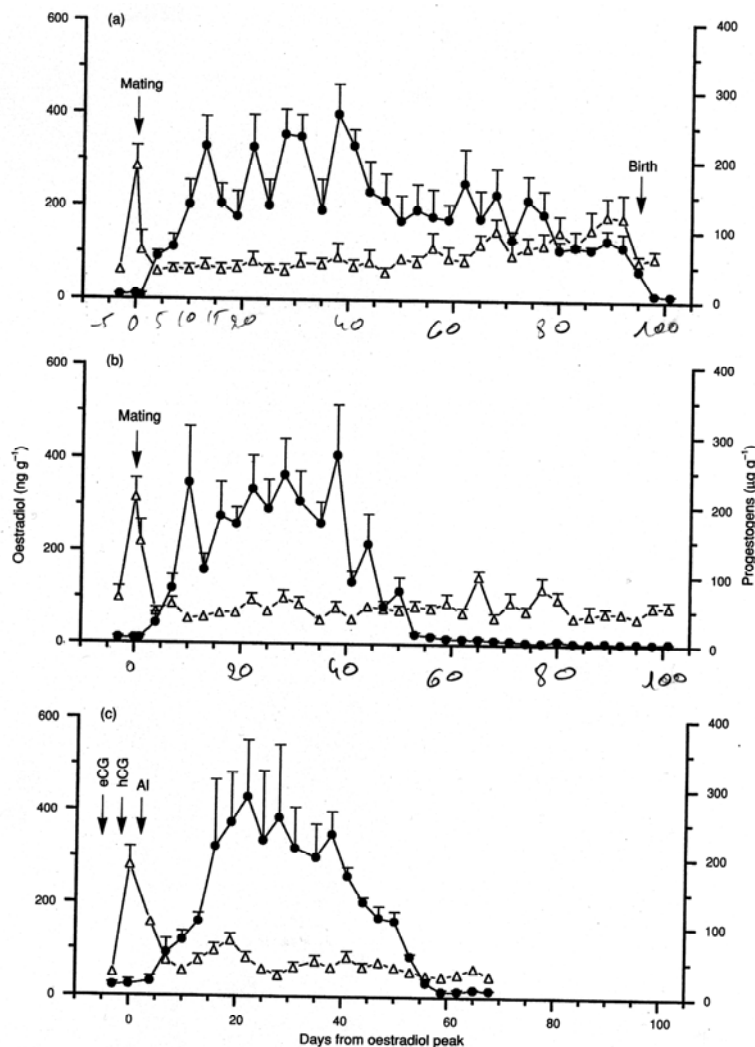


Figure 22 :

Profil hormonaux par dosage dans les fèces (oestradiol et progestérone) chez des femelles guépard a) gestante, b) non gestante après accouplement, c) non gestante après ovulation induite et insémination artificielle.

D'après Brown 96[13]

Ces méthodes de suivi hormonal se révèlent donc être intéressantes et pratiques pour la détermination des différents stades du cycle mais il n'existe pas encore de validation pour chaque espèce et donc une indexation pour chaque hormone est donc souvent préalablement nécessaire [66].

Les différentes méthodes, évoquées ci-dessus bien qu'indirectes (comportement, cytologie et dosage) permettent donc une bonne approche du cycle oestral et de la gestation chez la lionne et la femelle guépard et coïncident entre elles.

Des méthodes plus directes par visualisation des modifications ovariennes lors de l'ovulation peuvent être également appliquées : il s'agit de la laparoscopie et de l'échographie.

1.5.4 La laparoscopie

La laparoscopie suivant ou non un traitement hormonal visant à provoquer l'ovulation est très utilisée pour visualiser les modifications structurales des ovaires.

Cette technique est utilisée indifféremment chez la lionne et chez la femelle guépard [24 ; 56 ; 126 ; 135], on dispose cependant de plus de données et d'images pour la femelle guépard. En effet l'espèce étant depuis plus longtemps en danger d'extinction, plus d'informations ont été collectées.

Les femelles sont dans un premier temps anesthésiées avec une association de tilétamine-zolazepam (TELAZOL® (3 à 6 mg/kg)) [56]. Chaque femelle anesthésiée est placée sur le dos sur la table chirurgicale, nettoyée et la cavité abdominale est insufflée avec de l'air ambiant en utilisant une pompe à bras et sonde avec une aiguille de 2 mm de diamètre insérée trans-abdominalement. .

Un ensemble de trocart-canule de 10 mm de diamètre relié à un laparoscope à 180° est inséré dans la cavité abdominale à travers une incision de 2 cm de long faite près de l'ombilic .

Le laparoscope est attaché à une source de lumière extérieure par un câble à fibre optique et est utilisé pour examiner l'appareil reproducteur en détail depuis la bifurcation du corps utérin avec les cornes utérines sur toute la longueur de chaque corne utérine jusqu'à la jonction tubo-utérine, l'ovaire, l'oviducte et finalement le ligament large.

L'aiguille est utilisée pour manipuler le ligament large et autoriser la vision de tous les aspects de chaque ovaire et pour examiner, compter et mesurer les follicules ovariens, les corps lutéaux et les kystes paraovariens.

Les résultats de ces investigations ont montré la présence de 4 structures différentes sur les ovaires :

-Les follicules (*figure 23*) qui sont des structures nettes avec des surfaces aplaties et avec ou sans distinction du stroma ovarien. Ceux-ci peuvent être de 3 tailles différentes : les follicules de moins de 2 mm de diamètre sont des follicules immatures, ceux de plus de 2 mm de diamètres contiendraient les ovocytes les plus capables de fertilisation [26] ceux dont le diamètre est supérieur à 4 mm sont les follicules préovulatoires.

-Les corps hémorragiques (*figure 25*), sites d'ovulation récentes, d'apparence rouge vif, de 4 à 8 mm de diamètre et se situant à moins de 4 mm au-dessus de la surface ovarienne.

-Les corps lutéaux (*figure 24*), indiquant que l'ovulation a eu lieu à cet endroit au moins 48 heures avant, de coloration orange- jaunâtre, mesurant 6 à 7 mm de diamètre et situé 1 à 2 mm au-dessus de la surface ovarienne.

-Les cicatrices lutéales, tâches plates et jaunes de 2mm et moins de diamètre.

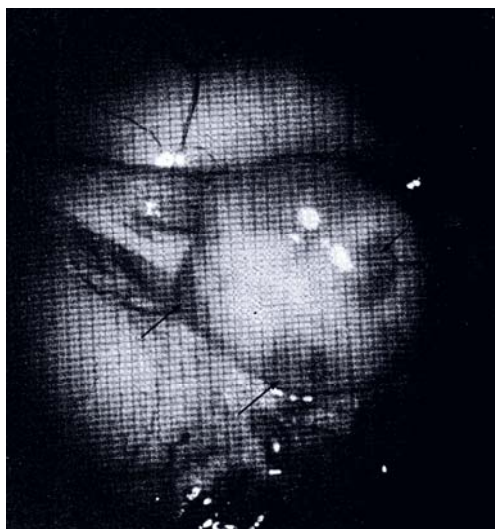


Figure 23: ovaire de femelle guépard observé par laparoscopie présentant 4 follicules après traitement FSH. D'après Wildt 81 [126].

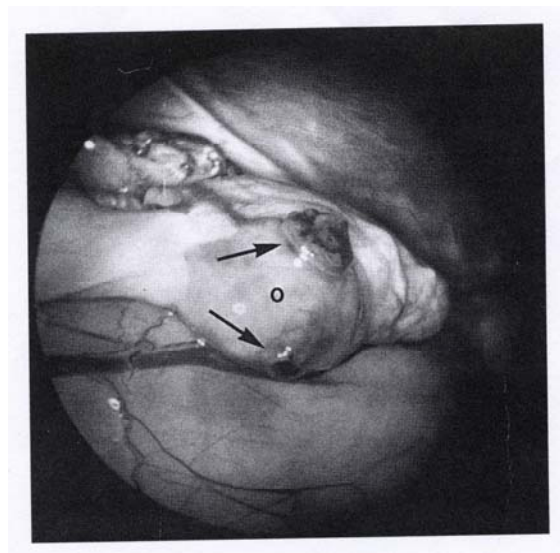


Figure 24 : ovaire de femelle guépard observé par laparoscopie présentant des corps lutéaux après stimulation Hormonale. D'après Howard 97[58].

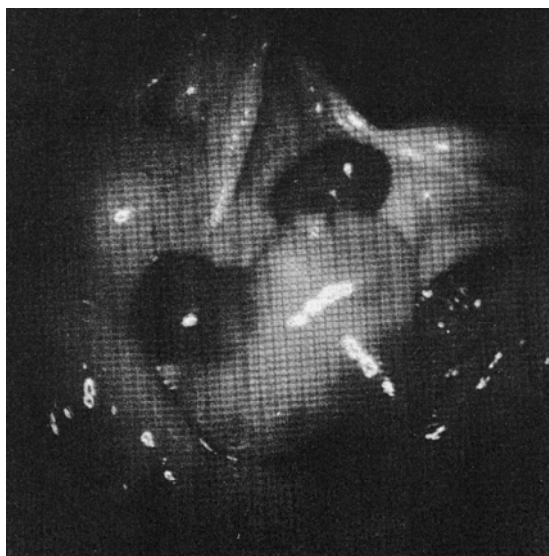


Figure 25 :
Ovaire de femelle guépard observé par laparoscopie présentant 3 corps hémorragiques après stimulation hormonale
D'après Wildt 81 [126]

La laparoscopie permet donc d'identifier et de classifier les différentes structures présentes sur les ovaires et donc de déterminer le statut reproducteur de l'animal étudié.

D'autre part elle permet de vérifier que le traitement utilisé pour provoquer la maturation folliculaire et/ou l'ovulation est une réussite.

L'idéal est alors de pratiquer une laparoscopie avant le traitement pour évaluer l'efficacité des injections effectuées [126].

Les traitements utilisés sont des traitements d'induction de la maturation folliculaire et de déclenchement de l'ovulation.

La laparoscopie permet donc de déterminer avec certitude le statut reproducteur de l'animal à un moment précis. Cette technique est néanmoins contraignante car chirurgicale et non répétable à volonté. Une autre technique permettrait de s'affranchir de cette difficulté : il s'agit de l'échographie.

1.5.6 L'échographie

L'échographie est un moyen de suivi du cycle oestral et de gestation qui commence à être développé chez les petits carnivores domestiques.

Il peut également se révéler intéressant chez les animaux sauvages bien que son utilisation ne soit pas encore fréquente.

On ne dispose pas de données sur son utilisation chez le guépard et le lion, seules quelques espèces comme l'éléphant et le rhinocéros profitent pour l'instant de cette technique [49, 50]. Néanmoins son utilisation semble toute indiquée pour déterminer le statut reproducteur et la cyclicité de ces espèces ainsi que la santé des reproducteurs potentiels et à terme remplacer les techniques chirurgicales par son caractère non-invasif et répétable [50].

1.6 Accouplement [19 ; 20 ; 109]

Dans les grandes lignes, l'accouplement chez les lions et les guépards est identique, nous décrirons en détail celui relevé chez le lion [109] (figure 26).

La femelle en chaleur est agitée, ne tient pas en place, s'allonge quelques instants puis se relève brusquement, alterne une marche rapide et des petits sauts et se roule fréquemment sur le dos.

Le mâle reste près d'elle, bouge en même temps qu'elle mais reste dans un premier temps à environ un mètre d'elle. Puis il se rapproche, la suit toujours en touchant fréquemment sa croupe avec sa tête, renifle sa vulve et a une attitude de flehmen.

Parfois elle refuse qu'il s'approche et l'évite puis se rapproche.

Le mâle lui lèche la nuque, le dos, la croupe et essaie parfois de l'arrêter dans sa course en lui donnant des coups de tête.

La lionne s'accroupit, ses pattes en avant et à plat sur le sol des coudes aux pattes avant, sa croupe restant en l'air, la queue déviée sur le côté. Parfois elle marche 10 à 20 m en cercle autour du mâle, sa croupe typiquement dirigée vers sa tête.

Quand la femelle est immobilisée, le mâle s'accroupit sur elle ses pattes avant de chaque côté, les pattes arrières au niveau de la croupe et la pénètre 3 fois en 2 secondes pour un total de 10 à 30 fois.

Le mâle peut ignorer complètement la nuque de la femelle ou bien la lécher ou encore la mordre, rarement jusqu'au sang néanmoins.

Alors que le mâle est monté la femelle émet un grognement profond et continu. Le mâle n'émet pas de son au début mais donne un ou plusieurs miaulements et retrousse les babines.

Le contact se termine abruptement, le mâle miaule et le grognement de la femelle devient un feulement.

Le mâle saute à côté de la femelle tout en émettent un bruit semblant intermédiaire entre un rugissement et un feulement alors que la femelle tourne brusquement la tête avec un feulement explosif, ses pattes soulevées comme pour battre le mâle. Cette réaction est attribuée à la douleur ressentie au retrait du pénis épineux.

On décompte en moyenne une cinquantaine d'accouplements en 24 heures [23], ce qui est remarquable quantitativement mais plus médiocre qualitativement car la semence serait de moins en moins bonne qualité au fur et à mesure de accouplements [15].

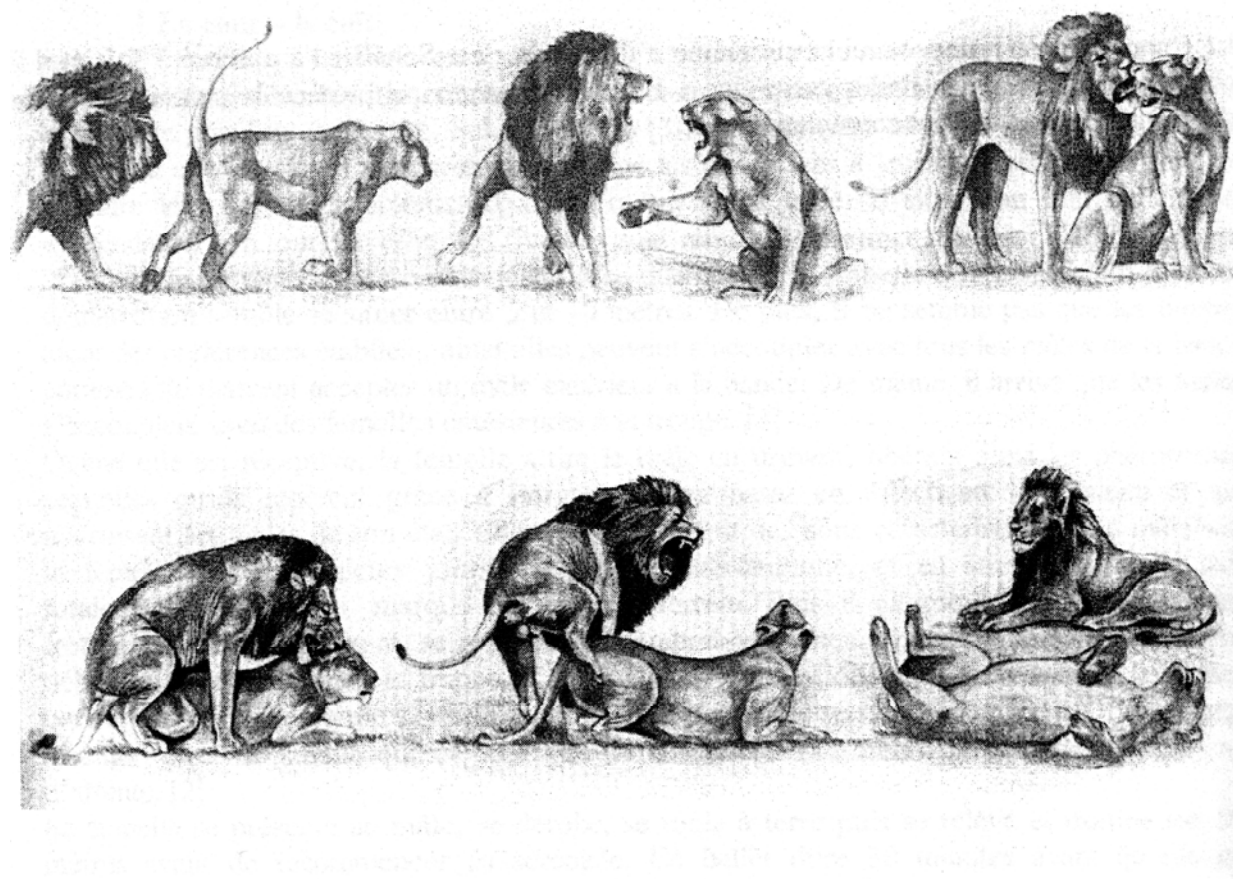


Figure 26 :
Illustration du déroulement de l'accouplement chez les lions
D'après Hanby et Bygott (Morin 2001 [81])

1.7 Gestation, mise bas et élevage des jeunes

1.7.1 La gestation

Chez la femelle guépard la gestation (durée entre la saillie et la mise bas) est évaluée à environ 95 jours et à 110 jours chez la lionne.

Pendant la gestation la lionne présente un gonflement de l'abdomen et les mamelles se remplissent de lait et augmente de volume [81].

La gestation de la femelle guépard n'est visible que deux semaines avant la mise-bas par un gonflement du ventre. On ne remarque pas de grossissement des mamelles. La femelle guépard en fin de gestation a également une tendance à rester couchée, ce qui annonce une mise-bas assez proche (1 semaine) [108].

Toutes deux ont tendance à s'isoler à l'approche de la mise-bas [19 ; 96]. Elles prennent possession de troncs d'arbres, de branchages, de rivières asséchées.

A l'approche imminente de la mise-bas la sangle abdominale se relâche, le ligament sacro-sciatique se détend et la vulve augmente de volume.

1.7.2 La mise bas

La mise bas a souvent lieu la nuit car la température de jour est trop élevée.

Les contractions sont de plus en plus fréquentes et permettent dans un premier temps l'élimination de des poches allantoïdienne et amniotique [81] puis l'expulsion un à un des jeunes. Souvent la femelle déchire les enveloppes fœtales [108] et tire sur son petit pour l'aider à sortir [81].

La jeune mère ingère ensuite les annexes et coupe le cordon ombilical avec les dents.

Entre deux petits la femelle lèche et nettoie le nouveau-né de manière à l'imprégner de son odeur et de faciliter l'acceptation du jeune par la troupe dans le cas des lions [81].

La durée de la mise bas varie de 1h30 à 3h et ne dépend pas forcément du nombre de jeunes [108].

Chaque portée comprend dans les 2 cas 1 à 6 jeunes, soit environ une portée par an pour les femelles guépard [19] mais une portée tous les 2 ans pour les lionnes [93].

1.7.3 L'élevage des jeunes

Le comportement maternel après la naissance et adapté aux besoins spécifiques du jeune et les risques auxquels ils sont exposés.

Les jeunes guépards sont d'une manière générale très exposés aux prédateurs que sont les lions et les hyènes.

Les femelles guépard utilisent alors une variété de tanière qui permettent de mettre les jeunes à l'abri des éléments, des prédateurs mais en ayant toujours un accès à la nourriture et à l'eau. La plupart du temps elles choisissent des marécages et des endroits où la végétation est haute. Les tanières sont changées tous les 5-6 jours.

Les jeunes sont ainsi cachés dans les tanières pendant en moyenne 8 semaines sachant que les jeunes issus de portées plus larges ont tendance à sortir plus tôt [69].

Malgré cette utilisation et cette variation ingénieuse des tanières la mortalité est très élevée (la femelle guépard est obligée de les laisser seuls pour partir à la chasse) puisque seuls 28% des jeunes sortent des tanières et 95% d'entre eux n'atteignent jamais l'indépendance [19].

Le sevrage des jeunes guépards se situe vers 3 mois mais souvent il commencent à déchiqueter la viande à la 5^{ème} semaine puis accompagnent leur mère à la chasse dès 45 jours [101].

Les jeunes guépards restent auprès de leur mère environ 18 mois et restent ensuite 6 mois avec leur fratrie.

Les femelles guépard retournent en chaleur environ 3 semaines après la perte d'une portée.

Contrairement aux petits guépards, les lionceaux sont beaucoup moins menacés par d'éventuels prédateurs.

Quand les lionceaux sont laissés seuls dans leur tanière, il est tout de même peu probable qu'ils se fassent attaquer car ils sont peu repérables grâce à leur immobilité [81].

De plus chez les lionnes l'élevage des jeunes se fait en communauté, ce qui intensifie l'importance du synchronisme des conceptions [99] et permet une coopération sur plusieurs niveaux.

En effet non seulement les femelles s'entraident dans l'apprentissage des règles de la communauté et de la chasse au petits mais elles sont également plus efficace dans le défense du territoire vis à vis des femelles des troupes voisines. Les jeunes d'âge semblable sont donc davantage protégés.

La synchronisation et la coopération dénuée de toute hiérarchisation permet donc un succès reproducteur plus important et une plus faible mortalité des jeunes [93 ; 94].

Pendant l'allaitement la lionne reste à disposition des lionceaux en position couchée, ces derniers viennent aux mamelles lorsqu'ils ont faim, orientés par la seule détection des phéromones émises par les mamelles [81].

A partir de 6 semaines l'élevage des jeunes se fait en « crèches », certaines lionnes vont à la chasse, d'autres s'occupent des jeunes et leur apprennent les règles de la hiérarchie comme la priorité à la carcasse [96].

L'apprentissage se fait essentiellement par la toilette et le jeu à la fois entre jeunes et entre jeunes et adultes [81].

Chez les lions, le plus grand risque de mortalité pour les jeunes lionceaux de moins de 24 mois est l'infanticide par de nouveaux mâles prenant soudain le pouvoir.

En effet lors d'une prise de pouvoir par une nouvelle coalition de mâles on note une grande augmentation des morts de jeunes de moins de 24 mois ou le cas échéant d'expulsion de ces jeunes.

Ceci est très important chez les lions car cela a une grande influence sur le succès reproducteur des mâles.

En effet lorsque la portée de la femelle survit, celle-ci ne revient pas en chaleur (ou plus exactement ne montre pas d'intérêt pour le mâle) avant l'indépendance de ses lionceaux c'est à dire pas avant 18 mois.

Si la mort de sa portée n'est pas due à un infanticide, elle peut se reproduire à nouveau environ après une durée de 24 jours soit l'équivalent d'un à deux cycles classiques.

Si la mort est due à un infanticide, la femelle n'accepte pas les nouveaux mâles pendant environ 134 jours soit l'équivalent de 6 à 9 cycles [92].

En tout état de cause la femelle peut adopter divers types de comportement vis à vis de l'arrivée de nouveaux mâles au pouvoir :

Elle peut défendre ses jeunes en détectant très tôt l'arrivée de mâles infanticides par leur rugissement différent de ceux de la troupe habituelle [78] et cachent alors davantage leur progéniture, elle peut également provoquer un avortement spontané si elle est déjà gestante ou bien justement s'accoupler avec les nouveaux mâles si elle est déjà gestante. Ceci s'explique sans doute plus par une augmentation du taux d'œstrogène en fin de gestation pouvant imiter la période de chaleur que d'une manipulation de la lionne afin de protéger sa progéniture à naître [23]. En effet les nouveaux mâles acceptent souvent les nouveau-nés comme les leurs dans ce cas.

La plupart des femelles néanmoins abandonne leur progéniture et entame une période d'évitement des nouveaux mâles [91].

Cette période dure au minimum 3 mois ce qui constitue tout de même un avantage de l'infanticide par rapport aux 18 mois nécessaires si les jeunes sont présents [92].

L'élevage des jeunes lionceaux semble alors plus évolué que celui des petits guépards et apporte plus de sûreté quant à la survie des jeunes même si l'infanticide est très fréquent alors qu'il semble ne pas exister chez le guépard.

Ceci est sans doute dû à la plus grande sociabilité du lion par rapport au guépard qui lui permet alors d'avoir un potentiel reproducteur plus grand par nature.

2. Les mâles

2.1 Anatomie de l'appareil reproducteur mâle

Comme pour l'appareil reproducteur femelle, celui-ci est superposable à celui du chat (figure 27) et aucune planche anatomique n'est disponible dans la littérature pour le guépard et le lion.

Les testicules sont situés dans un scrotum sessile à environ 10 cm de l'anus et mesurent environ 10 cm de long et 7 cm de large chez le guépard [90] et de volume moyen de 14cm³ [133].

Comme chez tous les félidés, l'os pénien est plus petit que celui des canidés, le pénis est au repos dirigé vers l'arrière et vers le bas [87 ; 120] et est relevé vers l'avant lors du coït.

Le gland est court et recouvert comme chez le chat d'épines ou papilles kératinisées [23 ; 133].

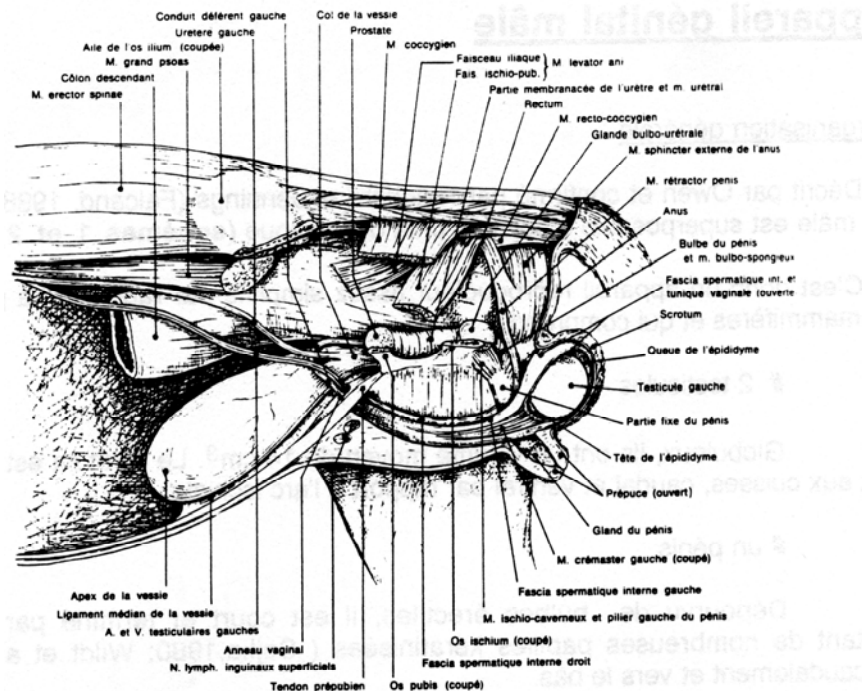


Figure 27 :
Appareil génital du chat mâle
D'après Barone 78 (Thevenin 96 [120])

2.2 Spermatogenèse

La fonction primaire des testicules est la spermatogenèse [48].

Les spermatozoïdes sont élaborés dans les tubes séminifères qui renferme les cellules de la lignée germinale que sont le spermatogonies souches localisées à la périphérie, et les cellules de Sertoli, grandes cellules pyramidales et allongées qui les entourent et jouent le rôle de support, de protection et de nutrition de ces cellules ainsi que dans la libération des spermatozoïdes.

Sous l'influence des hormones LH(stimulation de la synthèse de testostérone et maturation des spermatozoïdes), FSH (initiation et maintien de la spermatogenèse) la spermatogenèse résulte en l'obtention de spermatozoïdes qui nécessitent encore une capacitation dans les voies génitales femelles ou un milieu spécifique in vitro pour fertiliser l'ovule.

La testostérone intervient dans le développement des organes sexuels (verge, scrotum, testicule, prostate) mais aussi sur les différences de taille, de poids, de musculature, la présence de crinière pour les lions ainsi que sur le comportement sexuel.

La durée de la spermatogenèse est difficile à évaluer et n'est pas connue chez le guépard et le lion.

2.3 Puberté et maturité sexuelle.

La puberté est caractérisée par la reprise des divisions spermatogoniques après une période d'arrêt de divisions mitotique des spermatogonies.

Or celle-ci est difficile à évaluer et on considère alors plutôt comme le début de la puberté le moment d'apparition des premiers spermatozoïdes mobiles.

2.3.1 Le guépard

Chez le guépard celle-ci a été évaluée entre 15 à 26 mois selon une étude portant sur des animaux captifs dans 18 institutions nord-américaines [133].

Néanmoins le guépard n'est pas capable de procréer encore à cet âge, le taux de testostérone étant trop faible [16].

La maturité sexuelle effective est évaluée à l'âge de la première reproduction c'est-à-dire pour le guépard entre 30 et 36 mois [86].

On peut alors classer les guépards d'âge différents en 3 catégories, reflétant le stade de maturité sexuelle notamment par le développement de caractères extérieurs [16] :

Entre 14 et 22 mois les guépards sont adolescents, portent une crinière formée de très longs poils clairs obscurcis par endroits par les tâches noires au niveau de la nuque, ont une face ronde ressemblant à celle des juvéniles et sont un peu plus graciles que les adultes. Ils sont indépendant vis-à-vis leur mère mais sont encore en compagnie des femelles de leur portée, c'est la période lors de laquelle on commence à observer quelques spermatozoïdes mobiles.

Entre 23 et 42 mois ils sont subadultes, c'est-à-dire que ce sont de jeunes adultes et ont la plupart du temps perdu la totalité de leur crinière mais gardent souvent une face ronde. Ils possèdent un nombre de spermatozoïdes mobiles plus important et sont parfois capables de se reproduire. Ils sont la plupart du temps non accompagnés des femelles qui se sont séparées de la troupe à leurs premières chaleurs.

A partir d'environ 3 ans, ils sont considérés comme adultes, sans crinière, les poils noirs et clairs de la nuque de même longueur. Ils sont définitivement matures sexuellement et se reproduisent normalement.

2.3.2 Le lion

Chez les lions, le sevrage a lieu à 8 mois et ils sont considérés comme juvéniles jusqu' à l'âge de 24 mois.

Entre 25 et 48 mois les lionceaux sont subadultes et c'est à cet âge qu'a été évalué le début de la spermatogenèse par Hanby et Bygott dans une étude comprenant 122 subadultes vivant en Tanzanie [43]. Ceux-ci sont généralement encore avec leur troupe d'origine.

Il est d'usage de considérer que la maturité sexuelle est acquise entre 3,5 et 4 ans[46 : 109]. L'acquisition de celle-ci va de paire avec l'acquisition des caractères sexuels secondaires majeurs tels une grande augmentation de la taille et de la longueur de la crinière.

Les lionceaux quittent leur troupe d'origine entre 3 [10]et 4 ans [43].

Leurs premiers jeunes naissent en général quand les pères ont 4 ans et demi [93] soit le plus tôt possible après la prise d'une nouvelle troupe.

2.4 Succès reproducteur

Chez le lion contrairement au guépard le succès reproducteur semble être plus variable en fonction des individus et surtout influencé par des paramètres particuliers dus à l'organisation sociale du lion.

En effet lorsque les lions sont matures sexuellement, il est nécessaire qu'ils prennent possession d'une troupe de femelles avant de pouvoir se reproduire avec les femelles de la troupe en question.

La prise de pouvoir a lieu lorsque les lions ont atteint leur développement musculaire maximum, c'est-à-dire à environ 5-6 ans [43].

La prise de possession d'une troupe survient alors lorsque les mâles arrivants sont plus forts physiquement que les mâles initialement présents [23].

La prise de pouvoir par une nouvelle coalition de mâles peut soit donner lieu à de violents combats et expulsion rapide des perdants soit les mâles ne luttent même pas voyant que les arrivant sont bien plus forts.

Une fois la possession de la troupe établie, le succès reproducteur des nouveaux mâles résidents dépend de la taille de la coalition, de la durée de la tenue de la troupe, du nombre de femelles dans la troupe et de la survie des jeunes [93].Ce dernier paramètre est cependant plus important pour le succès reproducteur des femelles que pour celui des mâles.

La taille de la coalition est un élément majeur du succès reproducteur.

D'une part le succès reproducteur individuel des membres d'une coalition augmente avec la taille de la coalition [38] donc la plupart du temps les mâles s'associent régulièrement avec des compagnons non apparentés pour former des coalitions de 2 ou 3.

Dans les coalitions plus grandes on ne trouve généralement que des lions issus des mêmes troupes avec des possibilités d'âge différents.

Les membres d'une même coalition coopèrent dans la défense du territoire donc les plus nombreux ont une meilleure chance de rester en place [38].

Ainsi les coalitions les plus larges tiennent leur troupe plus longtemps. Les groupes formés de 3 individus restent au pouvoir 2,3 fois plus longtemps que les paires et les groupes de 6 individus restent au pouvoir 3,8 fois plus longtemps que les paires [15].

De plus les groupes larges qui sont restés au moins 2 ans en place ont souvent accès à des femelles de groupes voisins.

En règle générale on n'observe pas de hiérarchie dans les groupes de mâles, tous les partenaires sont sur un pied d'égalité vis-à-vis des femelles reproductrices et ils se partagent également la paternité de tous les lionceaux à naître [15].

Les coalitions se forment quand les lions sont jeunes ce qui laisse peu de possibilité pour les mâles exclus seuls. Ils ont en général la possibilité de former des paires mais rarement davantage.

La taille des groupes de mâles dépend de leur capacité à produire et à élever des jeunes.

Les désavantages dus aux petites portées, à un rapport déséquilibré entre le nombre de mâles et de femelles et les fortes mortalités peuvent être évités si un grand nombre de femelles donne naissance aux lionceaux de façon synchrone.

Les larges coalitions apportent donc un réel avantage à ses membres.

On peut alors raisonnablement se demander pourquoi le nombre de mâles en coalition n'est pas plus important encore.

Il semble que la raison soit qu'à partir d'un certain nombre, ce qui était un avantage devient un désavantage puisque tous ne peuvent pas alors reproduire et l'égalité qui est présente dans des coalitions plus petites ne se vérifie pas dans ce cas.

En effet des tests ADN ont montré que quand la densité de mâles est trop élevée les mêmes mâles sont souvent les géniteurs de tous les lionceaux obtenus [23].

Ceci implique donc dans ce cas d'une part l'établissement d'une hiérarchie qui n'est pas coutumière dans la tribu des lions et d'autre part une diminution de la variété génétique transmise puisque réduit à quelques individus.

Le succès reproducteur des lions est donc plus complexe que celui du guépard et ceci du à la particularité de son organisation sociale. Néanmoins dans les deux cas il est important de noter l'importance de la qualité de la semence.

2.5 Evaluation de la fertilité des mâles

L'évaluation de la fertilité se fait par l'examen de l'intégrité des organes reproducteurs et de la qualité de l'éjaculat.

2.5.1 L'examen externe des organes reproducteurs

Dans un premier temps et avant toute analyse les testicules et le pénis sont observés à l'œil nu et palpés. Les testicules sont mesurés à l'aide de compas de laboratoire et leur volume est calculé.

Le pénis est extrait de son fourreau et les potentielles anomalies sont examinées. La présence normale de spicules est observée [133].

Un examen de l'éjaculat est ensuite nécessaire pour permettre une meilleure évaluation de la fertilité.

2.5.2 Les caractéristiques de l'éjaculat

L'évaluation de la qualité de la semence commence par un prélèvement correct de l'éjaculat.

2.5.2.1 Techniques de récoltes [57]

Plusieurs techniques de récolte peuvent être utilisées.

2.5.2.1.1 La collection post-mortem [57]

Cette méthode a pour objectif la récupération de spermatozoïdes matures et viables de façon à mettre de côté du matériel génétique par cryoconservation.

Pour cela, on procède par le « flush » ou la macération des conduits déférents et de l'épididyme caudal en les faisant tremper dans une solution isotonique de chlorure de sodium ou dans un diluent cryoprotecteur.

Comme les tissus sont le siège de nombreux changements et que l'autolyse a lieu rapidement, les organes reproducteurs ont besoin d'être réfrigérés à 5°C rapidement après la mort et les spermatozoïdes mobiles peuvent être récupérés jusqu'à 12 h plus tard.

2.5.2.1.2 Le massage rectal des glandes accessoires [57]

A l'aide d'une main gantée chez les grandes espèces ou d'une sonde rectale chez les petites, une légère pression est appliquée sur le plancher du rectum de façon répétitive, d'avant en arrière au niveau des organes accessoires internes.

2.5.2.1.3 Récolte de la semence après le coït [57]

Cette technique est sans doute la plus ancienne méthode de récolte de sperme. Le plus gros désavantage de cette technique est que le sperme est contaminé par les sécrétions vaginales qui peuvent affecter la viabilité des spermatozoïdes.

La détection de sperme sur un frottis vaginal obtenu après une reproduction naturelle est utilisée dans certains programmes de reproduction en captivité pour confirmer la copulation et la présence d'éjaculat contenant des spermatozoïdes chez les mâles.

2.5.2.1.4 L'électroéjaculation

L'électroéjaculation est de loin la technique la plus utilisée et la plus adaptée aux espèces sauvages.

Cette technique consiste en la stimulation des nerfs stimulant les organes reproducteurs par la délivrance d'un courant électrique [57].

La récolte du sperme lors de l'électroéjaculation s'effectue par stimulation des nerfs contrôlant l'érection et l'éjaculation à savoir les nerfs hypogastriques responsables de l'émission et le nerf honteux interne et les nerfs pelviens responsables de l'érection et de l'éjaculation au sens strict [120].

La stimulation est permise sur animaux anesthésiés grâce à l'application de séries de pulsations électriques.

L'éjaculat obtenu est constitué des spermatozoïdes ainsi que des sécrétions prostatiques et bulbo-urétrales.

Anesthésie :

Le mâle est dans un premier temps mis à jeun pendant 12 à 24 heures puis subit une anesthésie par injection en intramusculaire de kétamine ou de tilétamine/zolazépam ou une association de kétamine/xylazine. On se méfiera par contre du diazépam, des dérivés de la phénothiazine et des anesthésiques inhalés comme l'halothane et l'isoflurane qui peuvent provoquer une contamination par l'urine et une diminution rapide de la motilité spermatique par action sur la relaxation musculaire.

Chez le guépard un protocole anesthésique fréquemment utilisé est 3 à 6 mg/kg de tilétamine/zolazépam ou 10mg/kg de kétamine associé à 1 mg/kg de xylazine [58].

Chez le lion on utilise souvent une sédation à la xylazine par flèche puis de la kétamine à 1 mg/kg puis en supplément si nécessaire [9].

Une association médétomidine et kétamine peuvent aussi être utilisés, assurant une bonne relaxation musculaire [121].

Chez le lion, l'utilisation du propofol semble intéressante [28].

Principe de la technique d'électroéjaculation :

L'électroéjaculation consiste en l'introduction d'une sonde rectale munie d'électrodes ventrales inclinée vers le plancher du pelvien afin de stimuler les glandes accessoires et les intervenant dans l'érection et l'éjaculation à savoir les nerfs hypogastriques responsables de l'émission et le nerf honteux interne et les nerfs pelviens responsables de l'érection et de l'éjaculation au sens strict [120].

La stimulation est permise sur animaux anesthésiés grâce à l'application de séries de pulsations électriques.

L'éjaculat obtenu est constitué des spermatozoïdes ainsi que des sécrétions prostatiques et bulbo-urétrales.

Matériel (figure 28) :

L'utilisation d'électrostimulateurs délivrant du courant continu ou alternatif est possible, les plus utilisés étant à courant alternatifs [57].

Le courant le plus utilisé est de type alternatif sinusoïdal et la fréquence la plus employée est de 60 HZ [132].

Deux sortes de sondes sont principalement utilisées chez le guépard :

- Une sonde de 15 cm de long, 1 cm de diamètre avec 2 électrodes [29].
- Une sonde de 23 cm de long et de 1,6 cm de diamètre avec 3 électrodes [58 ; 128].

Chez le lion les sondes utilisées sont des sondes de 28 cm de long, de 2 cm de diamètre avec 3 électrodes de 6, 9 cm [9].

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des sondes présentant des électrodes longitudinales par rapport à des électrodes circulaires [57].

Il est également préférable de n'avoir que des électrodes ventrales et latérales de manière à éviter le risque d'une ataxie potentielle avec des électrodes dorsales.

La sonde lubrifiée doit maintenir le contact électrique entre la sonde et le plancher rectal.

Les électrodes doivent être en contact direct avec le plancher ventral du rectum et positionnées directement en regard des glandes accessoires [57].

La contamination par l'urine de l'éjaculat peut également avoir lieu si le voltage utilisé est supérieur à ce qui est nécessaire pour l'éjaculation ; C'est pourquoi de nombreux protocoles ont été testés avant l'établissement de protocoles précis devenus traditionnels.



Electrostimulateur



Sonde rectale avec 3 électrodes

Figure 28 : Photo du matériel d'électroéjaculation

Protocoles :

L'animal anesthésié est dans un premier temps disposé en décubitus latéral de manière à avoir accès à la fois au pénis et à l'anus.

La sonde lubrifiée est insérée dans le rectum sur 15 cm chez le guépard [120] et de 10 à 15 cm chez le lion [9].

Le protocole le plus utilisé consiste en l'application de salves de 10 stimulations avec montée de 1 volt entre les salves d'une même série.

Lors d'une séance d'électroéjaculation on applique un total de 80 stimuli électriques répartis en 3 séries de 30, 30 et 20 stimuli. L'animal se repose 3 à 5 minutes entre chaque série.

Chez le guépard comme chez le lion le voltage initial est de 4 volts[10 ; 120] et le protocole consiste alors en :

Une première série comprenant 10 stimuli à 4 volts, 10 à 5 volts et 10 à 6 volts. Cette première série est suivie d'un repos de 3 à 5 minutes.

La deuxième série comprend 10 stimuli à 5 volts, 10 à 6 volts et 10 à 7 volts. Cette série est également suivie d'un repos de 3 à 5 minutes.

La dernière série comporte 10 stimuli à 6 volts et 10 stimuli à 7 volts.

L'électroéjaculation est la technique la plus utilisée car elle possède de nombreux avantages :

L'animal est anesthésié donc aisément manipulable, aucun conditionnement n'est nécessaire, le sperme est de même qualité que lors de prélèvement par vagin artificiel [130].

Le besoin d'anesthésie reste néanmoins un facteur gênant car elle doit être pratiquée pour chaque prélèvement.

Il semble également que la muqueuse rectale puisse être irritée par de telles manipulation [120] et que cette technique soit génératrice de stress.

Une fois récoltée la semence peut être analysée afin d'estimer sa qualité et la fertilité de l'animal.

2.5.2.2 Analyse de la semence

L'analyse de la semence se fait en deux étapes : une analyse descriptive puis fonctionnelle

2.5.2.2.1 Analyse descriptive :

La première approche de l'analyse est descriptive, différents paramètres sont relevés :

- Le volume et le pH de l'éjaculat

Le volume de l'éjaculat est immédiatement lu sur le tube collecteur gradué

Chez le lion le volume moyen obtenu pour un éjaculat d'adulte vivant dans les plaines du Serengeti est de 6 ml, il n'est plus que de 3,4 ml pour les lions du Cratère de Ngorongoro [10]. Chez le guépard la moyenne générale est de 1,3 ml [132]

Le pH est évalué à l'aide de papier pH.

- La concentration

La concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat est déterminée par une méthode manuelle à l'aide d'un hématocytomètre ou par une méthode automatique par un compteur Coulter [57]

La concentration en spermatozoïdes dans l'éjaculat de guépard est estimée à $27,3 \cdot 10^6$ spz/ml [132]. Elle atteint $12,3 \cdot 10^6$ spz/ml chez les lions du Serengeti et $11 \cdot 10^6$ spz/ml chez les lions du Cratère [10].

- La mobilité et la mobilité progressive

Celles-ci sont évaluées par examen de la semence sous microscope.

Au moins 5 μ l d'éjaculat est placé sur une plaque chauffante pour être maintenu à 37°C et observé sous microscope sous des grossissements x 250 à x 400.

La mobilité moyenne est estimée en pourcentage et à l'œil.

Pour évaluer la mobilité progressive des spermatozoïdes, on les classe en 5 catégories [57] :

Catégorie 0 : La mobilité est nulle

Catégorie 1 : Légers mouvements de côté sans progression vers l'avant

Catégorie 2 : Mouvements modérés de côté avec une progression vers l'avant occasionnelle.

Catégorie 3 : Faible progression vers l'avant

Catégorie 4 : Progression vers l'avant

Catégorie 5 : Progression rapide vers l'avant.

Le guépard possède en moyenne 70% de spermatozoïdes mobiles [133], les lions adultes des plaines du Serengeti 89 % et ceux du Cratère du Ngorongoro 59 %.

La mobilité progressive est de 3,7 chez le guépard, 4,1 chez les lions du Serengeti et de 2,9 chez les lions du Cratère de Ngorongoro.

Pour déterminer la mobilité générale des spermatozoïdes en considérant à la fois le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et la mobilité progressive, on calcule l'Index de Mobilité Spermatique (SMI) [57] :

$SMI = [\text{mobilité spermatique (\%)} + (20 \times \text{mobilité progressive})] / 2.$

Il faut noter également que la semence récoltée par électroéjaculation contient généralement un volume plus important, une plus faible concentration et un pH plus élevé que lorsqu'elle est collectée par vagin artificiel [57].

- Morphologie des spermatozoïdes

La morphologie des spermatozoïdes est évaluée après fixation d'un aliquote de 20 µL d'éjaculat dans 0,5 ml de solution physiologique saline contenant 1% de glutaraldéhyde [57].

L'observation s'effectue avec un microscope à contraste de phase. 200 spermatozoïdes par aliquote sont observés à un grossissement x 1000.

Les méthodes de coloration sont variables, on peut utiliser une coloration au nitrate d'argent ou une coloration rapide au rose bengal.

Les spermatozoïdes normaux et anormaux sont comptés, les anormaux sont classés en différentes catégories selon leur type d'anormalité.

Les spermatozoïdes normaux morphologiquement sont en 3 régions principales (*figure 29*) : la tête, la pièce intermédiaire et la pièce principale.

La pièce intermédiaire et la pièce principale forment ensemble la queue ou flagelle du spermatozoïde [80].

La tête du spermatozoïde contient le noyau et l'acrosome qui occupe la majeure partie du volume.

L'acrosome se situe antérieurement et recouvre d'ordinaire le noyau par des échancrures profondes.

Le matériel cytosquelettique se trouve dans l'espace constitué par l'acrosome et la surface extérieure de la membrane nucléaire.

Le noyau est plus petit que dans la plupart des autres cellules somatiques et la chromatine est plus condensée.

L'acrosome est une extension de l'appareil de Golgi issu du développement des spermatides pendant les derniers stades de la spermatogenèse. Il contient de nombreuses enzymes hydrolytiques nécessaires au passage des spermatozoïdes à travers la zone pellucide de l'ovule. D'autres enzymes aident à la fusion avec l'ovule.

Le flagelle du spermatozoïde permet l'action de la force locomotive nécessaire pour atteindre l'ovocyte et aussi dans le processus de pénétration lors de la fertilisation.

Le flagelle des mammifères est long et peut être divisé en quatre parties : la pièce de connexion, la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce finale.

A l'intérieur même du flagelle se trouvent l'axonème, les mitochondries gainées, les fibres denses extérieures et les gaines fibreuses.

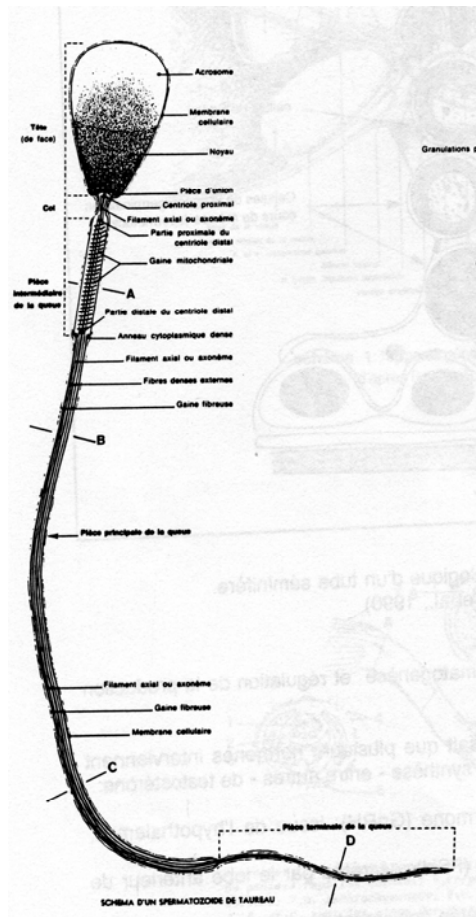


Figure 29:

**Morphologie normale d'un spermatozoïde.
D'après Barone, 78 (Thevenin [120])**

Les spermatozoïdes anormaux morphologiquement (*figure 30*) peuvent être classés en deux catégories [133]: primaires et secondaires en fonction du moment supposé de la malformation.

Ainsi les malformations primaires sont dues à un problème au niveau de la spermatogénèse et comprennent les flagelles enroulés, les défauts d'acrosome, l'absence de gaine mitochondriale, les spermatozoïdes micro et macrocéphaliques, bicéphaliques et biflagellés.

Les malformations secondaires sont dues à une anomalie durant le trajet dans les conduits déférents et comprennent les spermatozoïdes avec pièces intermédiaires courbes avec ou sans gouttelette cytoplasmique, queue ou pièce de connexion courbes.

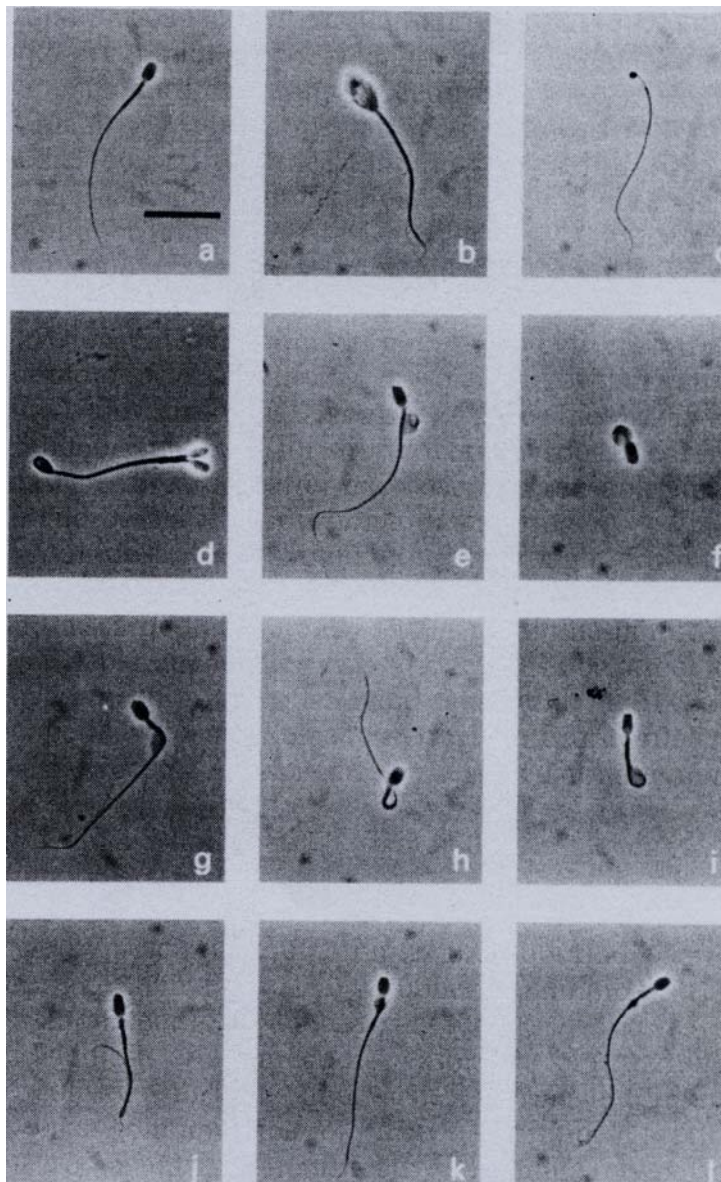


Figure 30:

Diverses anomalies morphologiques rencontrées chez les spermatozoïdes de guépards.

D'après Howard 93 [57].

- a) Normal
- b) Macrocéphalique
- c) Microcéphalique
- d) Bicéphalique
- e) Acrosome anormal
- f) Flagelle courbe
- g) Pièce intermédiaire (PI) avec gouttelette cytoplasmique.
- h) PI sans gouttelette cytoplasmique
- i) Flagelle courbe avec gouttelette cytoplasmique
- j) Flagelle courbe sans gouttelette cytoplasmique
- k) Gouttelette cytoplasmique proximale
- l) Gouttelette cytoplasmique distale.

La fréquence des malformations structurales est variable en fonction des espèces. On sait que la fréquence est bien moins élevée chez les canidés que chez les félidés.

Néanmoins des variations sont également énormes chez les espèces de félidés.

Il est reconnu que le guépard possède un taux de spermatozoïdes très élevé (70-80%), taux que l'on retrouve également chez les populations restreintes de lion telles que les populations du Cratère du Ngorongoro et chez le lion asiatique (60%)[10 ; 52 ; 57 ; 127 ; 128 ; 137].

En revanche chez les lions des plaines du Serengeti on retrouve un taux raisonnable de spermatozoïdes anormaux (30%) [130] .

On peut d'ores et déjà se poser la question de l'influence de la faible variabilité génétique chez ces petites populations sur le pourcentage de spermatozoïdes anormaux et la corrélation avec la fertilité de ces espèces [72].

Pour estimer la capacité du sperme à fertiliser des ovules, d'autres analyses sont néanmoins nécessaires.

2.5.2.2.2 Evaluation de la fonction spermatique [57] :

Des analyses plus poussées sont nécessaires pour évaluer la capacité des spermatozoïdes à fertiliser. Pour cela on utilise trois techniques :

- L'essai de pénétration de l'ovule conservée dans une solution hypertonique de chlorure de sodium
- L'essai de pénétration de l'ovule de hamster dépellucidée
- L'essai de pénétration de l'ovule pellucidée

L'essai de pénétration de l'ovule conservée dans une solution hypertonique de chlorure de sodium est utilisée pour déterminer les besoins des spermatozoïdes pour la capacitation *in vitro* [54 ; 57].

La capacitation est le processus physiologique par lequel les spermatozoïdes acquièrent la capacité à fertiliser un œuf et entraîne la suppression ou l'altération des composants associés à la surface des spermatozoïdes.

L'essai consiste en la conservation de l'ovule dans une solution hypertonique de chlorure de sodium puis en la co-incubation de l'œuf et des spermatozoïdes dans un milieu de culture, et plus tard en l'évaluation de la pénétration de l'œuf.

La conservation dans le chlorure de sodium de l'ovule détruit sa capacité à bloquer la polyspermie donc plusieurs spermatozoïdes peuvent pénétrer l'espace péri vitellin. Le nombre de spermatozoïdes ayant pénétré est un index quantitatif de la capacitation dans une population spermatique.

Cette technique a été utilisée chez le guépard avec des ovules de chat domestique (*figure 31*) pour déterminer l'équipement nécessaire à la capacitation des spermatozoïdes de guépard.

Les électroéjaculats de dix guépards sont dilués et co-incubés dans une solution de médium Ham's F-10 contenant soit aucune protéine, soit du sérum albumine bovin ou du sérum de veau fœtal. Les spermatozoïdes de guépard ont été capable de pénétrer l'œuf avec des taux différents cependant en fonction du milieu : 35% avec du sérum de bœuf et 49% avec du sérum de veau fœtal mais seulement 7% avec un milieu sans protéine.

Ces résultats permettent d'orienter et d'utiliser des milieux adaptés pour permettre une capacitation correcte des spermatozoïdes récoltés.

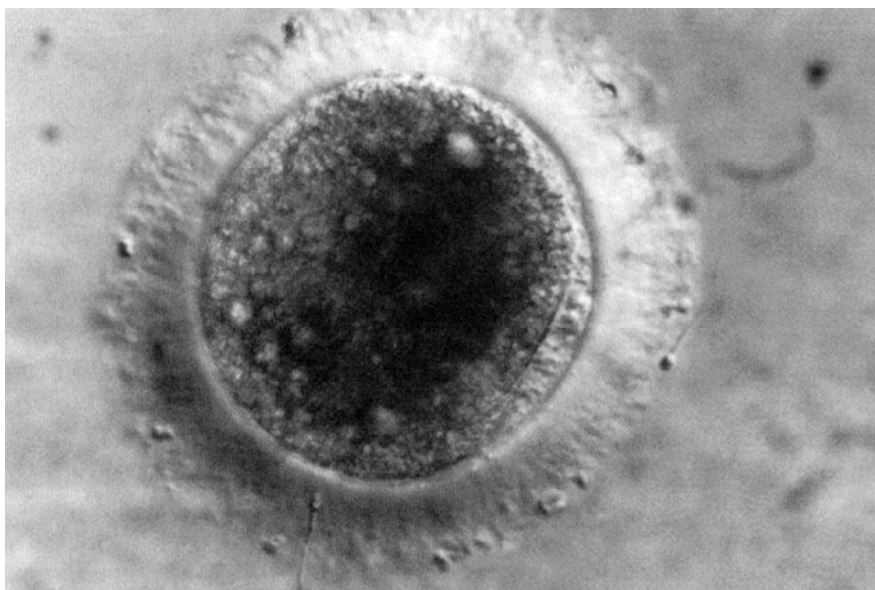


Figure 31 :

Ovule de chatte domestique conservée par une solution de chlorure de sodium et co-incubée avec des spermatozoïdes de guépard. Les spermatozoïdes sont accolés à l'ovule, d'autres sont localisés au niveau des couches externes et internes de l'ovule.

D'après Wildt and al 93 [133].

L'essai de pénétration de l'ovocyte de hamster dépellucidé mesure la capacité d'un spermatozoïde à pénétrer l'œuf et à subir la décondensation nucléaire avec le vitellus.

Cet essai repose sur la capacité de l'ovocyte de hamster sans zone pellucide à être pénétré par un spermatozoïde hétérologue.

Pour cela, les ovules sont traités avec de la hyaluronidase et de la trypsine pour supprimer respectivement les cellules du cumulus et la zone pellucide.

Ces ovules débarrassés de leur zone pellucide sont placés dans un milieu de culture contenant des spermatozoïdes et la pénétration est évaluée plus tard et définie par la présence de spermatozoïdes gonflés ou à têtes décondensées avec un flagelle correspondant dans le vitellus. Ce test est utilisé pour étudier l'impact de la tératospermie sur la pénétration de l'ovule.

Il s'est avéré lors d'une étude effectuée à la fois chez le chat domestique et chez les félidés sauvages que le taux de pénétration est cinq fois supérieur chez le individus normospermiques c'est à dire avec un pourcentage de formes normales de spermatozoïdes supérieur à 60% par rapport aux individus tératospermiques c'est-à-dire avec une semence contenant moins de 40% de spermatozoïdes normaux.

Ceci nous amène à la conclusion que la tératospermie constatée plus haut chez le guépard et les lions du Cratère de Ngorongoro a une influence certaine sur la fonction spermatique de ces individus.

L'essai de pénétration d'ovule pellucidée, contrairement au deux essais précédents évalue la capacité d'un spermatozoïde à s'accoler puis à pénétrer la zone pellucide. Cet essai utilise des ovocytes collectés à partir de follicules antraux et peut être utilisée chez les félinés sauvages car les ovocytes avec zone pellucide intacte peuvent être récoltés après le décès de l'animal et il est également possible d'utiliser des ovocytes de chat domestique sans que cela influence la capacité des spermatozoïdes à pénétrer les ovocytes.

Comme lors de l'essai précédent le taux de réussite de cet essai est influencé par le taux de spermatozoïdes anormaux dans l'éjaculat. Les individus ayant un fort taux de tératospermie ont un très faible taux de pénétration des ovocytes.

Pour le guépard les spermatozoïdes normaux et anormaux s'ils sont issus d'individus normospermiques peuvent s'accoler à la zone pellucide mais pour pouvoir pénétrer l'ovocyte au niveau de la couche extérieure, les spermatozoïdes doivent quasiment tous être normaux (à 84 %) et pour être à l'intérieur de la zone il est indispensable qu'ils soient normaux.

Cet essai montre que tous les spermatozoïdes peuvent s'accoler à la zone pellucide mais que seuls les normaux peuvent pénétrer.

Les deux derniers essais cumulés confirment que les spermatozoïdes issus d'individus tératospermiques ont une pénétration d'ovocyte compromise à tous les stades [107] : l'accolement à la zone pellucide, la pénétration et la décondensation nucléaire.

D'une manière plus générale il est considéré aujourd'hui que la tératospermie compromet sérieusement la capacitation par une régulation inadéquate des mécanismes cellulaires associés à la capacitation, la réaction acrosomique par des dommages accentués de l'ADN et sa décondensation incomplète et la pénétration de la zone pellucide d'où une incapacité à fertiliser les ovocytes comme cela avait déjà été mis en évidence chez le chat [53].

Dans un but expérimental une biopsie peut être effectuée afin d'analyser les caractéristiques histomorphologiques des testicules [82].

2.5.3 La biopsie

Les animaux sont préalablement anesthésiés, le scrotum est préparé et nettoyé chirurgicalement puis on incise le scrotum, les tuniques vaginales et albuginée avec une lame de scalpel stérile. Une pression douce est ensuite appliquée des deux côtés du testicule et le parenchyme testiculaire formant une petite protubérance à cet endroit est excisé et fixé dans une solution.

Les échantillons de testicules sont ensuite déshydratés, scellés avec de la paraffine et des sections de 7µm sont réalisées et sont ensuite colorées à l'hématoxyline et éosine.

Les tubes séminifères sont alors étudiés et considérés comme témoins directs de la spermatogenèse.

On regarde le pourcentage de tubes séminifères, le nombre de spermatides par tubule et l'aspect histologique des cellules de Leydig.

Dans une étude portant sur les populations de lions issues des plaines du Serengeti et du cratère du Ngorongoro (*figure 32*) Munson et son équipe [82] ont pu observer que la spermatogenèse était active et évidente sur chaque biopsie pour chaque population.

Or bien que le diamètre des tubules séminifères soit identique dans les deux populations, les lions issus du Cratère ont moins de tubes séminifères avec des spermatides (84% chez les lions du Serengeti et 64% chez les lions du Cratère) ainsi que moins de spermatides par tube.

D'autre part l'ensemble des espaces interstitiels dont les cellules de Leydig est plus grand chez les lions du Cratère et peut parfois comprimer les vaisseaux. Les lions du Cratère présentent donc proportionnellement moins de parenchyme testiculaire occupé par des tubes séminifères.

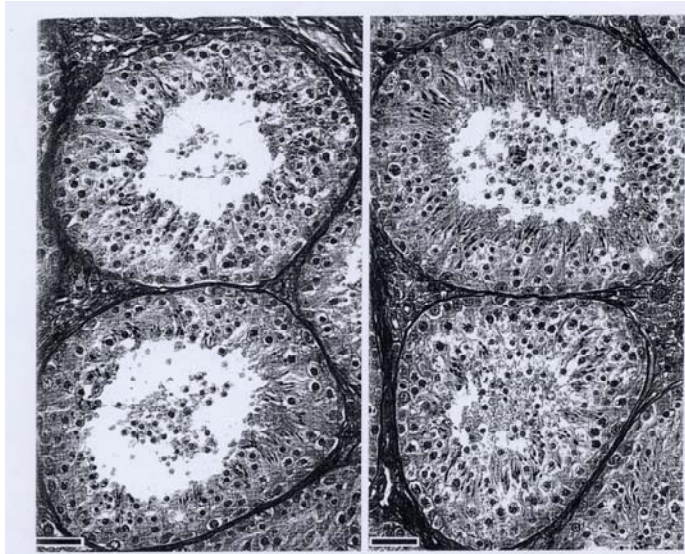


Figure 32 :
Photomicrographie de testicules de lions du Cratère de Ngorongoro (à droite) avec moins de spermatides que ceux du Serengeti (à gauche). D'après Munson [82].

Ces résultats montrent alors un problème lors de la différenciation terminale aux dernières étapes de la spermatogenèse chez les lions du Cratère qui n'est pas présente chez les lions du Serengeti. Des spermatozoïdes avec des défauts de développement sont libérés prématurément par les cellules de Sertoli et la quantité de sperme est moindre. On retrouve un phénomène comparable chez les guépards. Une atrophie des tubes séminifères révélée par biopsie peut concourir à un problème de fertilité [37].

Ces observations confirment la présence de problèmes réels lors de la formation des spermatozoïdes à la fois chez le guépard et chez certaines populations de lions.

Le phénomène de tératospermie semble donc être un des facteurs essentiels de la faiblesse de la reproduction de ces espèces menacées et a donc été très largement étudié. Plusieurs causes ont été mises en avant sans qu'aucune n'ait été résolument prouvée aujourd'hui.

2.6 La recherche des causes de la tératospermie chez les félidés sauvages

Plusieurs hypothèses ont été émises à ce jour, les plus importantes étant le stress lors de la détention en captivité ou lors du prélèvement, le manque de variabilité génétique et une insuffisance hormonale.

2.6.1 Le stress.

Le stress peut être quantifié et objectivé par la mesure du taux de cortisol présent dans les fèces ce qui permet d'éviter le stress causé par sa propre mesure [36].

On peut d'ores et déjà éliminer l'hypothèse de la cause du stress lors de l'électroéjaculation car des essais de prélèvement par vagin artificiel ont donné exactement les mêmes résultats chez le guépard [133].

D'autre part chez le lion les mêmes protocoles sont utilisés chez les lions du Serengeti et les lions du Cratère de Ngorongoro et les résultats sont très différents.

De plus chez le guépard l'influence de l'électroéjaculation a été évaluée et comparée à une injection d'ACTH.

Si une augmentation en cortisol est bien notée en fin d'électroéjaculation elle est réellement inférieure à celle suivant une injection d'ACTH et ne semble pas influencer sur les concentrations hormonales de testostérone et de LH, responsables de la spermatogenèse.

Le stress induit par le maintien en captivité a également été évoqué mais là encore les résultats obtenus chez des animaux captifs ou libres ne diffèrent pas.

En liberté, le stress environnemental comme les changements climatiques ou la destruction de l'habitat a probablement une influence non négligeable sur le potentiel reproducteur de ces espèces et sur leur conservation et augmente naturellement leurs dépenses en énergie. Il n'est néanmoins pas évident qu'il ait une action directe sur la tératospermie localisée des lions et des guépards [98; 99]

2.6.2 L'origine génétique

Les populations ayant un taux de tératospermie important que nous avons déjà cité (les lions du Cratère du Ngorongoro, les lions asiatiques et les guépards) ont un point commun : ce sont toutes des populations de taille réduite pour lesquelles la consanguinité est assez fréquente [95 ; 130].

2.6.2.1 Les lions

Les lions du Cratère de Ngorongoro ont subi une ou plusieurs périodes de rétrécissements de populations appelées « goulots d'étranglement » La plus récente est liée à l'importance des pluies torrentielles qui se sont abattues sur le Cratère en 1961 et à l'épizootie de stomoxes (mouches piqueuses) en 1962 [95 ; 131]. Les lions du cratère ont développé des maladies de peau dévastatrices les empêchant de chasser leur proies.

Ces catastrophes écologiques ont réduit la population de cratère à 7 femelles et 1 mâle.

On considère que la population actuelle descend de ces lions ainsi que de 7 mâles ayant migré des plaines du Serengeti entre 1962 et 1969.

Aucune migration supplémentaire n'a eu lieu depuis. Aujourd'hui la centaine de lions du cratère sont issus de ces 15 individus.

La population est stable et entretenue grâce à l'abondance d'herbivores non migratoires. En effet le cratère du Ngorongoro est un volcan éteint situé à l'ouest du Gregory Rift au nord de la Tanzanie. Il est immédiatement accolé aux plaines du Serengeti à l'ouest.

Au nord, au Sud et à l'Est une forêt dense prédomine et le désert est présent à l'ouest. Le terrain riche et les pluies modérées sont idéaux pour une population d'herbivores non migratoire.

De la même manière les lions d'Asie ont vu leur nombre réduit par la chasse et les activités humaines à une population de très petite taille ayant subi une énorme contraction au début du XXème siècle. Ils furent réduits à environ 20 individus, les 250 lions présents aujourd'hui dans le forêt de Gir descendent donc de ces 20 individus [131].

Pour montrer le manque de variation génétique supposé chez ces petites populations on retiendra une étude réalisée par Packer en 1991 [95] établissant une comparaison de fréquence d'allèles polymorphes au niveau de plusieurs loci enzymatiques entre les lions du Cratère du Ngorongoro et les lions du Serengeti. Cette étude a montré que le pourcentage d'hétérozygotie des lions du Cratère était de 2,2% alors qu'il était de 3,3 % pour les lions du Serengeti.

Une autre étude réalisée par Yuhki et O'Brien en 1990 (relatée par Packer [95]) et basée sur une comparaison au niveau du Complexe Majeur Histocompatibilité (CMH) qui est un des complexes génétique les plus polymorphes a également montré la moindre variété génétique des lions du Cratère : ils ne présentaient qu'un tiers de la variabilité observée chez les lions du Serengeti.

Ce manque de variabilité des populations chez le lion a également été mis en corrélation avec le nombre important de formes anormales de spermatozoïdes [82 ; 95; 131] est reconnu comme étant une de ses causes possibles.

2.6.2.2 Les guépards

De la même manière le guépard semble avoir subi un ou plusieurs « goulots d'étranglement » au cours de son histoire ce qui a entraîné nombre d'accouplements consanguins menant aujourd'hui à des individus génétiquement très proches.

Pour mettre cette uniformité génétique en évidence plusieurs études ont été menées [87]

Une électrophorèse classique sur échantillon sanguin a été entreprise sur les guépards du Centre De Wildt [87] et ont mené au résultat qu'aucune des 52 protéines évaluées ne présente de variation électrophorétique. Les guépards étudiés étaient donc homozygotes pour chaque locus protéique.

Pour préciser ces résultats des électrophorèses sur gel à deux dimensions ont été effectuées et les résultats obtenus sur 155 protéines ont montrés un polymorphisme de 3% soit moins de 1/3 du polymorphisme habituellement observé chez d'autres espèces, même parmi les autres espèces de félidés.

Une autre manière de mesurer la diversité génétique des individus est l'étude des caractères morphologiques des crânes. En effet lors de consanguinité importante les crânes présentent une asymétrie des côtés gauche et droit. Une fois de plus, les guépards s'affirment comme étant consanguins à un degré très important en présentant une asymétrie bien plus grande et bien plus fréquente que d'autres espèces de félinés.

De plus comme chez le lion, le polymorphisme du CMH a été étudié [87] et ce par le biais de greffes de peaux. Lors de cette étude sur 6 paires de guépards non apparentés et 1 paire issue des mêmes parents, des allogreffes et des autogreffes ont été réalisées.

L'uniformité des guépards fut une fois de plus mise en évidence par l'acceptation de toutes les allogreffes et par la non différenciation de celles-ci avec les autogreffes au cours des 10 à 13 premiers jours.

Le guépard présente donc une grande uniformité génétique due à la consanguinité établie depuis plusieurs générations [87 ; 88].

Il semble également que cette homogénéité génétique soit mise en cause dans le fait que les guépards soient particulièrement sensibles à de nombreuses infections telle que la péritonite infectieuse féline, si bien que la présence de celle-ci dans un groupe de guépard puisse provoquer une réelle épizootie.

La tératospermie observée chez les populations consanguines de guépard et de lion semble donc avoir un lien important avec l'homogénéité génétique de ces espèces.

Une autre hypothèse qui a été avancée pour expliquer ce taux anormalement élevé de spermatozoïdes et qui n'est pas incompatible avec la précédente est le taux de testostérone.

2.6.3 L'origine hormonale

Comme nous l'avons vu plus haut la testostérone joue un rôle important dans la spermatogenèse. Il est donc naturel d'envisager que si son taux est trop faible la spermatogenèse ne peut pas se faire correctement et donc la libération de formes anormales de spermatozoïdes peut avoir lieu.

De manière similaire au dosage des hormones chez les femelles, les hormones mâles peuvent être dosées dans les fèces [14 ; 119] ou dans le sang [26].

Il a été effectivement noté chez le guépard un taux circulant de testostérone significativement plus faible que dans d'autres espèces [26 ; 37] d'où une possible corrélation entre la faible qualité de l'éjaculat et la faible concentration de testostérone [26].

Cependant la relation entre la stimulation de LH et la testostéronémie semble respectée et une injection de GnRH augmente significativement la concentration en LH et en testostérone sériques [129].

D'autre part il semble que chez le guépard, une trop grande sécrétion de testostérone empêche la formation ou la libération de spermatozoïdes [129].

Il semble donc qu'il n'y ait pas de relation directe entre la relative faible concentration en testostérone chez le guépard mais il semble plutôt qu'il s'agisse de variations interspécifiques [129]. Il existe de même des variations de ce taux entre les individus.

Il n'est donc pas prouvé que le taux de testostérone soit trop faible chez le guépard pour provoquer une malformation des spermatozoïdes. D'autre part les différentes populations de lion étudiées (Serengeti, Ngorongoro, Asie) ne présentent pas de variations notables pour la concentration de testostérone circulante [14].

Celui-ci n'est donc probablement pas la cause de la tératospermie chez ces populations.

L'homogénéité génétique semble donc aujourd'hui être la cause principale de la faiblesse reproductive du guépard et des petites populations isolées de lion. Or même si l'apparition de guépards royaux présentant des caractères morphologiques différents donne l'espoir d'un commencement de regain de diversité génétique chez le guépard, celui-ci peut être très long avant qu'une réelle diversité apparaisse et pour cela une reproduction active doit être maintenue.

C'est pourquoi il semble indispensable aujourd'hui d'aider ces espèces à survivre et donc à se reproduire dans des conditions optimales.

Pour cela plusieurs méthodes sont envisagées : des programmes spécifiques en captivités sont mis en place et des techniques de reproduction assistée sont appliquées à ces espèces.

Troisième Partie :

Reproduction Assistée

Dès que les problèmes d'extinction se sont posés des plans de sauvegarde par reproduction en captivité se sont développés.

1. Programmes en captivité

Les recherches ont été poussées chez le guépard pour qui la reproduction en captivité est difficile [27].

1.1 Le guépard

La reproduction du guépard en captivité est un réel problème puisque moins de 30% de la population captive réussi à produire des jeunes [87].

La première reproduction en captivité s'est produite en 1956 à Philadelphie alors que des guépards sont maintenus en captivité depuis le début du XXème siècle. La première reproduction en France a eu lieu en 1968 puis en 1970 [100].

Il semble cependant que la captivité n'ait pas d'effet sur la qualité de la semence mais en revanche elle aurait un rôle à jouer sur le nombre de naissances [72].

Chez le guépard, la reproduction en captivité peut être réduite par divers facteurs d'entretien qui ont été très étudiés ces dernières années afin d'améliorer le taux de reproduction dans les zoos.

1.1.1 La nourriture

La nourriture est un facteur important de l'entretien du guépard en captivité.

En effet, les guépards sont très sensible à la fraîcheur de la viande qui leur est apportée [79 ; 100].

Des viandes telles que lapins ou poulets entiers doivent être fraîchement tués [100], la viande de bœuf doit être inspectée par un personnel compétent à l'abattoir de manière à ne pas introduire de salmonellose ou de tuberculose au sein des populations de guépard.

D'autre part certains lots de viande peuvent contenir de grandes quantités d'hormones de croissance qui peuvent influencer sur l'état hormonal des animaux [79].

A la viande doit être ajouté un supplément en cuivre, thiamine, vitamines A et E ainsi qu'en acides gras essentiels. Le rapport phospho-calcique doit être réajusté à 1/1.

Les adultes mangent approximativement 2kg de viande par jour pendant 6 jours et sont laissés à jeun le septième.

Les femelles gestantes sont nourries environ 1/3 de plus que le régime standard, sa ration étant augmentée graduellement durant le dernier mois [79].

De plus il faut vérifier l'absence de phytoestrogènes dans la nourriture car il a été prouvé que celle-ci causaient à la fois de nombreuses maladies du foie et des problèmes d'infertilité liés à une fibrose utérine importante [115].

1.1.2 L'état sanitaire

D'autre part, l'uniformité génétique évoquée plus haut fait du guépard une espèce particulièrement sensible aux maladies infectieuses [83].

En effet, une étude portant sur la mort de 69 guépards de 1975 à 1995 [83] a montré que les guépards étaient particulièrement sensibles aux gastrites, gloméruloscléroses, maladies véno-occlusives. Ces trois maladies représentent à la fois chez les jeunes et chez les adultes 50% des cas de décès ou d'euthanasie.

Si les guépards sont soumis à des situations de stress, ils peuvent facilement déclencher une hyperplasie corticosurrénale, une déplétion lymphatique de la rate ou une fibrose cardiaque.

Les jeunes sont en plus très sensibles à des pneumonies et des septicémies.

Dès qu'une maladie infectieuse se déclare, celle-ci devient très importante chez le guépard et elle peut être responsable d'une réelle épizootie chez cette espèce [79]. Nous avons également déjà évoqué la salmonellose et la tuberculose qui heureusement rare avec les précautions prises lors de la distribution de viande.

Devant cette hypersensibilité à toute maladie qui peut se présenter, les zoos ont mis en place de réels protocoles de vaccination afin de limiter l'incidence de toutes ces maladies.

En Afrique du Sud les guépards sont vaccinés annuellement contre la panleucopénie, la rhinotrachéite infectieuse et les calicivirus. Les jeunes guépards sont vaccinés à huit semaines et trois mois.

Une fois toutes les précautions prises à l'égard de cet animal très sensible qu'est le guépard, il existe également des règles à observer concernant la reproduction pour espérer obtenir une certaine efficacité [79 ; 102].

1.1.3 La Gestion de la reproduction

En effet quelques principes gouvernent une bonne gestion de la reproduction chez les guépards :

1.1.3.1 Surveillance du poids

Dans la nature, les guépards sont très actifs mais en captivité ils deviennent plutôt inactifs car ils n'ont plus à chasser pour se nourrir, ne craignent plus les prédateurs et le risque d'une telle situation est un surpoids important pouvant compromettre la reproduction.

1.1.3.2 Choix des reproducteurs

Le mâle est choisi selon des critères de fertilité connus. Les mâles utilisés sont en général des mâles ayant déjà reproduit [108].

Généralement c'est le mâle sélectionné qui détermine quelle femelle est la plus apte à reproduire lorsqu'il est mis en sa présence. C'est la technique utilisée dans les zoos disposant de couloirs longeant les enclos des femelles : le mâle est lâché dans les couloirs et détecte la femelle la plus réceptive.

Si le zoo ne dispose pas de couloirs de ce type la détection des chaleurs se base sur les modifications de comportement des femelles et est très difficile à repérer [108].

1.1.3.3 Mise en contact

Il est important de n'autoriser qu'un contact intermittent entre les deux sexes. En effet lorsqu'ils sont gardés ensemble un trop long moment, il semble qu'une habitude s'installe et que le mâle ne soit plus intéressé par la femelle alors que s'ils sont mis en présence par intermittence cela augmente d'une part l'intérêt que le mâle porte aux femelles mais aussi provoque des oestrus plus souvent chez les femelles [79].

Il est également nécessaire de mettre en contact les femelles avec les mâles une fois avant la date prévue pour la copulation puis de la retirer et de l'y remettre une deuxième fois pour le coït, l'attraction des animaux n'en est que plus importante et la réussite est plus grande [77 ; 79].

La méthode la plus utilisée notamment à Whipsnade (Angleterre) et Sigeon (Afrique du Sud) est de n'autoriser aucun contact visuel, auditif ou olfactif avant la période de chaleurs de la femelle [100].

Il est également préférable de libérer plus d'un mâle dans l'enclos des femelles car les interactions entre animaux augmentent le sens de la compétition et l'intérêt pour les femelles. Ceci influence également le comportement des femelles : le comportement d'oestrus est exacerbé en présence de plusieurs mâles [79].

Les mâles sont laissés un ou deux jours et cela est suffisant [79], les comportements sexuels n'étant souvent extériorisés que sur une journée en captivité [71].

Le dernier point important à respecter est de déranger les guépards le moins possible avec les activités humaines par exemple des constructions de bâtiments ne doivent pas avoir lieu pendant les périodes de reproduction [79].

1.1.3.4 Gestation et mise bas

Le diagnostic de gestation est souvent difficile à établir, les modifications physiques et comportementales des femelles gestantes étant très frustes. Les seules méthodes utilisables sont alors la cytologie et les dosages hormonaux décrits précédemment mais peu utilisés à cet effet.

Si la gestation est néanmoins détectée, les femelles sont nourries environ 1/3 de plus que le régime standard, sa ration étant augmentée graduellement durant le dernier mois [79].

La mise bas est rarement observée car la présence de l'homme est un facteur de stress pour les femelles guépard.

1.1.4 L'évaluation de la qualité de l'environnement

Pour finalement évaluer la qualité de l'environnement proposé aux guépards et donc savoir s'ils sont dans les meilleures conditions possibles pour se reproduire on peut apprécier par observation le comportement maternel des femelles, les interactions entre les jeunes et leurs mères et le comportement des mâles vis-à-vis des femelles.

Il est également nécessaire de collecter toutes les données disponibles sur le passé reproducteurs des animaux et également d'étudier l'habitat avec précision de manière à ce qu'il se rapproche le plus possible de la vie sauvage : arbres, buissons et autre végétation [31]. Si le comportement ressemble au comportement observé à la vie sauvage, le changement et l'enrichissement de l'environnement ne sont pas nécessaires. Dans le cas contraire ils sont préférables pour permettre une reproduction correcte.

Malgré toutes ces précautions et ces attentions la reproduction du guépard n'est pas évidente en captivité. On peut néanmoins noter de nombreux progrès et un taux de réussite plus important ces dernières années.

1.2 Le lion

Le lion ne rencontre pas le même type de difficultés de reproduction que le guépard puisqu'il se reproduit presque aussi aisément en captivité que dans la nature.

C'est pourquoi dans les années 1970 se sont développés de nombreux programmes de reproduction d'animaux captifs en danger dans un cadre structuré le SSP (Species Survival Programme) sous la direction l'association des zoos et aquariums américains (AZA).

En 1981 l'AZA a établi un programme de survie pour le lion asiatique, celui-ci étant près de l'extinction et la population fortement consanguine risquait de compromettre la pérennité de l'espèce.

Ce plan mettait en œuvre une coopération entre les différents zoos possédant des lions asiatiques, ceux-ci descendant tous de 7 animaux fondateurs.

Cependant il fut rapporté de nombreuses fois et certifié par O' Brien and al en 1987 [142] que la majorité de la population captive de lions asiatiques n'était pas pure mais souvent mêlée à la population africaine.

Ces résultats ayant été obtenus par comparaison de la population captive et de la population vivant dans la forêt de Gir, le plan de reproduction a été interrompu et un nouveau programme établi en 1990 incluant des établissements européens.

Cela commença par la réception de 4 lions (2 mâles et 2 femelles) par le zoo de Londres et provenant d'Asie et étant de lignée pure.

Les zoos de Zurich et de Helsinki ont ensuite reçu également des lions asiatiques en 1991 et 1992.

A la fin de l'année 1996, 12 zoos participaient à ce programme de reproduction.

Dans les deux espèces envisagées, la reproduction en captivité semble être une aide précieuse à leur survie malgré des difficultés spécifiques d'espèce. Néanmoins ces programmes sont très longs à mettre en place et il peut se passer un certain temps avant que leur efficacité soit relevée.

C'est pourquoi à ces programmes se rajoutent différentes méthodes de reproduction assistée dont le but est également de permettre à ces espèces une reproduction efficace.

Il existe de nombreuses méthodes de reproduction assistée. Certaines sont très développées chez le guépard et le lion (insémination artificielle,), d'autres plus récentes le sont moins (transfert embryonnaire, fécondation in vitro) et certaines ne sont pas encore explorées chez ces espèces (congélation d'embryon, ICSI, SUZI).

2.1 L'insémination artificielle

L'insémination artificielle est la plus ancienne méthode de reproduction assistée et encore la plus utilisée chez le guépard et le lion.

Elle consiste au dépôt de semence directement dans les voies génitales femelles sans passer par le coït.

La première étape de cette technique est alors l'induction de l'ovulation chez la femelle afin d'inséminer au moment le plus opportun.

2.1.1 L'induction de l'ovulation

Cette étape est nécessaire d'une part à la synchronisation des femelles si on désire en inséminer plusieurs en même temps et d'autre part pour être sûrs que la fécondation est possible au moment où on insémine.

2.1.1.1 Protocoles utilisés chez le guépard

De nombreux protocoles sont utilisés chez le guépard associant des analogues des hormones naturelles destinées à provoquer dans un premier temps la maturation folliculaire (eCG ou FSH purifiée) puis l'ovulation (hCG) [103].

Auteurs	Induction de la maturation Folliculaire	Induction de l'ovulation	Résultats de l'ovulation (nb femelles)
Wildt (1981)	10mg FSH porcine 5j	500 UI hCG 6 et 7j chaleurs	3/8
Goodrowe (1991)	1600 UI eCG	750 UI hCG 82-84h ap eCG	2/4
Howard (1992)	200 UI eCG 400 UI eCG	100 UI hCG 80h ap eCG 250 UI hCG 80h ap eCG	4/4 (grands CL) 4/4 (petits CL)
Howard (1997)	100 UI eCG 200 UI eCG 400 UI eCG	100 UI hCG 80h ap eCG 100 UI hCG 80h ap eCG 250 UI hCG 80h ap eCG	1/6 13/18 (grand CL) 5/5 (petits CL)

Tableau 1: Récapitulatif des protocoles d'induction de l'ovulation chez le guépard

Les premiers protocoles utilisés [126] consistent en des injections de 10mg de FSH porcine dans 1 ml de solution saline tous les jours pendant 5 jours.

Le comportement de chaleurs est observé et les femelles guépard reçoivent 500 UI d'hCG le 6^{ème} et 7^{ème} jour après le début des chaleurs.

Les résultats sont évalués après examen des ovaires par laparoscopie à différents moments (J0,J6,J7) et les corps hémorragiques (qui suivent immédiatement l'ovulation), les follicules matures ou non et les corps jaunes sont décomptés.

Le protocole s'avère être efficace puisque dans la majeure partie des cas on observe des corps hémorragique et/ou des follicules matures. Néanmoins avec un tel protocole il est impossible de déterminer précisément le moment de l'ovulation car il n'y a pas eu de laparoscopie tous les jours.

Aujourd'hui les protocoles les plus utilisés sont à base de eCG par voie intramusculaire pour la maturation folliculaire et d'hCG pour déclencher l'ovulation environ 80h après l'injection de eCG [24 ; 34 ; 56 ; 58].

Pour les doses d'hormones injectées plusieurs protocoles ont été testés[24 ; 34 ; 56 ; 58]. Un dosage faible (200 UI eCG - 125 UI hCG) et un dosage fort (400 UI eCG – 250 UI hCG) ont été comparé[56].

La laparoscopie a été effectuée entre 42,5 et 47h post hCG..

Les résultats montrent qu'on obtient 2 fois plus d'ovulation avec le dosage fort mais que cela a également une influence sur la morphologie des follicules :

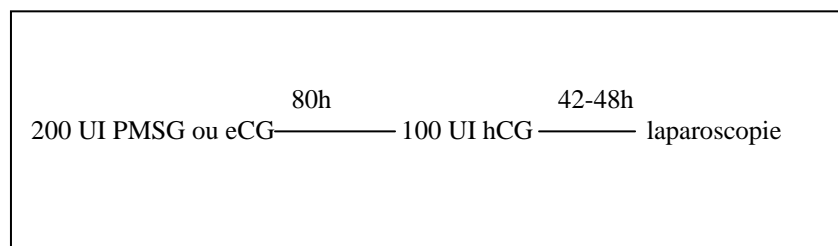
Lorsque la dose forte est utilisée on obtient de petits corps lutéaux de 2 à 4 mm de diamètre et pâles alors qu'avec un faible dosage on obtient des corps lutéaux de meilleure qualité, de 5 à 8 mm de diamètre et permettant la présence d'une gestation complète.

Avec ce faible dosage on se rapproche à de ce qui se passe lors d'ovulation naturelle aussi bien morphologiquement que quantitativement.

On peut supposer que les follicules n'ayant pas ovulé lors de des forts dosages vont avoir tendance à sécréter des oestrogènes en excès et compromettre la conception et l'implantation de l'embryon même s'il y a un bon taux de progestérone sécrété par les corps jaunes.

Une autre étude plus récente a confirmé ce choix d'un protocole utilisant ces doses: 200UI d'eCG et 100 UI d'hCG semblent les plus efficaces [58 ; 59].

Depuis ce protocole est adopté pour provoquer l'ovulation de la femelle guépard :



2.1.1.2 Protocoles utilisés chez le lion

Chez le lion le nombre de protocoles est plus restreint car les publications concernant les inséminations artificielles de lion sont moindres également.

Cependant deux protocoles coexistent et sont radicalement différents.

Le premier et le plus ancien consiste en l'observation dans un premier temps du comportement de chaleur de la lionne, celui-ci étant plus expressif que chez la guépard en captivité. Puis 5 à 7 jours après le début des chaleurs une injection de 1000 UI d'hCG est réalisée pour provoquer l'ovulation et l'insémination est réalisée juste après.

Si néanmoins cette méthode n'est pas satisfaisante il est possible de faire une injection de GnRH dosée à 100-200 µg 12h avant l'insémination [9].

La méthode la plus récente a été utilisée par Armstrong et son équipe en 2004 au zoo d'Omaha aux Etats-Unis [1].

L'objectif de l'étude n'était pas de faire suivre cette manipulation par une insémination artificielle mais une récolte l'ovocyte, manipulation qui nécessite également une stimulation préalable de la maturation folliculaire à son maximum donc jusqu'au stade le plus proche possible de l'ovulation.

Les lionnes ont alors subi dans un premier temps une injection de 50 UI de FSH porcine purifiée et 80h heures plus tard un implant de desloreline (OVUPLANT®) a été placé sur le thorax latéral au-dessus de la scapula pour stimuler la maturation ovocytaire finale.

L'ovulation n'a pas été provoquée chimiquement mais les lionnes ont subi une laparoscopie exploratrice 24h plus tard et la présence de corps hémorragiques et de corps lutéaux montre que l'ovulation avait commencé

Auteurs	Induction de la maturation Folliculaire	Induction de l'ovulation	Résultats de l'ovulation (nb femelles)
Bowen (1982)	observations comportementales	1000 UI d'hCG au 5 ^è chaleurs	
Armstrong (2004)	50g FSH porcine	implant de desloréline 80h ap FSH	3/3

Tableau 2: Récapitulatif des protocoles d'induction de l'ovulation chez le lion

2.1.2 L'importance du lieu et du temps de l'insémination

Il est très important voire primordial de définir le moment le plus approprié pendant l'œstrus. Le meilleur moyen de contrôler la fonction ovarienne est soit de mesurer les paramètres endocriniens comme vu précédemment ou de visualiser directement les structures ovariennes par laparoscopies comme dans les études précédemment citées en attendant le développement de l'échographie sur ces espèces [21].

Chez les félidés en règle générale l'insémination a plus de chance de réussir si elle est réalisée après que l'ovulation ait commencé.

Par exemple chez le guépard l'ovulation est présumée comme ayant lieu 40 heures après l'injection d'hCG.

C'est pourquoi les inséminations « post-ovulatoires » c'est à dire ayant lieu quand les femelles ont au moins déjà un corps jaune, sont réalisées à 43-48h après l'injection d'hCG chez la guéparde [58 ; 59].

Mais il semble également que l'anesthésie perturbe l'ovulation chez les félidés et l'ovulation est de meilleure qualité si elle a lieu avant que l'animal soit anesthésié [55].

Le moment de l'insémination se révèle donc être un paramètre crucial de la réussite de l'insémination. L'endroit choisi pour inséminer est tout aussi important.

En effet il existe plusieurs possibilités : le dépôt de la semence peut se faire par voie intravaginale, intra cervicale ou en intra-utérine.

Les plus faciles, plus accessibles et moins traumatisantes semblent être à première vue les voies intravaginale et intracervicale c'est pourquoi des essais ont été dans un premier temps réalisés par ces voies. Or les 23 tentatives réalisées chez le guépard se sont révélées être toutes des échecs de gestation [60].

Pour éviter ce problème des techniques d'insémination artificielle par voie intrautérine ont été développées. Celles-ci consistent au dépôt de sperme dans la corne utérine par laparoscopie. Le dépôt doit avoir lieu le plus près possible du site de fertilisation c'est à dire l'oviducte [60]. Les résultats de ces techniques sont plus satisfaisants que ceux obtenus par voies intravaginale et intracervicale : on obtient 6 gestations sur 13 inséminations soit un taux de réussite de 46% [58].

Pour qu'une insémination artificielle ait toutes les chances de réussir il faut donc associer un timing précis (40h post hCG chez la guéparde) et la voie intrautérine qui semble la plus apte à donner des résultats.

L'insémination artificielle peut ensuite être réalisée à l'aide de 3 catégories de semence : la semence fraîche, c'est à dire utilisée quasiment immédiatement après la récolte, réfrigérée ou congelée.

2.1.3 Les différents types d'utilisation de la semence

Après le prélèvement de la semence par électroéjaculation dans la plupart des cas la semence peut être utilisée immédiatement en semence fraîche ou plus tard et doit alors subir une réfrigération et le plus souvent une congélation.

2.1.3.1 Utilisation en semence fraîche

La semence récoltée peut alors être utilisée immédiatement, les spermatozoïdes gardent leur mobilité pendant 1 heure à 37°C et jusqu'à 140 minutes à 23°C [73] mais elle peut également subir préalablement quelques manipulations avant d'être introduite dans les voies vaginales femelles.

La semence est diluée puis centrifugée[56 ; 58]:

1.5 ml de semence de guépard est diluée avec 1.5 ml de diluant commercial contenant 5% de sérum de veau fœtal traité à la chaleur.

L'ensemble est ensuite centrifugé 10 minutes à 300g, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 200-300 µl de diluant froid.

La semence diluée est laissée à température ambiante jusqu'à l'insémination.

La dilution permet d'avoir un plus grand volume à introduire dans les voies génitales.

On utilise en moyenne 250-300µl par femelle [56].

Les premiers jeunes guépards obtenus par insémination artificielle ont été obtenus avec semence fraîche en 1992 [56].

Le principe est le même avec la semence de lion : le sperme est centrifugé pendant 10 minutes à 1470g, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu avec 200µl de plasma séminal.

On obtient ainsi un volume total de 0.3 à 0.6 ml [9].

L'avantage principal de la semence fraîche est le fait que la fertilité est maintenue avec un nombre relativement peu important dans un inséminât alors qu'avec de la semence congelée le nombre de spermatozoïdes doit être plus important (jusqu'à 15 fois supérieur) pour atteindre les mêmes résultats [135].

D'autre part si la semence est diluée suffisamment dans un environnement liquide adéquat comme ceux décrits plus haut, la fertilité peut être maintenue jusqu'à 3 à 5 jours à température ambiante (10 à 21°C) puis diminue ensuite de 6 % par jour [135].

La fertilité peut néanmoins être maintenue plus longtemps par l'ajout d'antioxydants, d'agents chélateurs ou de composés aromatiques. Des antibiotiques peuvent être également ajoutés pour éviter la croissance des microorganismes ou même réduire leur nombre et surtout pour réduire la possibilité de transmission de la maladie [135].

L'insémination en semence fraîche a donc l'avantage de préserver la fertilité des spermatozoïdes et a été sans doute la méthode la plus utilisée ces dernières années. Pour préserver la semence un peu plus longtemps, la réfrigération est une méthode possible également.

2.1.3.2 Utilisation en semence réfrigérée

La semence est mélangée à un diluant, refroidi et conservé à 5°C.

Cette procédure autorise une conservation comprise entre une nuit et 5 à 7 jours voir même jusqu'à 14 jours pour la semence de chat [73].

Les études ont été très poussées sur les différents diluants pour trouver l milieu idéal pour limiter les dommages induits par le froid sur la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes.

Dans de nombreux diluants le jaune d'œuf est utilisé comme cryoprotecteur mais il apparaît qu'il n'augmente pas de la même manière la survie des spermatozoïdes chez les félinés.

De plus les monosaccharides (glucose, fructose, galactose) semblent être de très bons substrats énergétiques en général mais dans le cas du sperme félin aucun n'apporte d'avantage supplémentaire.

D'autre part le taux de refroidissement influence également la survie des spermatozoïdes [106]. En effet l'intégrité morphologique des spermatozoïdes semble moins affectée par un refroidissement lent que par un refroidissement rapide.

En pratique, le protocole utilisé chez les félinés reste néanmoins le suivant :

Semence
+
diluant Tes-Tris 1 :1(acide trishydroxyméthyl amino méthane sulfonique) à 292-325mOsm/kg
+
jaune d'œuf

Ce protocole permet la conservation d'une mobilité à 51,4% pour la semence prélevée par éjaculation et 69% pour la semence prélevée à partir de l'épididyme. La semence de félinés peut ainsi être conservée pendant 5 jours [73].

La réfrigération de semence est donc une alternative lorsque l'utilisation en semence fraîche n'est pas possible. Chez le guépard et chez le lion, l'utilisation de semence fraîche ou congelée est pourtant souvent préférée.

Le développement de méthodes de congélation de semence est de plus en plus important aujourd'hui et semble être de plus en plus utile pour la sauvegarde des espèces en danger.

2.1.3.3 Utilisation en semence congelée

La technique de congélation de semence apporte plusieurs avantages :

Elle réduit le problème de l'éloignement entre les reproducteurs : on peut transporter la semence au lieu de transporter l'animal.

Elle permet ainsi d'essayer de ramener un peu de diversité génétique chez les espèces qui en sont privées en évitant les accouplements consanguins.

Elle permet la création d'une véritable banque génétique par la conservation de sperme d'animaux rares ou décédés et dont la semence pourra être utilisée ultérieurement, plusieurs fois.

Il s'agit des « frozen zoo » ou de la Genome Ressource Bank (Banque de ressource génomique) [134 ; 139].

La « banque de ressource génomique » (GRB) offre en effet l'opportunité d'une stratégie de conservation d'espèces en danger par assistance effective de la gestion génétique des populations captives [135].

L'intérêt est grandissant et le but ultime est de réintroduire ces populations en milieu sauvage [3].

La GRB centralise la collection, le traitement, la conservation et l'utilisation des gamètes, des embryons et de tout matériel génétique.

Elle est en association directe avec les techniques de reproduction assistée (ART). Cette association facilite la gestion et la conservation des espèces en danger et a le potentiel pour déceler la perte de diversité génétique dans les populations captives en réintroduisant le matériel génétique original sans retirer les individus de la vie sauvage [134].

Le concept n'est néanmoins pas nouveau, il existe depuis longtemps pour les plantes et les ressources culturelles.

Les objectifs sont divers, le premier étant l'application aux espèces sauvages en réduisant les problèmes de distance et le nombre d'animaux vivants nécessaire pour assurer la diversité génétique.

Ainsi la cryoconservation est une priorité qui a pour but de s'affranchir des difficultés à obtenir une bonne fertilité et il est alors possible d'utiliser des espèces plus communes pour propager les espèces en danger (exemple des transferts d'embryons entre espèces).

Pour cela il est nécessaire de développer une grande coopération au niveau global, régional, nationale et aux communautés locales ainsi qu'une collaboration des scientifiques des différentes disciplines.

Il est également nécessaire de prendre des mesures quantitatives pour sélectionner avec le plus grand soin les espèces à mettre en banque et d'avoir des bases de données sérieuses sur les animaux utilisés.

La première utilisation réussie de semence congelée pour l'insémination artificielle du guépard a été réalisée en 1997 [59].

Cette expérience a donné lieu à la gestation de 2 femelles sur 6 inséminées avec 6 et 15.10^6 spermatozoïdes et préalablement traitées avec 200 UI d'eCG et 100 UI d'hCG..

Ces deux femelles ont donné naissance à 1 et 3 jeunes.

Le sperme utilisé a été prélevé chez des guépards sauvages en provenance Namibie, congelés et transportés en Amérique du Nord pour inséminer 9 femelles guépard.

Basés sur ce qui existait déjà chez les autres carnivores comme les canidés ou pour les animaux de rente, des protocoles de congélation adaptés aux caractéristiques de la semence des félidés ont vu le jour ces dernières années.

Avant la congélation, le sperme est refroidi à 4°C [30] ou 5°C [73] dans un milieu contenant une solution tampon d'acide trishydroxyméthyl amino méthane sulfonique à pH 7.4 [30] comme pour la réfrigération.

A ce milieu est rajouté cependant des agents cryoprotecteurs, le plus utilisé étant le glycérol. Celui-ci est utilisé à une concentration de 4%, la semence des félidés semblant particulièrement sensible à de fortes concentrations [73].

Le sperme des félidés est également très sensible aux changements d'osmolalité et l'ajout de cryoprotecteur en plusieurs étapes avec une solution isotonique minimise les pertes de mobilité et les interruptions de membrane [73].

Pour le moment aucun diluant idéal pour la semence des félidés n'a encore été mis au point. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le protocole suivant :

Semence
+
diluant Tris (1 :1)
+
20% de jaune d'œuf
+
4% de glycérol
+
taux de congélation de 3.85°C/min.

L'ajout de taurine comme antioxydant à 25 ou 50mM peut être envisagé car la mobilité semble davantage préservée après décongélation [73].

Après refroidissement l'ensemble est distribué dans des paillettes ou des ampoules ou des pastilles et exposé à de la vapeur d'azote liquide par suspension 4 à 5 cm dans de l'azote liquide avant l'immersion et conservation finale.

La diminution de température peut être programmée et est souvent de $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 5°C à -80°C avant immersion totale dans le liquide.

Pour décongeler la semence stockée, les techniques diffèrent en fonction de la conservation. Les paillettes décongelent rapidement dans une eau à 35°C , les ampoules décongelent lentement dans des bains de mélange eau/ glace pendant 10 minutes.

Les pastilles sont décongelées rapidement en les plongeant dans une solution saline à 0.9% réchauffée à 37°C [73].

La congélation de semence est une procédure qui s'avère donc aujourd'hui très utile et en développement dans le domaine des espèces sauvages. Elle se heurte néanmoins à des problèmes techniques : elle ne conserve pas autant l'intégrité des spermatozoïdes que l'utilisation en semence fraîche.

En effet l'exposition au froid est responsable de dommages pour les spermatozoïdes ce qui rend la fertilité par insémination artificielle plus faible par cette méthode que par l'utilisation en semence fraîche.

L'exposition au froid diminue la mobilité des spermatozoïdes, ainsi que la mobilité progressive et altère la morphologie avec une grande diminution de l'intégrité acrosomique.

La réaction acrosomique est alors prématurée et la durée de vie des spermatozoïdes limitée.

Les spermatozoïdes issus de congélation seraient également responsables d'une plus importante mortalité embryonnaire précoce.

D'autre part il est nécessaire de préciser que les spermatozoïdes provenant d'individus tératospermiques (guépard, petites populations de lion) est plus sensible aux effets de la congélation que ceux provenant d'individus normospermiques (lion du serengeti).

En effet dans une étude comparant les deux sortes d'individus [106] ont montré que les mâles normospermiques gardent une grande proportion de membranes intactes après un stress hypotonique ce qui n'est pas le cas des individus tératospermiques ce qui montre que les mâles normospermiques et les mâles tératospermiques ont des caractéristiques membranaires différentes ce qui modifie les conditions requises pour la congélation et la cryoconservation.

Il semble bien que les individus possédant un nombre élevé de spermatozoïdes anormaux aient plus de difficultés à résister aux différents stress imposés par la congélation.

Les différentes utilisations de semence ont toutes leurs avantages et leurs inconvénients, l'utilisation en semence fraîche étant la plus utilisée jusqu'à maintenant, celle en semence congelée semblant être très prometteuse. Quelque soit le type de semence utilisée elle n'influence pas la technique d'insémination.

2.1.4 Les techniques d'insémination artificielle

La technique d'insémination artificielle peut être non chirurgicale, elle s'effectue alors en intravaginale ou en intracervicale par utilisation d'une sonde d'insémination adaptée.

2.1.4.1 Insémination intracervicale

Cette technique très utilisée chez la chienne se révèle être complètement inefficace chez la femelle guépard mais peut être utilisée avec succès chez la lionne [9].

Au 5^{ème} jour de ses chaleurs la lionne est anesthésiée avec de la xylazine à 1mg/kg, placée sur le dos, son arrière-train élevé à 45° environ.

Un spéculum lubrifié est introduit dans le vagin. L'aiguille à insémination est insérée via le spéculum jusqu'à l'os cervical, le bout émoussé de l'aiguille est inséré aussi loin que possible à une profondeur totale de 17 à 23 cm de la commissure vulvaire.

La semence est doucement introduite et la lionne est maintenue avec son arrière-train relevé pendant la durée de l'anesthésie.

Cette technique semble efficace puisque dans 3 cas sur 5 la femelle avait produit des embryons [9]

2.1.4.2 Insémination intrautérine

L'insémination intrautérine est la seule utilisée avec des résultats positifs chez la femelle guépard. Elle peut se faire par laparoscopie ou par laparotomie, la première étant la plus utilisée car moins traumatique.

La technique d'insémination par laparoscopie (*figure 33*) consiste au dépôt de semence directement au niveau de la corne utérine à l'aide d'un cathéter inséré par une incision abdominale [60]

Les femelles induites à l'ovulation par les procédés précédemment cités sont anesthésiées par une injection intramusculaire de tilétamine et zolazépam (5.8-6.8 mg/kg).

L'anesthésie est maintenue avec de l'isoflurane ou halothane pendant toute la durée de l'opération [56]. La femelle guépard doit subir dans un premier temps une laparoscopie destinée à visualiser l'état des organites ovariens avant une insémination potentielle.

Tout d'abord une aiguille est insérée latéralement à la ligne médiane produit un pneumopéritoine (*Figure 33 A*).

Cette aiguille est reliée à un bulbe d'insufflateur manuel.

Un trocart cannelé de 12 mm de diamètre est inséré à travers une incision de 2 cm située 4cm crânialement à l'ombilic. Le trocart est retiré et remplacé avec un laparoscope rigide de 10 cm de diamètre attaché à une source de lumière.

Le ovaire sont examinés et les follicules pré-ovulatoires et les corps lutéaux post-ovulatoires sont recherchés. Une fois l'activité ovarienne explorée, un forceps est inséré à 3cm latéralement de l'ombilic pour stabiliser chaque corne (*Figure 33 B*).

L'utérus est relevé contre la paroi abdominale et un cathéter stérile, de 18,5 cm de long est inséré sous laparoscopie en percutané dans le premier tiers de la lumière utérine (*Figure 33C*). Le stylet du cathéter est enlevé et remplacé dans un tube de polyéthylène stérile contenant la suspension de sperme.

Le tube est inséré au-delà de l'extrémité du cathéter et dans la lumière utérine et le sperme dilué est expulsé dans la lumière en utilisant environ 0.4 ml d'air délivré par une seringue de 1ml [56] (*Figure 33 D*).

On injecte en moyenne 100-150 µl de suspension dans chaque corne de la même manière [58], on retire tous les instruments et on suture les sites des incisions.

L'anesthésie aura duré environ 60-120 minutes alors que la technique en elle-même dure seulement en moyenne une trentaine de minutes.

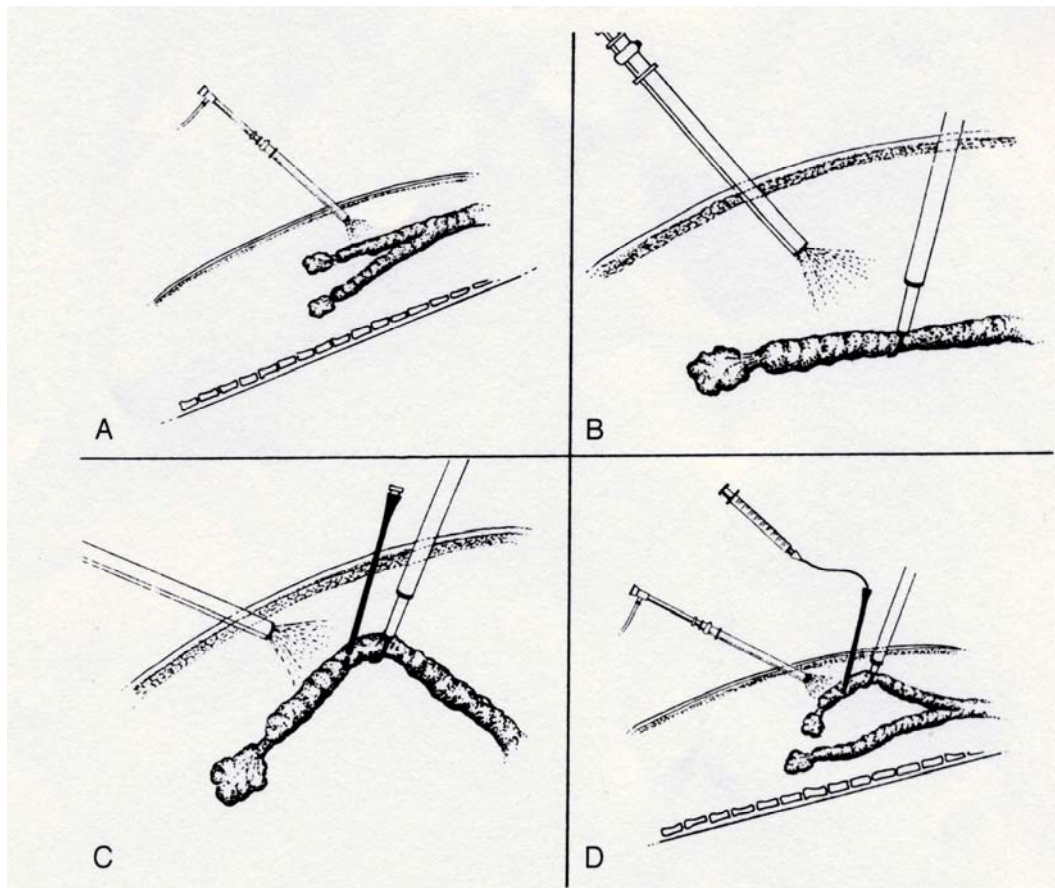


Figure 33 :

La technique d'insémination artificielle intrautérine par laparoscopie

A : Identification de l'appareil génital par le laparoscope

B : Stabilisation des cornes par les forceps

C : Elévation de la corne, introduction du cathéter dans la paroi abdominale

D : Dépôt de sperme dans le corne

D'après Howard 92 [55]

La technique d'insémination artificielle par voie laparoscopique est maintenant une technique très rodée chez le guépard et donne de plutôt bon résultats en semence fraîche et plus récemment en semence congelée.

La technique d'insémination artificielle est la plus ancienne des techniques de reproduction assistée et on voit apparaître aujourd'hui de nouvelles techniques qui peuvent lui être associées ou non, la plus connue étant la fécondation *in vitro*.

2.2 La fécondation *in vitro*

Cette technique a déjà beaucoup été utilisée pour comprendre les interactions ovocyte/spermatozoïde, la relation avec la tératospermie et le rôle de celle-ci.

Cette méthode est très étudiée aujourd'hui afin d'être appliquée aux félidés exotiques sur le modèle du chat. Le premier félidé sauvage à avoir été utilisé pour la fécondation *in vitro* est le léopard [33]. La technique a ensuite été adaptée aux autres espèces.

L'utilisation de la fécondation *in vitro* offre l'opportunité de contrôler le facteur génétique des populations captives en danger. Les spermatozoïdes et ovocytes collectés peuvent provenir d'individus choisis pour générer des embryons *in vitro* qui pourront alors être congelés si besoin.

Lors fécondation *in vitro*, les femelles subissent des protocoles de superovulation en injectant des doses d'hormone plus importantes que celles qui sont nécessaires afin d'obtenir un nombre de follicules plus important.

Cependant cette technique bien qu'utile et très utilisée a des effets délétères et non souhaités sur la fonction reproductrice des femelles : le développement ovocytaire peut s'avérer être anormal (hétérogénéité des stades de développement à l'ovulation, augmentation des embryons polyploïdes et trisomiques, fertilisation réduite), le développement folliculaire peut présenter des défauts (pic de LH prématuré, suppression de l'ovulation, ovulation prématurée), un déclenchement d'hyperoestrogénisme induit par les gonadotrophines utilisées, diminution de l'efficacité de ces gonadotrophines lors d'utilisation ultérieure [3].

Ces techniques de superovulation sont donc à utiliser avec précautions.

La technique de fécondation *in vitro* se divise en cinq étapes distinctes que nous allons étudier ici.

La première étape est la récolte des gamètes puis il est nécessaire de provoquer la maturation des ovocytes récoltés et la capacitation des spermatozoïdes puis ils seront mis en présence pour la maturation et enfin la dernière étape consiste en la culture des embryons.

2.2.1 La récolte des gamètes.

Les méthodes de récolte des spermatozoïdes ne diffèrent pas de celles étudiées jusqu'ici, la plus utilisée étant l'électroéjaculation chez le guépard et le lion.

La récolte des gamètes femelles comprend la récupération de follicules ovariens et d'ovocytes.

Le follicule ovarien est l'unité morpho-fonctionnelle ovarienne et est constitué de l'ovocyte et des cellules somatiques. Il est essentiel pour la viabilité de l'ovocyte car il assure la croissance et la maturation de l'ovocyte immature pour finalement le libérer lorsqu'il est mûr à l'ovulation.

Il est donc envisageable de prélever soit le follicule entier pré-antral, lequel poursuivra la maturation de l'ovocyte *in vitro* soit de prélever directement les ovocytes [117].

2.2.1.1 Récolte de follicules pré-antraux [61].

L'avantage que pourrait avoir cette méthode serait d'augmenter l'utilisation d'ovocytes par activation des phases initiales de développement. Les follicules pré-antraux semblent être capable de se développer *in vitro* jusqu'à la phase antrale.

Les ovaires de lionnes et de femelles guépard notamment ont été récupérés après ovario-hystérectomie au maximum 8 heures après la mort des animaux. Les ovaires sont immédiatement déposés dans une solution saline avec 1% de solution d'antibiotiques et de fongicides.

Les ovaires sont ensuite lavés trois fois dans la solution saline et les ovaires sont disséqués dans leur moitié et la medulla est enlevée. Le cortex, épais de 1 à 2 mm est pressé avec précautions à travers un tamis de dissociation cellulaire. Cette suspension cellulaire est ensuite passée à travers une série de tamis en nylon avec des trous de 200, 100 et 40 µm.

Le tamis de 40 µm est rincé avec 10 ml de la solution saline de manière à récupérer toutes les cellules mesurant entre 40 et 100 µm de diamètre.

La suspension de follicules obtenue est centrifugée à 300g pendant 5 minutes et resuspendu dans 1 mL de milieu de culture.

Dans cette étude menée par Jewgenow la dissection de ces ovaires a permis l'isolement de nombreux follicules pré-antraux : 0 à 12500 par ovaire.

L'observation de ceux-ci par microscopie a révélé que la population de follicules était constituée de 80 à 90% de follicules primordiaux ou primaires et de 10 à 20% de follicules secondaires.

Cependant la procédure d'isolation mécanique a provoqué la perte de 50 à 80 % de viabilité des follicules..

Les meilleurs résultats ont été atteints par la récupération d'ovocytes de lions : ils ont ainsi obtenu un taux de conception de 31, 6% [116] en utilisant cette technique de récolte d'ovocytes.

Cependant la procédure d'isolation mécanique a provoqué la perte de 50 à 80 % de viabilité des follicules sans pour autant altérer la morphologie des cellules.

La récupération de follicules pré-antraux est donc possible chez les félinés et est intéressante dans l'objectif de la fécondation *in vitro*. Néanmoins il reste le problème de la perte de viabilité à surpasser et d'autres études sont également nécessaires afin de bien maîtriser la maturation de ces ovocytes ainsi que leur congélation.

2.2.1.2 Récoltes d'ovocytes

Pour cela plusieurs techniques sont utilisées :

- L'ovum pick-up

On peut commencer par citer la technique de l'ovum pick-up très utilisée pour le bétail qui consiste en l'insertion d'une sonde ultrasonographique dans le vagin ou le rectum de la femelle et récupération des ovocytes par ponction. Cette technique est en attente de développement chez le guépard et le lion chez lesquels on ne dispose pas encore de sonde adaptée.

- La dissection de l'ovaire

Comme nous l'avons vu précédemment la récolte d'ovocytes peut également se faire par dissection de l'ovaire [61] avec isolation mécanique 8 heures maximum après la mort de l'animal ou après laparotomie sur animal vivant [104].

Les ovocytes sont récupérés après laparotomie le long de la ligne médiane ventrale. Ils sont collectés dans des tubes en plastique stériles contenant une solution tampon avec 5% de sérum de veau nouveau-né et 10 UI d'héparine par ml. Le milieu de récolte contient également des antibiotiques (pénicilline et streptomycine et des sources d'énergie (glutamine, pyruvate, glucose, calcium).

Les ovocytes sont ensuite maintenus à environ 37°C dans un milieu sans héparine pendant toute la période de la récolte.

Les ovocytes qui apparaissent normaux sont sélectionnés et utilisés plus tard pour la fécondation *in vitro*.

Deux heures après la récolte les ovocytes sont placés dans 1mL solution tampon de bicarbonate.

- La laparoscopie

La dernière technique utilisée pour la récupération d'ovocytes est la laparoscopie [26].

Elle est de loin préférable à la laparotomie car beaucoup moins invasive.

Elle s'effectue le plus souvent après traitement aux gonadotrophines afin de provoquer la maturation folliculaire et d'induire l'ovulation et même parfois d'induire une super ovulation, le but étant de récolter le maximum d'ovocytes possible.

La technique de laparoscopie est la même que pour l'insémination utérine. Les structures ovariennes sont observées et évaluées sous laparoscope.

Une aiguille de calibre 22 et de 4 cm de long, attachée à un tube de polyéthylène est rincée dans 2-3 ml d'une solution contenant 10% de sérum de veau fœtal et 40 UI/ml d'héparine.

Un tube collecteur siliconé est attaché à la partie libre du tube de polyéthylène et le système d'aspiration est conduit par une pompe .

Les follicules distincts de diamètre supérieur à 1.5mm sont perforés avec l'aiguille pendant qu'une légère pression négative (100mmHg) est appliquée par la pompe.

Après que tous les follicules d'un ovaire aient été aspirés le tube collecteur et l'aiguille d'aspiration sont remplacés et la procédure est la même pour l'ovaire controlatéral.

Les tubes collecteurs sont vidés dans des récipients en plastique et les ovocytes sont examinés par stéréomicroscopie.

Quelque soit la technique utilisée les ovocytes sont ensuite évalués et classés selon leur état de maturité.

Les ovocytes entourés de cellules de cumulus et d'une corona radiata apparaissent noir de façon homogène et sont classés comme excellents.

Les ovocytes classés comme acceptables maintiennent une apparence noire au niveau du noyau avec quelques couches de densité compacte au niveau du cumulus. Les ovocytes dégénérés n'ont pas de cumulus et ont un cytoplasme pâle [34].

Les ovocytes dégénérés sont éliminés du protocole de fécondation *in vitro*.

Les ovocytes ainsi récoltés doivent ensuite subir l'étape de la maturation.

2.2.2 La maturation ovocytaire

La maturation ovocytaire est un processus complexe faisant intervenir en association le noyau, le cytoplasme et le cytosquelette simultanément de manière à rendre les cellules capables de fertiliser[116].

Les ovocytes récupérés et classés excellents ou corrects nécessitent la culture dans un milieu spécifique pendant 24h [104] à 30-36h [4] avant la co-incubation avec les spermatozoïdes[6].

Les milieux utilisés pour le guépard et le lion sont présentés en annexe 3.

La maturité de ces ovocytes après ce traitement peut être évaluée immédiatement après par fixation des ovocytes pendant 3 à 5 jours dans un mélange d'acide acétique glacial et de méthanol et coloration Giemsa [62].

Les ovocytes sont classés matures si les chromosomes sont en télophase I ou métaphase II.

Si les ovocytes sont destinés à une fécondation *in vitro* ils sont alors mis en présence de spermatozoïdes et la maturité est évaluée par leur capacité à fertiliser ou non.

Chez le lion, on obtient par ces techniques une maturation d'environ 25% des ovocytes [4] et chez le guépard seuls 16,7% des ovocytes sont mûrs après traitement[62].

Il est donc nécessaire de rendre les ovocytes matures avant de réaliser la fertilisation *in vitro* mais il est également nécessaire que les spermatozoïdes subissent quelques transformations lors de la capacitation.

2.2.3. La capacitation des spermatozoïdes

La capacitation est un processus complexe pendant lequel les changements des constituants membranaires cellulaires renforcent la préparation du sperme à pénétrer un ovocyte [116].

Les méthodes de capacitation *in vitro* sont de nature plutôt empirique depuis les premiers essais sur le hamster en 1963. Les milieux sont relativement variables en fonction des espèces et utilisent des milieux contenant du calcium, à pH contrôlé avec du bicarbonate et contenant également des sources de protéines comme du sérum albumine bovin ou du sérum de veau fœtal [6].

Il n'existe pas de milieu idéal, celui-ci est très variable d'une espèce à l'autre de même que la durée d'incubation nécessaire.

Les protocoles utilisés pour le lion et le guépard sont en annexe 4

On pourra noter que pour le guépard de bons résultats sont obtenus lorsque les spermatozoïdes sont mis en incubation avec de la sérum albumine bovine (35% de capacitation) ou du sérum de veau fœtal (49%) et faibles si aucune source de protéine n'est présente (7%) [57].

Une fois que les ovocytes ont subi la maturation *in vitro* et les spermatozoïdes la capacitation *in vitro*, ils peuvent être soumis à la fertilisation.

2.2.4 La fécondation *in vitro* ss

La fertilisation est le mécanisme le mieux connu de la fécondation *in vitro*.

Il s'agit de la liaison du spermatozoïde à l'ovocyte aidé par les protéines liées réciproquement aux deux cellules et de la pénétration des différentes couches de l'ovocyte par l'action à la fois de la propulsion mécanique du spermatozoïde et des enzymes libérées par l'acrosome.

Les spermatozoïdes capacités et les ovocytes matures sont donc mis en présence lors de cette phase (*Figure 34*) .

Les protocoles utilisés sont exposés en annexe 5.

Le temps de co-incubation varie selon les études : après 12h [62], 16h [1] ou 18h [34] de co-incubation, les ovocytes sont rincés plusieurs fois dans une solution contenant 0.2% de hyaluronidase et débarrassés mécaniquement des cumulus restant.

Les ovocytes sont ensuite replacés dans un milieu neuf avec une goutte d'huile et sont cultivés encore pendant 12 à 18h et évalués ensuite entre 25 et 42h après la mise en présence des spermatozoïdes pour la fertilisation [34].

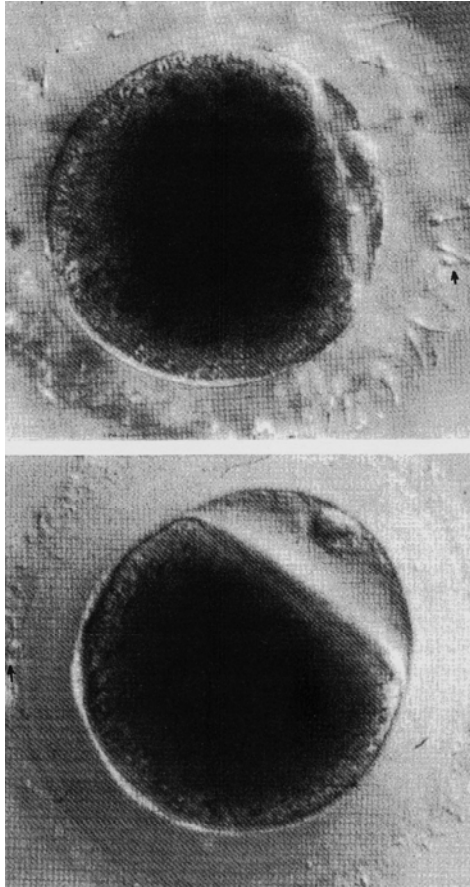


Figure 34 :

Pénétration conspécifique d'ovocytes par des spermatozoïdes de guépard.

D'après Donoghue 92 [26]

Les critères de fécondation retenus sont basés sur la présence de deux globules polaires, deux pronucléi et le clivage au stade 2 cellules minimum.

Les ovocytes qui ne se sont pas clivés sont fixés, colorés et examinés pour évaluer le stade qu'ils ont atteint.

Les ovocytes qui ont atteint le stade deux cellules ou plus sont classés en fonction de leur qualité : les embryons de bonne à excellente qualité sont parfaitement symétriques, sphériques et complètement noirs. Les embryons sont classés de faible qualité s'ils sont partiellement dégénérés, de couleur pâle ou contenant des blastomères lysés [26].

Après cet examen les embryons se replacent en milieu de culture et poursuivent leur développement

2.2.5 La culture des embryons *in vitro*

Les embryons sont donc replacés dans un milieu de culture neuf et identique au précédent et sont examinés à 24h [62], 48 et 72h [26], 110h [1] et évalués pour le stade de développement.

2.2.6 Les résultats obtenus chez le guépard et le lion.

Chez le lion, les résultats sont plutôt positifs puisque plusieurs études ont montré la possibilité de fertiliser des ovocytes de lion *in vitro*.

En effet Bartels en 2000 [4] obtenait 12,7% d'ovocytes fertilisés et surtout plus récemment Armstrong [1] a obtenu 50% de fertilisation dont la moitié des embryons ont atteint le stade morula après 110h.

La fécondation *in vitro* chez le lion est donc possible et intéressante.

Pour le guépard les résultats sont plus mitigés mais néanmoins réels. Dans certaines études comme celle menée par Johnston en 1991[62] les résultats sont nuls puisqu'aucune fertilisation d'ovocyte de guépard n'avait pu être observée.

Néanmoins Donoghue et son équipe en 1992 [26] ont démontré la faisabilité de la production d'embryons de guépard *in vitro* puisqu'ils ont obtenu 10 embryons au stade 16 cellules à 72h post-co-incubation, 7 autres ayant atteint le stade 8 cellules et 2 autres celui du stade 4 cellules à 72h sur un total de 37 embryons fécondés et un total de 99 ovocytes cultivés. Le pourcentage d'embryons obtenus est donc relativement faible par rapport à ce qui a été réalisé chez le lion.

Cela peut facilement être mis en relation avec la tératospermie connue chez le guépard par opposition à la normospermie habituelle du lion (excepté le lion asiatique et les petites populations).

Néanmoins cette étude a démontré qu'il était bien possible d'obtenir des embryons de guépard malgré la tératospermie évidente. Il est à présent nécessaire d'accentuer les recherches sur les milieux de culture qui pourraient augmenter le taux de réussite chez cette espèce.

La fécondation *in vitro* se révèle donc une technique réellement envisageable dans le cadre des programmes de sauvegarde de ces deux espèces.

Avec l'insémination artificielle elle constitue les deux méthodes de reproduction assistée les plus utilisées pour l'obtention d'embryons.

Dans un cas comme dans l'autre elles peuvent être complétées par une technique de transfert d'embryon intra ou inter spécifique.

2.3 Le transfert d'embryon

Le transfert d'embryons consiste à placer les embryons récoltés après insémination artificielle ou après fécondation *in vitro* dans l'utérus d'une mère porteuse.

Il est indispensable lorsqu'il s'agit d'une fécondation *in vitro* et est utile lorsque les embryons sont produits par insémination artificielle car certaines femelles ont un potentiel réduit pour mener les jeunes à terme.

L'embryon peut ainsi être transféré soit chez une femelle de la même espèce évaluée comme étant plus apte à mener la gestation à terme.

Il peut également être transféré chez une espèce différente car dans de trop petites populations le nombre de femelles capables de mener à terme une gestation est souvent un facteur limitant.

Ces deux procédés sont envisageables dans le cadre des espèces sauvages telles le lion et le guépard mais les données sur le développement embryonnaire et sur la reconnaissance foeto-maternelle ne sont pas encore assez abouties [21].

Quelques résultats ont cependant été obtenus dans le cadre du transfert d'embryons intraspécifique chez le tigre où une femelle sur 6 receveuses a mené une gestation à terme et obtenu 3 tigrons [25] et chez le caracal où une femelle a mis au monde 2 chatons caracal sur 7 femelles inséminées [105].

Quelques résultats ont été également obtenus dans le cadre du transfert interspécifique après fécondation *in vitro*.

En effet en 1993 [104] des embryons de chat indien du désert et de chat de la jungle ont été transférés avec succès dans l'utérus de chattes. Ceux-ci ont été transférés 96 à 120h après culture *in vitro*. Sur l'ensemble des essais une seule portée de chat indien du désert a été obtenue. Celle-ci était constituée d'un chat vivant et d'un mort-né.

De la même manière, 3 chatons Chat sauvage africain ont vu le jour suite au transfert embryonnaire de 8 morula issue de la fécondation *in vitro* chez une chatte domestique receveuse [105].

Ceci démontre bien que le transfert d'embryons est envisageable chez les espèces sauvages en danger bien qu'il n'y ait pas encore de résultats concernant le guépard et le lion.

Néanmoins le taux de gestation après transfert chez ces quelques espèces est très faible.

Les raisons de ce problème ne sont pas encore claires mais il est possible que les embryons exogènes ne sécrètent pas les facteurs correctes et la quantité adéquate au bon moment pour prévenir la lutéolyse [3].

Le devenir de ces embryons récoltés est donc principalement d'être transféré dans l'utérus de femelles porteuses mais dans certains cas il est également possible de congeler ces embryons.

2.4 La congélation d'embryons et d'ovocytes.

Cette solution peut aussi permettre de préserver le matériel génétique recueilli et de ne pas l'utiliser immédiatement et d'attendre potentiellement le développement de techniques fiables pour le transfert d'embryon chez les espèces en danger tels que le guépard et le lion.

La méthode standard [70] et utilisée déjà chez plusieurs espèces consiste en la cryoprotection des embryons par 1.5 M de DMSO (diméthylsulfoxyde) à 20°C puis ils sont refroidis à -7°C où il se produit la formation de glace.

Le vitesse de refroidissement est ensuite de 0.3 à 0.5°C/min jusqu'à une température intermédiaire de -30, -35°C avant d'être plongé dans l'azote liquide pour la conservation.

Les échantillons sont ensuite réchauffés rapidement à 300°C/min pour utilisation.

La plupart des embryons ne sont néanmoins pas abîmés quand ils sont refroidis à une température inférieure à 0°C.

De plus des embryons issus d'insémination artificielle ou de fécondation *in vitro* on déjà été congelés chez les félidés, à la fois chez le chat domestique et quelques espèces de félidés sauvages.

Les premiers chatons nés à la suite d'un transfert d'embryon congelé a eu lieu il y a plus de 10 ans. Mais cela ne s'est encore pas produit chez les félidés sauvages.

Ces derniers n'ont pour le moment fait l'objet que de congélation d'embryon.

Cependant celle-ci s'est révélée très intéressante car contrairement aux embryons de bétail les embryons de félinés sauvages sont congelables aux stades 2 à 4 cellules. .

Cette technique est une réussite chez de nombreuses espèces aux caractéristiques physiologiques et développementales différentes mais il n'est cependant pas certain qu'elle fonctionne pour toutes les espèces et surtout elle ne fonctionne pas avec les ovocytes car ceux-ci sont très sensibles au refroidissement.

Néanmoins les ovocytes de félinés semblent moins sensibles au froid que les autres espèces de carnivores. En effet il est d'ores et déjà d'actualité que des ovocytes de chat congelés ont donné des embryons de stade 8 cellules après fécondations *in vitro* alors que ceci serait impensable chez de nombreux autres mammifères.

De la même manière il est également possible chez ces espèces de congeler les follicules pré-antraux [61].

La congélation, sous toutes ses formes (ovocytes, spermatozoïdes, embryons) semble donc être effectivement une alternative satisfaisante dans l'avenir de la sauvegarde de ces espèces et se développe de plus en plus aujourd'hui.

Parallèlement de nouvelles technologies sont mises au point. Elles ne font pas encore l'objet d'une grande préoccupation en ce qui concerne la sauvegarde des espèces de félinés sauvages mais leur utilisation pourrait à terme être intéressante également.

2.5 Les nouvelles technologies

Les principales techniques développées ces dernières années sont l'ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) et SUZI (Subzonale Insemination)

La première consiste en l'injection sous microscope d'un seul spermatozoïde dans un ovocyte mur pour la maturation.

La seconde suit le même principe que la première sauf que l'injection se fait en région subzonale c'est à dire dans la zone pellucide de l'ovocyte.

La technique de l'ICSI [136] comporte 5 étapes : la stimulation ovarienne, semblable à celle utilisée pour l'insémination artificielle ou pour la fécondation *in vitro*, le recueil et la préparation des gamètes, la microinjection et la culture embryonnaire et finalement le transfert embryonnaire.

L'intérêt de cette méthode est de permettre la reproduction d'espèces et d'individus tératospermiques (dont le taux de tératospermie dépasse 60%) dont la fertilité est limitée par la mobilité et une faillibilité de la réaction acrosomique, ce qui est préjudiciable pour la fécondation *in vitro*.

Cette technique a déjà été réalisée chez le chat avec l'obtention de chatons mais n'est pas encore développée chez les félinés sauvages.

Elle pourrait sans doute pourtant voir le jour pour des espèces à fort taux de tératospermie comme le guépard ou même le lion d'Asie.

Discussion sur le techniques évoquées

L'étude de la reproduction du guépard (*Acinonyx jubatus*) et du lion (*Panthera leo*) nous a permis de mettre en évidence le développement de nombreuses techniques d'exploration des paramètres de la physiologie sexuelle de ces espèces.

Si on a pu en apprécier la qualité et les facultés d'adaptation aux caractéristiques spécifiques de ces espèces on peut néanmoins regretter certaines lacunes persistantes.

En effet malgré les moyens techniques important mis en œuvre et les nombreuses études réalisées, on ne dispose pas encore à l'heure actuelle d'informations suffisante afin de déterminer avec précision le déroulement des cycles de reproduction et surtout le moment exact de l'ovulation. Ce manque de données est surtout présent pour le lion chez qui l'ovulation n'a encore pas été suffisamment étudiée puisque chez cette espèce, on ne note pas les même problèmes de reproduction en captivité que chez le guépard.

C'est pourquoi la technique d'insémination artificielle est moins développée chez le lion alors qu'elle est très développée et que la procédure est devenue quasiment routinière en 15 ans chez le guépard d'après le Dr Wildt [146].

Le développement de l'échographie dans ces espèces pourrait être utile et apporter les précisions qui manquent encore. Il est d'ailleurs surprenant que cette technique non-invasive ne soit pas encore développées ni chez le lion ni chez le guépard.

D'autre part les techniques de reproduction assistée sont également nombreuses et en pleine expansion.

C'est le cas notamment de la fécondation *in vitro* qui est très développée en médecine humaine et qui nécessite encore quelques mises au point pour être réellement efficace chez le guépard et le lion.

En effet les mécanismes des différentes étapes étant peu connus les protocoles sont établis de façon empiriques et la technique manque de recul chez ces espèces.

De plus, le taux important de tératospermie détecté chez le guépard et les petites populations consanguines de lions implique théoriquement de mauvais résultats par fécondation *in vitro*.

Or l'obtention de quelques embryons de guépards démontre à la fois que les prévisions concernant la fertilité effective des spermatozoïdes est encore faillible et que finalement la technique de fécondation *in vitro* a de l'avenir y compris dans ces espèces.

Concernant les nouvelles technologies telles que l'ICSI qui semblent pouvoir supplanter la fécondation *in vitro* le problème qui se pose est plutôt d'ordre éthique.

En effet cette technique autorise la reproduction d'individus dont la faible qualité de la semence est un obstacle. Le risque dans ce cas est de propager cette défaillance et de sélectionner des individus dont la reproduction est toute aussi précaire que les mâles utilisés.

Conclusion

Le guépard et le lion se ressemblent en de nombreux points liés à leur appartenance à la grande famille des félidés ainsi qu'à leur situation critique dans leurs environnements respectifs.

Cependant ils diffèrent sur bien des aspects à la fois génétiques, comportementaux et physiologiques.

Ces différences sont à prendre en compte dans les programme d'aide à la reproduction de manière à en optimiser les résultats.

En effet, si l'insémination artificielle semble être la méthode de choix pour le guépard, les nouvelles techniques (ICSI) qui permettent de passer outre les difficultés liées au taux important de tératospermie semblent avoir un avenir certain.

Le lion apparaît quant à lui comme un candidat idéal à la fécondation *in vitro*, exception faite des petites populations consanguines dont la gestion se rapprocherait plus de celle du guépard.

Le développement de ces nombreuses techniques de reproduction assistée apparaît donc comme une solution pour la sauvegarde des espèces menacées. Il est cependant important de ne pas négliger les actions de réconciliation des populations humaines et animales partageant le même environnement sans lesquelles l'utilisation de ces techniques s'avèreraient inutile, le but ultime de tous ces efforts étant la réintroduction de ces espèces dans leur milieu d'origine.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARMSTRONG D.L, CRICHTON E.G, SCHWALBACH L.M.J, GARDNER D.K., LOSKUTOFF N.M. (2004).

Ovarian Stimulation, Laparoscopic Oocyte Retrieval, IVF and Blastocyst Production Using Sequential Media in the African Lion (*Panthera leo*). *Repro.Fertil.Dev.*, **16(2)** , 221.

2. ASA C.S, JUNGE R.E, BIRCHER J.S, NOBLE G.A, SARRI K.J, PLOTKA E.D (1992)

Assessing Reproductive Cycles and Pregnancy in Cheetahs (*Acinonyx jubatus*) by Vaginal Cytology. *Zoo Biology*, **11**, 139-151.

3. BAINBRIDGE D.R.J, JABBOUR H.N, (1998)

Potential Assisted Breeding Techniques for the Conservation of Endangered Mammalian Species in Captivity : A Review, *Vet.Rec* , **143**, 159-168.

4. BARTELS P., LUBBE K., KILIAN I, FRIEDMANN Y., VAN DYK G., MORTIMER D. (2000)

In Vitro Maturation and Fertilization of Lion (*Panthera leo*) Oocytes Using Frozen-Thawed Epididymal Spermatozoa Recovered By Cauda Epididymectomy of an Immobilized Lion. *Theriogenology*, **53 (1)**, 325 Abstr.

5. BAUER H., DE IONGH H.H, PRINCEE F, NGANTOU D. (2003)

Research Needs for Lion Conservation in West and Central Africa. *CR Biologies*, **326**, 112-118.

6. BEDFORD J.M , CROSS N.L (1998)

Sperm Capacitation. IN: Encyclopedia of Reproduction. Academic Press, San Diego, **vol 4**, 597-602.

7. BERTRAM B (1978)

Pride of Lions. London: J.M dent and Sons, Ltd, 265p

8. BLAKE, C.A (1998)

Gonadotropin Secretion, Control of. IN: Encyclopedia of Reproduction. Academic Press, San Diego, **vol 2**, 529-546.

9. BOWEN M.J, PLATZ C.C, BROWN C.D, KRAEMER D.C (1982)

Successful Artificial Insemination and Embryo Collection in the African Lion (*Panthera leo*). *Am. Assoc. Zoo. Vet. Proc.*, 57-59.

10. BROWN J.L, BUSH M., PACKER C., PUSEY A.E, MONFORT S.L, O'BRIEN S.J.and al. (1991).

Developmental Changes in Pituitary-Gonadal Function in Free-Ranging Lions (*Panthera leo leo*) of the Serengeti Plains and Ngorongoro Crater . *J.Repro.Fertil*, **91**, 29-40.

11. BROWN J.L, BUSH M., PACKER C., PUSEY A.E., MONFORT S.L., O'BRIEN S.J. (1993)

Hormonal Characteristics of Free-Ranging Female Lions (*Panthera leo*) of the Serengeti Plains and Ngorongoro Crater.. *J.Repro.Fertil*, **97**, 107-114.

12. BROWN J.L, WASSER S.K., WILDT D.E, GRAHAM L.H (1994).

Comparative Aspects of Steroid Hormone Metabolism and Ovarian Activity in Felids Measured Noninvasively in Feces. *Biol. Reprod.*, **51**, 776-786

13. BROWN J.L., WILDT D.E, WIELEBNOWSKI N., GOODROWE K.L., GRAHAM L.H., WELLS S., HOWARD J.G.(1996)

Reproductive Activity in Captive Female Cheetah (*Acinonyx jubatus*) Assessed by Faecal Steroids. *J.Reprod.Fertil.*, **106(2)**, 337-346.

14. BROWN J.L, TERIO K.A, GRAHAM L.H (1996)

Fecal Androgen Metabolite Analysis for Noninvasive Monitoring of Testicular Steroidogenic Activity in Felids. *Zoo Biology*, **15 (4)** , 425-434.

15. BYGOTT J.D., BERTRAM B.C.R, HANBY J.P (1979)

Male Lions in Large Coalitions Gain reproductive Advantages. *Nature*, **282**, 839-841.

16. CARO T.M, COLLINS D.A (1986)

Male Cheetahs of the Serengeti. *Nat. Geo. Res.*, **2(1)**, 75-86.

17. CARO T. M (1993)

Behavioural Solution to Breeding Cheetahs in Captivity : Insight from the Wild. *Zoo Biology*, **12**, 19-30.

18. CARO T. M. (1994)

The Natural History of Cheetahs. In: *Cheetahs of the Serengeti Plains*, 30-47

19. CARO T.M (1994)

Female Reproduction and Cub Mortality. In: *Cheetahs of the Serengeti Plains*, 77-95.

20. CARO T.M. (1994)

The Mating System. In: *Cheetahs of the Serengeti Plains* , 199-231

21. COMIZZOLI P, MERMILLOD P, MAUGET R (2000).

Reproductive Biotechnologies for Endangered Mammalian Species. *Reprod.Nutr.Dev.*, **40**, 493-504.

22. CZEKALA N.M, DURRANT B.S, CALLISON L, WILLIAMS M, MILLARD S (1994)

Fecal Steroid Hormone Analysis as an Indicator of Reproductive Function in the Cheetah. *Zoo Biology*, **13**, 119-128

23. DENIS-HUOT C et M (2002)

L'Art d'être Lion. Paris : Gründ. 215p.

24. DOI O., KUSUNOHI H., SATO T, KAWAKAMI S., FUKUOKA T., OKUDA K. et al.(2001).

Serum Progesterone and Estradiol-17 β Concentrations, and Laparoscopic Observations of the Ovary in Cheetah (*Acinonyx jubatus*) with Pregnant Mare Serum Gonadotropin and Human Chorionic Gonadotropin Treatments. *J.Vet.Med.Sci*, **63(12)**, 1361-1364.

25. DONOGHUE A.M, HOWARD J.G, SEAL US, ARMLSTRONG D.L, TILSON R.L, WOLF P and al (1990).

In Vitro fertilization and Embryo Development *In Vitro* and *In Vivo* in the tiger (*Panthera tigris*), *Biol Reprod*, **46**, 1047-1056.

26. DONOGHUE A.M, HOWARD J.G., BYERS A.P., GOODROWE K.L, BUSH M., BLUMER E. and al. (1992)

Correlation of Sperm Viability with Gamete Interaction and Fertilization *In Vitro* in the Cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Biol. Reprod*, **46**, 1047-1056.

27. DURANT S.M.(2000)

Predator Avoidance, Breeding Experience and Reproductive Success in Endangered Cheetahs. *Anim. Behaviour*, **60**, 121, -130.

28. EPSTEIN A., WHITE R, HOROWTIZ I, KASS P.H., OFRI R. (2002)

Effects of Propofol as an Anesthetic Agent in Adult Lions (*Panthera leo*) : A Comparison with Two Established Protocols. *Research in Veterinary Science*, **72**, 137-140.

29. FALCAN E.M (1988)

Le Guépard (*Acinonyx jubatus*) : Reproduction et possibilités d'élevage. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Lyon, 129p.

30. FARSTAD W. (2000)

Current State in Biotechnology in Canine and Feline Reproduction. *Anim.Reprod.Sci*, **60-61**, 375-387.

31. FEDERICO B., BRACCHI P.G.(2001).

Captive Bred Cheetah Behaviour. *Annali della Facolta di Medicina Veterinaria (Parma)*, **21**, 47-60.

32. FUSTON P.J., MILLS M.G.L, BIGGD H.C., RICHARDSON P.R.K (1998)

Hunting by Male Lions: Ecological Influences and Socio-Ecological Implications. *Anim.Behav.*, **56**, 1333-1345.

33. GOODROWE K.L, MILLER A.M, WILDT D.E (1989)

In Vitro Fertilization of Gonadotropin-Stimulated Leopard Cat (*Felis Bengalensis*) Follicular Ovocytes. *J. Exp.Zoo*, **252**, 89-95.

34. GOODROWE K.L., CRAWSHAW G.J, B., M.S., MEHREN K.G.(1991).

Stimulation of Ovarian Activity and Oocyte Recovery in the Caracal (*Felis caracal*) and Cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J. Zoo.Wildl. Med*, **22** (1), 42-48.

35. GOODROWE K.L, WALKER S.L., RYCKMAN D.P., MASTROMONACO G.F. , HAY M.A, BATEMAN H.L and al (2000)

Piecing Together the Puzzle of carnivore Reproduction. *Anim.Reprod.Sci*, **60-61**, 389-403.

36. GRAHAM L.H, BROWN J.L (1996)

Cortisol Metabolism in the Domestic Cat and Implications for Non-Invasive Monitoring of Adrenocortical Function in Endangered Felids. *Zoo Biology*, **15**, 71-82.

37. GRAWSHAW G.J., BROWN J.L, DOODROWE K.L (1991)

Investigation of Infertility in a Male Cheetah (*Acinonyx Jubatus*). *J.Zoo.Wildl.Med*, **22** (1), 119-124).

38. GRINNEL J, PACKER C, PUSEY A.E (1995)

Cooperation in Male Lions: Kinship, Reciprocity and Mutualism. *Anim.Behav.*, **49**, 95-105.

39. GRINNEL J., MC COMB K.,(2001)

Roaring and Social Communication in African Lions: the Limitations Imposed by Listeners. *Anim.Behav.*, **62**, 93-98.

40. GROS P.M. (1998)

Status of the Cheetah *Acinonyx jubatus* in Kenya : a field interview assessment, *Biol. Cons*, **85**, 137-149

41. GROS P.M, REJMANEK M. (1999)

Status and Habitat of Uganda Cheetahs : an Attempt to Predict Carnivore Occurrence on Vegetation Structure. *Biodiversity and Conservation*, **8**, 1561-1583

42. GROS P.M. (2002)

The Status and Conservation of the Cheetah *Acinonyx jubatus* in Tanzania, *Biol. Cons*, **106**, 177-185

43. HANBY J.P, BYGOTT J.D (1987)

Emigration of Subadult Lions. *Anim.Behav.*, **35**, 161-169

44. HANBY J.P, BYGOTT J.D., PACKER C. (1995)

Ecology, Demography and Behaviour of Lions in Two Contrasting Habitats : Ngorongoro Crater and Serengeti Plains. In: Serengeti II: Dynamics, Management and Conservation of an Ecosystem. Ed A.R.E. Sinclair et Peter Arcese, 315-330.

45. HEINSOHN R., PACKER C (1995)

Complex Cooperative Strategies in Group-Territorial African Lions. *Science*, 269, 1260-1262

46. HEINSOHN R., PACKER C, PUSEY A (1996)

Development of Cooperative Territoriality in Juvenile Lions. *Pr.S.Soc.Lond.B*, **263**, 475-479.

47. HEINSOHN R (1997)

Group Territoriality in Two Populations of African Lions. *Anim.Behav.*, **53**, 1143-1147.

48. HESS R.A (1998)

Spermatogenesis, Overview. IN: Encyclopedia of Reproduction. Academic Press, San Diego, **vol 4**, 539-545.

49. HILDEBRANDT T.B, GORITZ F.(1998)

Use of Ultrasonography in Zoo Animals. In: Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy 4. Ed. Fowler M.E, 41-54.

50. HILDEBRANDT T.B., HERMES R., JEWGENOW K., GORITZ F. (2000)

Ultrasonography as an Important Tool for the development and Application of Reproductive Technologies in Nondomestic Species *Theriogenology*, **53**, 73-84.

51. HILTON-TAYLOR C (2000)

2000 IUCN red list of threatened species. 61p

52. HOWARD J.G., BUSH M, Hall, L.L., WILDT D.E. (1984)

Morphological Abnormalities in Spermatozoa of 28 Species. In *10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, **2**, 66-68.

53. HOWARD, J.G, BUSH M, WILDT D.E (1991)

Teratospermia in Domestic Cats Compromises Penetration of Zona-Free Hamster Ova and Cat Zonae Pellucidae. *J.Androl*, **12**, 36-45

54. HOWARD, J.G, BARONE M, BUSH M, WILDT D. (1991)

A Heterologous Salt-Stored Zonae Pellucidae Assay for Assessing Sperm Capacitation and the Impact of Teratospermia in the Cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J.Androl.*, **Abstr 101**, p.50.

55. HOWARD, J.G, BARONE .M.A, DONOGHUE A.M, WILD D.E (1992)

The Effect of Pre-Ovulatory Anesthesia on Ovulation in Laparoscopically Inseminated Domestic Cats, *J.Reprod.Fert.*, **96**, 175-186.

56. HOWARD, J.G, DONOGHUE A., BARONE M.A., GOODROWE K.L, BLUMER E.S, SNODGRASS K (1992).

Successful Induction of Ovarian Activity and Laparoscopic Intrauterine Artificial Insemination in the Cheetah. *J.Zoo.Wildl.Med.*, **23** (3), 288-300.

57. HOWARD, J.G (1993).

Semen Collection and Analysis in Carnivores. *Zoo and Wildlife Medicine*, **3**, 390-398.

- 58. HOWARD, J.G, ROTH T.L, BYERS A.P, SWANSON W.F, WILDT D.E (1997)**
Sensitivity to Exogenous Gonadotropins for Ovulation Induction and Laparoscopic Artificial Insemination in the Cheetah and Clouded Leopard. *Biol.Reprod.*, **56**, 1059-1068.
- 59. HOWARD, J.G, ROTH T., SWANSON J.L, BUFF J.L, GRISHAM J, MARKER-KRAUS and al. (1997)**
Successful Intercontinental Genome Resource Banking and Artificial Insemination with Cryopreserved Sperm in Cheetahs. *J.Androl.*, **Abstr 123**, p.55.
- 60. HOWARD, J.G (1998)**
Assisted Reproductive Techniques in Nondomestic Carnivores. In: Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy 4. Ed Fowler M.E, 449-457.
- 61. JEWGENOW K, STOLTE M. (1996)**
Isolation of Preantral Follicles from Nondomestic. Cats-Viability and Ultrastructural Investigations. *Anim.Repro.Sci*, **44**, 183-193.
- 62. JOHNSTON L.A., DONHOUGHUE A.M., O'BRIEN, S.J., WILDT D.E. (1991).**
Rescue and Maturation *In Vitro* of Follicular Oocytes Collected from Nondomestic Felid Species . *Biol.Repro.*,**45**, 898-906.
- 63. JOUBERT D, JOUBERT B (2000)**
Grands Chasseurs Sous la Lune, les Lions du Savuti. Paris, Nationnal Géographic Editions. 168p.
- 64. KELLY M.J, DURRANT S.M (2000)**
Viability of the Serengeti Cheetah Population, *Cons.Biol* ,**14**, 78.
- 65. KHAN J.K.,(1995)**
Conservation and Management of Gir Lion Sanctuary and National Park Gujarat, India. *Biological Conservation*, **73**, 183-188.
- 66. LASLEY B.L., KIRKPATRICK J.F (1991)**
Monitoring Ovarian Function in Captive and Free-Ranging Wildlife by Means of Urinary and Fecal Steroids. *J.Zoo.Wildl.Med*, **22** (1), 23-31.
- 67. LASLEY B.L, SHIDELER S.E (1991)**
Methods for Assessing Reproduction in Nondomestic Species. In: Zoo Animal Medicine: Current Therapy 3, Ed:Fowler M.E 79-86.
- 68. LAURENSEN M.K, CARO T.M, BORNER M (1992)**
Female Cheetah Reproduction. *Nat. Geog. Res. Expl.*, **8** (1), 64-75.
- 69. LAURENSEN M.K. (1993)**
Early Maternal Behaviour of Wild Cheetahs : Implications for Captive Husbandry. *Zoo Biology*, **12**, 31-43.
- 70. LEIBO S.P., SONGSASEN N. (2002).**
Cryopreservation of Gametes and Embryos of Nondomestic Species. *Theriogenology*, **57**, 303-326.
- 71 LEROY E. (1993)**
Contribution à l'Etude Ethologique du Guépard en Captivité : Application à la détection de l'oestrus chez la femelle. Thèse de Doctorat Vétérinaire,Alfort.149p.
- 72. LINDBURG, D.G., DURRANT B.S., MILLARD S.E, OOSTERHUIS J.E. (1993)**
Fertility Assessment of Cheetah Males With Poor Quality Semen, *Zoo.Biol.*,**12**, 97-103.

- 73. LUVONI G.C., KALCHSCHMIDT E., LEONI S., RUGGIERO C. (2003).**
Conservation of Feline Semen Part I: Cooling and Freezing protocols. *J. Feline.Med.Surg.*, **5**(4), 203-208.
- 74. LUVONI G.C., KALCHSCHMIDT E., MARINONI G. (2003)**
Conservation of Feline Semen Part II: Cold-induced Damages on Spermatozoal Fertilizing Ability. *J. Feline.Med.Surg.*, **5**, 257-263.
- 75. MAGILL R (2003)**
The Cheetah Challenge, *Wildl. Cons*, **106**, 5.
- 76. MARKER-KRAUS L (1991)**
International Cheetah Studbook , Smithsonian Institution Press, Washington DC, USA
- 77. MARKER-KRAUS L, GRISHAM J (1993)**
Captive Breeding of Cheetahs in North American Zoos : 1987-1991. *Zoo Biology*, **12**, 5-18.
- 78. MC COMB K, PUSEY A., PACKER C., GRINNEL J (1993)**
Female Lions Can Identify Potentially Infanticidal Males from their Roars. *Proc.R.Soc.Lond.B*, **252**, 59-64.
- 79. MELTZER D.G.A., FOWLER M.E., MILLER, R.E. (1994).**
Medical Management of a Cheetah Breeding Facility in South Africa. In *Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy 4*. Ed. Fowler M.E, 415-423.
- 80. MILLETTE C.F (1998)**
Spermatozoa. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, San Diego, **vol 4**, 586-596.
- 81. MORIN S (2001)**
Anatomie et Ethologie du Lion (*Panthera leo*). Thèse de Doctorat Vétérinaire ; Toulouse. 123p.
- 82. MUNSON L, BROWN J.L, BUSH M., PACKER C., JANSSEN D., REIZISS S.M., and al (1996)**
Genetic Diversity Affects Testicular Morphology in Free-Ranging Lions (*Panthera leo*) of the Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *J.Repro.Fertil*, **108**, 11-15.
- 83. MUNSON L., NESBIT J.W., MELTZER D.G.A., COLLY L.P, BOLTON L., KRIEK N.P.J (1999)**
Disease of Captive Cheetahs (*Acinonyx jubatus jubatus*) in South Africa : A 20-year Retrospective Survey. *J.Zoo.Wildl.Med.*, **30** (3) 342-347.
- 84. NATOLI E (1991)**
Mating Strategies in Cats: a Comparison of the Role and Importance of Infanticide in Domestic Cats, *Felis catus* and Lions, *Panthera leo leo*.
- 85. NOWELL K, JACKSON P (1995)**
New Red List for Wild Cats, *Cat News*, **23**, 23
- 86. NOWELL K, JACKSON P (1996)**
Wild Cats: Status Survey and Conservation Action Plan. 382p
- 87. O'BRIEN S.J (1986)**
Le Guépard en Péril Génétique. Pour la Science, **juil**, 34-42
- 88. O'BRIEN S.J. (1994)**
The Cheetah's Conversion Controversy. *Conservation Biology*, **8** (4), 1153-1155.

89. O'BRIEN S.J. (1994)

A Role for Molecular Genetics in Biological Conservation, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **91**, 5748-575

90. OWEN (1835)

On the Anatomy of the Cheetah, (*Felis jubata*.). *Trans.Zool.Soc.London*, **1**, 129-137

91. PACKER C, PUSEY A (1983)

Adaptation of Female Lions to Infanticide by Incoming Males. *The American naturalist*, **121**, 716-728.

92. PACKER C, PUSEY A (1983)

Male Takeovers and Female Reproductive Parameters: A Simulation of Oestrous Synchrony in Lions (*Panthera leo*). *Anim Behav*, **31**, 334-340.

93. PACKER C., HERBST L., PUSEY A., BYGOTT D, HANBY P., CAIRNS SJ. and al (1988)

Reproductive Success of Lions. In: Reproductive Success. Ed. Th CLUTTON-BROCK, 263-382.

94. PACKER C, GILBERT D.A, PUSEY A.E, O'BRIEN S.J (1991)

A Molecular Genetic Analysis of Kinship and Cooperation in African Lions. *Nature*, **351**, 562-564.

95. PACKER C, PUSEY A, ROWLEY H., GILBERT D.A, MARTENSON J, O'BRIEN S.J (1991)

Case Study of a Population Bottleneck: Lions of the Ngorongoro Crater;. *Conservation Biology*, **5**, 219-230.

96. PACKER C, PUSEY A, EBERLY L. (2001)

Egalitarianism in Female African Lions. *Science*, **293**, 680-693.

97. PARROTT J, SKINNER M (1998)

Gonadogenesis, Female. In : Encyclopedia of Reproduction. Academic Press, San Diego., **vol 2**, 483490.

98. PARSON P.A (1994)

The Energetic Cost of Stress. Can Biodiversity be preserved. *Biodiversity Letters*, **2**, 11-15.

99. PARSON P.A (1995)

Evolutionary Response to Drought Stress: Conservation Implications, *Biol.Cons*, **74**, 21-27.

100. PERICARD J-M (1990)

Reproduction des Guépards : Protocoles pour Animaux Captifs. *La Semaine Vétérinaire*, **556**, p.26.

101. PERRIN C (2003)

Reproduction des guépards femelles en captivité : Etude Comportementale et suivi des stéroïdes fécaux. Thèse de Doctorat vétérinaireVétérinaire., Nantes, 124p.

102. PETIT T (1996)

Un Programme pour Gérer les Guépards Captifs et Sauvages. *La Semaine Vétérinaire*, **818** , p. 37.

103. PHILLIPS L.G., SIMMONS L.G, HOWARD J.G., WILDT D.E., (1982)

Gonadotropin Regimen for Inducing Ovarian Activity in Captive Wild Felids. *J.Am.Vet.Med.Assoc*, **181**(11), 1246-1250.

104. POPE C.E, KELLER G.L., DRESSER B.L (1993)

In Vitro Fertilisation in Domestic and Non-Domestic Cats Including Sequences of Early Nuclear Events, Developpement *In Vitro*, Cryopreservation and Successfull Intra-and Interspecies Embryo Transfer. *J.Reprod.Fert.*, **Suppl 47**, 189-201

105. POPE C.E (2000)

Embryo Technology in Conservation Efforts for Endangered Felids. *Theriogenology*, **53**, 163-174.

106. PUKAZEHEINTHI B.S, NOILES E, PELICAN K., DONOGHUE A., WILDT D.E, HOWARD J.G (2000)

Osmotics Effects on Feline Spermatozoa from Normospermic versus Teratospermic Donors. *Cryobiology*, **40**, 139-150.

107. PUKAZEHEINTHI B.S., WILDT D.E.,HOWARD J.G.(2001)

The Phenomenon and Significance of Teratospermia in Felids. *J.Repro.Fertil.Suppl*, **57**, 423-433.

108. SALLE M.A (1991)

Le Guépard ; Etude Zoologique en Liberté, Maintien en Captivité. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Nantes. 95p.

109. SCHALLER G.B (1972)

The Serengeti Lion : A Study of a Predator-Prey relations. Ed University of Chicago Press. 480p.

110. SCHALLER G.B (2002)

The Last of Their Kind, *Wildl.Cons*, **avril**, 72.

111. SCHEEL D., PACKER C. (1991)

Group Hunting Behaviour of Lions: a Search for Cooperation. *Anim.Behav.*, **41**, 697-709.

112. SCHMIDT A, NADAL L, SCHMIDT M.J, BEAMER B. (1974)

Serum Concentration of Oestradiol and Progesterone during the Normal Oestrous Cycle and Early Pregnancy in the Lion (*Panthera leo*), *J.Repro.Fertil*, **57**, 267-272

113. SCHRAMM R.D, BRIGGS M.B, REEVES J.J (1994)

Spontaneous and Induced Ovulation in the Lion. *Zoo Biology*, **13**, 301-307.

114. SCHWARZENBERGER F., MOSTL E., PALME R., BAMBERG E (1996)

Faecal Steroid Analysis for Non-invasive Monitoring of Reproductive Status in Farm, Wild and Zoo Animals. *Anim. Repro Sci.*, **42**, 515-526.

115. SETCHELL K.D.R, GOSSELIN S.J, WELSH M.B., JOHNSTON J.O., BALISTRERI W.F, KRAMER L.W (1987).

Dietary Estrogens- A Probable Cause of Infertility and Liver Disease in Captive Cheetahs, *Gastroenterology*, **93**, 225-233.

116. SILVA A.R, MORATO R.G, SILVA L (2004)

The Potential for Gamete recovery from Non-Domestic Canids and Felids. *Anim.Reprod.Sci*, **81**, 159-175.

117. STUART S , STUART T (1996)

Africa's Vanishing Wildlife, Smithsonian Institution Press, Washington DC , USA.

118. SWANSON W.F., ROTH T.L., BLUMER E., CITINO S.B., KENNY D., WILDT D.E. (1996)

Comparative Cryopreservation and Functionality of Spermatozoa from the Normospermic Jaguar (*Panthera onca*) and the Teratospermic Cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Theriogenology*, **45** (1), 241.

119. TERIO K;A., CITINO S.B., BROWN J.L. (1999)

Fecal Cortisol Metabolite Analysis for Noninvasive Monitoring of Adrenocortical Function in the Cheetah (*Acinonyx jubatus*), *J.Zoo.Wildl.Med.*, **30**(4), 484-491

120. THEVENIN (1996)

Fertilité du Guépard Mâle : Etude Bibliographique. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Lyon, 71p.

121. TOMIZA N, TSJIMOTO T, OGINO T., NAKAMURA K., HARA S. (1997)

Chemical Restraint of African Lions with Medetomidine-Ketamine. *J.Vet.Med.Sci*, **59** (4), 307-310.

122. VAN VOORHIS B.J (1998)

Follicular Developpement. IN: Encyclopedia of Reproduction. Academic Press, San Diego, **vol 2**, 376-389.

123. WATSON P.F (2000)

The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. *Anim.Reprod.Sci*, **60-61**, 481-492.

124. WASSER S.K., HUNT K.E., BROWN J.L, COOPER K., CROCKETT C.M. (2000)

A Generalized Fecal Glucocorticoid Assay for Use in a Diverse Array of Nondomestic Mammalian and Avian Species, *General and Comparative Endocrinology*, **120**, 260-275.

125. WIELEBROWSK N, BROWN J.L. (1998)

Behavioural Correlates of Physiological Estrus in Cheetahs. *Zoo Biology*, **17**, 193-209

126. WILDT D.E., PLATZ C.L., SEAGER S.W.J., BUSH M. (1981).

Induction of Ovarian Activity in the Cheetah (*Acinonix jubatus*). *Biol.Reprod.*, **24**, 217-222.

127. WILDT D.E, BUSH J.G, O'BRIEN S.J., MELTZER D., VAN DYK A., EBEDES H. and al, (1983)

Unique Seminal Quality in the South African Cheetah and a Comparative Evaluation in the Domestic Cat. *Biol.Reprod*, **29**, 1019-1025.

128. WILDT D.E, MELTZER D., CHKRABORTY P.K., BUSH M. (1984)

Adrenal-Testicular-Pituitary Relationships in the Cheetah Subjected to Anesthesia/Elctroejaculation. *Biol. Reprod*, **30**, 665-672.

129. WILDT D.E, CHAKRABORTY P.K, MELTZER D., BUSH M (1984)

Pituitary and Gonadal Responses to LH Releasing Hormone Administration in the Female and Male Cheetah. *J.Endocr.*, **101**, 51-56.

130. WILDT D.E., O'BRIEN S.J, HOWARD J.G, CARO T.M, ROELKE M.E., BROWN J.L and al (1987).

Similarity in Ejaculate-Endocrine Characteristics in Captive Versus Free-Ranging Cheetahs of Two Subspecies. *Biol.Reprod*, **36**, 351-360.

131. WILDT D.E, BUSH J.G, GOODROWE K.L, PACKER C., PUSEY A.E., BROWN J.L (1987)

Reproductive and Genetic Consequences of Founding Isolated Lion Populations. *Nature*, **329**, 328-331.

132. WILDT D.E, PHILIPPS L.G, SIMMONS L.G, CHAKRABORTY P.K, BROWN J.L, HOWARD J.G (1988).

A Comparative Analysis of Ejaculate and Hormonal Characteristics of the Captive Male Cheetah, Tiger, Leopard, and Puma. *Biol.Reprod.*, **38**, 245-255.

133. WILDT D.E, BROWN J.L, BARONE M.A, COOPER K.A, GRISHAM J, HOWARD J.G (1993)

Reproductive Status of Cheetahs (*Acinonyx Jubatus*) in North American Zoos: The Benefits of Physiological Surveys for Strategic Planning, *Zoo Biology*, **12** (1), 45-80.

134. WILDT D.E, RALL W.F, CRISTER J.K, MONFORT S.L, SEAL U.S (1997)

Genome Resource Banks. *Bioscience*, **47** (10), 689-698.

135. YOSHIDA M. (2000).

Conservation of sperms : Current Status and New Trends. *Anim.Reprod.Sci*, **60-61**, 349-355

Références internet :

136. <http://ampcohin.paris.free.fr/lesdifferentestechniques.html>

137. <http://globalcrossing.net/~brendel/felidae.html>

138. www.animalinfo.org/species/carnivor/acinjuba.htm

139. www.arabianwildlife.com/fr.zoo_html

140. www.asiatic-lion.org/captive.html

141. www.cheetah.org

142. www.cites.org/fra/index.shtml

143. www.dewildt.org.za/cheetah/index.html

144. www.dinosoria.com

145. www.lioncrusher.com

146. [www.lynx.uio.no/catfolk/cnissues/cn08-12.htm](http://www lynx.uio.no/catfolk/cnissues/cn08-12.htm)

147. www.nationalgeographic.com

148. www.redlist.org

ANNEXES

Annexe 1: Les différentes catégories de la liste rouge de l'IUCN [148]

EXTINCT (EX)

A taxon is Extinct when there is no reasonable doubt that the last individual has died. A taxon is presumed Extinct when exhaustive surveys in known and/or expected habitat, at appropriate times (diurnal, seasonal, annual), throughout its historic range have failed to record an individual. Surveys should be over a time frame appropriate to the taxon's life cycle and life form.

EXTINCT IN THE WILD (EW)

A taxon is Extinct in the Wild when it is known only to survive in cultivation, in captivity or as a naturalized population (or populations) well outside the past range. A taxon is presumed Extinct in the Wild when exhaustive surveys in known and/or expected habitat, at appropriate times (diurnal, seasonal, annual), throughout its historic range have failed to record an individual. Surveys should be over a time frame appropriate to the taxon's life cycle and life form.

CRITICALLY ENDANGERED (CR)

A taxon is Critically Endangered when the best available evidence indicates that it meets any of the criteria A to E for Critically Endangered (see Section V), and it is therefore considered to be facing an extremely high risk of extinction in the wild.

ENDANGERED (EN)

A taxon is Endangered when the best available evidence indicates that it meets any of the criteria A to E for Endangered (see Section V), and it is therefore considered to be facing a very high risk of extinction in the wild.

VULNERABLE (VU)

A taxon is Vulnerable when the best available evidence indicates that it meets any of the criteria A to E for Vulnerable (see Section V), and it is therefore considered to be facing a high risk of extinction in the wild.

NEAR THREATENED (NT)

A taxon is Near Threatened when it has been evaluated against the criteria but does not qualify for Critically Endangered, Endangered or Vulnerable now, but is close to qualifying for or is likely to qualify for a threatened category in the near future.

LEAST CONCERN (LC)

A taxon is Least Concern when it has been evaluated against the criteria and does not qualify for Critically Endangered, Endangered, Vulnerable or Near Threatened. Widespread and abundant taxa are included in this category.

DATA DEFICIENT (DD)

A taxon is Data Deficient when there is inadequate information to make a direct, or indirect, assessment of its risk of extinction based on its distribution and/or population status. A taxon in this category may be well studied, and its biology well known, but appropriate data on abundance and/or distribution are lacking. Data Deficient is therefore not a category of threat. Listing of taxa in this category indicates that more information is required and acknowledges the possibility that future research will show that threatened classification is appropriate. It is important to make positive use of whatever data are available. In many cases great care should be exercised in choosing between DD and a threatened status. If the range of a taxon is suspected to be relatively circumscribed, and a considerable period of time has elapsed since the last record of the taxon, threatened status may well be justified.

NOT EVALUATED (NE)

A taxon is Not Evaluated when it has not yet been evaluated against the criteria.

Note: As in previous IUCN categories, the abbreviation of each category (in parenthesis) follows the English denominations when translated into other languages (see Annex 2).

Annexe 2 : Technique d'analyse des fécès [2] :

- 1- Deshydratation et pulvérisation
- 2- 0.1 à 0.2g de poudre porté à ébullition dans 5 mL de solution constituée à 90% d'éthanol distillé pendant 20 minutes.
- 3- Centrifugation à 500g pendant 10 minutes.
- 4- Récupération du surnageant.
- 5- Resuspension du culot dans 5 mL de la solution d'éthanol, mélange pendant 1 minute.
- 6- Centrifugation
- 7- Association des deux surnageants
- 8- Deshydratation et redissolution dans 1 mL de méthanol
- 9- Dilution dans une solution tampon
- 10- Analyse par radio-immunologie

Annexe 3:

Protocole de maturation ovocytaire utilisé chez le guépard et le lion **[4 ; 62 ; 104]**

Milieu de culture : Eagle's MEM®
0.24mM pyruvate
1% de sérum de veau fœtal (FCS)
3 mg/mL de sérum albumine bovin (BSA)
10µg/mL de FSH
2.5µg/mL de LH

Température : 38°C

Composition de l'air : 5% CO₂
5% O₂
90% N₂

Durée d'incubation : 24h [104] à 30-36h [4]

Annexe 4 :

Protocoles de capacitation des spermatozoïdes utilisés chez le guépard et le lion [1 ; 62]

	Lion [1]		Guépard [62]
<u>Milieu de culture :</u>	TL-HEPES® 6mg/mL de BSA 10% de FCS	HEPES-Hams F10® 10%FCS 5% sérum de lion	HEPES-Hams F10 10%FCS
<u>Dilution de la semence :</u>	1 :10	1 :10	1 :10
<u>Température :</u>	ambiante(20-25°C)	ambiante(20-25°C)	ambiante(20-25°C)
<u>Durée :</u>	6h	6h	6h

Annexe 5 :

Protocoles de fécondation in vitro utilisés chez le guépard et le lion [1 ; 4 ; 62]

	Lion [1 ; 4]		Guépard [62]
<u>Ovocytes</u>	24	18	14
<u>Concentration en Spermatozoïdes (/mL)</u>	$0,5.10^6$	1.10^6	2.10^5
<u>Milieu de culture (0.5mL)</u>	Ham's F-10® 1.0mM pyruvate 2mM glutamine 5% FCS 20µg/mL gentamicine	GI Sequential Medium®	Ham's F10®
<u>Température :</u>	38°C	38°C	38°C
<u>Composition de l'air :</u>	5% CO2 5% O2 90% N2	5% CO2 5% O2 90% N2	5% CO2 5% O2 90% N2
<u>Durée d'incubation :</u>	12h	16h	12h

La Reproduction du Guépard et du Lion

ARNOLD Caroline

RESUME

Le guépard (*Acinonyx jubatus*) et le lion (*Panthera leo*) sont deux espèces de félidés sauvages dont le déclin est d'ores et déjà annoncé.

La destruction de leur habitat, la chasse, la prédation, la consanguinité sont des facteurs avérés de la vulnérabilité de ces espèces.

Désormais classés vulnérables par l'IUCN et leur commerce étant extrêmement réglementé par la CITES il a été intéressant dans cette étude de faire le point sur les connaissances actuelles quant à la physiologie sexuelle de ces deux espèces ainsi que les moyens déjà mis en œuvre pour leur sauvegarde.

Deux axes sont aujourd'hui explorés : la reproduction en captivité basée sur l'observation des comportements en liberté et la reproduction assistée que nous avons développée.

Les techniques de reproduction assistée sont multiples.

L'insémination artificielle est la technique la plus ancienne, la mieux connue et la plus rodée, la fécondation *in vitro* et le transfert d'embryon sont en plein développement et les nouvelles technologies comme l'ICSI ne sont pas encore adaptées à ces espèces mais sont pleines d'avenir.

Mots Clés :

- | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| - Félin Sauvage | - Insémination artificielle |
| - Guépard (<i>Acinonyx jubatus</i>) | - Fécondation <i>in vitro</i> |
| - Lion (<i>Panthera leo</i>) | - Transfert d'embryon |
| - Reproduction | - Captivité |
| - Maîtrise de la reproduction | - Comportement |

JURY :

Président : Pr.

Directeur : Pr. Fontbonne

Assesseur : Pr. Courreau

Adresse de l'auteur :

211 bis rue du Ménil

92600 Asnieres-sur-Seine

Cheetah and Lion Reproduction

ARNOLD Caroline

SUMMARY:

The cheetah (*Acinonyx jubatus*) and the lion (*Panthera leo*) are two of the wild felid species that are henceforce declining.

Destruction of their habitat and hunting by men or by predators and inbreeding are established factors of the vulnerability of these species.

From now on they are classified as vulnerable by the IUCN and their trade is extremely controlled by the CITES.

Then it was of interest to take stock of the current knowledge on the sexual physiology of these species and of the strategies already used for their conservation.

Today, two ways are explored: breeding in captivity based on behavioural observations and assisted reproduction that we studied more.

Assisted Reproduction techniques are numerous.

Artificial insemination is the oldest and the best known and the most used technique, in vitro fecundation and embryo transfer are developing and new technologies as ICSI are not yet used for these species but are really hopeful for conservation.

Key Words:

- | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| - Wild felids | - Artificial insemination |
| - Cheetah (<i>Acinonyx jubatus</i>) | - <i>In Vitro</i> Fecondation |
| - Lion (<i>Panthera leo</i>) | - Embryo transfert |
| - Reproduction | - Captivity |
| -Control of reproduction | -Behaviour |

JURY :

President : Pr.

Director: Pr. Fontbonne

Assessor: Pr. Courreau

Author's Adress :

211 bis rue du Ménil

92600 Asnieres-sur-Seine