



**Conservation and Reproduction of Endangered Wild  
African/Asian/American Species**

**MAIN ABSTRACTS**

*IN*

**INTERNATIONAL  
CONGRESS  
PROCEEDINGS**



Muséum  
National  
d'Histoire  
Naturelle



**ENVA**  
Ecole nationale vétérinaire d'Alfort



# IXE CONGRÈS INTERNATIONAL SUR LES ANIMAUX SAUVAGES ET EXOTIQUES

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

8-10 mars 2012 - Workshops : 7 mars

Pr Gilles Boeuf

Président du Muséum National d'Histoire Naturelle

Dr. Norin Chai

Chairman



# RÉCOLTE ET EXAMEN DE LA SEMENCE CHEZ LE GUÉPARD

Nicolas NUDELMANN (DVM)<sup>1,2</sup>, Flora LALOI (DVM)<sup>1</sup>, Xavier LÉVY (DVM, Dipl ECAR)<sup>2</sup>, Fernando MIR (DVM, Res ECAR)<sup>1,2</sup> & Alain FONTBONNE (DVM, PhD, Dipl ECAR)<sup>1,2</sup>

## CONTEXTE SCIENTIFIQUE

La récolte et l'examen de la semence des guépards mâles (*Acinonyx jubatus*) est une étape déterminante avant d'effectuer une insémination artificielle (IA) ou une congélation du sperme dans cette espèce. En effet, de nombreux guépards semblent souffrir d'une mauvaise qualité du sperme due à de nombreuses anomalies morphologiques spermatiques (tératospermie), ce qui rend la congélation du sperme ou son utilisation en IA limitées.

Les protocoles d'électro-éjaculation chez le guépard ne sont pas bien standardisés. En outre, l'étude de la bibliographie montre que la contamination par de l'urine est un problème fréquent, peut être due à la sur-stimulation du tractus génital.

Le but de cette étude était d'améliorer et de tenter de standardiser la technique de récolte de sperme par électro-éjaculation chez le guépard mâle.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

Un chat siamois, destiné à être euthanasié pour des raisons de santé, à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort et un guépard mâle trouvé mort dans une réserve privée en Afrique du Sud ont été utilisés pour un examen anatomique de l'appareil génital interne.

Le chat a été anesthésié avec une association de médétomidine, butorfanol et kétamine. Un éjaculat a été obtenu avec succès par électroéjaculation (voir protocole ci-dessous), puis la sonde de stimulation rectale de 12 cm a été laissée en position à l'intérieur du rectum. Le chat a ensuite été euthanasié et une autopsie immédiate a été réalisée afin de visualiser la position exacte de la sonde rectale par rapport à la localisation de la prostate et de la vessie.

13 guépards adultes âgés 2 à 7 ans et appartenant à une réserve privée d'Afrique du Sud ont également été inclus dans cette étude. Leurs performances de reproduction antérieures étaient inconnues.

Ces guépards ont été télé-anesthésiés utilisant une combinaison de 40 µg / kg de dexmedetomidine (Dexdomitor®, Pfizer) et 2,5 mg / kg de kétamine (Imalgène 1000®, Merial).

Tous les guépards ont subi au préalable une échographie transrectale de la prostate, afin d'évaluer sa taille et son aspect. La distance entre l'anus et la partie crâniale de la prostate a été enregistrée.

Avant la récolte de sperme, la vessie des animaux était sondée, vidée, puis rincée plusieurs fois en utilisant un milieu cellulaire M199® (Sigma-Aldrich). La vessie a été remplie avec 20 ml de M199, juste avant l'électrostimulation. Ce milieu cellulaire rose change de couleur selon le pH. Notre hypothèse était que cette pratique nous permettrait de limiter et de mieux visualiser la contamination d'urine pendant le processus d'électro-éjaculation.

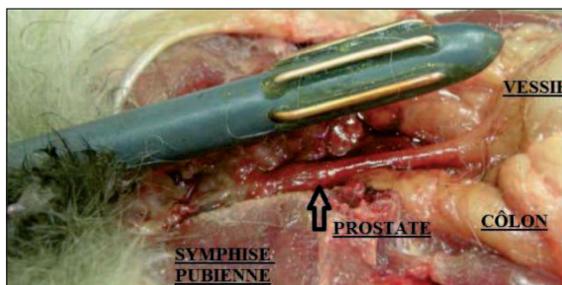
L'électro-éjaculation a été réalisée en utilisant un électrostimulateur standard (P et T Electronics, USA), avec une sonde rectale bipolaire de 20 cm possédant 3 électrodes longitudinales.

L'extrémité du pénis était placée dans un tube de centrifugation cristal en polystyrène (M23914®, Bioblock). Au cours de la récolte de sperme de chaque guépard, le tube de récolte était retiré et remplacé après chaque émission de semence afin d'évaluer individuellement macroscopiquement la couleur et microscopiquement la qualité de chaque « jet ».

Le protocole d'électrostimulation se composait de 30 stimulations (10 à 2 volts, 10 à 3 volts, 10 à 4 volts), suivie 5 minutes plus tard par 30 stimulations (10 à 3 volts, 10 à 4 volts, 10 à 5 volts), puis suivie 5 minutes plus tard par 20 stimulations (10 à 4 volts, 10 à 5 volts).

Les spermogrammes et les spermocytogrammes ont été réalisés en utilisant un hémacytomètre (Thomas chambre) et la technique de coloration des spermatozoïdes félines décrite par Pope et al. (1991).

## RÉSULTATS



Position des électrodes de la sonde rectale entre la prostate et la vessie chez le chat domestique

La qualité du sperme recueilli du chat siamois était bonne, et aucune contamination d'urine ne s'est produite pendant le processus de l'éjaculation. Son autopsie juste après l'électro-stimulation a montré que les électrodes étaient situées juste en amont de la prostate, caudalement à la vessie.

Chez le guépard qui a été autopsié, le pôle crânial de la prostate se trouvait à une distance de 14 cm crânialement à l'anus.

Chez le chat et le guépard, la prostate semble localisée très en arrière de la vessie, au contraire des chiens, chez lesquels elle est souvent plus proche du col de la vessie.

Chez les 13 guépards qui ont été électro-éjaculés, la sonde rectale a été insérée de manière à ce que les électrodes soient situées entre 11 et 16 cm de l'anus (12,5 cm en moyenne).

1 : ENVA, 7 avenue Général de Gaulle - 94700 Maisons-Alfort, France , Email : afontbonne@vet-alfort.fr

2 : CRESAM, 165 rue Pierre Brossollette - 91160 Noisy-Le-Grand

Une contamination d'urine s'est produite durant la collecte de sperme chez 6 guépards, mais le changement de la couleur de milieu M199 (il est devenu jaunâtre en cas de contamination d'urine) nous a permis d'arrêter la procédure, de vider et de rincer la vessie, et de recommencer procédure d'électro-stimulation.

La moyenne du volume total du sperme recueilli chez chaque guépard a été de 6,6 mL. Le pH moyen du sperme prélevé était de 7,8 (7,5 à 8,6). Le nombre total de spermatozoïdes par animal était de 34,5 millions en moyenne, mais il variait entre 0,08 millions à 129 millions par animal. Un guépard s'est révélé azoospermique.

L'estimation de la motilité initiale des spermatozoïdes des échantillons prélevés était de  $46,36 \pm 24,6\%$  (0 à 80%). Le pourcentage d'anomalies spermatiques était de  $47,4 \pm 8,96\%$  (31 à 62%), ce qui constitue une assez bonne qualité pour les guépards par rapport à ce qui est publié dans la littérature.

## CONCLUSION

La réalisation d'un examen échographique préalable permet de déterminer la position exacte de la prostate. De ce fait, il est possible d'effectuer une procédure d'électrostimulation reproductible qui permet la récolte d'éjaculats de qualité acceptable chez les guépards. L'utilisation concomitante du milieu M199 pour rincer la vessie et visualiser la contamination d'urine semble améliorer la réussite de la procédure.

## RÉFÉRENCES

- 1- CROSIER AE et al. Ejaculate traits in the Namibian Cheetah (*Acinonyx jubatus*): influence of age, season and captivity. *Reprod Fertil Dev.*, 2007; 19(2): 370-382.
- 2- HOWARD JG. Semen collection, analysis and cryopreservation in non-domestic mammals. In: *Current therapy in theriogenology*, Morrow DA, 2nd Ed., Philadelphia: WB Saunders, 1986: 1047-1053.
- 3- LALOI F. Amélioration de la technique d'électro-éjaculation chez les félinés. Thèse Med Vet. Alfort 2011, 115 pages.
- 4- POPE CE et al. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *J Zoo Wildlife Med*, 1991, 22(1), 87-95.

# COLLECTION AND EXAMINATION OF SEMEN IN MALE CHEETAHS

Nicolas NUDELMANN (DVM)<sup>1,2</sup>, Flora LALOI (DVM)<sup>1</sup>, Xavier LÉVY (DVM, Dipl ECAR)<sup>2</sup>, Fernando MIR (DVM, Res ECAR)<sup>1,2</sup> & Alain FONTBONNE (DVM, PhD, Dipl ECAR)<sup>1,2</sup>

---

## SCIENTIFIC CONTEXT

Collection and examination of semen in male cheetahs (*Acinonyx jubatus*) is a determinant preliminary step for performing artificial insemination (AI) or freezing semen in this species. Indeed, many cheetahs appear to suffer from poor semen quality due to many sperm defects (teratospermia) that makes freezing of semen or its use in AI cautionable.

Protocols for electro-ejaculation of cheetahs are not well standardized. Furthermore, the literature shows that urine contamination is a frequent problem, may be due to the overstimulation of the genital tract.

The purpose of this study was to improve and standardize a technique of collection of semen and electro-ejaculation in male cheetahs.

## MATERIALS AND METHODS

One Siamese domestic cat that was intended to be euthanized for health reasons at the Alfort Veterinary College and one male cheetah found dead in a private reserve in South Africa were used for anatomical examination.

The Siamese cat was anaesthetized with a combination of medetomidine, butorphanol and ketamine. A semen sample was successfully obtained by electroejaculation (see below), then the rectal 12cm stimulation probe was left inside the rectum. The cat was subsequently euthanized and an immediate necropsy examination was performed to visualise the exact position of the rectal probe in comparison with the localization of the prostate and the bladder.

13 adult male cheetahs aged 2 to 7 years and belonging to a private South African reserve were also included in this study. Their previous reproductive performances were unknown.

These cheetahs were teleanaesthetized using a combination of 40 µg/kg dexmedetomidine IM (Dexdomitor®, Pfizer) and ketamine 2,5 mg/kg (Imalgene 1000®, Merial).

All cheetahs underwent a preliminary trans-rectal ultrasonographic examination of the prostate, to assess its size and aspect. The distance between the anus and the cranial portion of the prostate was recorded.

Before semen collection, the bladder of the animals was catheterized, emptied and then rinsed several times using M199® cell medium (Sigma-Aldrich). It was filled with 20ml of M199 just prior to the electrostimulation protocol. This pink cell medium changes its colour depending on the pH. We hypothesized that this practice would enable us to limit and better visualise the urine contamination during the ejaculation process.

Electroejaculation was performed using a standard electrostimulator (P and T Electronics, USA), with a 20 cm bipolar rectal probe with 3 longitudinal electrodes.

The tip of the penis was placed in a polystyrene cristal centrifugation tube (M23914®, Bioblock). During semen collection in each cheetah, the tube was removed and replaced after each emission of semen in order to assess the macroscopical colour and the microscopical quality.

The electrostimulation protocol consisted of 30 stimulations (10 at 2 volts, 10 at 3 volts, 10 at 4 volts) followed 5 minutes later by 30 stimulations (10 at 3 volts, 10 at 4 volts, 10 at 5 volts) then followed 5 minutes later by 20 stimulations (10 at 4 volts, 10 at 5 volts).

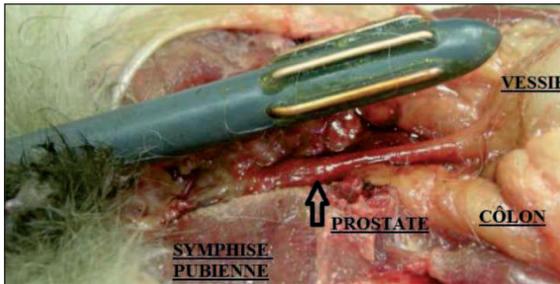
Spermogram and spermocytogram were performed using a haemocytometer (Thomas chamber) and the staining technique described by Pope et al.(1991).

1 : ENVA, 7 avenue Général de Gaulle - 94700 Maisons-Alfort, France , Email : afontbonne@vet-alfort.fr

2 : CRESAM, 165 rue Pierre Brosolette - 91160 Noisy-Le-Grand

## RESULTS

The quality of the semen collected on the Siamese domestic cat was good, and no urine contamination occurred during the ejaculation process. Its necropsy just after electro-stimulation showed that the electrodes were located just cranial to the prostate, caudal to the bladder.



Position of the electrodes of the rectal probe between the prostate and the bladder in the domestic cat

In the cheetah which was necropsied, the cranial pole of the prostate was found 14 cm cranial to the anus.

In the cat and in the cheetah, the prostate appeared localized quite caudally from the bladder, on the contrary to what is found in dogs, where it is closer to the neck of the bladder.

In the 13 cheetahs that were electro-ejaculated, rectal probes were inserted so that the electrodes were located between 11 to 16 cm from the anus (12.5 cm in average).

Urine contamination occurred in the course of semen collection in 6 cheetahs, but the change of the colour of M199 medium (it became yellowish in case of

urine contamination) allowed us to stop the procedure, empty and rinse the bladder, and begin again the electro-stimulation procedure.

The average of total volume of collected semen in each cheetah was 6.6 mL. Average pH of collected semen was 7.8 (7.5 to 8.6). The total number of spermatozoa per animal was 34.5 millions in average, but it varied between 0.08 millions to 129 millions per animal. One cheetah was azoospermic.

The estimation of initial sperm motility of collected samples was  $46.36 \pm 24.6 \%$  (0 to 80%). The percentage of sperm defects was  $47.4 \pm 8.96 \%$  (31 to 62%), which was a rather good quality for cheetahs compared with what is found in the literature.

## CONCLUSION

Using a previous ultrasonographic examination to determine the exact position of the prostate, it is possible to perform a repeatable electrostimulation procedure which enables the collection of rather good ejaculates in cheetahs. The concomittant use of M199 medium to rinse the bladder and to visualise urine contamination seems to improve the success of the procedure.

## RÉFÉRENCES

- 1- CROSIER AE et al. Ejaculate traits in the Namibian Cheetah (*Acinonyx jubatus*): influence of age, season and captivity. *Reprod Fertil Dev.*, 2007; 19(2): 370-382.
- 2- HOWARD JG. Semen collection, analysis and cryopreservation in non-domestic mammals. In: *Current therapy in theriogenology*, Morrow DA, 2nd Ed., Philadelphia: WB Saunders, 1986: 1047-1053.
- 3- LALOÏ F. Amélioration de la technique d'électro-éjaculation chez les félinés. Thèse Med Vet. Alfort 2011, 115 pages.
- 4- POPE CE et al. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *J Zoo Wildlife Med*, 1991, 22(1), 87-95.

# L'ÉCHOGRAPHIE OVARIENNE CHEZ LES GUÉPARDS ET D'AUTRES GRANDS FÉLINS

Alain FONTBONNE (DVM)<sup>1,2</sup>, Xavier LÉVY (DVM)<sup>2</sup>, Nicolas NUDELMANN (DVM)<sup>1,2</sup> & Jean-Yves ROUTIER (DVM)<sup>2</sup>

## CONTEXTE SCIENTIFIQUE

L'échographie ovarienne est actuellement utilisée chez les carnivores domestiques pour déterminer le moment de l'ovulation et d'éventuels troubles ovariens (dysovulation, kystes ovariens ou tumeurs ovariennes...).

En effet, la détection du moment de l'induction de l'ovulation par échographie pourrait être un facteur important pour le taux de réussite de l'insémination artificielle chez les félidés. Chez le chat domestique, certains auteurs ont suivi par échographie la maturation folliculaire de cycles ovulatoires et non-ovulatoires (Malandain et al. 2006). Dans cette espèce, les follicules pré-ovulatoires grandissent jusqu'à un certain diamètre, puis en l'absence d'ovulation, régressent et finalement s'atrophient. A l'aide de cette technique, il a été démontré que les follicules pré-ovulatoires mesurent environ 3mm de diamètre, moment auquel il peut être intéressant d'induire l'ovulation hormonalement. Cependant, ces études n'ont pas déterminé le temps optimal pour induire l'ovulation. Chez les chats domestiques, il a été montré que la durée de maturation folliculaire pendant l'oestrus naturel varie selon la chatte, et par conséquent, le délai entre le début de l'oestrus et le stade pré-ovulatoire varie énormément.

Chez plusieurs animaux sauvages, certaines études ont démontré l'intérêt de l'échographie pour suivre l'évolution de la maturation folliculaire en utilisant des sondes transrectales (Hildebrandt et al. 2000). D'autres études ont été publiées concernant l'évolution du diamètre folliculaire chez les félidés pendant la période pré-ovulatoire utilisant une méthode endoscopique chirurgicale, mais cette technique semble trop invasive pour les animaux vivant *in-situ*.

Le but de cette étude était de confirmer l'utilisation potentielle et l'utilisation pratique de l'échographie ovarienne chez les guépards et autres félins sauvages.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

11 femelles guépards (*Acinonyx jubatus*) vivant dans une réserve privée en Afrique du Sud ont participé à cette étude. 4 lionnes (*Panthera leo*), 1 femelle léopard (*Panthera pardus*), 1 femelle jaguar (*Panthera onca*) and 1 femelle puma (*Puma concolor*) résidant dans 2 parcs zoologiques en France ont également été incluses dans l'étude.

Parmi les 11 femelles guépards, 7 femelles ont été induites hormonalement en chaleurs 72 heures avant par injection d'eCG (100 IU IM, Chronogest PMSG®, Intervet, Holland). Les autres 4 femelles étaient à différents stades du cycle oestral. Toutes les autres femelles ont été induites en chaleurs hormonalement (eCG, 100 to 100 IU IM), sauf une lionne qui présentait des signes cliniques d'hyperoestrus au moment de l'examen.

L'examen échographique des ovaires a été réalisé sur tous les animaux sous anesthésie générale. Toutes les femelles guépards, la femelle léopard et la femelle puma ont été anesthésiées à l'aide d'une combinaison de médétomidine et kétamine. La lionne et la femelle jaguar ont été anesthésiées à l'aide d'une combinaison de détomidine et tilétamine.

Le matériel d'échographie consistait en un échographe portable Logiqbook XP® (General Electric's Healthcare) avec 2 sondes (une sonde 4-10 Mz microconvexe pédiatrique et une sonde 4-10mZ linéaire).

- Une échographie transcutanée des ovaires a été réalisée chez 5 femelles guépards, une lionne et une femelle jaguar : après tonte des poils en région sous-lombaire, juste en arrière de la dernière côte, du gel de couplage a largement été appliqué et l'échographie a été réalisée ensuite.

- Une échographie ovarienne transrectale a été réalisée chez tous les animaux : à l'aide d'un guide plastique pour guider la sonde et rigidifier le câble à l'intérieur du rectum pour avancer jusqu'au site des ovaires.

Chez toutes les femelles, un frottis vaginal et un échantillon de sang hépariné pour mesurer la progestérone plasmatique ont été réalisés.

## RÉSULTATS



Follicules pré-ovulatoires chez une femelle guépard induite en chaleurs artificiellement avec de l'eCG

Les images d'échographies transcutanées étaient de mauvaises qualités. Chez les femelles en oestrus, il a été impossible de visualiser clairement la taille exacte des follicules pré-ovulatoires et de déterminer les caractéristiques exactes des ovaires.

L'échographie transrectale a permis d'obtenir de meilleures images des ovaires chez tous les animaux, incluant les lionnes. En particulier, les follicules pré-ovulatoires ont été clairement visualisés (cf figure 1) et mesurés chez les femelles guépards et 2 lionnes. Une troisième lionne présentait un large kyste ovarien dans un ovaire probablement à l'origine des signes cliniques d'hyperoestrus. Une femelle guépard et une femelle puma étaient gestante pendant l'examen, les corps jaunes ont été clairement visualisés.

Chez toutes les femelles, les images échographiques des ovaires étaient en accord avec les résultats des frottis vaginaux et taux hormonaux.

1 : ENVA, 7 avenue Général de Gaulle - 94700 Maisons-Alfort, France afontbonne@vet-alfort.fr

2 : CRESAM, 165 rue Pierre Brosolette - 91160 Noisy-Le-Grand, France

## CONCLUSION

L' échographie ovarienne transrectale est une technique fiable pour visualiser les ovaires chez les guépards et d'autres grands félins.

Les auteurs remercient les Drs Thomas Hilbebrandt, Frank Göritz, Thierry Petit, Corine Esser, Rosemary Moigno, Florence Ollivet-Courtois, Cindy Maenhoudt and Natalia Santos pour leur conseils utiles et aides techniques.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1- FONTBONNE A. *In vivo* ovulation, oocyte maturation and fertilisation in the bitch. 2008. Download at: [http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/50/09/86/PDF/These\\_A\\_Fontbonne.pdf](http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/50/09/86/PDF/These_A_Fontbonne.pdf)
- 2- HERMES R. et al. Establishment of assisted reproduction technologies in female and male African wild dogs *Lycaon pictus*. *J. Reprod. Fertil Suppl.* 2001; 57: 315-321
- 3- HILDEBRANDT TB et al. Ultrasonography as an important tool for the development and application of reproductive technologies in non-domestic species. *Theriogenology* 2000 53(1): 73-84
- 4- MALANDAIN E. et al. Croissance folliculaire et ovulation chez la chatte. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France.* 2006, 159(2) : 113-120. Download at : <http://www.academie-veterinaire-defrance.org/bulletin/pdf/2006/Numero02/113.pdf>

## OVARIAN ULTRASONOGRAPHY IN CHEETAHS AND OTHER LARGE FELIDS

Alain FONTBONNE (DVM)<sup>1,2</sup>, Xavier LÉVY (DVM)<sup>2</sup>, Nicolas NUDELMANN (DVM)<sup>1,2</sup> & Jean-Yves ROUTIER (DVM)<sup>2</sup>

### SCIENTIFIC CONTEXT

Ovarian ultrasonography is now widely used in domestic carnivores to determine the time of ovulation and eventual ovarian abnormalities (dysovulation, ovarian cysts or tumours...).

Indeed, detection of ovulation induction time by ultrasonographic examination could be an important factor in the success rate of artificial insemination in felids. In the domestic cat, some authors have monitored follicular maturation in non-ovulatory and ovulatory cycles by ultrasonography (Malandain et al. 2006). In this species, the pre-ovulatory follicles grow to a certain diameter, and, in absence of ovulation, regress in size and undergo atresia. With this technique, it has been demonstrated that pre-ovulatory follicles are around 3 mm in size, time at which it may be interesting to induce ovulation hormonally. However, these studies have not determined the optimal time to induce ovulation. In domestic cats, it has been shown that the duration of follicular maturation during natural oestrus varies depending on the queen, and therefore the delay between the beginning of oestrus and the pre-ovulatory stage varies significantly.

In several wild animals, some studies have demonstrated the interest of ultrasound in order to follow follicular maturation using trans-rectal probes (Hildebrandt et al. 2000). Other studies have been published on the evolution of follicular diameters in felids during the pre-ovulatory period using a surgical endoscopic technique, but this technique appears too invasive for in-situ living animals.

The purpose of our study was to confirm the potential use and adapt the practicability of ovarian ultrasound in cheetahs and other wild felids.

### MATERIALS AND METHODS

11 females cheetahs (*Acinonyx jubatus*) living in South African private reserves were successfully used for this study. 4 lionesses (*Panthera leo*), 1 female leopard (*Panthera pardus*), 1 female jaguar (*Panthera onca*) and 1 female puma (*Puma concolor*) living in 2 French zoological parks were also included in this study.

Among the 11 female cheetahs, 8 females had been hormonally induced in oestrus 72 hours before by injecting eCG (100 IU IM, Chronogest PMSG®, Intervet, Holland). The other 4 females were at different stages of the oestrous cycle. All other females had been hormonally induced in oestrus (eCG, 100 to 100 IU IM), except one lioness that was showing clinical signs of hyperoestrus.

Ovarian ultrasonographic examination was performed in all animals under general anaesthesia. All cheetahs, the leopard and the puma were anaesthetized using a combination of medetomidine and ketamine. The lionesses and jaguar were anaesthetized with a combination of tiletamine and detomidine.



Trans-cutaneous images appeared of rather poor quality. In oestrous females, we were unable to clearly visualise the exact size of pre-ovulatory follicles and to determine the exact features of the ovaries

The ultrasound equipment consisted of a portable ultrasound machine Logiqbook XP (General Electrics Healthcare) with 2 transducers (4-10 Mz microconvex paediatrics transducer and 4-10mZ linear transducer).

- A transcutaneous ovarian ultrasound examination was performed in 5 cheetahs, 1 lioness and 1 jaguar: after shaving the hair in the caudal area of the last rib, an ultrasound gel was thoroughly applied and ultrasound was performed.

- A transrectal ovarian examination was performed in all other animals: using a plastic handle to guide the transducer and rigidify the cable inside the rectum up to the ovarian sites.

In all females, a vaginal smear and a blood sample (heparin test tube) to assess progesterone ( $\pm$  oestradiol) was performed.

### RESULTS

Trans-cutaneous images appeared of rather poor quality. In oestrous females, we were unable to clearly visualise the exact size of pre-ovulatory follicles and to determine the exact features of the ovaries.

Trans-rectal ultrasonography allowed much better imaging results of the ovaries in all animals,

1 : ENVA, 7 avenue Général de Gaulle - 94700 Maisons-Alfort, France [afontbonne@vet-alfort.fr](mailto:afontbonne@vet-alfort.fr)

2 : CRESAM, 165 rue Pierre Brosolette - 91160 Noisy-Le-Grand, France

including lionesses. Especially, large pre-ovulatory follicles were very clearly measured in cheetahs and in 2 lionesses. A third lioness presented a large follicular cyst in one ovary probably at the origin of the clinical signs of hyperoestrus. One cheetah and one puma were found pregnant during the examination, corpora lutea were clearly seen.

Trans-rectal ultrasonography allowed much better imaging results of the ovaries in all animals, including lionesses. Especially, large pre-ovulatory follicles were very clearly measured in cheetahs and in 2 lionesses. A third lioness presented a large follicular cyst in one ovary probably at the origin of the clinical signs of hyperoestrus. One cheetah and one puma were found pregnant during the examination, corpora lutea were clearly seen.

In all females, the ovarian ultrasonographic images were in accordance with the results of vaginal smears or hormonal assays.

## CONCLUSION

Trans-rectal ovarian ultrasonography is a reliable technique to visualise the ovaries in cheetahs and other large felids.

*The authors want to thank Drs Thomas Hilbebrandt, Frank Göritz, Thierry Petit, Corine Esser, Rosemary Moigno, Florence Ollivet-Courtois, Cindy Maenhoudt and Natalia Santos for their useful advices and technical help.*

## REFERENCES

- 1- FONTBONNE A. *In vivo* ovulation, oocyte maturation and fertilisation in the bitch. 2008. Download at: [http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/50/09/86/PDF/These\\_A\\_Fontbonne.pdf](http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/50/09/86/PDF/These_A_Fontbonne.pdf)
- 2- HERMES R. et al. Establishment of assisted reproduction technologies in female and male African wild dogs (*Lycaon pictus*). *J. Reprod. Fertil Suppl.* 2001; 57: 315-321
- 3- HILDEBRANDT TB et al. Ultrasonography as an important tool for the development and application of reproductive technologies in non-domestic species. *Theriogenology* 2000 53(1): 73-84
- 4- MALANDAIN E. et al. Croissance folliculaire et ovulation chez la chatte. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France.* 2006, 159(2) : 113-120. Download at : <http://www.academie-veterinaire-defrance.org/bulletin/pdf/2006/Numero02/113.pdf>



**7<sup>th</sup> EVSSAR Congress**  
*The European Veterinary Society for Small Animal Reproduction*

Catholic University of Louvain  
Louvain-La-Neuve, Belgium  
14-15<sup>th</sup> May, 2010

EDITORS: Tom Rijsselaere, Gaia Cecilia Luvoni and Philippe Bogaerts

## Artificial insemination in wild felids

A. Fontbonne<sup>1</sup>, F. Göritz<sup>2</sup>, T. Hildebrandt<sup>2</sup>, X. Lévy<sup>3</sup>, M.I.M. Martins<sup>1</sup>, E. Fontaine<sup>1,3</sup>,  
JY. Routier<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores (CERCA). Ecole Nationale Vétérinaire. 7 avenue du Général de Gaulle. 94704 Maisons-Alfort Cedex. France. <sup>2</sup>Reproduction Management. Institute for Zoo and Wildlife Research (IZW). Alfred-Kowalke-Straße 17. D-10315 Berlin. Germany.

<sup>3</sup>Conservation et Reproduction des Espèces Sauvages Africaines Menacées (CRESAM). 165 rue Pierre Brossolette. 93160 Noisy Le Grand. France. E-mail: afontbonne@vet-alfort.fr

Of the 37 felid species, all but the domestic cat are classified as threatened with extinction (1). Many are classified vulnerable by the IUCN (International Union for Conservation of Natural Resources). Regarding this decline, the use of artificial insemination (AI) would be especially valuable in the areas where very few animals remain and are scattered. The IUCN states that “artificial insemination is a useful tool that has potential application toward maintaining the viability of *in situ* populations” (Status Survey and Conservation Action Plan on Wild Cats 1996). Because habitat fragmentation is an important threat to the long term survival of some felid populations, this technique would be a very useful tool for virtually restoring connectivity among isolated and distant populations, hence reducing the risk of inbreeding depression (2). In such a case, this technique may help increasing the genetic pool, when inseminating females with the semen of males which are genetically as distant as possible (3). Finally, in a near future, the development of genetic resource banking may lead to a possible use of frozen or chilled semen to inseminate large felids and “it will also be less dangerous, more cost-effective and more practical to transport frozen spermatozoa than stress-susceptible live animals”. “Frozen semen may be used interactively with living populations to periodically infuse genetic material among diverse captive or wild-stocks or preserved genes from previous generations” (IUCN 1996). As such, AI may be tried first in captive animals, to ensure increased genetic diversity of these captive populations (4, 5). But the development of a non-invasive technique may also in a near future help conservationists to use AI in some specific cases in wild-living animals.

In many countries, veterinary programs have been developed aiming to improve the management and efficacy of assisted reproduction technologies. In France, for example, the CRESAM non-profit society began in 2005 a project aiming to perform AI *in situ* in African cheetahs and lions, with the scientific help of the Berlin IZW, which is one of the major research institute working in this field in Europe. Many other international research groups have aroused in this topic, such as IBREAM (Institute for Breeding Rare and Endangered African Mammals).

The aim of our presentation is to describe the practical aspects and often the difficulty of developing repeatable protocols and field scientific trips in wild felids assisted reproduction, due to the low availability of animals, their very heterogeneous habitat (captive, semi-captive or free-ranging) and the low number of publications, which sometimes include controversial statements from different authors. We shall mainly focus on AI, as other biotechnologies may be described elsewhere (*see lecture from P. Comizzoli et al.*).

### 1. Seasonality and cyclicity.

The knowledge of sexual endocrinology is essential before developing successful assisted reproductive programs. In wild felids, hormonal cycles, identified by assaying steroid hormones in faeces (3/4<sup>th</sup> of the cases) or in urine, have been described in only 18/36 species (6). *In situ*, some felid species clearly show a reproductive season (tiger, snow leopard, Pallas cat...) while others seem to be cycled all year long (lion, leopard, cougar, ocelot, cheetah...). In many species like cheetahs, ocelots and many small cats, there seems however to that it exist very long periods of ovarian inactivity, independent of seasonal anoestrus. This can be amplified by stress and captivity.

For example, 25% of female cheetahs living in American zoos do not express any ovarian activity all year long (6). Furthermore, social interactions play a major role in inducing or preventing oestrus. This shows the necessity to adapt the protocol to the context, captivity or not, reproductive season or not...

## **2. Induced of oestrus and ovulation.**

It would probably be beneficial performing AIs during natural oestrus as it may give better results. Indeed, gonadotropins may lead to abnormal endocrine environment (7). However, in felids, behavioural signs of heat are often difficult to detect with certainty, especially in wild-living animals. Vaginal cytology may be a good indicator (8) but repeated anaesthetic procedures, potentially bearing side effects, may be detrimental for ovulation.

In experimental protocols, oestrus is most often induced using gonadotropins, especially eCG, as felid ovaries are very sensitive to its hormonal action and one injection is often enough to induce heats (9). In wild animals, gonadotropins can be administered intramuscularly using a dart (9). The dosage is not proportional to the size of the cat (the 10 kg ocelot necessitates a dose twice as big as for the 35 to 40 kg cheetah). The main published protocols have been collected in the review by Pelican et al (10). Most often, hCG is injected 80 to 84 hours following eCG administration in order to induce ovulation, which occurs 37 to 42 hours later. The delay between eCG and hCG administration seems to play an essential role, as premature hCG induction may lead to ovulation of immature oocytes incapable of being fertilised and/or an incorrect embryonic development (11), while a proper delay may facilitate intrafollicular maturation, promoting fertilization and cleavage (9).

However, many recent studies tend to show that gonadotropins bear many side effects: ovarian hyper-stimulation, counteraction with embryonic development or implantation, immunosensibilization...(7, 9). Furthermore, posology of gonadotropins seems to play a major role on the further AI success. In cats, the dose of eCG played a direct role to obtain, or not, *in vivo* embryos after surgical AI (12). In cheetahs, eCG 200 IU induced fertile oestrus, while oestrus induced with eCG 100 IU or eCG 400 IU were infertile (13). Indeed, high doses of gonadotropins may be detrimental for oocyte quality and increase susceptibility to oocyte degeneration (9,14). Alltogether, the optimal protocol for oestrus induction and timing of ovulation induction remains to be elucidated (15). Also, due to the difficulty of detecting oestrus in many species, it is advisable to use gonadotropins only when the ovary is not already in a follicular or luteal phase. This is why many authors nowadays recommend a pre-treatment with progestins to force an ovarian rest before inducing oestrus (16).

Most wild felids seem to be sensitive to subcutaneous GnRH agonists implants. Due to the initial "flare-up" activating effect, it may be profitable to induce fertile oestrus with such drugs. Indeed, we managed to induce oestrus using subcutaneous Ovuplant® implants containing deslorelin in 2 cheetahs and 1 lioness living in South Africa, while it failed to induce heats in 3 cheetahs living in captivity in France (Fontbonne unpublished). To avoid side-effects of hCG, ovulation also may be induced in wild cats using GnRH and its analogues (9).

One controversial topic concerns the eventual bad effect of anaesthesia on ovulation, as most wild felids need of course a chemical restraint during the insemination procedure. Many authors recommend not beginning the inseminations in the pre-ovulatory period, minimum 42 hours following ovulation induction in large cats (9,13,17). However, others have published successful results in the domestic cat, performing AIs under anaesthesia just after inducing ovulation (18). Others get similar results with a tendency to get better results when anaesthesia is performed after ovulation (19). However, all these experimental trials are difficult to compare, as some of them concern natural oestrus (18) and others induced oestrus (13). Stress due to repeated manipulations

of animals, together with general anaesthesia, may be detrimental for ovulation (20). Furthermore, the role of various anaesthetic agents on ovulation should be more carefully studied.

Finally, timing of ovulation induction could be an important factor. In the domestic cat, some authors have monitored follicular maturation in non-ovulating and ovulating cycles by ultrasound (21, 22). However, they have not studied the optimal time of ovulation induction. In domestic cats, it has been shown that the timing of follicular maturation during natural oestrus varies depending on the queen, and therefore the delay between the beginning of oestrus and the pre-ovulatory stage varies significantly (22). In several large wild felids, some studies have demonstrated the interest of ultrasound following of follicular maturation using trans-rectal probes (23). Other studies have been published on the evolution of follicular diameters in felids during the pre-ovulatory period using surgical endoscopic techniques (13). This may be an important clue, as it is not sure that eCG administration will always induce pre-ovulatory follicles at a fixed timing. Furthermore, it may not be necessary to wait for a maximal follicular size to induce ovulation. For example, some trials have studied the timing of induction of ovulation in the dromedary (*Camelus dromedarius*). From their results, it appears that the optimal time for induction of ovulation occurs before the ovarian follicles have reached their maximal pre-ovulatory diameter (24). That may also be the case in felids. Therefore, a better timing of ovulation induction may help in increasing the conception rate after AI obtained in these species (15).

### **3. Sperm preservation in wild felids.**

In wild felids, semen is generally collected by electro-ejaculation. It may be chilled (very few publications) or frozen. However, nowadays felid semen banking is not done on a routine basis. However, some research institutes like the IZW have begun banking semen in a variety of wild felids (Görizt, personal communication). There are few published data about this very valuable sperm conservation technique (25, 26). This may be due to the high level of teratospermia (high percentage of sperm cellular defects) within all felid species, which make the conservation of feline sperm more difficult to achieve (27). Due to ethical reasons and also due to the difficulty of experimenting on wild animals, the domestic cat (*Felis silvestris catus*) has been frequently used as a model to develop protocols and techniques of assisted reproduction and biotechnologies to be applied in wild felids. Concerning the semen, the biochemical and biophysical characteristics remain more or less the same within all felid species, allowing studies conducted in the domestic cat to be applied also in wild felids (28, 29). The season of the year may also play a role in sperm quality and thus conservation (30). However, although some semen characteristics are essential to the fertilizing ability of sperm, in cats, there is a lack of studies demonstrating the relationship between the evaluated sperm motion parameters and the *in vitro* or *in vivo* fertilizing potential (20). Furthermore, teratospermia being an important trait of felid semen, it seems necessary to develop a freezing semen protocol especially devoted to teratospermic semen (29), as “bad-freezer” males cannot have their frozen ejaculates used for AI at the moment, although usable in other reproductive biotechnologies.

### **4. Artificial insemination techniques.**

Artificial Insemination (AI) has been developed in the domestic cat and in many wild felids (31). In the domestic cats, the pregnancy rate after AI is comprised between 11 % to 80 %, depending on the type of heats (natural or induced), the number of spermatozoa inseminated and the type of AI (with fresh or frozen sperm, deposited in the vagina or inside the uterus) (32). As a whole, in wild felids, the pregnancy rate after AI remains moderate, between 5 to 50 %. In the cheetah, some AI trials have been conducted. The results vary between 0 % and 46.2% (13, 31). The best technique seems to be obtained when fresh semen is deposited inside the uterus. Howard et al. (31) have mainly used surgical endoscopic AI techniques (coelioscopy). However, in order to inseminate wild felids, a non-surgical non-invasive technique is preferable. A non-invasive ultrasound-guided artificial insemination has been developed in felids (33). A modified non-invasive inseminating technique

has also been described (34). These techniques allow performing a trans-cervical catheterization and an intra-uterine deposition of semen. They may potentially be used in wild-living cats.

### References:

- 1: Pelican et al. *Therio.*, 2006, 66(1), 37-48.
2. Andrabi SMH and Maxwell WMC, *Anim Reprod Sc*, 2007, (99), 223-243.
3. Queney G. et al. *Proceed. Felid Biology and Conversation Conf. Oxford (2007)*, p.100
4. Hermes R. et al., *Anim Reprod Sc*, 2004, (82-83), 49-60.
5. Swanson WF, *Therio*, 2006, (66), 49-58.
6. Brown JL, *Therio*, 2006, (66), 25-36.
7. Graham et al. *Therio*. 2000, (54), 1117-1131.
8. Asa CS et al., *Zoo Biol*, 1992, (11), 139-151.
9. Kützler MA, *Therio*, 2007, (68), 354-374.
10. Pelican KM et al. *Therio.*, 2006, (66), 37-48.
11. Saint-Dizier M et al. *Molecular Reprod Dev*, 2007, 74(8), 989-996 .
12. Yu XF et al. *Therio*, 2010, 73(4),413-420
13. Howard JG et al., *Biol Reprod.*, 1997, **56**, 1059-1608.
14. Goodrowe KL et al., *Anim Reprod Sc*, 2000, (60-61), 389-403.
15. Axner E, *Reprod Dom Anim*, 2008, (43,Suppl.2), 144-149.
16. Pelican KM et al., *Dom Anim Endocrin.*, 2008, (34), 160-175.
17. Donoghue AM et al., *J Reprod Fertil*, 1996, (107), 53-58.
18. Tanaka A et al., *J Vet Med Sci*. 2000 Nov;62(11):1163-7.
19. Chatdarong K. et al. *Therio.*, 2007, (68), 1326-1333.
20. Villaverde AI et al. *Anim Reprod Sc*, 2009 (114), 434-442.
21. Günzel-Apel AR et al. *Tierarztl Prax Ausg K Klientiere Heimtiere*, 1998, 26(4), 275-83.
22. Malandain E. et al., *Proceed. EVSSAR congress, Liège (202)*, p.141.
23. Hildebrandt TB et al., *Therio*. 2000, (53), 73-84.
24. Skidmore JA et al. *J Reprod Fertil*. 1996,106(2),185-192.
25. Hermansson U et al. ,*Therio*. 2007 Apr 15;67(7):1239-1248.
26. Siemieniusch M et al. *Anim Reprod Sci* 2007 May;99(1-2):135-44.
27. Pukhazenti BS et al. *Therio*. 2006, (66), 112-121.
28. Swanson WF, *ILAR J.*, 2003, 44 (4), 307-316.
29. Crosier AE et al. *Cryobiol*. 2006 (52), 169-181.
30. Stornelli MA et al. *Reprod Dom Anim*, 2009 (44, Suppl.2), 287-290.
31. Howard JG and Wildt DE, *Therio.*, 2009, (71), 130-148.
32. Tsutsui T, *Therio.*, 2006, 66(1), 122-125
33. Hildebrandt TB et al. *Proceed. EVSSAR congress. Oslo (2000)*, p.60.
34. Fontbonne et al. *Proceed. Felid Biology and Conversation Conf. Oxford (2007)*, p.76.

Close this window to return to IVIS  
www.ivis.org



# ***ABSTRACTS***

**6<sup>th</sup> International Symposium on  
Canine and Feline Reproduction**

**&**

**6<sup>th</sup> Biennial EVSSAR Congress**

**European Veterinary Society for Small Animal Reproduction**

***"Reproductive biology and medicine of  
domestic and exotic carnivores"***

University of Veterinary Sciences  
9<sup>th</sup> – 11<sup>th</sup> July 2008  
Vienna, Austria

Editors: G. England, P. Concannon, S. Schäfer-Somi

Reprinted in IVIS with the permission of the Symposium Organizers

## DEVELOPMENT OF AN ENDOSCOPIC TRANSCERVICAL NON-INVASIVE ARTIFICIAL INSEMINATION TECHNIQUE FOR LARGE FELIDS

Alain Fontbonne <sup>1)</sup>, Xavier Lévy <sup>2)</sup>, Emmanuel Fontaine <sup>1)</sup>, Hélène Jacques <sup>2)</sup>, Corine Esser <sup>3)</sup> and Jean-Yves Routier <sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup>Ecole Nationale Vétérinaire, 7 avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France; <sup>2)</sup>38320 Eybens, France ; <sup>3)</sup>83160, La Valette du var, France ; <sup>4)</sup>CRESAM, 93160 Noisy le Grand, France. Email: [afontbonne@vet-alfort.fr](mailto:afontbonne@vet-alfort.fr).

**Introduction** - Artificial insemination (AI) is expected to become a promising tool in wild felid conservation programs. Among the indications of this technique, we may find habitat fragmentation, risk of inbreeding depression in isolated populations and the use of frozen and/or chilled semen. In felids, partly due to teratospermia, much better results are obtained after AI when the semen is deposited directly inside the uterus (1). So far, AI in wild felids has mainly been tried in captive animals, using surgery - laparotomy or laparoscopy (1). However, such a surgical technique is too invasive to be used without any risk of post-surgical complications in wild animals living in the field. In order to develop a non-invasive AI technique, we adapted the endoscopic transcervical insemination technique used in domestic dogs (2).

**Materials and methods** - The trials were made on 8 females. 5 females were living in a zoo (Zoo du Mont Faron, 83 Toulon, France): one tigress (*Panthera tigris*), one lioness (*Panthera leo*), one leopard (*Panthera pardus*), one jaguar (*Panthera onca*) and one cheetah (*Acinonyx jubatus*). Trials were also attempted on 3 other cheetahs living in 3 different places. Heats were induced using eCG (Chronogest PMSG®. Intervet Inc. The Netherlands). Depending on the species, 100 to 1000 IU were injected IM according to the protocols described by Pelican et al. (3). 72 hours later, the animals were put under general anaesthesia with the following protocols (Cheetahs/Leopard: medetomidine (Domitor®) 40 to 100 µg/kg + ketamine (Ketamine Virbac ®) 2.5 to 3 mg/kg. Lions/Jaguar: Tiletamine (Zoletil®) 1.5 mg/kg + 40 µg Detomidine (Domosedan®) 40 µg/kg. Tigress: Tiletamine (Zoletil®) 5 mg/kg). A human ureteral catheter (Neoplex ®, Porges Ltd, France / Diameter 5 Fr) was optically guided through the cervix ostium up to the uterine horns inside a very thin rigid human uretero-roscope (length 34 cm / diameter 9.5 fr) without obturator (Karl St orz Inc., Germany) inserted inside the proximal vagina. In the tigress, the attempt was made with a dog urinary catheter (diameter 8 Fr) guided with a rigid cystoureteroscope ( + sheath and obturator) used for domestic dogs (length 29 cm/ diameter 22 Fr. Karl Storz Ltd. Germany). In order to facilitate the visualisation of opening of the anterior vagina, air was insufflated using an automatic insufflator (Karl St orz Inc., Germany) or preferably a manual air pump. The video images were recorded with a portable computerised monitor (Telepack®, Karl Storz Ltd., Germany).

**Results** - Catheterisation of the uterine cervix was successful in 8/8 attempts. The duration of the entire procedure took between 3 to 26 minutes, around 10 minutes in average. Between the narrow proximal and the wider distal vagina, numerous folds of the vaginal mucosa were visualised in all females. In 2 cases (one jaguar and one cheetah), it was difficult to penetrate in the proximal vagina due to the difficulty in visualising the posterior part of this organ in the middle of these numerous vaginal folds.

**Conclusion** - Endoscopic transcervical technique may provide a non-invasive intra-uterine artificial insemination technique for large felids. The adaptation of this technique to smaller

wild cats has to be further studied. Of course, artificial inseminations using this technique remain to be performed. However, because habitat fragmentation is an important threat to the long term survival of large cat populations, this technique may be a very useful tool for virtually restoring connectivity among isolated and distant populations, hence reducing the risk of inbreeding depression.

### **References**

- (1) Howard JG., Roth TL., Byers AP., Swanson WF., Wildt DE. 1997. Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard. *Biol Reprod*, 56, 1059-1068.
- (2) Wilson M.S. Endoscopic transcervical insemination in the bitch. In "Recent advances in small animal reproduction" [www.ivis.org](http://www.ivis.org), 12 dec 2003. 8 pages.
- (3) Pelican KM., Wildt DE., Pukazhenti B. Howard JG. 2006. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology*, 66, 37-48.

### **Acknowledgements**

The authors want to thank especially Mr Christophe Lecromps and Mr Ludovic Valente from Karl Storz company, France, for providing the endoscopic and monitoring equipment and for their technical assistance.

# Programme and Abstracts

## **Felid Biology and Conservation**

*An International Conference*

The Wildlife Conservation Research Unit, Oxford University  
Panthera Foundation  
IUCN/SSC Cat Specialist Group

**17-20 September 2007**

**Oxford**

Compiled by: Joeline Hughes and Richard Mercer

Cover Art: Priscilla Barlett

Cover Design:

## **Development of a Non-Invasive Intra-Uterine Artificial Insemination Technique for Large Felids**

Alain Fontbonne<sup>1\*</sup>, Xavier Lévy<sup>1</sup>, Emmanuel Fontaine<sup>1</sup>, Hélène Jacques, Corine Esser & Jean- Yves Routier

<sup>1</sup> *Alfort Veterinary College, Paris, France*

Artificial insemination (AI) is expected to become a promising tool in wild felid conservation programs. In felids, partly due to teratospermia, much better results are obtained after AI when the semen is deposited directly inside the uterus. So far, AI in wild felids has mainly been tried in captive animals, using surgery - laparotomy or laparoscopy. Such a surgical technique is too invasive to be used without any risk of post-surgical complications in wild animals living in the field. In order to develop a non-invasive AI technique, we adapted a trans-cervical intra-uterine inseminating technique. A human ureteral catheter (4 or 5 Fr) is optically guided through the cervix ostium up to the uterine horns inside a very thin human ureteroscope (Karl Storz Inc., Germany) inserted inside the proximal vagina. The duration of the entire procedure often takes less than 10 minutes. Successful trials have been made in hormonally induced oestrous large felids females: one tiger, one lioness, one leopard, one jaguar and four cheetahs. Because habitat fragmentation is an important threat to the long term survival of large cat populations, this technique would be a very useful tool for virtually restoring connectivity among isolated and distant populations, hence reducing the risk of inbreeding depression.

\* [afontbonne@vet-alfort.fr](mailto:afontbonne@vet-alfort.fr)

## **Establishment of Genetic Profiles in Cheetahs Using Microsatellites Developed in the Domestic Cat**

Guillaume Queney<sup>1</sup>, Delphine Delattre<sup>1</sup>, Alain Fontbonne<sup>2</sup>, Jean-Yves Routier<sup>3</sup> & Bertrand Lafrance<sup>4</sup>

*<sup>1</sup> Antagene 69760 Limonest, France<sup>2</sup> Alfort Veterinary College, Paris, France<sup>3</sup> 93160 Noisy le Grand, France, France<sup>4</sup> 2136 Djibouti, Republic of Djibouti*

Non-invasive techniques of assisted reproduction may be useful in order to provide complementary tools that may help, in specific cases, to restore connectivity among isolated and distant populations, hence reducing the risk of inbreeding depression. For this purpose, genetic profiles have been established in cheetahs in order to optimise natural matings or artificial inseminations with the highest genetic heterogeneity as possible. The genetic prints have been obtained from an 8 microsatellites panel already developed and commonly used in the domestic cat. Genetic profiles have been obtained from 17 cheetahs of different origin: 9 in South Africa (6) and French zoos (3) and 8 in Djibouti. The results show a mean polymorphism of 5.5 alleles per marker (2 to 8) and a strong genetic structuration among sub-species. 12 specific alleles were identified in the South-African sub-population (out of a total of 30 alleles) and 11 specific alleles were identified in the Djibouti sub-population (out of a total of 29 alleles).

The allelic diversity and the heterozygosity calculated from these microsatellites markers are comparable with what is seen among different breeds in the domestic cat.

\* [gqueney@antagene.com](mailto:gqueney@antagene.com)

# Establishment of genetic profiles in cheetahs using microsatellites markers developed in the domestic cat

Guillaume QUENEY (1), Delphine DELATTRE (1), Alain FONTBONNE (2), Jean-Yves ROUTIER(3), Bertrand LAFRANCE (4)

(1) Laboratoire ANTAGENE - Immeuble Le Mallem, 2 allée des Séquoias, 69760 Limonest, France - www.antagene.com

(2) Alfort Veterinary College, Paris, France - afontbonne@vet-alfort.fr

(3) 93160 Noisy le Grand, France - France

(4) 2136 Djibouti, Rep. of Djibouti



## Material and methods

17 cheetahs :

- 6 from South Africa (*Acinonyx jubatus jubatus*)
- 8 from Djibouti (*Acinonyx jubatus raynieri*)
- 3 from french zoos



DNA extracted from cheek swab or blood samples  
8 microsatellites markers genotyped  
(developed in domestic cat)



## Aims

Non invasive techniques of assisted reproduction:

- Optimise reproduction with the highest genetic heterogeneity
- Restore connectivity among isolated and distant populations
- Reduce the risk of inbreeding depression

## Abstract

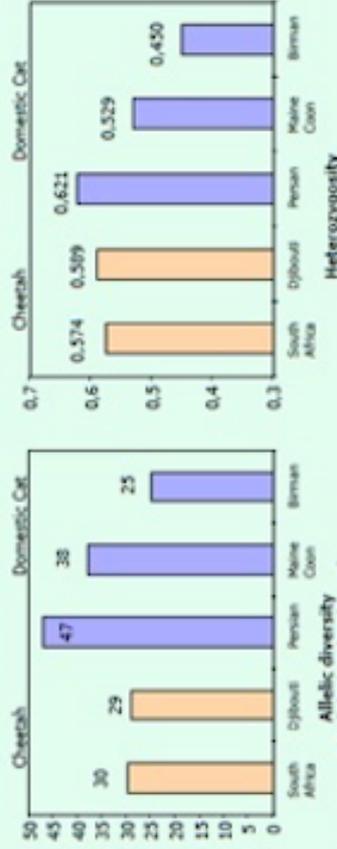
Non-invasive techniques of assisted reproduction may be useful in order to provide complementary tools that may help, in specific cases, to restore connectivity among isolated and distant populations, hence reducing the risk of inbreeding depression.

For this purpose, genetic profiles have been established in cheetahs in order to optimize natural matings or artificial inseminations with the highest genetic heterogeneity as possible. The genetic profiles have been obtained from an 8 microsatellites panel already developed and commonly used in the domestic cat. Genetic profiles have been obtained from 17 cheetahs of different origin: 9 in South Africa (6) and french zoos (3) and 8 in Djibouti. The results show a mean polymorphism of 5,5 alleles per marker (2 to 8) and a relatively strong genetic structuration among sub-species. 12 specific alleles were identified in the South-African sub-population (out of a total of 30 alleles) and 11 specific alleles were identified in the Djibouti sub-population (out of a total of 29 alleles).

The allelic diversity and the heterozygosity calculated from these microsatellites markers are comparable with what is seen among different breeds in the domestic cat.

## Relatively high genetic diversity

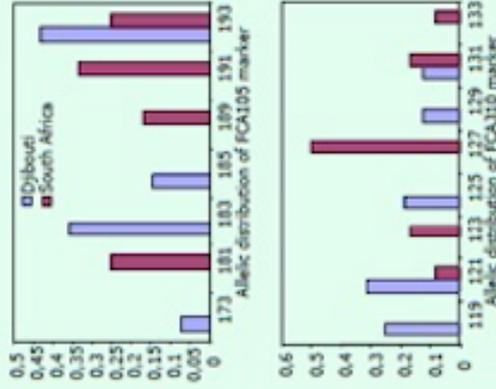
compared to different breeds in domestic cat



44 alleles on the 8 microsatellite markers  
30 and 29 alleles in each subspecies

## Relatively strong genetic structuration

between the 2 subspecies



12 specific alleles in South Africa (among 30 alleles)  
11 specific alleles in Djibouti (among 29 alleles)

## Applications for in situ conservation (natural populations) or ex situ conservation (zoos, banks)

Establishment of cheetahs genetic profiles (8 microsatellite markers)  
Evaluation of genetic diversity of local populations or sub-populations  
Evaluation of genetic distances between cheetahs  
Reproduction (natural mating or artificial insemination) between the more genetically distant cheetahs  
Development of a bank of genetic profiles for wild or captive cheetahs in the world

**BULLETIN**  
**DE**  
**L'ACADÉMIE VÉTÉRINAIRE**  
**DE FRANCE**



**CE BULLETIN EST CÉDÉ AVEC LE MANTENANT DU MINISTRE DE L'ALIMENTATION, DE L'AGRICULTURE  
ET DE LA PÊCHE, AVEC LE SOUTIEN DES ASSOCIATIONS ET FIRMS SUIVANTES:**

**Animaf Société Alimentation, Traffart, Norovio**

# L'INSÉMINATION ARTIFICIELLE CHEZ LES FÉLIDÉS

## ARTIFICIAL INSEMINATION IN FELIDS

Par Alain FONTBONNE <sup>(1)</sup>, Xavier LEVY <sup>(2)</sup>, Emmanuel FONTAINE <sup>(2)</sup> et Jean-Yves ROUTIER <sup>(3)</sup>  
(communication présentée le 25 janvier 2007)

### RÉSUMÉ

L'insémination artificielle chez le chat domestique et les félinés sauvages répond à plusieurs indications. Chez le chat, elle peut notamment permettre d'aider la reproduction lorsque l'accouplement ne se produit pas ou difficilement et de favoriser les échanges géographiques de semence et donc un brassage et une meilleure sélection génétiques. Chez les félins sauvages, elle joue un rôle complémentaire au sein des programmes de conservation. Son utilisation est cependant complexe. L'œstrus et l'ovulation sont le plus souvent induits par l'emploi de gonadotropines qui possèdent cependant des effets indésirables, notamment un risque d'hyperstimulation ovarienne. La semence des mâles est généralement récoltée par électro-éjaculation. Elle peut être congelée. Néanmoins, un problème spécifique aux félins tient à la tératospermie, c'est-à-dire la production de nombreux spermatozoïdes porteurs d'anomalies morphologiques. L'insémination artificielle donne de meilleurs résultats lorsque la semence est déposée par voie intra-utérine. Pendant longtemps, la laparoscopie a été la technique de référence, mais récemment, des techniques de cathétérisme du col utérin par voie vaginale ont été mises au point, aussi bien chez le chat que chez certains félinés sauvages. Les résultats de l'insémination artificielle chez les félinés restent moyens (souvent moins de 50 % de gestations obtenues).

**Mots-clés :** chat, chatte, félinés, insémination artificielle.

### SUMMARY

*Artificial insemination in the domestic cat and in wild felids has several indications. In the cat, it may replace natural reproduction when matings are unsuccessful or difficult, and it may help to perform geographical exchanges of semen and therefore enhance genetic improvement. In wild felids, it plays a complementary role inside conservation programs. However, its use is complex. First, oestrus and ovulation have to be induced. This is most often obtained using gonadotrophins, which unfortunately may induce undesirable effects, like ovarian hyperstimulation. In males, the semen is generally collected by electro-ejaculation. It may be frozen. However, teratospermia, which is the production of numerous spermatozoa showing morphological abnormalities, is a specific problem affecting felids. Intrauterine inseminations give better results. For a long period, laparoscopy was recommended in felids to perform intrauterine inseminations. Recently, new techniques consisting of catheterizing the cervix through a vaginal access have been developed in the cat as in some wild felids species. Altogether, the rate of success of artificial insemination in felids remains moderate.*

**Key words:** cat, queen, felids, artificial insemination.

(1) Docteur Vétérinaire, DEA, Diplômé du Collège Européen de Reproduction Animale (ECAR), Maître de Conférences en Reproduction Animale à l'ENV Alfort, Président de l'EVSSAR (European Veterinary Society for Small Animal Reproduction), Vice Président de l'Association CRESAM (Conservation et Reproduction des Espèces Sauvages Africaines Menacées).

(2) Docteurs Vétérinaires, Résidents en Reproduction Animale à l'ENV Alfort.

(3) Docteur Vétérinaire, Président du CRESAM.

## INTRODUCTION

Les félidés forment une famille animale très dispersée géographiquement (il existe des félins sur tous les continents sauf l'Antarctique), dont les membres sont aussi de format très disparate : le chat à pattes noires (*Felis nigripes*) pèse 1,5 kg et le tigre de l'Amour (*Panthera tigris altaica*) atteint parfois 300 kg ! Malgré ces apparentes différences, les félins montrent une similarité très forte sur le plan des mécanismes qui régissent leur reproduction.

Parmi les 37 espèces de félidés recensées, 36 sont, à des degrés divers, menacées d'extinction. L'influence néfaste de l'homme (chasse, développement de l'agriculture, détérioration de l'habitat...) et l'émergence de maladies, souvent transmises par le bétail (tuberculose...), expliquent notamment cette situation critique. À ce titre, l'insémination artificielle (IA) est un outil complémentaire qui, trop longtemps négligé, peut jouer un rôle important dans les programmes de conservation des petits et grands félins.

La physiologie de la reproduction du chat domestique est désormais assez bien connue. Chez les félidés sauvages, les données concernant la reproduction manquent, particulièrement dans certaines espèces moins connues du grand public et donc moins étudiées. Le chat domestique a d'ailleurs servi de modèle pour le développement de nouvelles techniques de reproduction assistée chez les félidés sauvages et notamment, de l'insémination artificielle.

## LA PHYSIOLOGIE ET LE CONTRÔLE DE LA REPRODUCTION CHEZ LES FÉLIDÉS

### Les profils hormonaux

La connaissance de l'endocrinologie sexuelle est essentielle pour développer des techniques de reproduction assistée.

Chez la chatte domestique chez laquelle les profils hormonaux ont été établis grâce à des prises de sang répétées, la durée des cycles est très variable selon les races. L'œstrus dure de 3 à 7 jours, avec des signes comportementaux plus marqués au 3<sup>e</sup> jour, au cours duquel il est conseillé, en élevage, de réaliser l'accouplement avec un maximum de chances de réussite.

Chez les félidés sauvages, les cycles hormonaux, identifiés grâce aux dosages des hormones stéroïdes dans les fèces (trois-quart des cas) ou dans l'urine, ont été étudiés chez seulement 18 des 36 espèces de félins sauvages (Brown 2006). Ils montrent de grandes variations suivant les espèces : globalement, les femelles sont cyclées toutes les 2 à 4 semaines, la durée des chaleurs variant de 3 à 10 jours.

### La saisonnalité

Le chat domestique est une espèce à reproduction saisonnière : les chattes présentent sous nos climats un anœstrus hivernal. Toutefois, lorsqu'un éclaircissement suffisamment important, « *suf-*

*fisant pour lire un journal sans effort* » (soit 323 lux au niveau du sol), est maintenu pendant 14 heures par jour, elles présentent des cycles en continu toute l'année (Leyva *et al.* 1989). On sait désormais que la mélatonine joue un rôle déterminant dans cette appréciation de la photopériode, l'administration de mélatonine dans cette espèce pouvant supprimer temporairement la cyclicité.

Chez les félidés sauvages, certaines espèces ont une activité sexuelle clairement saisonnière (tigre, panthère des neiges, chat de Pallas...), alors que d'autres semblent être cyclées toute l'année (lions, léopard, puma, guépard, ocelot...), même s'il existe des pics de naissances à certaines périodes (Racine 2006).

### Existence de périodes non saisonnières d'anœstrus

Des espèces comme le guépard, l'ocelot et diverses espèces de chats sauvages présentent une inactivité folliculaire à certaines périodes, parfois très longues, indépendantes de celle de l'anœstrus saisonnier.

Les conditions de captivité peuvent amplifier ce phénomène : la mesure des concentrations de stéroïdes dans les fèces a permis de montrer que 25 % des femelles guépards, en captivité dans les parcs zoologiques américains, n'ont aucune activité ovarienne au cours de l'année (Brown 2006).

Les interactions sociales jouent un rôle important dans le développement de cet anœstrus. Les guépards femelles, qui vivent souvent isolées à l'état sauvage, manifestent souvent un anœstrus, lorsqu'on les héberge à plusieurs en captivité. Si on les sépare, l'activité ovarienne normale réapparaît fréquemment. À l'inverse, chez l'ocelot, c'est au contraire l'hébergement solitaire qui semble inhiber l'activité ovarienne (Pelican *et al.* 2006).

### Déclenchement de l'ovulation

La chatte domestique a longtemps été considérée comme une espèce à ovulation provoquée, déclenchée par l'accouplement. Il faut plusieurs coïts répétés pendant une courte période, pour induire un pic de LH d'intensité suffisante pour déclencher l'ovulation (Baudon 2003). Mais récemment, l'existence d'ovulations spontanées a été démontrée chez des chattes en groupe (Baudon 2003).

Chez les félidés sauvages, des espèces (lion, léopard, et plusieurs chats sauvages notamment) semblent également capables de présenter des ovulations spontanées dans certaines conditions encore mal connues. Elles ne se produisent pas ou sont exceptionnelles chez d'autres espèces (tigre, guépard, puma, ocelot...).

### Fertilité

Bien que les femelles des félidés soient cyclées jusqu'à un âge avancé, leur fertilité est très réduite au-delà d'un certain âge, surtout si elles sont primipares. Ainsi, les chances de réussite de l'IA sont très réduites après l'âge de 7 ans chez le guépard, alors que les femelles vivent jusqu'à 12 à 15 ans en captivité (Pelican *et al.* 2006). Ce phénomène ne serait pas lié à un défaut de la réponse aux traitements hormonaux destinés à déclencher

les chaleurs et l'ovulation, mais plutôt à la moins bonne qualité des ovocytes et à des altérations du milieu utérin perturbant l'implantation et la gestation.

Chez les mâles, indépendamment de l'âge, on observe fréquemment une tératozoospermie (taux élevé d'anomalies des spermatozoïdes), laissant penser que la fertilité des félinés mâles n'est pas non plus très bonne (Pukazhenti *et al.* 2006).

## LES INDICATIONS DE L'INSÉMINATION ARTIFICIELLE CHEZ LES FÉLINÉS

### Chez le chat domestique

Chez les éleveurs de chats, l'IA, encore peu utilisée dans cette espèce, peut permettre :

- d'aider à la reproduction lorsque l'accouplement ne se produit pas ou se réalise avec difficulté (faible libido chez les chats Persans, par exemple) ;
- de lutter contre les maladies sexuellement transmissibles ;
- de permettre des échanges géographiques de semence et donc un brassage et une meilleure sélection génétiques ;
- de permettre la reproduction de mâles castrés - ce qui est fréquent chez le chat pour minimiser le marquage urinaire - ou décédés.

Sur le plan de la recherche, des sous-populations de chats porteurs de maladies génétiques sont élevées pour être utilisées comme modèles de maladies génétiques humaines. Ces petites populations se reproduisent souvent mal du fait d'une consanguinité accrue et des maladies qu'elles développent. L'insémination artificielle peut aider à maintenir des naissances chez ces lignées de chats.

### Chez les autres félinés

Les 36 espèces de félinés sauvages sont toutes, à des degrés divers, menacées d'extinction. L'IA est une des armes pouvant être utilisées dans les programmes de conservation. Ses indications peuvent être notamment :

- de permettre l'obtention de naissances et donc le maintien dans la nature de petites populations très décimées ou dispersées géographiquement ;
- de favoriser le brassage génétique en inséminant les femelles avec la semence de mâles éloignés génétiquement et/ou géographiquement ;
- d'obtenir des naissances lorsque les conditions environnementales ne le permettent pas pour des raisons inconnues. Moins de 20 % des mâles guépards et moins de 30 % des femelles se reproduisent dans les parcs zoologiques d'Amérique du Nord, ce qui limite la variabilité génétique de cette espèce en captivité ;
- d'éviter de déplacer les femelles ou de mettre en contact des individus qui ne se connaissent pas, ce qui induit notamment des stress multiples ou des risques d'agressions. On préfère ainsi le transport de la semence des mâles, ce que l'IA peut permettre. Cette solution est également souvent moins coûteuse.

## INDUCTION DES CHALEURS ET DE L'OVULATION

### Utilisation de gonadotropines

Les protocoles de déclenchement des chaleurs et de l'ovulation chez les félinés font le plus souvent appel à des gonadotropines chorioniques : eCG (equine chorionic gonadotropin, anciennement PMSG), puis hCG (human chorionic gonadotropin).

La sensibilité des ovaires des félinés aux gonadotropines est importante et une seule injection d'eCG est le plus souvent suffisante pour déclencher des chaleurs. Ceci est en partie lié à la grande persistance de l'effet de cette hormone dans l'organisme pendant 120 heures chez le chat domestique (Swanson *et al.* 1996). L'eCG agit en augmentant le nombre de récepteurs de LH dans l'ovaire. Notons que les doses utilisées ne sont pas proportionnelles au poids des femelles traitées (l'ocelot de 10 kg nécessite une dose d'eCG deux fois plus élevée qu'un guépard de 35 ou 40 kg).

Chez le chat domestique, un des protocoles les plus courants recommande une injection intramusculaire de 100 UI d'eCG, suivie 80 heures plus tard d'une injection de 75 UI d'hCG (Pelican *et al.* 2006).

En ce qui concerne les félinés sauvages, Pelican *et al.* (2006) ont récemment rédigé une synthèse des principaux protocoles rapportés dans la littérature. La plupart du temps, la chronologie des événements est assez standardisée entre espèces : l'hCG est le plus souvent administrée 80 à 84 heures après l'eCG. Les doses administrées varient, suivant les espèces, entre 100 UI (panthère longibande) et 1000 UI (tigre) pour l'eCG, et entre 75 UI (chat léopard) et 750 UI (tigre) pour l'hCG. L'ovulation se produit, suivant les espèces, entre 37 et 42 heures après l'administration d'hCG.

Plusieurs études récentes indiquent que les traitements d'induction par les gonadotropines peuvent générer une hyperstimulation ovarienne : l'augmentation anormale du taux plasmatique d'œstrogènes, nettement plus élevé que lors des cycles naturels, peut alors diminuer la qualité des ovocytes ovulés et perturber le développement embryonnaire précoce, l'implantation et le maintien de la gestation. Ce phénomène serait en partie lié au développement différé de follicules ovariens accessoires, qui est observé 5 à 7 jours après la première ovulation. Il s'explique par le fait que l'eCG a une action prolongée dans le temps et peut induire une seconde vague de maturation folliculaire ; quant à l'hCG, bien qu'ayant un effet inducteur de l'ovulation prédominant chez les félinés, elle peut aussi induire la folliculogénèse qui, chez les félinés, semble avoir un déterminisme très particulier. Saint-Dizier *et al.* (2007) ont très récemment montré qu'au cours de la folliculogénèse chez la chatte, les récepteurs de LH s'expriment très tôt dans les cellules de la granulosa des follicules, dès que ceux-ci atteignent un diamètre de 800 µm, beaucoup plus précocement que ce qu'on observe dans la plupart des autres espèces. De ce fait, il n'est pas étonnant que cette hormone ait une action inductrice sur le développement folliculaire ovarien dans cette espèce.

Lors de cycles induits par les gonadotropines, on peut également observer la sécrétion prématurée ou excessive de progestérone ou au contraire, des insuffisances lutéales au cours de la gestation qui suit. Les avortements précoces qui peuvent s'en suivre expliquent peut-être en partie le relatif faible taux de réussite de l'IA chez les félins.

L'ajustement des doses de gonadotropines utilisées est extrêmement important pour la réussite d'une IA chez les félins. Chez 19 femelles guépards inséminées, Howard *et al.* (1997) n'ont obtenu des naissances que lorsque les femelles recevaient 200 UI d'eCG, et les traitements par des doses de 100 UI ou de 400 UI ont été sans effet. Or, dans le premier cas, de grands corps jaunes sont observés, pouvant expliquer le maintien de la gestation, alors que dans le second, les corps jaunes, plus petits et plus nombreux, concourent vraisemblablement à une sécrétion insuffisante pour assurer la gestation. La qualité des corps jaunes dépendrait ainsi en grande partie de la dose injectée mais la signification et l'origine de ces deux types de corps jaunes restent encore obscures.

Le guépard semble toutefois être l'espèce chez laquelle on risque le moins d'induire une hyperstimulation ovarienne par les gonadotropines, ce qui pourrait être lié à l'existence des périodes d'inactivité ovarienne relativement fréquentes dans cette espèce, qui durent entre 2 et 5 mois. En effet, cette hyperstimulation ovarienne a moins de probabilité de se produire si le traitement est appliqué en dehors des périodes d'activité folliculaire. C'est pourquoi, chez les grands félins, plusieurs protocoles récents visent à induire un repos ovarien par des progestogènes ou par des implants délivrant en continu des agonistes de la GnRH, avant le traitement inducteur des chaleurs par les gonadotropines (Pelican *et al.* 2006).

L'efficacité des gonadotropines est inconstante et souvent diminuée chez les espèces de félidés qui présentent parfois des ovulations spontanées. Il est aussi fréquent, dans la plupart des cas, que plusieurs follicules, ayant pourtant atteint le stade pré-ovulatoire, n'ovulent pas lors de chaleurs induites et restent à ce stade non-ovulé au moment de l'IA (Howard *et al.* 1997; Pelican *et al.* 2006).

Enfin, les administrations répétées de gonadotropines sont immuno-sensibilisantes et leur efficacité est diminuée si les injections sont trop rapprochées. Aussi conseillons-nous de ne pas les utiliser chez une même femelle à moins de 6 mois d'intervalle.

#### Utilisation de pFSH/pLH

Afin de minimiser l'hyperstimulation ovarienne secondaire et la formation d'anticorps, certains auteurs ont utilisé avec succès des protocoles d'induction de chaleurs par la FSH ou la LH porcines purifiées (chat domestique, caracal, tigre, guépard, lion, jaguar, puma...). L'efficacité de ces hormones porcines n'est pas surprenante car, récemment, une forte homologie structurale de ces hormones porcines avec la FSH et la LH du tigre a été mise en évidence. Ces protocoles nécessitent des injections répétées, souvent quotidiennes, et sont peu applicables sans

déclencher des stress importants chez les espèces sauvages, sauf dans certaines conditions bien particulières de captivité. Le développement d'implants ou de suspensions huileuses à libération prolongée pourrait aider à pallier cette difficulté.

Il n'est pas impossible non plus que les progrès de la génétique moléculaire (les FSH et LH du tigre ont déjà été séquencées) permettent de synthétiser prochainement des gonadotrophines homologues, possédant une efficacité accrue chez les félins (Pelican *et al.* 2006).

#### Utilisation d'agonistes de GnRH

La mise sur le marché d'implants libérant en continu dans l'organisme des agonistes de GnRH (leuprolide, desloréline, nafaréline...), possédant dans un premier temps un effet activateur de la folliculogénèse, a permis d'induire des chaleurs suivies d'ovulation (Pelican *et al.* 2006). Dans une étude préliminaire, l'association Conservation et Reproduction des Espèces Sauvages Africaines Menacées (CRESAM) a induit des chaleurs chez deux femelles guépards et une lionne avec des implants sous-cutanés de desloréline (données personnelles non publiées). Les résultats sont toutefois encore trop fragmentaires pour pouvoir tirer des conclusions sur l'efficacité de tels protocoles.

#### Stimulation mécanique

Lors de chaleurs déclenchées naturellement, Baudon (2003) rapporte le déclenchement réussi de l'ovulation chez 8 chattes sur 12 à l'aide d'une stimulation mécanique du vagin. Le procédé consistait à introduire dans le vagin un écouvillon de type coton-tige et à en frotter la muqueuse. Les stimulations étaient répétées cinq fois à 30 minutes d'intervalle. Une telle méthode est inutilisable chez les félins sauvages.

#### Influence de l'anesthésie sur l'ovulation

La plupart des espèces de félins sauvages nécessitent une contention chimique pour permettre l'administration d'hormones ainsi que la réalisation des IA. Des études ont suggéré que l'anesthésie pourrait éventuellement interférer avec le transport de la semence et perturber l'ovulation, surtout lorsque cette anesthésie se produisait en phase pré-ovulatoire (Howard *et al.* 1992). Elles ont conduit plusieurs auteurs à conseiller la réalisation d'IA post-ovulatoires, chez le chat domestique aussi bien que chez les félins sauvages. Par exemple, chez le guépard, Howard *et al.* (1997) recommandent de ne pas débiter les inséminations et donc, de ne pas anesthésier les femelles dans les 42 heures qui suivent l'injection d'hCG, pour être certain que l'ovulation a déjà eu lieu lors de l'intervention sous anesthésie; ils ont ainsi obtenu des gestations après des inséminations réalisées sous anesthésie entre 43,5 et 48,0 heures après l'injection d'hCG. La même observation a été faite chez le puma (Barone *et al.* 1994) et chez le tigre (Donoghue *et al.* 1996).

Cette théorie est toutefois remise en cause chez le chat domestique par les études d'une équipe japonaise (Tsutsui *et al.* 2000): dix chattes sur 18 (56 %) ont été gestantes à la suite d'IA

pratiquées sous anesthésie générale avant l'ovulation, alors que seulement cinq sur 24 (21 %) l'ont été suite à des IA effectuées après l'ovulation.

### Choix du moment du déclenchement de l'ovulation

Chez la chatte domestique, Malandain *et al.* (2006) ont montré que le suivi de la croissance folliculaire par échographie ovarienne était la technique la plus fiable pour décider du moment optimal d'induction de l'ovulation en vue d'une IA. Elle permet d'optimiser la réussite de l'intervention, par rapport à des protocoles standardisés, proposant l'injection d'hCG à un délai fixe après celle d'eCG, ou à un jour fixe lors de l'oestrus naturel. Chez les félins sauvages, on pourrait n'induire l'ovulation, grâce à cette méthode de suivi, que lorsque les follicules ovariens ont atteint une taille pré-ovulatoire. L'association CRESAM a développé une technique d'échographie ovarienne chez le guépard, utilisant une sonde transrectale (données non publiées). Néanmoins, les études en sont encore à leur début et la nécessité d'anesthésies répétées ne facilite pas son utilisation.

### Réussite de l'induction de l'ovulation

Le dosage de la progestérone plasmatique permet de juger indirectement de la survenue de l'ovulation par la mise en route d'une activité lutéale. Toutefois, chez les félins, le taux sanguin de progestérone reste basal entre 40 et 50 heures après l'injection d'hCG et ne montre une augmentation significative que cinq jours après l'ovulation. Chez les félins sauvages, cette activité lutéale est plus facilement repérée en dosant les métabolites de la progestérone dans les fèces.

## PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DE LA SEMENCE

### Prélèvement du sperme chez le chat domestique

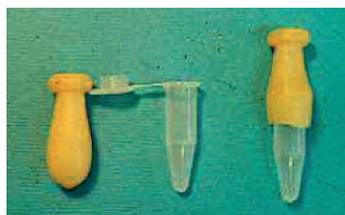
La semence peut être récoltée à l'aide d'un vagin artificiel (*figure 1*) ou par électro-éjaculation. Le sperme épидидymaire peut également être obtenu par ponction de l'épididyme ou par sa dissection chirurgicale post-mortem.

Les chats peuvent être entraînés en 2 à 3 semaines à la méthode de récolte manuelle par un vagin artificiel. Celui-ci est fabriqué à l'aide d'un tube Eppendorf relié à une poire pour pipette Pasteur coupée à son extrémité la plus large. Il est nécessaire de placer le mâle en contact avec une femelle en chaleurs, afin qu'il s'excite en la chevauchant. Le pénis est dévié et placé dans le vagin artificiel pour l'éjaculation.

L'électroéjaculation (*figure 2*) est la technique de récolte la plus utilisée car elle ne nécessite pas d'apprentissage préalable et elle peut s'employer chez des chats agressifs. Une sonde rectale spécifique est introduite dans le rectum sur environ six centimètres. Il s'agit d'une électrode d'un centimètre de diamètre, portant trois à cinq électrodes longitudinales à son extrémité proximale. L'électroéjaculateur est constitué d'un générateur ajustable qui permet le contrôle précis du stimulus électrique appliqué à l'animal. Chez le chat, on applique le plus souvent des stimulations toutes les trois secondes, de deux à six volts d'amplitude. Trois à quatre séries de 30 stimulations sont ainsi répétées, séparées par un repos de cinq minutes.

Baudon (2003) recommande, afin de minimiser les pertes de semence, d'introduire au préalable sur quatre à cinq centimètres une sonde urétrale féline reliée à une seringue à insuline dont le piston a été retiré. La semence monte dans le corps de la seringue par capillarité au cours du prélèvement. Le *tableau 1* indique, à titre d'exemple, les caractéristiques moyennes de la semence des chats utilisés.

Très récemment, Zambelli et Cunto (2005) ont décrit une technique de récolte par sondage urétral simple : une sonde urétrale fine (diamètre 3 Fr) est introduite sur neuf centimètres, après



**Figure 1 :** Méthode de construction d'un vagin artificiel utilisable chez le chat pour recueillir la semence (cliché ENVA).



**Figure 2 :** Sonde d'électroéjaculation utilisée chez le chat : les trois électrodes longitudinales sont placées en face ventrale du rectum. (cliché ENVA).

	Volume de sperme en mL	Mobilité	Pourcentage d'anomalies	Intégrité des acrosomes	Concentration en millions de spermatozoïdes par mL	Nombre de spermatozoïdes inséminés en millions
Moyenne	0,292	75 %	29 %	95 %	31,667	8,633
Écart type	0,079	9,369 %	7,468 %	4,116 %	25,159	7,281
Maximum	0,4	90 %	39 %	98 %	100	30
Minimum	0,1	15 %	15 %	85 %	12	4

**Tableau 1 :** Caractéristiques moyennes de 12 éjaculats prélevés par électro-éjaculation (d'après Baudon 2003).

anesthésie par la médétomidine administrée par voie intramusculaire à la dose de 130 à 140 µg/kg. Cette molécule,  $\alpha 2$  agoniste, permet, à forte dose, l'élimination de spermatozoïdes dans l'urètre sans éjaculation complète.

Le nombre de spermatozoïdes récoltés n'est pas ou peu affecté par le type de technique. Néanmoins, l'électroéjaculation tend à augmenter le volume des sécrétions prostatiques et donc, le volume des éjaculats recueillis.

### Prélèvement du sperme chez les félins sauvages

On utilise en général l'électro-éjaculation nécessitant l'emploi de sondes spécifiques adaptées au format de l'espèce, le générateur restant le même.

À titre d'exemple, le protocole de stimulation utilisé avec succès chez le guépard et le lion par l'association CRESAM consiste en trois séries de 30 stimulations selon le protocole suivant :

- 1<sup>ère</sup> série: 30 stimulations (10 stimulus de 4 volts, 10 de 5 volts, 10 de 6 volts),
- 2<sup>e</sup> série: 30 stimulations (10 stimulus de 5 volts, 10 de 6 volts, 10 de 7 volts),
- 3<sup>e</sup> série: 20 stimulations (10 stimulus de 6 volts, 10 de 7 volts).

### Conservation de la semence

La conservation de la semence éjaculée, par réfrigération à température ambiante ou à +4 °C, ainsi que par congélation, a été réalisée chez le chat domestique et plusieurs espèces de félinidés sauvages (Luvoni *et al.* 2003 ; Zambelli *et al.* 2006). La congélation de sperme épидидymaire a été tentée avec succès, notamment chez le lion (Racine 2006). La conservation de la semence de chats et des différents félins est cependant assez difficile du fait de la mauvaise qualité (tératospermie), fréquente, du sperme des félins.

### La tératospermie chez les félinidés

La tératozoospermie (ou tératospermie), c'est-à-dire la production de nombreux spermatozoïdes porteurs d'anomalies morphologiques, est observée chez au moins 28 espèces de félinidés sur les 37 existantes (Pukazhenti *et al.* 2006). La technique de récolte de la semence, l'abstinence prolongée ou au contraire la répétition des prélèvements de sperme ne jouent aucun rôle sur ce phénomène.

L'anomalie la plus fréquemment rencontrée chez les félins est l'existence d'une pièce intermédiaire coudée. Les anomalies de la tête, de l'acrosome ou des flagelles et la persistance de gouttelettes cytoplasmiques (corps résiduels) sont également fréquentes.

Les spermatozoïdes porteurs d'anomalies morphologiques peuvent subir une absence ou un retard de capacitation, une difficulté à franchir la zone pellucide et à développer une réaction acrosomique. La congélation d'un éjaculat tératospermique est également plus aléatoire. Récemment, il a été démontré une baisse de fertilité liée à l'intégrité de la chromatine. Au bilan,

plus le sperme est porteur d'anomalies spermatiques, moins l'animal est fertile.

L'origine de ce phénomène pourrait être liée à la diminution de la diversité génétique chez certaines espèces (guépard par exemple). Ainsi, les mâles vivant dans des sous-populations félines très isolées sont très tératospermiques (cas du lion asiatique, de la panthère de floride chez laquelle près de 90 % des spermatozoïdes sont anormaux dans les éjaculats). Chez le chat domestique, la tératospermie augmente dans les lignées très consanguines, utilisées par exemple comme modèles de maladies génétiques humaines (Pukazhenti *et al.* 2006).

Dans les populations très isolées ou en captivité, cette tératospermie est parfois accompagnée d'oligozoospermie (faible nombre de spermatozoïdes par éjaculat) et d'asthénozoospermie (faible mobilité des spermatozoïdes éjaculés). En captivité, le stress et une alimentation inadaptée pourraient aggraver ces phénomènes. Ainsi, une supplémentation vitaminique peut parfois augmenter la quantité de spermatozoïdes éjaculés, mais pas leur qualité morphologique (Pukazhenti *et al.* 2006). L'influence d'une baisse du taux d'androgènes intratesticulaires est suspectée chez les félins tératospermiques, mais constitue un point encore mal élucidé et controversé.

Un mécanisme adaptatif semble s'être mis en place chez les félins : ceux-ci produisent plus de spermatozoïdes que la plupart des autres mammifères par gramme de tissu testiculaire, et les pertes en cellules germinales au cours de la spermatogenèse sont réduites. Par exemple, les chats domestiques normospermiques ont un taux d'apoptose cellulaire de 30 % après les deux premières divisions méiotiques. Chez ces mêmes chats, le rendement de la méiose est de 2,8 spermatides rondes pour un spermatocyte primaire. Chez les chats tératospermiques, le taux d'apoptose cellulaire n'est que de 15 % et le rendement de la méiose est de 3,5 spermatides rondes pour un spermatocyte primaire (Franca & Godinho, 2003). Ainsi, la quantité de spermatozoïdes semble être acquise au détriment de leur qualité, ce qui indique des mécanismes très particuliers et encore peu explicités de la spermatogénèse et de la spermiogénèse dans cette famille animale (Pukazhenti *et al.* 2006).

Pukazhenti *et al.* (2006) ont démontré expérimentalement que des chats domestiques très consanguins et très tératospermiques avaient significativement des testicules 35 % plus gros et des tubes séminifères 40 % plus volumineux par rapport à des chats normospermiques. Chez les chats tératospermiques, non seulement la spermatogenèse était accrue, mais la spermiation était également accentuée, avec davantage de spermatides longues obtenues par gramme de tissu testiculaire.

Selon certains auteurs, le mécanisme d'adaptation des éjaculats à cette tératospermie expliquerait que des accouplements répétés soient nécessaires chez les félins, afin que davantage de sperme soit déposé dans les voies génitales femelles.

Néanmoins, la part exacte de cette forte tératospermie dans le déclin de la fertilité des félins n'est pas encore très claire.

## TECHNIQUES D'INSÉMINATION ARTIFICIELLE

Les premières inséminations artificielles ont été réalisées avec succès chez le chat domestique, il y a une trentaine d'années; ce n'est pourtant que très récemment, à partir de 2000, que l'intérêt pour l'IA est réapparu. De ce fait, le nombre de publications est encore assez limité et l'IA féline n'est toujours pas une technique de routine en médecine vétérinaire et au sein des programmes de conservation de la faune sauvage.

Concernant les espèces sauvages, des IA ont déjà été suivies de naissances chez le guépard, le tigre, le puma, le léopard, l'ocelot, la panthère des neiges et plusieurs petits félins. Par contre, aucune IA n'a été conduite chez le lion, sans doute parce que cette espèce se reproduit assez facilement en captivité.

Dans la plupart des espèces (chat, guépard...), la dose de spermatozoïdes inséminés joue un rôle important dans le taux de réussite obtenu, que l'IA soit réalisée par voie intravaginale ou intra-utérine.

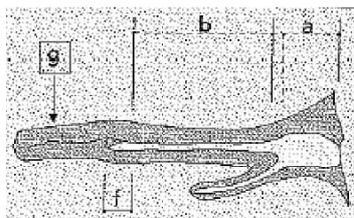
Notons que l'IA après réfrigération de la semence à +4 °C dans un dilueur protecteur, technique couramment utilisée chez le chien, qui permet de transporter la semence sur de grandes distances dans un récipient isotherme, est théoriquement possible chez les félins. Mais, à notre connaissance, aucune IA avec de la semence réfrigérée transportée n'a encore été répertoriée chez le chat ni chez les félinidés sauvages.

### IA intra-vaginale

Chez la chatte domestique, la semence peut être déposée dans le vagin antérieur (**figure 3**) à l'aide d'un cathéter de très fin diamètre, par exemple, une aiguille fine à extrémité mousse de 9 cm de long (Sojka *et al.* 1970) ou un cathéter de nylon de 9 cm de long pour 1,5 mm de diamètre (Tanaka *et al.* 2000). Baudon (2003) utilise une sonde urinaire de chat coupée à 4,5 cm, avec un mandrin plus court que la sonde, qui guide le passage dans le vagin postérieur.

Les chattes peuvent ou non être anesthésiées. Même anesthésiées, celles-ci sont souvent maintenues avec les membres postérieurs surélevés pendant 15 à 20 minutes, afin de limiter les reflux de semence (**figure 4**).

Après insémination de semence fraîchement récoltée, Sojka *et al.* (1970) ont obtenu des taux de gestation de 54 % (14/26) avec des doses de 50 à 100 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes déposées au fond du vagin. Les chattes n'étaient pas anesthésiées. Sous anesthésie,



**Figure 3 :** Coupe longitudinale de la partie distale de l'appareil génital de la chatte (d'après Fontbonne 2006). a : vestibule (ou vagin postérieur) ; b : vagin sensu scripto (ou vagin antérieur) ; f : col utérin ; g : corps utérin.

utilisant des doses plus élevées (80 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes), ce qui correspond environ à la dose collectée après deux éjaculations successives, Tanaka *et al.* (2000) ont obtenu 78 % de gestations (7/9). Selon ces auteurs, il faut utiliser de fortes doses lors d'IA intra-vaginale car les chats, dans la nature, effectuent plusieurs accouplements successifs avec la même chatte, ce qui augmente la dose de spermatozoïdes déposée au fond du vagin. Cependant, Baudon (2003) a obtenu 4 gestations chez 9 chattes inséminées par voie intra-vaginale, avec seulement 4 à 9 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes.

En semence congelée, une seule publication mentionne une réussite de 11 % (6/56) après insémination artificielle intra-vaginale (Platz *et al.* 1978).

Chez les félinidés sauvages, des naissances ont été obtenues par IA intra-vaginale en semence fraîche chez le léopard de Perse et le tigre, en déposant de très fortes doses de spermatozoïdes (500 x 10<sup>6</sup>) (Chagas *et al.* 2000). Néanmoins, sans doute en raison de la mauvaise qualité de la semence des félins sauvages, le rendement des IA intra-vaginales est très mauvais : 23/23 échecs chez le guépard par exemple (Racine 2006).

### IA intra-utérine

En raison des résultats assez faibles de l'IA intra-vaginale, la plupart des auteurs recommandent l'IA intra-utérine chez les félinidés.

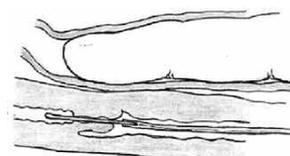
#### Chez le chat domestique

Dans cette espèce, l'IA intra-utérine a été réalisée pendant longtemps par laparotomie ou par laparoscopie.

Zambelli & Cunto (2005) ont décrit une technique très séduisante de cathétérisme du col utérin par voie vaginale, en utilisant un fin cathéter urinaire de chat en plastique de 3 Fr de diamètre avec une aiguille fine à bord mousse à son extrémité. Ce cathéter est repéré par palpation transrectale et guidé dans le conduit cervical en appuyant sur le col, afin de rendre l'axe du col utérin horizontal (**figure 5**). Grâce à cette technique, les auteurs ont réussi à cathétériser le col utérin chez 4 chattes sur 8.

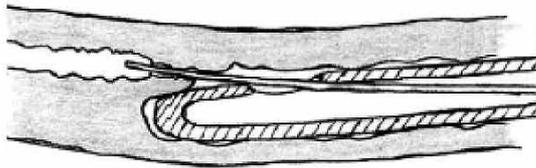


**Figure 4 :** Sur-élévation des membres postérieurs d'une chatte au cours d'une insémination intra-vaginale (cliché E. Malandain, ENVALfort)



**Figure 5 :** Position du doigt dans le rectum lors de cathétérisme du col utérin chez la chatte (d'après Zambelli & Cunto, 2005, avec l'autorisation des auteurs).

D'autres techniques, apparemment moins efficaces, font appel à un cathéter urinaire pour chat, en plastique de 3,5 Fr de diamètre, guidé dans le vagin par une petite gouttière en polypropylène, obtenue à partir d'une sonde urinaire modifiée (Chatdarong *et al.* 2001) (*figure 6*).



**Figure 6 :** Cathétérisme du col utérin chez la chatte par la technique décrite par Chatdarong *et al.* (d'après Zambelli & Cunto, 2005, avec l'autorisation des auteurs).

L'IA intra-utérine permet d'utiliser des doses de spermatozoïdes 5 à 10 fois moindres que lors d'IA intra-vaginale. Les taux de réussite sont très variables et s'échelonnent entre 13 et 80 % avec de la semence fraîche, en inséminant des doses de spermatozoïdes variant entre 2 et 20 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes.

En semence congelée, Tsutsui *et al.* (2000) ont obtenu des gestations dans 57 % des cas (8/14) après dépôt de 50 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes dans la corne utérine, du côté de l'ovaire montrant le plus de follicules. Tsutsui *et al.* (2003) ont même utilisé avec succès du sperme épидидymaire congelé. Toutefois chez le chat, Zambelli *et al.* (2006) notent qu'en insémination intra-utérine avec de la semence congelée, il faut en moyenne déposer un nombre de spermatozoïdes 5 fois plus élevé qu'avec de la semence fraîche, pour obtenir des résultats similaires.

Chez les félinidés sauvages, l'insémination artificielle est le plus souvent réalisée par laparoscopie et la semence peut être déposée directement dans chaque corne utérine.

Selon Racine (2006), à ce jour, des naissances ont été obtenues par IA intra-utérine de semence fraîche sous laparoscopie chez 8 espèces de félinidés sauvages : puma, ocelot, guépard, tigre, panthère longibande, chat léopard du Bengale, onccille et panthère des neiges. Une chatte domestique a été inséminée avec de la semence de chat léopard du Bengale, donnant naissance à des chatons hybrides. Suivant les espèces et les études, les taux de réussite varient entre 5 et 50 % seulement. Le nombre de spermatozoïdes inséminés semble jouer un rôle, mais le faible nombre d'études, la variabilité des espèces concernées et les variations du nombre de spermatozoïdes par éjaculat, rendent difficile, pour le moment, la confirmation de cette hypothèse. Des études complémentaires sont à conduire afin de mieux comprendre les raisons et d'améliorer les taux de réussite encore assez faibles de l'IA.

Le nombre d'IA de semence congelée est encore très réduit. Des naissances ont été observées chez l'ocelot (Swanson *et al.* 1996), chez le guépard (Howard *et al.* 1997) et chez le léopard (Luvoni *et al.* 2003).

Des essais d'IA intra-utérine suivis de gestations ont été réalisés chez des espèces comme le tigre et le guépard par les chercheurs de l'IZW - Institute for Zoo and Wildlife Research - à

Berlin (Thomas Hildebrandt et Frank Göritz, communication personnelle), en guidant la sonde d'insémination dans le vagin, par visualisation de celle-ci à l'aide d'une échographie transrectale. Néanmoins, la durée moyenne permettant de cathétériser le col utérin est, d'après ces chercheurs, d'environ 45 minutes à une heure, ce qui impose une anesthésie prolongée. De ce fait, cette technique n'est pas utilisable chez des animaux vivant à l'état sauvage.

Récemment, l'association CRESAM a adapté avec succès, chez plusieurs espèces de grands félinidés (tigre, lion, léopard, guépard), une technique de cathétérisme cervical sous endoscopie vaginale dérivée de la technique décrite chez le chien (Wilson, 2003) (*figure 7*). Le passage du col ne prend que quelques minutes. Deux femelles guépard ont été inséminées mais les résultats ont été négatifs (données personnelles).

### IA intratubaire

Chez la chatte domestique, après insémination dans l'oviducte (dépôt bilatéral dans l'infundibulum de 4 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes), Tsutsui *et al.* (2001) ont obtenu des gestations dans 43 % des cas (3/7). À notre connaissance, cette technique n'a jamais été tentée chez les félinidés sauvages.

## CONCLUSION

L'insémination artificielle chez le chat et les félinidés sauvages est encore peu développée et peu utilisée, alors que ses indications et ses intérêts sont nombreux. L'apparition de nouvelles techniques d'IA transcervicales moins invasives, chez le chat domestique comme chez les félinidés sauvages, devrait permettre de faciliter le recours à cette technique. Il reste à comprendre pourquoi les taux de réussite de l'IA féline sont encore assez faibles. Les protocoles d'induction des chaleurs et de l'ovulation avec des gonadotropines sont-ils inadaptés ? Faut-il systématiquement induire un repos ovarien avant de les mettre en œuvre ? Jusqu'à quel point la tératospermie joue-t-elle un rôle néfaste ? En outre, de nombreuses données de physiologie de la reproduction sont encore imparfaitement connues ; des études approfondies pourraient permettre d'améliorer le taux de gestations obtenu après IA, qui est encore assez faible, principalement chez les félinidés sauvages.



**Figure 7 :** Cathétérisme du col utérin chez une tigresse par visualisation directe grâce à l'endoscopie vaginale. On voit la sonde (en noir et blanc) pénétrer dans l'orifice cervical (ostium utérin). (cliché association CRESAM)

## BIBLIOGRAPHIE

- Barone, M.A., Wildt, D.E., Byers, A.P., Roelke, M.E., Glass, C.M., Howard, J.G. 1994. Gonadotrophin dose and timing of anaesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma. *J Reprod Fertil.* 101 (1): 103-108.
- Baudon, S. 2003. *Induction et suivi échographique de l'ovulation chez la chatte et insemination artificielle en semence fraîche : étude expérimentale sur 12 cas.* Thèse Méd. Vet. Alfort, 159 pages.
- Brown, J.L. 2006. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. *Theriogenology* 66 : 25-36.
- Chagas, E., Silva, J.N., Leitao, R.M., Lapao, N.E., Da Cunha, M.B., Da Cunha, T.P., Da Silva, J.P. 2000. Birth of Siam tiger cubs after transvaginal artificial insemination. *J Zoo Wild Med.* 31(4): 566-569.
- Chatdarong, K., Lohachit, C., Ponglowhapan, S., Linde-Forsberg, C. 2001. Transcervical catheterization and cervical patency during the oestrous cycle in domestic cats. *J Reprod Fertil Suppl.* 57: 353-356.
- Donoghue, A.M., Byers, A.P., Johnston, L.A., Armstrong, D.L., Wildt, D.E. 1996. Timing of ovulation after gonadotrophin induction and its importance to successful intra-uterine insemination in the tiger. *J Reprod Fertil.* 107 : 53-58.
- Fontbonne, A. Etiologie et démarche diagnostique face à des pertes vulvaires chez la chatte. 2006. *Le nouveau praticien vétérinaire*, 30 (septembre-octobre) : 57-61.
- Franca, L.R. & Godinho, C.L. 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length and daily sperm production in domestic cats. *Biol Reprod.* 68: 1554-1561.
- Howard, J.G., Barone, M.A., Donoghue, A.M., Wildt, D.E. 1992. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *J Reprod Fertil.* 96: 175-186.
- 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.
- Howard, J.G., Roth, T.L., Swanson, J.L., Buff, J.L., Grisham, J., Marker-Kraus, L. 1997. Successful intercontinental genome resource banking and artificial insemination with cryopreserved sperm in cheetahs. *J Androl. Abstr* 123 : 55.
- Leyva, H., Madley, T., Stabenfeldt, G.H. 1989. Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat. *J Reprod Fertil. Suppl.* 39, 125-133.
- Luvoni, G.C., Kalchschmidt, E., Leoni, S., Rugiero, C. 2003. Conservation of feline semen Part 1: cooling and freezing protocols. *J Feline Med Surg.* 5: 203-208.
- Malandain, E., Rault, D., Froment, E., Baudon, S., Begon, D., Chastant-Maillard, S. 2006. Croissance folliculaire et ovulation chez la chatte. *Bull Acad Vét France* 15: 113-120.
- Pelican, K.M., Wildt, D.E., Pukazhenth, B., Howard, J.G. 2006. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology* 66 : 37-48.
- Platz, C.C., Wildt, D.E., Seager, S.W. 1978. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 52: 279-282.
- Pukazhenth, B.S., Neubauer, K., Jewgenow, K., Howard, J.G., Wildt, D.E. 2006. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology* 66 : 112-121.
- Racine, B. 2006. *La reproduction assistée chez les félidés sauvages: étude bibliographique.* Thèse Méd. Vét. Alfort, 107 pages.
- Saint-Dizier, M., Malandain, E., Thoumire, S., Remy, B., Chastant-Maillard, S. 2007. Expression of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptors during follicular growth in the domestic cat ovary. *Mol Reprod Dev.* Published online 11 janv 2007.
- Sojka, N.J., Jennings, L.L., Hamner, C.E. 1970. Artificial insemination in the cat. *Lab Anim Care* 20: 198-204.
- Swanson, W.F., Howard, J.G., Roth, T.L., Brown, J.L., Alvarado, T., Burton, M., Starnes, D., Wildt, D.E. 1996. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots. *J Reprod Fertil.* 106 (1): 87-94.
- Tanaka, A., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Hori, T., Tsutsui, T. 2000. Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats. *J Vet Med Sci.* 62: 1163-1167.
- Tsutsui, T., Tanaka, Hori, T. 2001. Intratubal insemination with fresh semen in cats. *J Reprod Fertil. suppl.* 57 : 347-351.
- Tsutsui T., Wada M., Anzai M., Hori T. 2003. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci.* 65 : 397-399.
- Tsutsui, T. 2006. Artificial insemination in domestic cats. *Theriogenology* 66 : 122-125.
- Wilson, M.S. 2003. Endoscopic transcervical insemination in the bitch. In *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, (ed. P.W. Concannon, G. England, J. Verstegen III and C. Linde-Forsberg ), International Veterinary Information Service, Ithaca NY ([www.ivia.org](http://www.ivia.org)), Last updated : 12-Dec-2003 ; A1232.1203.
- Zambelli, D. & Cunto, M. 2005. Transcervical artificial insemination in the cat. *Theriogenology* 64 : 698-705.
- Zambelli, D. & Cunto, M. 2006. Semen collection in cats : techniques and analysis. *Theriogenology* 66 : 159-165.
- Zambelli, D., Merlo, B., Iacono, E., Prati, F., Belluzi, S. 2006. Fertilizing ability of electroejaculated cryopreserved semen in the domestic cat. *Reprod Dom Anim.* 41: 137-141.
- Zambelli D., Prati f., Merlo B., Cunto M. Collection of semen by urethral catheterization after pharmacologically induced spermatozoa releasing in the domestic cat. 2006. *Proceedings 5<sup>th</sup> biannual congress, European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR)*, Budapest, Hungary, 7-9 april, page 300.