

État des connaissances sur la physiologie de la reproduction des grands félins sauvages, sa maîtrise, et les techniques de reproduction assistée

COQUEMPOT P.¹, LINDEN A.¹, VOLPE R.¹, FURTHNER E.², DELEUZE S.²

¹ Service de Santé et Pathologies de la Faune sauvage, Département des Maladies infectieuses et parasitaires, bâtiment B43

² Service d'Obstétrique et Pathologies de la Reproduction des Animaux de Compagnie et des Équidés, Clinique des Animaux de Compagnie et des Équidés, bâtiment B44

Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, 20, Boulevard de Colonster, 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Prof. Stefan Deleuze - Email : S.Deleuze@ulg.ac.be

RÉSUMÉ : Les huit espèces de grands félinés sauvages sont considérées par l'*International Union for Conservation of Nature* comme menacées ou quasi menacées. Les techniques d'évaluation de leurs fonctions reproductrices reprennent celles pratiquées chez le chat, mais leur application est souvent contraignante car elle impose une anesthésie. Le dosage des métabolites hormonaux dans les matières fécales est une alternative non invasive qui démontre des variations significatives entre les cycles reproducteurs des espèces considérées.

Face aux faibles taux de reproduction observés en captivité chez la majorité des grands félins, l'étude de leur biologie et des comportements sociaux et reproducteurs est cruciale pour améliorer l'efficacité des programmes d'élevage. L'élaboration des *studbooks* permet la gestion de la génétique des populations et le recours systématique à ces registres empêcherait les accouplements consanguins. Lorsque la reproduction naturelle n'est pas envisageable, la reproduction assistée évite la disparition des espèces. La méthode la mieux maîtrisée actuellement est l'insémination artificielle, et d'autres techniques se développent, telles que la fécondation *in vitro*, le transfert et la congélation d'embryons. Cependant la forte tératospermie rencontrée chez les félinés issus de populations consanguines constitue un véritable frein à la fertilité, et les techniques telles que la micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïdes et l'injection de spermatozoïdes sous la zone pellucide tentent d'outrepasser cet obstacle.

1. Introduction

Parmi les 36 espèces de félinés (*Felidae*), 18 sont considérées comme des petits félins (leur poids étant inférieur à 6,5 kg), dix comme des félins moyens (7-20 kg) et huit sont classées dans la catégorie des grands félins (35-135 kg) : la panthère nébuleuse (*Neofelis nebulosa*), espèce intermédiaire entre les moyens et les grands félins, la panthère des neiges (*Uncia uncia*), toutes les espèces du genre *Panthera* comprenant les lions (*Panthera leo*), les tigres (*Panthera tigris*), les panthères (*Panthera pardus*)

et le jaguar (*Panthera onca*), les guépards (*Acinonyx jubatus*), et les pumas (*Puma concolor*). La distribution mondiale des grands félins s'étend sur tous les continents hormis l'Australie et l'Antarctique, mais leurs aires de répartition respectives ont fortement décliné et l'IUCN (Union internationale pour la Conservation de la Nature) attribue à la grande majorité de ces animaux le statut d'espèces menacées (tableau I). Les maladies émergentes, les espèces invasives, les activités humaines induisant la perte, la fragmentation et la surexploitation de leur habitat, sans oublier le

braconnage et la pollution, constituent les principaux facteurs du déclin des populations des félins sauvages (Fontbonne *et al.*, 2010). Les accouplements consanguins consécutifs à la fragmentation du territoire et à la diminution du nombre de reproducteurs augmentent l'homozygotie et l'expression des allèles délétères, phénomène connu sous le nom de dépression de consanguinité (Comizzoli *et al.*, 2010), ce qui fait apparaître des tares génétiques et favorise la tératospermie, réduisant en particulier l'aptitude des félins à se reproduire (Conservation et Reproduction des

Tableau I : répartition géographique et statut de conservation, tel que proposé dans la liste rouge à l'IUCN, des huit espèces de grands félins sauvages (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2014)



Légende : EX = espèce éteinte, EW = espèce éteinte à l'état sauvage, CR = espèce en danger critique d'extinction, EN = espèce en danger, VU = espèce vulnérable, NT = espèce quasi menacée, LC = préoccupation mineure

Espèces sauvages africaines menacées, 2009). Face à l'impossibilité de restituer aux animaux sauvages des territoires protégés à grande échelle dans un monde qui voit la démographie humaine croître et nécessiter toujours plus de ressources, des solutions complémentaires se développent pour restaurer la diversité génétique et les capacités reproductives des félins, telles que la reproduction en captivité et les techniques de reproduction assistée sur des animaux sauvages en liberté (Swanson, 2006). Après un état des connaissances acquises sur la biologie de la reproduction des huit espèces de félinidés sauvages, les stratégies de reproduction en captivité et les techniques de reproduction assistées seront successivement présentées.

2. Etat des connaissances sur la biologie de la reproduction des différentes espèces de grands félins

La reproduction étant fondamentale à la survie des espèces, comprendre ses mécanismes est une priorité pour sauvegarder les félins menacés (Pelican *et al.*, 2006). Le chat domestique (*Felis catus*) constitue l'animal de référence pour étudier l'anatomie et la physiologie de la reproduction des félins sauvages (Ganan *et al.*, 2009)

2.1. Anatomie de l'appareil génital des grands félins

Dans sa description générale du tractus génital femelle des félinidés sauvages, Brown (2011) ne relève pas de différence significative avec l'appareil reproducteur des chattes domestiques.

L'anatomie des appareils génitaux femelles chez les grands félins n'est cependant que très rarement décrite dans la littérature scientifique. De la même façon, aucune planche anatomique de l'appareil génital mâle n'est disponible dans la littérature pour les grands félins, il est assimilé à celui du chat

2.2. Techniques d'évaluation des cycles œstraux des félins femelles

2.2.1. Les observations comportementales

À l'instar de la chatte domestique, les femelles félinidés sauvages expriment des changements comportementaux lors de l'œstrus : vocalisations, frottements, roulades, attitude de lordose, port de la queue relevée sur le côté... (Caro, 1993). Les signes de chaleurs peuvent être absents ou discrets chez certaines espèces telles que la femelle guépard (Wielebnowski *et al.*, 1998), et ils sont souvent frustrés en captivité, ce qui complique la détection des chaleurs.

2.2.2. La cytologie vaginale

L'observation des cellules vaginales prélevées à différents stades du cycle permet d'apprécier l'imprégnation œstrogénique de l'animal. Cette technique réalisée en routine chez la chienne et la chatte est un bon indicateur du moment de l'œstrus et de la gestation. Son avantage majeur est qu'elle permet de savoir si la femelle est cyclée (frottis d'interœstrus : les cellules intermédiaires prédominent, et il persiste 10 à 30 % de cellules kératinisées résiduelles suite à l'œstrus)

ou non cyclée (frottis d'anoœstrus : les cellules parabasales basophiles prédominent et les cellules kératinisées sont absentes ou très rares) (Fontbonne, 2012). Cependant, la cytologie vaginale reste imprécise et contraignante chez les grands félins sauvages car la réalisation des frottis vaginaux impose l'anesthésie (Kinoshita *et al.*, 2011).

2.2.3. Les dosages hormonaux

Les profils hormonaux correspondant à chaque période du cycle peuvent être établis via le monitoring des œstrogènes et de la progestérone (Brown, 2011). La technique non invasive de dosage des métabolites hormonaux fécaux est préférée au dosage hormonal sanguin car elle évite la contention et l'anesthésie du félin (Kinoshita *et al.*, 2011). Environ 95 % des métabolites hormonaux du chat sont sécrétés dans les fèces en un ou deux jours, ce qui justifie le choix du monitoring hormonal via l'analyse des matières fécales chez les félinidés sauvages (Brown *et al.*, 1996). Il n'existe cependant pas encore de validation pour toutes les espèces, ce qui impose une indexation préalable pour chacune des hormones. Le développement du monitoring non invasif des hormones sexuelles a permis de révéler un fort degré de variabilité entre les cycles œstraux des différentes espèces de grands félins (Brown, 2011). Les données sont résumées dans le tableau II. Il existe de grandes différences interspécifiques relatives à l'impact de la saison sur les fonctions reproductrices des femelles : certaines espèces sont sensibles à la photopériode (panthère nébuleuse), d'autres pas (lion, léopard) (Brown, 2011). Une autre particularité rencontrée chez la panthère longibande et dans une moindre mesure chez la lionne est l'importance du taux d'ovulations spontanées, alors que la majorité des félins semble avoir une ovulation induite (Comizzoli *et al.*, 2010).

2.2.4. La laparoscopie

La laparoscopie permet de déterminer le statut reproducteur par la visualisation de quatre structures ovariennes principales : les follicules (leur diamètre augmente au cours de leur maturation), les corps hémorragiques (ovulation récente), les corps lutéaux (ovulation datant d'au moins 48 heures) et les cicatrices lutéales. Cette

Tableau II : cycles de reproduction des huit espèces de grands félins sauvages (Blomqvist et Sten, 1982 ; Schmidt et al., 1988 ; Kinoshita et al., 2011 ; Da Paz, 2012 ; Lueders et al., 2012), en comparaison au chat domestique

	Panthère nébuleuse (<i>Neofelis nebulosa</i>)	Once ou panthère des neiges (<i>Uncia uncia</i>)	Lion (<i>Panthera leo</i>)	Tigre (<i>Panthera tigris</i>)	Panthère (<i>Panthera pardus</i>)	Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	Guépard (<i>Actinonyx jubatus</i>)	Puma (<i>Puma concolor</i>)	Chat domestique (<i>Felis catus</i>)
durée de gestation	86-92 jours	98 - 104 jours	100 - 119 jours	108 - 110 jours	90 - 105 jours	90 jours	90 - 95 jours	82 - 98 jours	58 - 63 jours
nombre moyen de jeunes/portée	2	1 à 5	2 à 6	2 à 3	2 à 3	1 à 2	3 à 4	3 à 4	3 à 4
nombre de portées/an	maximum 1 portée/an	1 portée tous les deux ans	1 portée tous les deux ans	1 portée tous les 20-30 mois	1 portée tous les deux ans	1 portée tous les deux ans	1 portée tous les deux ans	1 portée tous les deux ans	2 à 3 portées par an
durée du cycle œstral	15 à 40 jours	1 à 16 jours	32 jours	28 jours	46 jours	47 jours		23 jours	en absence de mâle, pseudocycle de 40 jours
cycle œstral (détails)	œstrus : 3-6 jours	œstrus : 10-12 jours	proœstrus : 12 jours œstrus : 4 jours. Interœstrus : 16 jours	œstrus : plus de 9 jours	œstrus : 6-7 jours	œstrus : 6 à 17 jours	proœstrus : 8 jours œstrus : 4 jours. interœstrus : 28 jours (variable) anœstrus : 2-5 mois	œstrus : 8 jours	proœstrus : 1-3 jours œstrus : 10 jours (2 à 4 jours si mâle présent et saillie) dégénérescence folliculaire : 10 jours (corps jaune se développe si fécondation) interœstrus : 10 à 15 jours
saisonnalité de la reproduction (Lueders et al., 2012)	saisonnière : reproduction de décembre à mai	fin janvier-milieu mars. Reproduction modérément affectée par la photopériode	peu saisonnière mais pics de naissances en saison des pluies	influence de la photopériode modérée. La plupart des accouplements se déroulent de fin novembre à mi-avril.	peu saisonnière (Schmidt et al. 1988)	peu saisonnière mais pics de naissances en saison des pluies	peu saisonnière mais pics de naissances en saison des pluies	toute l'année	saisonnière : anœstrus en automne et en hiver (photopériode)
cycle œstral	polyœstrien	polyœstrien	polyœstrien	polyœstrien	polyœstrien	polyœstrien	polyœstrien	polyœstrien	polyœstrien
type d'ovulation	taux élevé d'ovulations spontanées	induite	provoquée 24h après l'accouplement. Occasionnellement spontanée	induite	induite mais parfois spontanée	induite	provoquée, 40h après l'accouplement	induite	provoquée, 24-30h après minimum 4 coïts
âge de maturité sexuelle	2 ans	2 ans	3-4 ans	3-6 ans pour les mâles, 3-4 ans pour les femelles.	2-3 ans	3-4 ans	21 à 22 mois	20 - 24 mois	7-8 mois
âge du sevrage	5 mois	5 mois	8 mois	6 mois	3 mois	6 mois	3 mois	3 mois	6 à 7 semaines. Retour en chaleur 15 jours après la mise bas (si pas d'allaitement), ou 40 jours après mise bas, ou 3-7 jours après sevrage
pseudogestation (si ovulation sans fécondation)	45-50 jours	31-53 jours (Kinoshita et al., 2011)	2-6 semaines	35 jours	1-5 semaines	non renseigné	51 jours	non renseigné	30-35 jours

technique chirurgicale est précise, mais son application est contraignante et ne peut pas être appliquée chez les félins sauvages (Howard *et al.*, 1992).

2.2.5. L'échographie

Chez la chatte domestique, l'échographie ovarienne est la technique de choix pour le suivi de la croissance folliculaire (Fontbonne *et al.*, 2010). Encore peu développée chez les félins sauvages car elle nécessite des anesthésies répétées, cette technique d'imagerie pourrait par son caractère non-invasif remplacer la laparoscopie pour déterminer le statut reproducteur et la cyclicité des femelles, ainsi que la santé des reproducteurs potentiels. Dans cette logique, l'association CRESAM (Conservation et Reproduction des Espèces sauvages africaines menacées) a développé une technique d'échographie ovarienne chez le guépard, utilisant une sonde transrectale (Fontbonne *et al.*, 2012).

2.3. Evaluation de la fertilité des félins mâles

2.3.1. Le problème de la tératospermie

La tératospermie correspond à la production de nombreux spermatozoïdes porteurs d'anomalies morphologiques (pièce intermédiaire coudée, corps résiduels...) diminuant la fertilité des mâles. Ce phénomène est observé chez au moins 28 des 36 espèces de félinidés (Pukazhenthil *et al.*, 2006 ; Fontbonne *et al.*, 2007), et le manque de variabilité génétique (dépression de consanguinité) semble en être la cause principale (Comizzoli *et al.*, 2010). L'analyse descriptive et fonctionnelle de la semence permet d'évaluer l'efficacité de la spermatogénèse et de la spermogénèse et ainsi d'estimer la fertilité des mâles.

2.3.2. L'analyse descriptive de l'éjaculat

Un spermogramme permet d'évaluer la qualité de la semence (Zambelli et Cunto, 2006). Divers paramètres sont analysés au cours de cet examen :

- l'apparence macroscopique : les changements de couleur peuvent être associés à des pathologies des glandes accessoires ou des testicules ;

- le volume et le pH de l'éjaculat : l'acidité du prélèvement peut indiquer une contamination urinaire, et l'alcalinité une contamination bactérienne ;
- la concentration en spermatozoïdes de l'éjaculat étant souvent faible chez les félins (Mota *et al.*, 2006), elle est difficilement déterminée à l'aide d'un hématocytomètre ou par un compteur Coulter. Les systèmes CASA (*computer-assisted sperm analysis*) plus récents permettent une estimation automatisée de la concentration en spermatozoïdes (Rijsselaere *et al.*, 2012) ;
- la morphologie des spermatozoïdes : l'observation s'effectue avec un microscope à contraste de phase, ou grâce à des colorants tels que le vert rapide-rose bengal, la solution de Hancock et Gledhillgreen (Zambelli et Cunto, 2006) ou le Diff-Quick (Mello-Martins *et al.*, 2011 ; Mota *et al.*, 2006) ;
- la mobilité et la mobilité progressive des spermatozoïdes sont évaluées par examen de la semence sous microscope ou par système CASA (Rijsselaere *et al.*, 2012). Il existe une gradation de la mobilité progressive des spermatozoïdes allant de la catégorie 0 (mobilité nulle) à la catégorie 5 (progression rapide vers l'avant) ;
- la viabilité est estimée grâce à la coloration éosine-nigrosine (Zambelli et Cunto, 2006) qui permet de différencier les spermatozoïdes vivants (non colorés, mais dont les contours sont marqués de bleu par la nigrosine) des spermatozoïdes morts (colorés en rose par l'éosine) ;
- d'autres paramètres tels que l'intégrité de l'acrosome et de la membrane spermatique (microscopie électronique en transmission, microscopie en fluorescence, tests hypoosmotiques) sont moins souvent analysés lors des spermogrammes de routine mais se révèlent importants pour évaluer précisément la qualité de la semence (Zambelli et Cunto, 2006). Ainsi, l'immunofluorescence indirecte utilisant des molécules (la tyrosine, l'annexine, ou l'ubiquitine) localisées spécifiquement sur l'acrosome ou sur

l'ADN permet de détecter une anomalie fonctionnelle du spermatozoïde (Mota *et al.*, 2006).

Le taux de spermatozoïdes anormaux est très élevé chez le guépard et les lions issus de populations restreintes, il reste au contraire raisonnable chez le lion des plaines du Serengeti (Brown *et al.*, 1991 ; Brown, 2011). Il existe chez les félinidés sauvages une corrélation négative entre la concentration et la qualité des spermatozoïdes. Cette production élevée de spermatozoïdes au détriment de leur qualité pourrait traduire un mécanisme adaptatif à la tératospermie. Cependant la part exacte de la forte tératospermie dans le déclin de la fertilité des félins n'est pas encore très claire (Fontbonne *et al.*, 2010).

2.4. L'accouplement

À l'exception du lion, les grands félins sauvages sont solitaires et territoriaux, les partenaires ne se rencontrent que pendant la période de reproduction (tableau III). Comme chez le chat domestique, l'accouplement des grands félinidés sauvages est ritualisé. Les coïts sont brefs et répétés à très grande fréquence (jusqu'à cent fois par jour).

La physiologie de la reproduction des différents grands félins n'est pas encore totalement élucidée, il reste de nombreuses études à réaliser afin d'approfondir les connaissances dans ce domaine pour mieux maîtriser les paramètres, que ce soit en captivité (Kinoshita *et al.*, 2011) ou en milieu naturel (Comizzoli *et al.*, 2010).

3. Stratégies d'élevage et techniques de reproduction assistée appliquées aux grands félins

3.1. Stratégies d'élevage

3.1.1. La reproduction en captivité

Les objectifs de la captivité peuvent se définir à court, moyen et long terme. Sur le court terme, le dessein d'un parc zoologique est de connaître la biologie, la nutrition et les comportements des espèces afin d'adapter le management à leurs besoins et d'apporter les soins adéquats aux animaux (Brown, 2011). L'objectif à moyen terme est

Tableau III : comportements social et reproducteur des huit espèces de grands félins sauvages, comparés à ceux du chat domestique (Laurenson, 1993).

Espèce	Comportement social et reproducteur
Guépard (<i>Acinonyx jubatus</i>)	Animal solitaire, mais plus sociable que la plupart des autres félinidés. La femelle sans jeune vit seule et les mâles vivent souvent en coalition de 2 à 5 membres, ou seuls. En captivité, les mâles sont isolés des femelles, et les zoos disposant de couloirs longeant les enclos des femelles y lâchent le mâle pour détecter la femelle la plus réceptive. L'introduction intermittente de plusieurs mâles dans l'enclos des femelles stimule la reproduction. La mise à la disposition des femelles de tanières artificielles multiples et isolées du bruit et des activités humaines seraient un bon outil pour amplifier le succès de l'élevage en captivité (Laurenson, 1993).
Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	Animal solitaire, les partenaires ne se rencontrent que pour la reproduction. Un territoire mâle peut englober celui de deux ou trois femelles. La copulation est brève mais fréquente, jusqu'à cent fois par jour. Le jaguar ne supporte pas d'avoir un partenaire imposé en captivité.
Lion (<i>Panthera leo</i>)	Animal social, les lions vivent le plus souvent soit dans un groupe familial comprenant plusieurs lionnes, les jeunes des deux sexes (les mâles sont chassés quand ils sont âgés de 2 à 3 ans) et un mâle dominant reproducteur, soit en bande de plusieurs mâles célibataires. Si une lionne accepte de se reproduire avec le mâle dominant (seul reproducteur du groupe), les accouplements se succèdent toutes les quinze minutes jusqu'à cinquante fois par jour. Les femelles d'un même clan ont généralement leurs chaleurs synchronisées et mettent ainsi bas simultanément, ce qui facilite leur coopération pour l'élevage des jeunes. Le comportement infanticide du nouveau mâle reproducteur déclenche l'œstrus chez la lionne et lui permet d'assurer sa propre descendance. Le mode de vie en captivité peut entraîner l'hypersexualité
Once ou panthère des neiges (<i>Uncia uncia</i>)	Animal solitaire sauf lors de la période de reproduction, au cours de laquelle les mâles restent avec la même femelle. Ils peuvent avoir de 12 à 36 rapports journaliers.
Panthère (<i>Panthera pardus</i>)	Animal solitaire, couples formés uniquement pendant la période de reproduction.
Panthère nébuleuse (<i>Neofelis nebulosa</i>)	Animal solitaire et territorial. Les mâles en liberté ne restent avec les femelles que pendant l'œstrus et l'accouplement. Cette panthère vit dans les hauteurs des branches d'arbres en forêt, et ne descend au sol que pour chasser. En captivité il est difficile de former des couples compatibles, et il existe une forte incidence des agressions des mâles envers les femelles. Le manque d'expression des chaleurs constitue un autre obstacle à la reproduction en captivité.
Puma (<i>Puma concolor</i>)	Solitaire et territorial, le Puma vit en couple uniquement pendant la période de reproduction. Les accouplements sont répétés une soixantaine de fois par jour. Le mode de vie en captivité peut entraîner l'hypersexualité
Tigre (<i>Panthera tigris</i>)	Animal solitaire et territorial. Le territoire d'un mâle englobe celui d'une ou plusieurs femelles avec qui il pourra s'accoupler. Lors des chaleurs de la tigresse, il peut y avoir jusqu'à cinquante copulations par jour. En captivité, des groupes ou des couples permanents peuvent être maintenus.
Chat domestique (<i>Felis catus</i>)	Solitaire et territorial. L'accouplement est ritualisé, les coïts durent 2 à 15 minutes et sont répétés de nombreuses fois.

la reproduction en captivité, afin de maintenir la taille des populations (Caro, 1993). Enfin, la visée sur le long terme des programmes d'élevage est non seulement d'augmenter la taille des populations en captivité, mais aussi leur qualité génétique (Johnson *et al.*, 2010). La réintroduction de prédateurs issus de la captivité est délicate et n'est pas encore d'actualité. À l'exception du puma, du tigre, du lion chez lesquels le mode de vie en captivité peut entraîner une hypersexualité

telle que des programmes de contraception sont nécessaires pour éviter leur surpopulation (Asa *et al.*, 2012), la grande majorité des félins présente des difficultés pour se reproduire dans les parcs zoologiques. Ceci s'explique en partie par l'antagonisme entre leur comportement discret dans la nature et l'exposition permanente au public à laquelle ils sont soumis en captivité (Brown, 2011). En plus d'une alimentation adaptée, un environnement propice à l'expression des comportements

naturels des félins est crucial pour permettre leur reproduction. La captivité tend à diminuer l'incidence de la saison sexuelle, la puberté semble avancée, et certains félins comme le jaguar, le guépard et la panthère nébuleuse ne supportent pas d'avoir un partenaire imposé. L'élevage des portées constitue aussi un vrai problème en captivité, la principale cause d'abandon étant le manque d'isolement de la mère et sa progéniture (Marker-Kraus et Grisham, 1993).

3.1.2. Les programmes d'élevages

Les programmes d'élevage européens, supervisés par L'Association européenne des Zoos et Aquariums (EAZA), concernent des espèces menacées d'extinction ou faiblement représentées dans les parcs zoologiques. L'objectif de ces EEPs (*European endangered species programmes*) est de constituer des populations viables de 250 à 500 individus en conservant, sur 150 ans, plus de 90 % de la diversité génétique des individus fondateurs de la population. Les espèces pour lesquelles la menace d'extinction est moins aigue sont gérées par les Studbooks européens (ESB). Le tableau IV dresse la liste des EEP développés pour les grands félins. Aux Etats-Unis, les studbooks et les programmes d'élevage nommés SSP (*species survival programme*) sont placés sous la direction de l'Association des Zoos et Aquariums américains (AZA) et concernent toutes les espèces de grands félins sauvages à l'exception du léopard.

Au niveau mondial, c'est l'organisation WAZA (*World Association of Zoo and Aquariums*) qui supervise les programmes d'élevage et de protection des espèces menacées.

Il existe de très nombreux projets et associations de protection des grands félins, mais seule une partie d'entre eux intègre la gestion de la reproduction au sein de leur programme. C'est le cas par exemple du projet de réhabilitation génétique du puma de Floride (Johnson *et al.*, 2010), du projet sur la panthère nébuleuse dans le parc zoologique thaïlandais *Khao Kheow Open Zoo*, du projet de reproduction du guépard mené par l'association CRESAM, et du programme de reproduction du lion asiatique initié par le zoo de Londres.

Jusqu'aux années 1980, les projets de reproduction dans les parcs zoologiques ne prenaient pas en considération l'aspect génétique des populations captives : quand une femelle et un mâle étaient de bons reproducteurs et

formaient un couple stable, ils étaient souvent sollicités pour se reproduire exclusivement entre eux, formant de nombreuses portées issues des mêmes parents. D'autres individus au contraire étaient d'utilisation moins aisée pour la reproduction et ont vu leur génétique se perdre. Il a découlé de ces deux phénomènes une importante détérioration de la génétique au sein des populations captives. Aujourd'hui les projets d'élevage incluent la gestion de la génétique des populations dans leur programme (Johnson *et al.*, 2010), via des collaborations et des échanges entre les institutions (SSP et EEP), et la constitution d'un pedigree pour que les animaux non apparentés soient reproduits ensemble. Dans plusieurs réserves d'Afrique du Sud, le CRESAM associe à son programme d'insémination artificielle *in situ* l'alimentation d'une banque génétique qui optimise la reproduction des guépards en favorisant l'hétérogénéité et le brassage génétique des populations (Conservation et Reproduction des Espèces sauvages africaines

Tableau IV : liste des *European endangered species programmes* développés pour les grands félins, extraite de la base de données de l'*European Association of Zoos and Aquaria*, disponible à l'adresse URL <http://www.eaza.net/activities/cp/Pages/EEP.aspx>.

Espèce concernée	Contact principal	Date de démarrage du projet
Guépard d'Afrique (<i>Acinonyx jubatus jubatus</i>)	Safaripark Beekse Bergen (The Netherlands)	1992
Guépard d'Afrique (<i>Acinonyx jubatus soemmerringi</i>)	Fota Wildlife Park (Ireland)	1992
Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	North of England Zoological Society (United Kingdom)	1998
Léopard de Chine du Nord (<i>Panthera pardus japonensis</i>)	Tierpark Hagenbeck (Germany)	2003
Léopard de l'Amour (<i>Panthera pardus orientalis</i>)	London Zoo (United Kingdom)	1993
Léopard de Perse (<i>Panthera pardus saxicolor</i>)	Westfälischer Zoologischer Garten Munster (Germany)	1990
Léopard du Sri Lanka (<i>Panthera pardus kotiya</i>)	Centre d'Etudes et de Recherche Zoologiques Augeron (France)	1996
Lion d'Asie (<i>Panthera leo persicus</i>)	Twycross Zoo (United Kingdom)	1994
Once (<i>Uncia uncia</i>)	Nordens Ark (Sweden)	1990
Panthère nébuleuse (<i>Neofelis nebulosa</i>)	Howletts Wild Animal Park (United Kingdom)	1990
Tigre de Sibérie (<i>Panthera tigris altaica</i>)	London Zoo (United Kingdom)	2010
Tigre de Sumatra (<i>Panthera tigris sumatrae</i>)	London Zoo (United Kingdom)	2010

menacées, 2009). Ainsi, lors d'échecs de l'accouplement naturel, la reproduction assistée en captivité ou *in situ* est une alternative évitant les phénomènes de consanguinité et de perte de diversité génétique.

3.2. Présentation des techniques de reproduction assistée appliquées aux grands félins

Selon le *World Zoo Conservation Strategy*, les principaux objectifs poursuivis par l'application des techniques de reproduction assistée (ART) au sein des programmes de conservation d'espèces sont les suivants : (i) permettre les échanges de matériel génétique entre les parcs zoologiques ou les réserves d'animaux sauvages sans déplacer les reproducteurs, (ii) rendre possible la reproduction d'animaux incapables de procréer naturellement pour des raisons physiques ou comportementales, (iii) permettre une croissance rapide de la population lorsqu'une population fondatrice de petite taille est disponible, (iv) maintenir le *ratio* entre mâles et femelles en sélectionnant le sexe lors des transferts d'embryons, (v) déterminer le nombre de descendants par individu, et enfin (vi) former une collection de gamètes et d'embryons des espèces d'intérêt. Il existe de nombreuses méthodes de reproduction assistée pratiquées chez le chat domestique et transposables aux grands félins sauvages. La technique la plus pratiquée est l'insémination artificielle. D'autres méthodes plus récentes sont en cours de développement (fécondation *in vitro*, congélation et transfert d'embryon) et certaines sont en expérimentation (micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïdes, injection de spermatozoïdes sous la zone pellucide, greffe de tissu ovarien, clonage).

3.3. L'insémination artificielle

L'insémination artificielle consiste au dépôt de la semence directement dans les voies génitales femelles. La réussite de cette technique n'a été, pour l'instant, reportée que chez 10 espèces félines (Goeritz *et al.*, 2012), notamment chez le guépard, le lion, le tigre, le puma, le léopard, et la panthère des neiges (once).

3.3.1. L'induction de l'ovulation

L'induction de l'œstrus et de l'ovulation permet d'inséminer la femelle

au moment le plus opportun. Les protocoles consistent généralement en l'injection d'eCG (*equine chorionic gonadotropin*) pour induire la maturation folliculaire, suivie par l'injection d'hCG (*human chorionic gonadotropin*) 80 à 84 heures plus tard. L'ovulation se produit, suivant les espèces, entre 37 et 42 heures après l'administration d'hCG (Fontbonne *et al.*, 2010).

En mars 2013, ces protocoles ont été validés par le CRESAM chez le lion et le tigre, mais pas chez le guépard car la dose d'hCG utilisée n'était pas encore suffisante (Fontbonne *et al.*, 2010). Une seule injection d'eCG est le plus souvent suffisante pour déclencher des chaleurs, mais son efficacité est inconstante et elle peut induire des effets secondaires tels que l'hypersimulation ovarienne, la perturbation de la sécrétion de progestérone, et l'immuno-sensibilisation (Fontbonne *et al.*, 2010). Les progrès de la génétique moléculaire permettent d'envisager l'utilisation de gonadotrophines homologues synthétiques.

La FSH (*follicle stimulating hormone*) ou la LH (*luteinizing hormone*) porcines purifiées sont une alternative aux gonadotrophines chorioniques (Goeritz *et al.*, 2012) mais ces hormones impliquent des injections répétées, sources de stress pour la femelle. Le développement d'implants ou de suspensions huileuses à libération prolongée pourrait aider à pallier cette difficulté. Enfin, des implants libérant des agonistes de GnRH (desloréline) sont en voie de développement.

3.3.2. Le prélèvement de la semence chez le mâle

En post mortem ou suite à une castration, la semence peut être rapidement prélevée dans l'épididyme ou le canal déférent (Zambelli et Cunto, 2006). Sur un animal vivant, le sperme peut être collecté par trois méthodes principales : directement après le coït (procédure la plus ancienne mais la moins efficace car les sécrétions vaginales peuvent affecter la viabilité des spermatozoïdes), par électroéjaculation (technique la plus utilisée actuellement), ou par cathétérisme urétral (méthode la plus récente).

L'électroéjaculation consiste en la stimulation de l'éjaculation sur des animaux anesthésiés, grâce à

l'application de séries de pulsations électriques. L'éjaculat obtenu est constitué de spermatozoïdes et des sécrétions prostatiques et bulbo-urétrales. L'inconvénient majeur de cette méthode est le risque de contamination de la semence par l'urine (Lueders *et al.*, 2012), mais des techniques telles que la vidange préalable de la vessie et l'utilisation du colorant urinaire M199 permettent de limiter la contamination urinaire.

Jusqu'à là appliquée uniquement sur le chat domestique, le cathétérisme urétral a été testé récemment sur sept lions d'Afrique et les résultats publiés en 2012 sont encourageants (Lueders *et al.*, 2012). Après une anesthésie générale avec la médétomidine (qui stimule la libération de sperme dans l'urètre) et la kétamine, une sonde transrectale est introduite pour localiser la prostate et éviter ainsi le cathétérisme de la vessie et la contamination urinaire de la semence. Un cathéter urinaire est avancé dans l'urètre pour permettre la collecte de sperme par des forces capillaires. Après retrait, l'échantillon présente une concentration en spermatozoïdes élevée avec une excellente motilité, ce qui fait de cette méthode une alternative envisageable à l'électroéjaculation, chez le lion et potentiellement chez les autres félins (Lueders *et al.*, 2012). De plus, aucune différence n'a été rapportée concernant la capacité de fécondation des spermatozoïdes obtenus via cathétérisme ou électroéjaculation (Lueders *et al.*, 2012). La semence peut être utilisée pour l'insémination artificielle ou la cryoconservation, cette dernière étant facilitée par la faible quantité de plasma séminal (qui peut endommager le sperme lors du refroidissement) obtenue lors du cathétérisme.

3.3.3. Les différents types d'utilisation de la semence

Le sperme prélevé peut être utilisé immédiatement ou être conservé à plus ou moins long terme par réfrigération et congélation (Chatdarong *et al.*, 2009). L'avantage majeur de la semence fraîche est qu'elle conserve mieux l'intégrité des spermatozoïdes, et nécessite un nombre de gamètes jusqu'à 15 fois inférieur à la semence congelée pour atteindre le même degré de fertilité (Yoshida, 2000). Les premiers guépards nés suite à une insémination artificielle ont été obtenus avec une semence fraîche en 1992. La

semence réfrigérée constitue une alternative lorsque l'utilisation en semence fraîche n'est pas possible. L'éjaculat est mélangé à un diluant, refroidi et conservé à 5°C (Luvoni *et al.*, 2003). La réfrigération permet de conserver le sperme pendant 5 à 7 jours, mais elle réduit la mobilité des spermatozoïdes. À ce jour, peu d'études ont été publiées sur la réfrigération de la semence féline et sur la durée de survie des spermatozoïdes à 4°C. Filliers et collaborateurs (2008) ont montré par analyse CASA (*computer assisted sperm analysis*) une dégradation de la qualité de la semence après un stockage de minimum 24 heures à 4°C par comparaison à la semence fraîche. Une étude a récemment comparé trois types de dilueurs pour la cryoconservation du sperme félin (Jimenez *et al.*, 2013), mais les publications sur ce sujet restent rares. La technique de congélation de la semence permet de surmonter le problème de l'éloignement entre les reproducteurs et d'augmenter la diversité génétique en évitant les accouplements consanguins (Ganan *et al.*, 2009). Le « *Smithsonian Institute* » (Washington) a ainsi obtenu la naissance de léopards suite à une insémination artificielle avec du sperme congelé importé d'Afrique. De plus, la cryoconservation du sperme d'animaux rares ou décédés contribue à la création d'une véritable banque génétique. La méthode de cryoconservation en « double étape » (Da Paz, 2012) utilisant le glycérol comme cryoprotecteur est la plus utilisée chez les carnivores. La semence issue d'individus tératospermiques est plus sensible aux effets délétères de la congélation que celle issue de félins normospermiques (Pukazhenthil *et al.*, 2006), ce qui constitue une difficulté à surmonter pour l'élaboration d'une cryobanque féline.

3.3.4. La technique d'insémination intra utérine

Pour optimiser l'insémination artificielle chez les grands félins, il faut associer un timing précis (insémination « post-ovulatoire ») et un lieu adéquat pour le dépôt de la semence (les cornes utérines) (Fontbonne *et al.*, 2007a). L'insémination intra-utérine peut être réalisée par laparoscopie (Howard *et al.*, 1992) ou par laparotomie, la première méthode étant la plus utilisée car la moins traumatique. En 2007, le CRESAM a mis au point une

nouvelle technique d'insémination intra-utérine par les voies naturelles (vaginale) : le cathétérisme cervical sous endoscopie vaginale (Fontbonne *et al.*, 2007b). Cette technique, à l'instar de ce qui est réalisé actuellement en routine chez la chienne, permet d'amener la semence au plus près des ovocytes rapidement et sans traumatisme. Elle s'est montrée réalisable chez le tigre, le lion, le léopard, et le guépard, mais aussi dans de nombreuses autres espèces de félidés sauvages menacées (Conservation et Reproduction des Espèces sauvages africaines menacées, 2009).

3.4. La fécondation in vitro

Le premier félidé sauvage sur lequel a été réalisée la fécondation *in vitro* (FIV) est le léopard. La FIV n'est pas encore applicable en routine dans la reproduction assistée chez les grands félins, mais elle est utilisée dans le cadre expérimental pour observer les interactions entre les gamètes et étudier le phénomène de la tératospermie. Ainsi, les chercheurs du « *Smithsonian Institute* » développent actuellement un protocole de FIV pour identifier les problèmes potentiels compromettant l'insémination artificielle chez la panthère longibande (Comizzoli *et al.*, 2010).

3.4.1. La récolte des gamètes

Les spermatozoïdes sont récoltés par électroéjaculation, comme décrit précédemment. Les ovocytes ou les follicules pré-antraux peuvent être récoltés en post mortem ou après ovariectomie, mais la procédure d'isolation mécanique provoque la perte de 50 à 80 % de la viabilité des follicules (Jewgenow et Stolte, 1996). Lorsqu'il est réalisé sur les ovaires en place, le prélèvement d'ovocytes est précédé par une induction de l'ovulation similaire à celle pratiquée lors de l'insémination artificielle. Les ovocytes sont récoltés via laparoscopie par aspiration dans un tube collecteur, puis examinés par stéréomicroscopie. L'*ovum pick-up* est une technique de ponction échoguidée qui n'est pas encore développée chez les grands félins.

3.4.2. La maturation in vitro

La maturation ovocytaire *in vitro* (MIV) est un processus complexe au cours duquel les modifications subies

par le noyau, le cytoplasme et le cytosquelette rendent la cellule apte à être fécondée. Les ovocytes sont mis en culture dans un milieu spécifique (Bartels *et al.*, 2000) pendant 24h à 36h avant la co-incubation avec les spermatozoïdes. Cette étape n'est pas encore bien maîtrisée chez les félidés sauvages : son efficacité est de 25 % chez le lion (Bartels *et al.*, 2000), et seulement de 16,7 % chez le guépard (Johnston *et al.*, 1991).

3.4.3. La capacitation des spermatozoïdes

La capacitation est l'étape de maturation de la membrane des spermatozoïdes, les rendant capables de féconder l'ovocyte (Silva *et al.*, 2004). Le développement de la méthode de capacitation *in vitro* est assez empirique et les milieux d'incubation varient en fonction des espèces. Les protocoles de capacitation des spermatozoïdes sont décrits pour le lion (Armstrong *et al.*, 2004) et le guépard (Johnston *et al.*, 1991).

3.4.4. La fécondation in vitro sensu stricto

Les spermatozoïdes capacités et les ovocytes matures sont co-incubés pendant 12h à 18 h, puis les ovocytes sont rincés et replacés dans un milieu neuf avec une goutte d'huile (Johnston *et al.*, 1991). Les protocoles sont décrits dans la littérature pour le guépard (Johnston *et al.*, 1991) et le lion (Bartels *et al.*, 2000 ; Armstrong *et al.*, 2004). Lors de l'évaluation réalisée 25 à 42 heures après la co-incubation, les critères de fécondation sont basés sur l'observation de deux globules polaires, deux pronucléi et le clivage au stade « 2 cellules » minimum. Comparée à l'efficacité de la FIV chez le chat domestique et le tigre, celle observée chez le guépard est relativement faible à cause du pléiomorphisme et du manque de mobilité des spermatozoïdes (Donoghue *et al.*, 1992). L'amélioration des milieux de culture pourrait augmenter le taux de réussite chez cette espèce fortement tératospermique.

3.4.5. La culture des embryons in vitro

Les embryons issus de la FIV sont placés dans un nouveau milieu de culture similaire au précédent, et ils sont évalués à différents stades de leur développement.

3.5. Le transfert d'embryons

Le transfert embryonnaire consiste à placer les embryons récoltés après insémination artificielle ou fécondation *in vitro* dans l'utérus d'une mère porteuse, celle-ci étant de la même espèce que la donneuse (transfert intraspécifique) ou d'une espèce différente (transfert interspécifique). En 1990, au sein du parc zoologique *Henry Doorly Zoo* (Omaha, USA), une portée de trois tigres du Bengale a été obtenue après fécondation *in vitro* et transfert des embryons à une tigresse de Sibérie (Donoghue *et al.*, 1990).

3.6. La congélation des embryons et des gamètes

La congélation d'ovocytes, de spermatozoïdes, ou d'embryons est une technique en phase de développement qui semble être une alternative intéressante dans l'avenir de la sauvegarde des félidés sauvages. Cette conservation cryogénique d'embryons peut permettre de préserver le matériel biologique recueilli en attendant le développement de techniques fiables pour le transfert d'embryon (Leibo et Songsasen, 2002). Le « *Smithsonian Institute* » inclut la technique de congélation dans son programme de management zoologique de routine : le vétérinaire confronté à une urgence médicale qui compromet la vie ou les futures capacités reproductrices d'une femelle lui prélève du tissu ovarien qui sera ensuite conservé par le froid (Comizzoli *et al.*, 2010). Cette démarche de cryoconservation permet la sauvegarde du patrimoine génétique des grands félins en danger via la constitution d'une banque de gamètes, d'embryons et de tout matériel génétique, centralisée par la *Genome Resource Bank*.

3.7. Les nouvelles techniques de reproduction

3.7.1. La micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïdes et l'injection de spermatozoïdes sous la zone pellucide

L'efficacité de l'insémination artificielle et de la FIV est limitée par la forte tératospermie rencontrée chez les grands félinés sauvages. La micro-injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (*intracytoplasmic sperm*

injection (ICSI) en anglais) et l'injection de spermatozoïdes sous la zone pellucide (SUZI en anglais pour *subzonal insemination*) s'affranchissent de cette limite grâce à l'injection directe du spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte (ICSI) ou sous la zone pellucide (SUZI). Les étapes successives de ces deux techniques sont : la stimulation ovarienne, la collecte et la maturation des gamètes, la micro-injection de la semence, la culture embryonnaire et finalement le transfert d'embryon(s). Le centre de recherches pour les espèces menacées d'Audubon (Nouvelle-Orléans) a réussi à obtenir des embryons de panthère nébuleuse et de lion par ICSI, mais le transfert de ces derniers dans une vieille femelle n'a pas abouti à une gestation (Damiani *et al.*, 2004).

3.7.2. La xénogreffe de tissu ovarien

Pour pallier au manque de disponibilité en ovocytes mûres, facteur limitant les techniques de reproduction assistée, Wiedemann et collaborateurs (2012) ont démontré la possibilité de congeler des cortex ovariens de lionne, et de les transplanter ultérieurement dans des souris immunodéficientes afin de récolter des follicules mûrs. Les ovaires des femelles de grande valeur génétique peuvent ainsi être conservés après la mort de l'animal et utilisés pour la sauvegarde des gamètes.

3.7.3. Le clonage reproductif

Le transfert de noyau de cellules somatiques (SCNT) est actuellement en expérimentation chez les grands félins sauvages : des embryons clonés de tigre et de lion ont été produits au Centre de Recherches pour les Espèces menacées d'Audubon. L'efficacité de cette technique reste cependant limitée par les anomalies de reprogrammation nucléaire, et par l'implication d'ADN mitochondrial issu d'une espèce différente lors de SCNT interspécifique. De plus, cette méthode de multiplication à l'identique n'introduit pas de diversité génétique (Gomez *et al.*, 2004 ; 2009).

4. Conclusion

Les différentes populations de grands félins sauvages subissent des pressions environnementales (braconnage,

compétition alimentaire, perte et fragmentation du territoire), et biologiques (maladies émergentes, consanguinité et tératospermie préjudiciables aux capacités reproductives) responsables de leur régression (Brown, 2011). La maîtrise des facteurs environnementaux s'avérant insuffisante pour assurer la sauvegarde des félins menacés, certains projets intègrent la gestion de la reproduction à leur programme de conservation (Conservation et Reproduction des Espèces sauvages africaines menacées, 2009). Deux axes principaux sont aujourd'hui explorés pour augmenter la taille et la qualité génétique des espèces félines menacées : l'élevage en captivité qui s'appuie sur l'étude comportementale des grands prédateurs sauvages (Caro, 1993), et la reproduction assistée qui peut s'appliquer aux félinés captifs et en liberté (Fontbonne *et al.*, 2010). Grâce à leur développement chez le chat domestique, les techniques de reproduction assistée sont en pleine expansion chez les félinés sauvages (Swanson, 2006), mais le fort taux de tératospermie rencontré dans les populations félines consanguines limite leur efficacité. La tératospermie devient ainsi à la fois une conséquence et un facteur du manque de brassage génétique chez les félinés. Si l'insémination artificielle est la technique la mieux maîtrisée actuellement, la FIV et la congélation d'embryons sont en progrès, et les nouvelles méthodes telles que l'ICSI ou la SUZI qui outrepassent les limites liées à la tératospermie montrent des résultats encourageants. Le plus grand facteur limitant l'avancée des techniques d'élevage et de reproduction assistée chez les grands félins sauvages reste les différences significatives qu'il existe entre les mécanismes reproducteurs d'espèces pourtant relativement proches (Comizzoli *et al.*, 2009). Les scientifiques sont ainsi confrontés à un paradoxe que seule l'étude de la biologie des félins pourra résoudre : la variabilité inter et intra spécifique dans la physiologie de la reproduction des grands félins est le principal obstacle à l'efficacité des techniques reproductives permettant l'élévation de la variabilité génétique intra spécifique.

Remerciements

L'auteur remercie Pierre Comizzoli, Alain Fontbonne, Ann-Katrine Garn,

Martha Gomez et Colleen Lambo pour les précieuses informations scientifiques qu'ils ont accepté de communiquer.

Current knowledge about large wild felids reproductive physiology, its control, and assisted reproductive technologies

ABSTRACT

All of the eight large wild feline species are considered as threatened or near-threatened by the International Union for Conservation

of Nature. The evaluation technologies of large felids reproductive functions are similar to the ones routinely applied in the domestic cat, but their use in wild animals is often limited by the necessity of anaesthesia. Using faecal hormones analysis for monitoring the reproductive activity in females is a non-invasive alternative that highlights significant differences between the felids reproductive cycles.

The reproductive rate in captivity is very low, and knowledge of wild felids behaviour is fundamental to improve the efficiency of the breeding programs. The studbooks allow genetic management

of large felids captive populations and application of these registers could avoid consanguineous mating. When natural reproduction is impossible, assisted reproductive technologies prevent the species extinction. Artificial insemination is currently the most developed technique. Other methods are in progress such as *in vitro* fertilization, embryo transfer or freezing. Nevertheless teratospermia highly affects the fertility in felids consanguineous populations, and improvement of the techniques such as intracytoplasmic sperm injection and subzonal insemination may circumvent this limitation.

BIBLIOGRAPHIE

- ARMSTRONG D.L., CRICHTON E.G., DANKOF S.M., SCHWALBACH L.M.J., GARDNER D.K., LOSKUTOFF N.M. Ovarian stimulation, laparoscopic oocyte retrieval, IVF and blastocyst production using sequential media in the African lion (*Panthera leo*). *Reprod. Fertil. Dev.*, 2004, **16**, 221-221.
- ASA C., BOUTELLE S., BAUMAN K. AZA Wildlife Contraception Center programme for wild felids and canids. *Reprod. Domestic Anim.*, 2012, **47** : Suppl 6, 377-380.
- BARTELS P., LUBBE K., KILIAN I., FRIEDMANN Y., VAN DYK G., MORTIMER D. *In vitro* maturation and fertilization of Lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen-thawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. *Theriogenology*, 2000, **53**, 325.
- BLOMQVIST L., STEN I. Reproductive biology of the snow leopard, *Panthera uncia*. In : Blomqvist L., International Pedigree book of snow leopards. Helsinki zoo : Helsinki, 1982, 71-79.
- BROWN J.L. Female reproductive cycles of wild female felids. *Anim. Reprod. Sci.*, 2011, **124**, 155-162.
- BROWN J.L., BUSH M., PACKER C., PUSEY A.E., MONFORT S.L., O'BRIEN S.J., JANSSEN D.L., WILDT D.E. Developmental changes in pituitary-gonadal function in free-ranging lions (*Panthera leo leo*) of the Serengeti plains and Ngorongoro Crater. *J. Reprod. Fertil.*, 1991, **91**, 29-40.
- BROWN J.L., WILDT D.E., WIELEBNOWSKI N., GOODROWE K.L., GRAHAM L.H., WELLS S., HOWARD J.G. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. *J. Reprod. Fertil.*, 1996, **106**, 337-346.
- CARO T.M. Behavioral solutions to breeding cheetahs in captivity: insights from the wild. *Zoo Biol.*, 1993, **12**, 19-30.
- CHATDARONG K., THUWANUT P., SUKSAMAI P., PATANATIRADAJ S., SANGWORNACHASUP A. Survival of frozen-thawed cat spermatozoa pre-cooled in the epididymides. *Reprod. Domestic Anim.*, 2009, **44**, 377-380.
- COMIZZOLI P., CROSIER A.E., SONGSASEN N., GUNTHER M.S., HOWARD J.G., WILDT D.E. Advances in reproductive science for wild carnivore conservation. *Reprod. Domestic Anim.*, 2009, **44** : Suppl 2, 47-52.
- COMIZZOLI P., SONGSASEN N., WILDT D.E. Protecting and extending fertility for females of wild and endangered mammals. *Cancer Treat. Res.*, 2010, **156**, 87-100.
- DA PAZ R.C.R. Wildlife cats reproductive biotechnology. In : Katkov I.I. (Ed.), Current frontiers in cryobiology. InTech : Rijeka, 2012, 369-388.
- DAMIANI P., GOMEZ M., COLE A., POPE E., AGUILAR R., HAMMOND B., NEL L., CORTEZ C., VACCARO J., SARRAT E., MARKEY E., DRESSER B. The production of intracytoplasmic sperm injection lion (*Panthera leo*) embryos using spermatozoa collected by percutaneous epididymal sperm aspiration from vasectomized males. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2004, **16**, 223-224.
- DONOGHUE A.M., HOWARD J.G., BYERS A.P., GOODROWE K.L., BUSH M., BLUMER E., LUKAS J., STOVER J., SNODGRASS K., WILDT D.E. Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization *in vitro* in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Biol. Reprod.*, 1992, **46**, 1047-1056.
- DONOGHUE A.M., JOHNSTON L.A., SEAL U.S., ARMSTRONG D.L., TILSON R.L., WOLF P., PETRINI K., SIMMONS L.G.,

- GROSS T., WILDT D.E. *In vitro* fertilization and embryo development *in vitro* and *in vivo* in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol. Reprod.*, 1990, **43**, 733-744.
- FILLIERS M., RIJSSELAERE T., BOSSAERT P., DE CAUSMAECKER V., DEWULF J., POPE C.E. Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4 degrees C) on sperm quality. *Theriogenology*, 2008, **70** : Suppl 6, 1550-1559.
- FONTBONNE A., FONTAINE E., ROUTIER J.-Y. L'insémination artificielle chez les félinés. *Bull. Acad. Vet. France*, 2007a, **160**, 143-151.
- FONTBONNE A., LEVY X., FONTAINE E., JACQUES H., ESSER C., ROUTIER J.-Y. Non-invasive intra-uterine insemination technique for large felids. In : The Wildlife Conservation Research Unit (Oxford University), IUCN/SSC Cat Specialist Group (Eds), Proceeding of the 1st Felid Biology and Conservation Conference, Oxford, 17-20 septembre 2007, 2007b, 76.
- FONTBONNE A., GÖRITZ F., HILDEBRANDT T., LEVY X., MARTINS M.I.M., FONTAINE E., ROUTIER J.-Y. Artificial insemination in wild felids. In : the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (Ed.), Proceedings of the 7th biannual Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction, Louvain-la-Neuve, 14-15 mai 2010, 2010, 67-70.
- FONTBONNE A., LEVY X., NUDELMANN N., ROUTIER J.-Y. Ovarian ultrasonography in cheetahs and other large felids. In : Proceedings of the 9th International Congress on wild and exotic animals, Paris, 8-10 mars 2012, 2012, 131.
- FONTBONNE A. Réaliser un frottis vaginal. In : Association française des Vétérinaires pour Animaux de Compagnie (Ed.), Proceedings du congrès national de l'Association française des Vétérinaires pour Animaux de Compagnie (AFVAC), Paris, 30 novembre - 2 décembre 2012, 2012, 1.
- GANAN N., GOMENDIO M., ROLDAN E.R. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5 degrees C on sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology*, 2009, **72**, 1268-1277.
- GOERITZ F., PAINER J., JEWGENOW K., HERMES R., RASMUSSEN K., DEHNHARD M., HILDEBRANDT T. Embryo retrieval after hormonal treatment to control ovarian function and non-surgical artificial insemination in African lions (*Panthera leo*). *Reprod. Domestic Anim.*, 2012, **47** : Suppl 6, 156-160.
- GOMEZ M.C., POPE C.E., GIRALDO A., LYONS L.A., HARRIS R.F., KING A.L., COLE A., GODKE R.A., DRESSER B.L. Birth of African wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells*, 2004, **6**, 247-258.
- GOMEZ M.C., POPE C.E., RICKS D.M., LYONS J., DUMAS C., DRESSER B.L. Cloning endangered felids using heterospecific donor oocytes and interspecies embryo transfer. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2009, **21**, 76-82.
- HOWARD J., WILDT D.E. Ejaculate-hormonal traits in the leopard cat (*Felis bengalensis*) and sperm function as measured by *in vitro* penetration of zona-free hamster ova and zona-intact domestic cat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 1990, **26**, 163-174.
- HOWARD J.G., BARONE M.A., DONOGHUE A.M., WILDT D.E. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *J. Reprod Fertil.*, 1992, **96**, 175-186.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES The IUCN red list of threatened species™. (2014) [en ligne] Adresse url : <http://www.iucnredlist.org/> consulté le 08/05/2014.
- JEWGENOW K., STOLTE M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats: viability and ultrastructural investigations. *Anim. Reprod. Sci.*, 1996, **44**, 183-193.
- JIMENEZ E., PEREZ-MARIN C., VIZUETE G., MILLAN Y., AGUERA E. Effect of different extenders on *in vitro* characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.*, 2013, **48** : Suppl 4, 665-672.
- JOHNSON W.E., ONORATO D.P., ROELKE M.E., LAND E.D., CUNNINGHAM M., BELDEN R.C., MCBRIDE R., JANSEN D., LOTZ M., SHINDLE D., HOWARD J., WILDT D.E., PENFOLD L.M., HOSTETLER J.A., OLI M.K., O'BRIEN S.J. Genetic restoration of the Florida panther. *Science*, 2010, **329**, 1641-1645.
- JOHNSTON L.A., DONOGHUE A.M., O'BRIEN S.J., WILDT D.E. Rescue and maturation *in vitro* of follicular oocytes collected from nondomestic felid species. *Biol. Reprod.*, 1991, **45**, 898-906.
- KINOSHITA K., INADA S., SEKI K., SASAKI A., HAMA N., KUSUNOKI H. Long-term monitoring of fecal steroid hormones in female snow leopards (*Panthera uncia*) during pregnancy or pseudopregnancy. *PloS One*, 2011, **6**, e19314.
- LAURENSEN M.K. Early maternal behavior of wild cheetahs: implications for captive husbandry. *Zoo Biol.*, 1993, **12**, 31-43.
- LEIBO S.P., SONGSASEN N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 2002, **57**, 303-326.
- LUEDERS I., LUTHER I., SCHEEPERS G., VAN DER HORST G. Improved semen collection method for wild felids: urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*). *Theriogenology*, 2012, **78**, 696-701.

- LUVONI G.C., KALCHSCHMIDT E., LEONI S., RUGGIERO C. Conservation of feline semen. Part I: cooling and freezing protocols. *J. Feline Med. Surg.*, 2003, **5**, 203-208.
- MARKER-KRAUS L., GRISHAM J. Captive breeding of cheetahs in North American zoos: 1987–1991. *Zoo Biol.*, 1993, **12**, 5-18.
- MELLO-MARTINS M.I., FONTBONNE A., MIT F., DORADO J., ORTIZ I., HIDALGO M. Computer-assisted sperm morphometry analysis of cat spermatozoa : preliminary results. In : the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (Ed.), Proceedings of the 14th European Veterinary Society for Small Animal Reproduction congress, Milan, 11 mars 2011, 2011, 76.
- MOTA P.C., RAMALHO-SANTOS J. Comparison between different markers for sperm quality in the cat: Diff-Quick as a simple optical technique to assess changes in the DNA of feline epididymal sperm. *Theriogenology*, 2006, **65**, 1360-1375.
- NUDELMANN N., LALOI F., LEVY X., MIR F., FONTBONNE A. Collection and examination of semen in cheetahs: a new approach. In : Proceedings of the 9th International Congress on wild and exotic animals. Paris, 8-10 mars 2012, 2012, 123.
- PELICAN K.M., WILDT D.E., PUKAZHENTHI B., HOWARD J. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology*, 2006, **66**, 37-48.
- PUKAZHENTHI B.S., NEUBAUER K., JEWGENOW K., HOWARD J., WILDT D.E. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology*, 2006, **66**, 112-121.
- RIJSSELAERE T, VAN SOOM A, MAES D, NIZANSKI W. Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: an update after 20 years. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012, **47** : Suppl 6, 204-207.
- CONSERVATION ET REPRODUCTION DES ESPÈCES SAUVAGES AFRICAINES MENACÉES
Projet scientifique novateur associant l'homme et l'animal dans un intérêt partagé. [en ligne] (2009) Adresse url : http://www.veterinaire routiernoel.com/adm/webmaster/routiernoel/upload/fondation_francais.pdf, consulté le 15/02/2015 .
- SCHMIDT A.M., HESS D.L., SCHMIDT M.J., SMITH R.C., LEWIS C.R. Serum concentrations of oestradiol and progesterone, and sexual behaviour during the normal oestrous cycle in the leopard (*Panthera pardus*). *J. Reprod. Fertil.*, 1988, **82**, 43-49.
- SILVA A.R., MORATO R.G., SILVA L.D. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Anim. Reprod. Sci.*, 2004, **81**, 159-175.
- SWANSON W.F. Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*, 2006, **66**, 49-58.
- WIEDEMANN C., HRIBAL R., RINGLEB J., BERTELSEN M.F., RASMUSEN K., ANDERSEN C.Y., KRISTENSEN S.G., JEWGENOW K. Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into an immunodeficient mouse. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012, **47** : Suppl 6, 300-304.
- WIELEBNOWSKI N., BROWN J.L. Behavioral correlates of physiological estrus in cheetahs. *Zoo Biol.*, 1998, **17**, 193-209.
- YOSHIDA M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000, **60-61**, 349-355.
- ZAMBELLI D., CUNTO M. Semen collection in cats: techniques and analysis. *Theriogenology*, 2006, **66**, 159-165