



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA BEJAIA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES DE L'ENVIRONNEMENT

# *Mémoire de Fin de Cycle*

En vue de l'obtention du diplôme de  
Master en Reproduction et Biotechnologies Animales

## Optimisation de la conservation du sperme de lapin par réfrigération

Réalisé par :

M<sup>r</sup> KHELLOUF Alla-Eddine

M<sup>elle</sup> MELAB Naoual

**Membres de Jury :**

Président : M<sup>r</sup> MOULAI R.

Examineurs : M<sup>r</sup> NAIT MOULOU D. M.

M<sup>elle</sup> RAHMANI A.

Promotrice : M<sup>me</sup> TALBI A.

Co-Promoteur : M<sup>r</sup> IGUER-OUADA M.



# Remerciements

*Nous remercions DIEU le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la force et la patience afin de mener ce travail à terme.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et grand respect à notre chère promotrice M<sup>me</sup> TALBI Pour son aide, sa disponibilité, ses conseils avisés, et ses remarques qui nous ont permis de présenter notre travail.*

*Toute notre gratitude s'adresse aussi à notre co-promoteur M<sup>r</sup> IGUER\_OUADA pour son aide et sa contribution à la réussite de ce modeste mémoire.*

*Nos sincères remerciements s'adressent aussi aux membres de jury d'avoir accepté de juger notre travail et de contribuer à son enrichissement par leurs valeureuses remarques :*

*M<sup>r</sup> MOULAI pour avoir accepté de présider le jury et d'évaluer notre travail.  
M<sup>lle</sup> RAHMANI et M<sup>r</sup> NAIT MOULOUD Pour avoir accepté d'examiner ce travail, d'avoir bien voulu prendre le temps d'évaluer et de juger notre travail.*

*Nous remercions également le directeur de l'Institut Nationale de La Recherche Agronomique d'Algérie-Bejaia-Oued-Ghir M<sup>r</sup> AIT MEZIANE T et à tous l'ensemble du personnel du centre.*

*Nous ne manquerons pas de remercier particulièrement M<sup>r</sup> Mansouri. H,  
Et monsieur FATMI.S, du département de génie des Procédés et pharmaceutique  
pour son aide lors de la pratique.*

*En dernier lieu, nous remercions chaleureusement toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*





# Dédicaces

*J'exprime mon profond respect et ma sincère gratitude aux êtres qui me sont les plus chères au monde, à mes parents qui ont su me faire confiance et me soutenir en toute circonstance au cours de toutes mes années d'études ; c'est avec émotion que je leur exprime toute ma gratitude mon admiration et mon profond respect.*

*A mes chères sœurs pour leurs soutien et leur encouragement : Nissa et son mari ainsi sa petite Sara, à Dawia, son mari Slimane et ses enfants Dassine et Saber.*

*Au charme et au bon humeur de notre famille, ma chère sœur Houda.*

*A mes deux chères frères Chamou et Boussad que j'estime énormément.*

*A notre aimable et l'inocent Fala que, Dieu te garde ta bonté.*

*A la joie et le bonheur de notre famille Walid.*

*Que Dieu garde ma famille toujours réunis.*

*A mon Ame-sœur qui a été toujours avec moi dans chaque instant de ma vie, je le remercie amplement pour le soutien moral dans les moments les plus hostiles de ma vie.*

*A tous mes chers amis Nassima, Zohra, Lydia, Rafik, Rachida Said, et Siham, avec eux j'ai passé les meilleurs moments de ma vie.*

*A toute les personnes que J'ai connues et que je n'ai pas citées.*

*A toute la promo RBA 2013/2014 surtout Samia et Noria.*

*A mon binôme Allaa et à toute sa famille.*

*Nawel*





# Dédicaces

*À tous les êtres chers que j'ai perdus, particulièrement mon cher grand-père qui nous a quittés, et qui restera gravé à jamais dans ma mémoire.*

*À mes chers parents, vous qui aviez su alimenter ma motivation et mon ardeur à réussir par la source inépuisable de vos conseils. Votre protection et votre soutien indéfectible à mon égard a contribué à mon éducation et à ma formation. Je souhaite que vous trouviez dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

*À mes deux chers frères **Fares** et **Mehdi** qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance, et aussi à leurs femmes qui ont agrandi et égayé notre famille par leur présence.*

*À ma chère petite sœur que j'aime, je lui souhaite bonheur, prospérité et réussite dans ces études.*

*À la grande vedette de la famille, mon neveu **Mohamed Islam**.*

*À mon binôme **Naoual**, merci pour ton amitié, je n'oublierai jamais l'assistance que tu m'apportais lors de notre travail et aux moments difficiles, ainsi qu'à toute ta famille.*

*Je ne saurais terminer sans citer mon amie et ma sœur **Saida**, merci pour ton amitié et ta fraternité, pour ta présence permanente à mes côtés et pour tes conseils. Merci ma sœur.*

*À tous mes amis, je n'oublie jamais les moments passés ensemble, vous m'avez encouragé et soutenu. Merci pour votre grande complicité. Que Dieu nous ouvre les portes de la réussite.*

*À toute la promo **RBA** 2013-2014, surtout à **Samia**, **Nouria**, **Souhila** et **Dania**, merci pour votre grande amitié et votre soutien.*

*Allaeddine*



# *liste des abréviations*

<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>
ADN	acide disoxyribonucléique
AGPI	acide gras polyinsaturé
ALH	amplitude of lateral head displacement
BCF	beat cross frequency
C	celsius
Ca	calcium
c.a.d	c'est-à-dire
CASA	computer assiste semen analyse
CH	méthyle
CHL	cholestérol
Cm	centimètre
ER	espèces réactives
ERO	espèces réactives de l'oxygène
ERN	espèces réactives d'azote
Fe	fer
g	gramme
GSH	glutathion
GSHP	glutathion peroxydase
GSSG	glutathion oxydé
h	heure
ha	hectare
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxide d'hydrogène
IA	insémination artificielle
INRA	institut national de la recherche agronome

## *Liste des abréviations*

---

INRAA	institut national de la recherche agronome en Algérie
K	potassium
Kg	kilogramme
Km	kilomètre
L	litre
LOO	lipide peroxyde
LIN	linéarités du chemin curviligne
meq	masse équivalente
Mg	magnésium
mg	milligramme
MI	motilité individuel
ml	millilitre
MM	motilité massale
mn	minute
mOsm	milliosmose
Na	sodium
NaCl	chlorur de sodium
NADPH	nicotinamide adinine dinucléotide phosphate
NO	dioxyde d'azote
NOS	nitrique oxyde synthase
O <sub>2</sub>	oxygène
OH	hydroxyde
PEG	polyéthylène glycol
pH	potentiel hydrogène

## *Liste des abréviations*

---

PNN	polynucléaire neutrophile
PTC	catalyseur de transfère de phase
RL	radicaux libres
RPE	résonance paramagnétique électronique
s	second
SAT	surface agricole total
SAU	surface agricole utile
SM	spermatozoïdes morts
SOD	superoxyde dismutase
SPZ	spermatozoïdes
t	temps
TB	tris buffer
UI	unité international
UV	ultra-violet
V	volume
VA	vagin artificielle
VAP	vilocity average pathway
VCL	curviliner velocity
Vit E	vitamine E
VSL	straight-line velocity
Zn	zinc
µm	micromètre
PM	poids moléculaire



# *liste des figures*

<b>Partie bibliographique</b>	
<b>Figure N°1</b> : Appareil reproducteur du lapin mâle.....	03
<b>Figure N°2</b> : Structure interne du testicule et de l'épididyme des Lapins.....	04
<b>Figure N°3</b> : Testicule et épидидyme du lapin adulte.....	05
<b>Figure N°4</b> : Portion libre de l'urètre : pénis du lapin.....	07
<b>Figure N°5</b> : Vue d'un spermatozoïde complet de lapin.....	19
<b>Figure N°6</b> : Les Principales anomalies morphologiques des spermatozoïdes.....	20
<b>Figure N°7</b> : Graphique de la motilité des spermatozoïdes.....	21
<b>Figure N°8</b> : Déséquilibre du statut pro/antioxydant en faveur d'un stress.....	23
<b>Figure N°9</b> : Les origines des espèces réactives.....	26
<b>Figure N°10</b> : Les différentes cibles des Espèces Réactives.....	27
<b>Figure N°11</b> : structure chimique du PEG.....	33
<b>Partie expérimentale</b>	
<b>Figure N°12</b> : Photographie des cages des lapins de l'université de Bejaia.....	45
<b>Figure N°13</b> : photographie du clapier de l'INRAA de Bejaïa.....	46
<b>Figure N°14</b> : photographie du matériel utilisé pour la collecte d sperme.....	47
<b>Figure N°15</b> : Les différentes étapes de la préparation du vagin artificiel.....	48
<b>Figure N°16</b> : Photographie de la méthode de collecte du sperme.....	49
<b>Figure N°17</b> : Photographie du sperme collecté.....	49
<b>Figure N°18</b> : Photographie du matériel utilisé pour l'analyse du sperme.....	50
<b>Figure N°19</b> : Photographie du microscope CASA (computer assisted semen analyser).....	54
<b>Figure N°20</b> : Histogramme représentant la VSL des SPZ à T0 dans les différents milieux utilisés.....	55
<b>Figure N°21</b> : Histogramme représentant la VSL des SPZ à T2h dans les différents milieux utilisé.....	56

<b>Figure N°22</b> : Histogramme représentant la VSL des SPZ à T4h dans les différents milieux utilisés.....	57
<b>Figure N°23</b> : Histogramme représentant la VSL des SPZ à T24h dans les différents milieux utilisés.....	58
<b>Figure N°24</b> : Histogramme représentant le pourcentage des SPZ mobile à T0 dans les différents milieux utilisés.....	59
<b>Figure N°25</b> : Histogramme représentant le pourcentage des SPZ mobile à T2h dans les différents milieux utilisés.....	60
<b>Figure N°26</b> : Histogramme représentant le pourcentage des SPZ mobile à T4h dans les différents milieux utilisés.....	61
<b>Figure N°27</b> : Histogramme représentant le pourcentage des SPZ mobile à T24h dans les différents milieux utilisés.....	62

*liste des tableaux*

<b>N° de tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau I</b>	La composition chimique du sperme chez le lapin.....	<b>10</b>
<b>Tableau II</b>	Les valeurs de sperme frais de lapin.....	<b>22</b>
<b>Tableau III</b>	les propriétés de quelques PEG.....	<b>36</b>
<b>Tableau IV</b>	les composants et les propriétés adéquates du tris buffer utilisé pour le lapin.....	<b>38</b>
<b>Tableau V</b>	influence de la semence conservée sur la prolificité.....	<b>40</b>
<b>Tableau VI</b>	influence de la semence conservée sur la fertilité.....	<b>41</b>
<b>Tableau VII</b>	les caractéristiques des lapins mâles de l'université de Bejaia.....	<b>45</b>
<b>Tableau VIII</b>	les caractéristiques des lapins mâles de l'INRAA de Bejaia .....	<b>46</b>
<b>Tableau IX</b>	les caractéristiques de la semence des deux males utilisés pour la réfrigération .....	<b>52</b>
<b>Tableau IIX</b>	les composantes de tris buffer.....	<b>53</b>

# *sommaire*

# Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

## Partie théorique

### CHAPITRE I : La reproduction chez le lapin

I– Anatomie de l'appareil génital mâle du lapin.....	3
I-1. Portion glandulaire.....	4
I-1.1. Testicules .....	4
I-2. Portion tubulaire .....	5
I-2.1. Epididyme.....	5
I-2.2. Conduit déférent.....	6
I-2.3. Urètre .....	6
I-3. Portion copulatrice .....	6
I-3.1 Pénis .....	6
I-4. Glandes annexes .....	7
I-4.1. Vésicule séminale .....	7
I-4.2. Prostate .....	7
I-4.3. Glandes bulbo-urétrales ou glandes de Cowper.....	7
I-4.4. Glandes inguinales .....	8
II– Composition du sperme du lapin.....	8
III– Spermatogenèse et production des spermatozoïdes .....	8
IV– Caractéristiques physico-chimique du sperme de lapin adulte .....	9
V– Caractères influençant sur le sperme du lapin.....	10
V-1. La photopériode .....	11
V-2. Protocoles d'alimentation .....	11
V-3. Age .....	12

V-4. La température .....	13
V-5.L'état de santé .....	13
V-6. Fréquence de collecte .....	13
V-7. Le comportement.....	14
VI– La Collecte de sperme .....	14
VI-1. Le vagin artificiel .....	14
VI-2. Technique de récolte .....	15
VII-Méthodes d'évaluation du sperme .....	15
VII-1. Évaluation macroscopique.....	16
VII-1.1. La couleur .....	16
VII-1.2. Le volume .....	16
VII-1.3. Le PH .....	16
VII-2. Evaluation microscopique .....	16
VII-2.1. La mobilité .....	16
a) motilité massale .....	17
b) motilité individuelle .....	17
VII-2.2. La concentration .....	17
VII-2.3. La viabilité .....	18
VII-2.4. La morphologie .....	18
VII-3. Évaluation du sperme avec le C.A.S.A .....	20

## CHAPITRE II : Le stress oxydatif

I– Le stress oxydant .....	23
II– Les radicaux libres (RL) .....	24
II-1. Le radical superoxyde $O_2^-$ .....	24
II-2. Le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée $H_2O_2$ .....	25
II-3. Le radical hydroxyle $OH^\circ$ .....	25
III– Les origine des radicaux libres (RL) .....	25
IV– Les différentes cibles des espèces réactives (ER) .....	26



V– Les antioxydants.....	27
V-1. Les systèmes antioxydants enzymatiques .....	28
V-1.1. Les superoxydesdismutases (SOD) .....	28
V-1.2. Les catalases .....	29
V-1.3. Les glutathion peroxydases (GSHPX) .....	29
V-2. Les systèmes antioxydants non-enzymatiques .....	29
V-2.1. La vitamine E .....	30
V-2.2. La vitamine C .....	31
V-2.3. Le glutathion .....	31
VI–Mesure du stress oxydatif .....	31
VII– Le polyéthylène glycol (PEG) .....	32
VII-1. Définition .....	32
VII-2. La structure du PEG .....	32
VII-3. Usage de la PEG.....	33
VII-3.1. Domaine médicale .....	33
VII-3.2. Domaine industriel .....	34
VII-3.3. Domaine biologique .....	34
VII-4. Les effets négatifs de la PEG .....	35
VII-5. Les propriétés de quelques PEG .....	36

## CHAPITRE III : Réfrigération

I– Description de la technique .....	37
II– Milieux de dilutions et leurs caractères .....	37
II-1. Les différents dilueurs utilisés pour le lapin .....	39
II-2. Le taux de dilution .....	39
III– Conservation par la réfrigération.....	40

III-1. Effet de la température .....	40
III-2. Choc thermique .....	41
III-3. Protocole de la réfrigération.....	41
III-4. Effet de la réfrigération sur les spermatozoïdes .....	42

## **Partie expérimentale**

### **Matériels et méthodes**

Objectif du travail .....	44
I– Collecte de la semence de lapin .....	44
I-1. Description de l’INRAA .....	44
I-2. Matériel de la collecte .....	44
I-2.1. Matériels biologiques.....	44
I-2.2. Matériels techniques .....	46
I-2.3. Etapes de la préparation du vagin artificiel.....	47
I-3. Méthodes de la collecte .....	48
II– Analyse du sperme.....	49
II-1. Matériels de l’analyse .....	49
II-2. Techniques d’analyse .....	50
II-2.1. Examen macroscopique .....	51
VI-2.1.1. La couleur .....	51
VI-2.1.2. Le volume .....	51
II-2.2. Examen microscopique .....	51
II-2.2.1. La motilité massale .....	51
II-2.2.2. La motilité individuelle .....	51

II-2.2.3. La concentration spermatique .....	51
II-2.2.4. La morphologie et la vitalité .....	52
III– Conservation de la semence avec réfrigération .....	53
III-1. Matériel de la réfrigération .....	53
III-2. Préparation des milieux (traitements) .....	53
III-3. Conservation du sperme à température ambiante et par réfrigération ..	54

## Résultats et discussions

I–Analyse des résultats de la VSL .....	55
II– Analyse des résultats du pourcentage de la mobilité .....	55
III– Discussion générale.....	63

Conclusion et Perspectives.....	64
---------------------------------	----

## Références bibliographiques

## Annexes

## Résumé

# *Introduction*

L'intérêt économique, sanitaire et zootechnique de la technique de l'insémination artificielle (IA) n'est plus à démontrer. Car on sait que la rentabilité d'un système d'élevage dépend en grande partie de la maîtrise de la reproduction et dont l'efficacité est dépendante des facteurs environnant notamment, l'alimentation, la nutrition et les conditions d'élevage. D'ailleurs Les hauts niveaux de performance reproductive peuvent se réaliser seulement sous un système de conduite optimum. L'insémination artificielle est un outil important pour l'amélioration génétique.

Au cours des années, l'insémination artificielle chez le lapin a augmenté dans les pays où l'élevage intensif de lapin est pratiqué, particulièrement en Europe. Cependant, l'insémination artificielle avec le sperme de lapin cryoconservé a été seulement employée pour la banque de ressource expérimentale ou génétique, cela en raison des problèmes liés à l'utilisation du sperme congelé (généralement une faible fertilité et/ou prolificité par rapport au sperme frais) rapportés par la plupart des auteurs (**Pinto et al., 1999 ; Decuardo, 2004 ; Sauveur et De Reviere, 1988**). L'insémination artificielle est habituellement effectuée avec le sperme refroidi stocké pendant des courtes périodes (au-dessous de 36 h) (**Viudes De Castro et al., 1999 ; Roca et al., 2000 ; Lopez-gatius et al., 2005**) avec lequel des hauts indices de fertilité et de prolificité sont obtenus. Par ailleurs, il a été prouvé que la semence de certains lapins ne supporte pas la congélation mais se comporte normalement à l'état réfrigéré. Cette technique est aussi un outil de démultiplication de la production de semence des reproducteurs les plus demandés. Elle permet dans certains cas de valoriser le progrès génétique de ces reproducteurs (**Eva Moce et Jose, 2009**).

Le sperme utilisé dans l'insémination artificielle est dilué par des dilueurs qui permettent de protéger les spermatozoïdes. L'efficacité des dilueurs et des méthodes de conservation réside dans leur potentialité à maintenir l'ensemble des fonctions des spermatozoïdes en milieu liquide soit entre 4 et 5° C soit à 15° C. Ils sont le plus souvent basés sur l'utilisation de milieu tel que le lait (**Dauzier, 1956 ; Colas et al., 1968**), le jaune d'œuf (**Dauzier, 1956 ; Salamon et Robinson, 1962**) et même l'utilisation de l'eau de coco (**Nunes, 1982 ; Salles, 1989**). La complexité de ces milieux rend difficile la définition des éléments directement impliqués dans la protection et la conservation des gamètes.

Malgré que l'addition de la caféine (**Lopez et Alvarino, 2000**) et de la gélatine (**Lopez-Gatius et al. 2005**) a montré une augmentation des paramètres de la vitesse des spermatozoïdes, cette augmentation de la motilité n'a pas conduit à une amélioration des paramètres de la reproduction, mais elle a diminué la qualité de mouvement des SPZ.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail avec un but principal de la mise au point d'un milieu permettant de prolonger la conservation de la semence du lapin pendant quelques heures. Et la possibilité de dilater l'intervalle entre la collecte de sperme et son application à la femelle, donc élargir les possibilités de rendement de l'IA.

Pour cela, nous avons essayé de nouveaux milieux à base de solution Tris buffer, à laquelle nous avons ajouté du polyéthylène glycol (PEG) seul ou associé à une ou les deux substances reconnues pour leurs rôles conservateurs, le cholestérol, qui consiste à renforcer la membrane cytoplasmique (**Mocé et al., 2009**), et la vitamine E connu comme un puissant antioxydant (**Watanab et al.,2009**) ; ces derniers sont aussi ajoutés seuls au tris buffer. Notre objectif est de tester l'effet de ces milieux sur la survie et la motilité des spermatozoïdes du lapin pendant deux jours (24 heures) de stockage à 4° C et de les comparer.

*Partie*  
*Théorique*

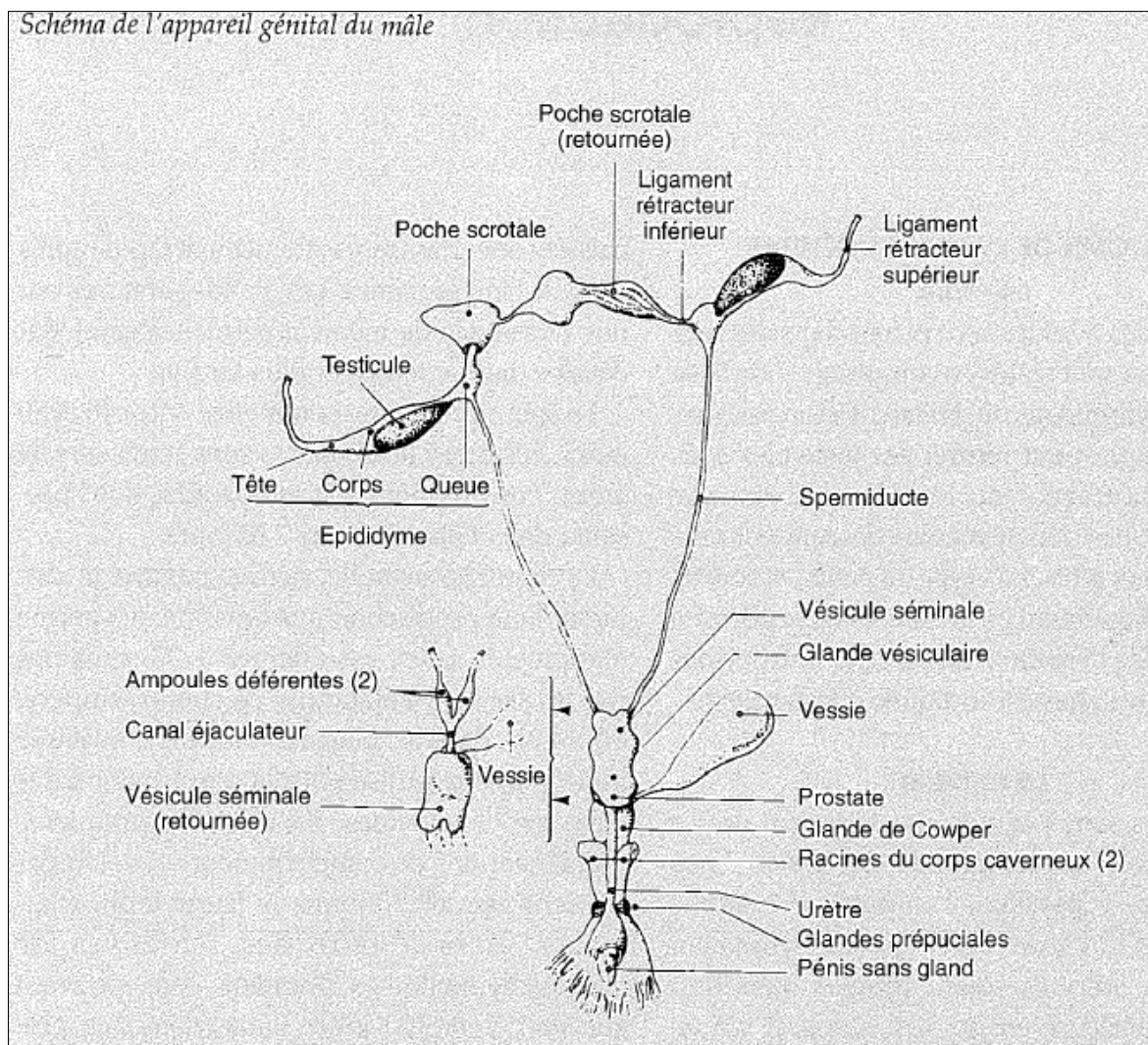
*Chapitre I*  
*la Reproduction chez*  
*le lapin*



## **I– Anatomie de l'appareil génital mâle du lapin**

Chez le lapin, l'appareil génital est similaire à celui des autres rongeurs. Il comporte 3 grandes portions qui sont: la portion glandulaire constituée par les testicules, la portion tubulaire constituée par l'épididyme, le canal déférent, l'urètre et la portion copulatrice constituée par le pénis (**Barone, 1976**). Mais aussi avec la présence des glandes annexes.

La **figure N°1** montre l'appareil reproducteur mâle du lapin.



**Figure N°1 : Appareil reproducteur du lapin mâle (Lebas, 1996)**

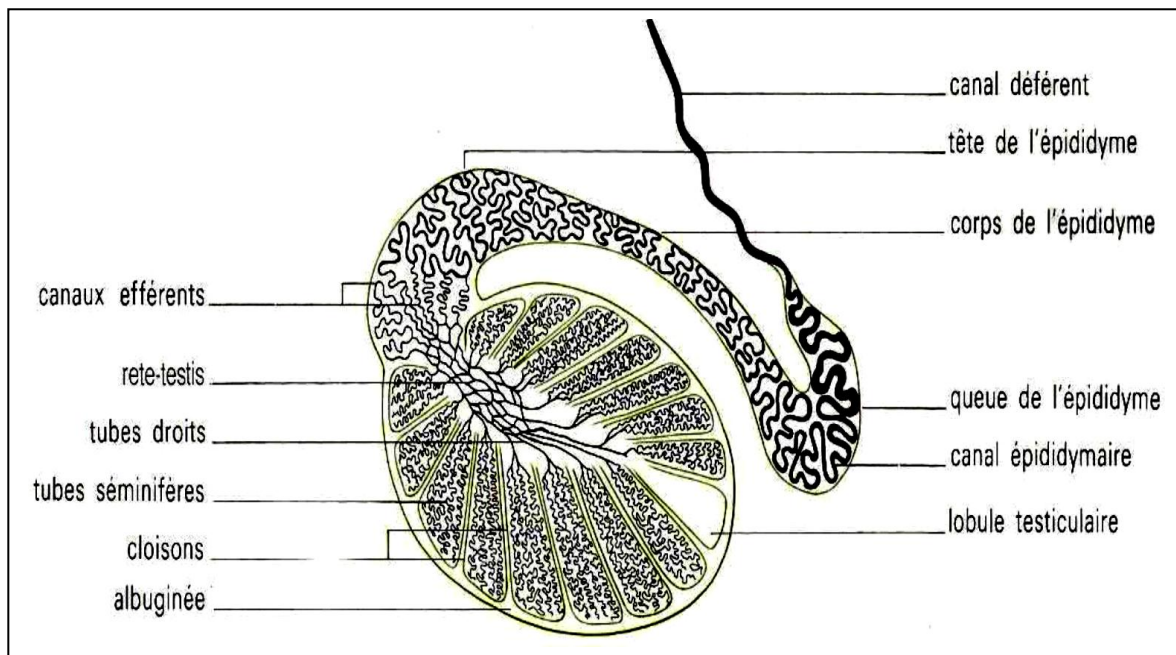
## I-1. Portion glandulaire

### I-1.1. Testicules

Ce sont des organes pairs, de forme ovale et allongé, amincis aux extrémités et sont légèrement comprimés. Le testicule a une longueur de 3 à 3,5 cm et une largeur de 1,5 cm pour un lapin de 4,5 kg et leur poids est de 1,5 à 2 g. Ils sont de couleur rosée et de consistance ferme et élastique et sont logés dans les enveloppes testiculaires (**Barone, 1984**).

Comme la plupart des mammifères, le lapin a un petit diverticule de la cavité abdominale appelé le scrotum, c'est là où les testicules vont se loger après une migration de l'avant (position intra-abdominale) vers l'arrière (position extra-abdominale). Cette position extra-abdominale conditionne la réussite de la spermatogenèse (**Van praag, 2002**).

Le testicule est entouré d'une enveloppe à membrane fibreuse résistante, épaisse et blanchâtre appelée Albuginée. Celle-ci émet des cloisons qui divisent le tissu conjonctif sous-jacent en lobules. On peut compter dans un testicule 200 à 300 lobules spermatiques communicants. Dans chaque lobule, on a des tubes séminifères qui sont des conduits très flexueux comportant une partie contournée et une partie droite qui se raccorde au rete-testis et forme la partie initiale des voies d'excrétions des spermatozoïdes (**figure N°2**).



**Figure N°2** : Structure interne du testicule et de l'épididyme des Lapins  
(**Bonnes et al.,1988**)

### I-2. Portion tubulaire

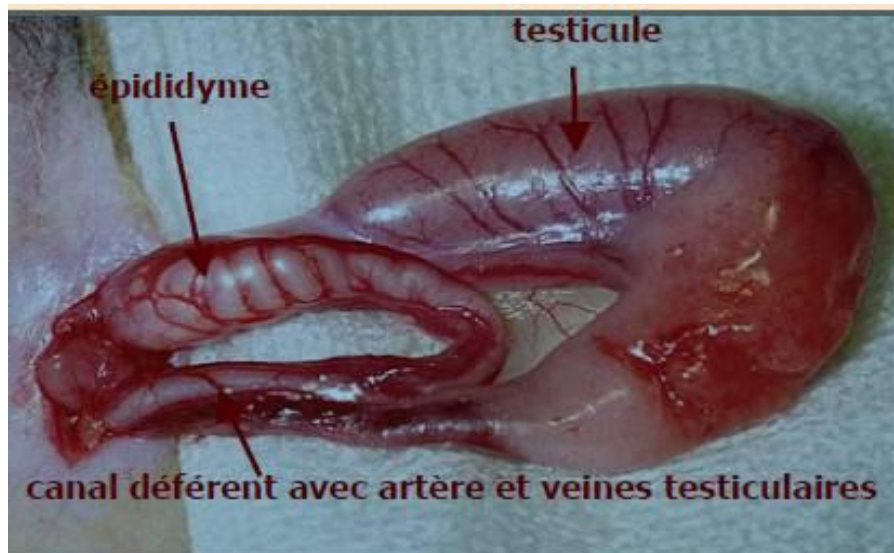
Cette portion est constituée par : l'épididyme, le conduit déférent et l'urètre.

#### I-2.1. Epididyme

C'est un canal extrêmement replié sur lui-même à l'intérieur d'une tunique conjonctive qui lui confère une forme globale allongée en croissant d'un pôle à l'autre du côté dorsal du testicule avec une longueur allant de : 1,5 à 3 cm, il comporte 3 parties (**figureN°3**):

- une tête volumineuse, qui coiffe largement l'extrémité capitée du testicule ;
- un corps représentant la portion moyenne. Il est épais chez le lapin ;
- une queue qui forme un appendice globuleux et mobile. (**Grasse, 1971 ;**

**Barone, 1978**).



**Figure N°3** : Testicule et épидидyme du lapin adulte (**Van praag, 2002**)

Les canaux du Rete-testis et les canaux efférents se prolongent dans le premier lobule de la tête de l'épididyme où ils se replient sur eux-mêmes. (**Bonnes et al., 1988 ; Abraham et Kierszenbaum, 2002 ; Welsch, 2002**) (**figure N°2**).

### **I-2.2. Conduit déférent**

Long, de 12 à 15 cm, et relativement épais. Il s'étend de la queue de l'épididyme jusqu'à l'urètre. Le conduit déférent, présente une ampoule assez nette, de 2 cm environ qui s'ouvre dans la partie caudale de la vésicule séminale par un orifice assez large et impair porté par le colliculus seminalis. C'est par l'intermédiaire de ce bref conduit que se fait la communication avec l'urètre (**Barone, 1978**).

### **I-2.3. Urètre**

L'urètre au niveau de l'appareil génital, forme la partie extra-pelvienne qui constitue le pénis. Au niveau du deuxième segment de l'urètre, se trouvent deux masses musculaires ; les muscles ischio-caverneux ou muscles érecteurs du pénis. Un épais corps caverneux l'entoure. L'urètre pénien va de la symphyse ischio-pubienne et se termine par l'ostium externe de l'urètre (**Barone, 1978**).

## **I-3. Portion copulatrice**

### **I-3.1 Pénis**

Le lapin est une espèce à pénis rétrofléchi. Il est logé dans le prépuce et ne sort que lors de l'accouplement. C'est un organe court, en forme de tube légèrement en pointe qui mesure environ 8 cm de long (**Roger, 2002**) (**figure N°4**).

Le pénis est suspendu par un ligament suspenseur, le ligament suspenseur du pénis est doublé par une paire de forts muscles subischio-caverneux qui n'existent chez aucune autre espèce domestique (**Barone, 1978**).

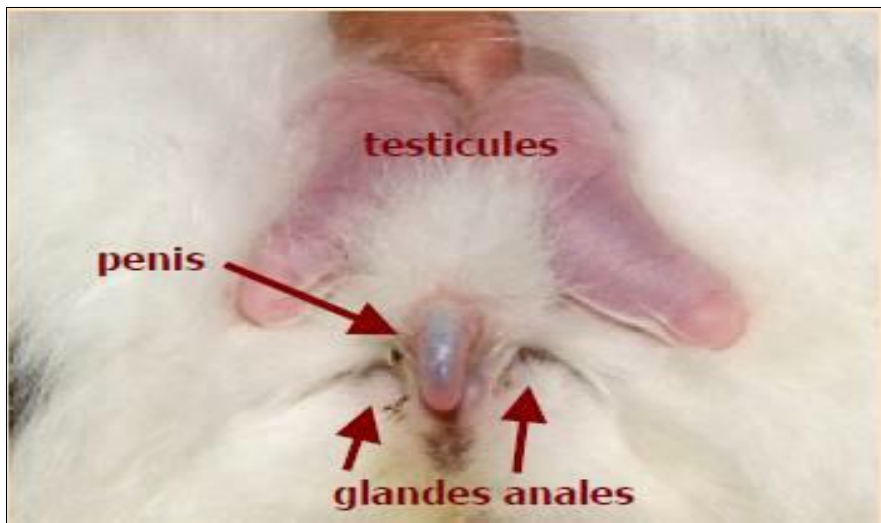


Figure N°4 : Portion libre de l'urètre : pénis du lapin (Shinkichi et Akira, 2004)

### I-4. Glandes annexes

#### I-4.1. La vésicule séminale

Chez le lapin, la vésicule séminale est impaire mais bilobée à son extrémité, sa longueur est d'environ 2,5 cm avec un aspect ajouré (Abraham et Kierszenbaum, 2002 ; Welsch, 2002). Elles débouchent dans le conduit déférent (Roger, 2002).

Sa partie caudale fusionne avec les canaux déférents pour former un canal éjaculateur impair qui s'ouvre dorsalement dans l'urètre au niveau du colliculus seminalis. (Barone, 1984).

#### I-4.2. La prostate

Chez le lapin, elle est remplacée par un complexe de plusieurs glandes (Lebas, 1996), toutes développées à partir de diverticules de la paroi urétrale au voisinage du colliculus seminal. Elle présente une partie diffuse disséminée dans la paroi de l'urètre et une partie conglomérée (Roger, 2002).

#### I-4.3. Les glandes bulbo-urétrales ou glandes de Cowper

Ce sont des formations sphériques paires, bilobées placée postérieurement à la prostate et dorsalement à l'urètre dans lequel elle s'ouvre par au moins 4 canaux (Sabbagh, 1983). Chaque glande est entourée par un corpuscule conjonctif (Roger, 2002).

### **I-4.4. Les Glandes inguinales**

Ces glandes ne se rencontrent que chez le lapin. Elles forment un groupe très important de glandes qui s'étalent sous la peau dans la région inguinale et sont bien développées (Roger, 2002).

## **II- Composition du sperme du lapin**

Le sperme du lapin se compose de deux parties principales, une partie gélatineuse qui empêche la semence de s'écouler hors du vagin après éjaculation (Mukherjee *et al.*, 1951). Et une partie liquide composée d'un plasma séminal accompagné de spermatozoïdes.

Le plasma séminal a un rôle dans le transport des gamètes lors de l'éjaculation. Il est composé de glycoprotéines, fructose, sorbitol, acide citrique, acide gras, des ions (Na, K, Ca, Mg) et de l'inositol, mais il est très pauvre en glucose (Boussit, 1989). Le sperme du lapin contient aussi des petites granules séminales (0,5 à 6 µm de diamètre) produit par la prostate, Il a été postulé que ces particules modulent le processus de capacitation et la réaction acrosomique des spermatozoïdes par la libération du cholestérol (Castellini, 2008 et Davis, 1974), la cinétique de sperme (Stegmayr et Rönquist, 1982 ; Fabiani *et al.*, 1995) ainsi que le transit des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle.

## **III - Spermatogenèse et production des spermatozoïdes**

La spermatogenèse est la production de spermatozoïdes matures haploïdes, à partir de cellules souches (spermatogonies) diploïdes au niveau des tubes séminifères des testicules. Elle se déroule en trois phases : la phase de multiplication, phase d'accroissement et la phase de maturation au niveau de l'épididyme (Boussit, 1989).

Il existe peu de données dans la littérature à propos de la spermatogenèse chez le lapin. May *et al.*, (1975) mentionnent un début d'activité de la spermatogenèse vers 63 jours d'âge. Cependant, il faut attendre l'âge de 84 jours pour que tous les tubes séminifères soient concernés (Leeson *et al.*, 1970 cités par Martinet, 1973).

Pour certains auteurs français, la spermatogénèse commence plus précocement vers l'âge de 40 à 50 jours. Mais les premières divisions zoniales ne donneront des spermatozoïdes que vers 60 jours (**Martinet, 1973**).

Les premiers spermatozoïdes n'apparaissent dans la tête de l'épididyme qu'à 112 jours (**Leeson et Leeson, 1970**).

L'éjaculat contiendra des spermatozoïdes dès 120 jours au moins.

Ces données ont été confirmées en **1996** par **Lebas** et ses collaborateurs qui disent que la spermatogénèse commence entre 40 et 50 jours, les tubes testiculaires sont actifs vers 84 jours et les premiers spermatozoïdes sont présents dans l'éjaculat vers 110 jours.

La maturité sexuelle se définit comme le moment où la production quotidienne de sperme n'augmente plus.

La durée de la spermatogénèse est de 38 à 41 jours (**Martinet, 1973**).

### IV- Caractéristiques physico-chimique du sperme de lapin adulte

D'après **Orgebin-Crist (1968)** et **Cole et Cupps (1977)**.

- Volume éjaculé: 0,6 à 1 ml.
- Concentration en spermatozoïdes : 10 à 1 000 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes/ml de sperme
- Nombre moyen de spermatozoïdes par éjaculat 200 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes
- Pourcentage de spermatozoïdes mobiles : 80 %
- Pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux 80 %.
- Nombre d'éjaculats possibles par semaine: 6.
- Nombre moyen de spermatozoïdes par testicule : 350 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes.
- Production de spermatozoïdes par jour 170 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes.
- Production de spermatozoïdes par gramme de testicule 24 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes.

Après 20 ans environs, d'autres études **Lebas et al., (1996)** ont rapporté des données différentes. Ils ont noté que Le volume des éjaculats est de l'ordre de 0,3 à 1 ml et varie en fonction de la race, de l'état physiologique et de la fréquence de la collecte. Quant à la concentration est évaluée de 150 x 10<sup>6</sup> à 500 x 10<sup>6</sup> spermatozoïdes par millilitre, mais le volume et la concentration sont susceptibles de variations.

De fausses montes, une ou deux minutes avant le coït, augmentent la concentration des éjaculats. Si on pratique deux accouplements successifs, la première monte sert de préparation à la seconde, qui est caractérisée par un volume moindre et une concentration améliorée.

La composition chimique du sperme chez le lapin diffère d'une race à l'autre, le pH du plasma séminal varie entre 6,8 et 7,3 (**Francisco et Louis, 2003**), alors que la pression osmotique semble proche de 308 milliosmose (**Boussit, 1989**), le **tableau 1** regroupe les différentes substances et leurs concentrations :

**Tableau I :** La composition chimique du sperme chez le lapin (**Boussit, 1989**)

Substance	Concentration dans le plasma séminal
Na	140-160 mg/100ml
K	70-85 mg/100ml
Ca	5-7 mg/100ml
Mg	22-31 mg/100ml

Substance	Concentration intracellulaire des spermatozoïdes
Fructose	40-400 mg/100ml
Glucose	traces parfois
Glycérylphosphorylcholine	280 mg/100ml
Inositol	30 mg/100ml
Acide citrique	110-550 mg/100ml
Sorbitol	80 mg/100ml
Acides gras libres	0,001 meq/100ml
Acides gras volatils	0,134 meq/100ml
Protéines totales	6 g/100ml
Catalase	27,5 mg/100ml

### V – Caractères influençant sur le sperme du lapin

La variabilité des caractéristiques du sperme chez les lapins mâles est généralement élevée (**Moce et al., 2005**) ; cependant, les caractères du sperme de certaines souches génétiques sont exposés à des protocoles stricts d'élevage qui ont montré une plus faible variabilité au sein des mâles (**Theau-Clément et al., 2003**) ce qui contribue à donner à ces facteurs une importance capitale en reproduction chez cette espèce animale. Ces facteurs sont :



### **V-1. La photopériode**

On sait déjà que pour **Walter et al., (1968)**, il est possible de provoquer une diminution de la concentration du sperme en spermatozoïdes et une baisse du poids des testicules grâce à une photopériode de 16 heures de lumière pour 8 heures d'obscurité.

C'est ainsi que le volume des éjaculats et leur concentration en spermatozoïdes sont maximum en mars (**Frolich, 1948**) et minimum en juillet (**Brambell, 1944**). Ces variations s'accompagnent d'une réduction de la taille des testicules de mars à juillet, de l'ordre de 60% du poids maximum et d'un accroissement testiculaire dès août. Il s'en suit une "stérilité estivale" associée à une augmentation du pH du sperme, une baisse de la motilité des spermatozoïdes, une diminution de la concentration en spermatozoïdes, une augmentation du pourcentage de spermatozoïdes anormaux et une baisse de la libido (**Hiroe et Tomizuka, 1965**).

### **V-2. Le protocole d'alimentation**

En ce qui concerne la quantité d'aliments qui doit être administrée aux lapins mâles, **Luzi et al., (1996)** ont montré qu'un protocole alimentaire restreint réduit la libido et quelques caractères séminaux. Cependant, le facteur le plus important n'est pas la quantité de nourriture fournie, mais ses caractéristiques chimiques.

Des recommandations spécifiques pour les lapins mâles ne sont pas disponibles et que certaines exigences spécifiques ont été établies (**De Blas et Wiseman, 1998**). Sauf que les régimes avec plus de 15% de protéines brutes sont recommandés pour assurer la production de sperme approprié.

Dans les spermatozoïdes de mammifères, une très grande quantité de lipides sont des AGPI n-3 et n - 6 série (**Apel-Paz et al., 2003**), ces derniers sont associés à la fluidité de la membrane et de sa compétence. Les espèces animales ne sont pas capables de synthétiser des acides gras polyinsaturés essentiels donc leur régime alimentaire doit fournir des quantités adéquates de ces acides gras pour compensé ce déficit.

Des recherches ont montrés que l'ajout de AGPI n - 3 modifie plusieurs caractères des spermatozoïdes du lapin (**Castellini et al., 2003b ; Castellini et al., 2004**). Des modifications pertinentes en ce qui concerne la motilité et les qualités cinétiques des

spermatozoïdes sont probablement attribuables à la hausse de l'élasticité de la membrane des spermatozoïdes chez les mâles recevant ce régime alimentaire (**Castellini et al., 2005**).

Par contre, des niveaux élevés de cholestérol dans le régime alimentaire agissent négativement sur le métabolisme des cellules de Sertoli (**Yamamoto et al., 1999**) et le processus normal de la spermatogenèse (**Mann et Lutwak-Mann, 1981**).

### **V-3. L'Age**

La maturité sexuelle survient à peu près à 5 mois (en fonction de la souche) et la qualité du sperme diminue généralement chez les lapins mâles les plus âgés. Récemment, quelques auteurs ont montré que la structure de la chromatine des spermatozoïdes des lapins entre 5 et 28 mois d'âge a changé de manière significative. Le plus bas pourcentage de spermatozoïdes avec endommagement de chromatine (1.7 à 2.4%) a été observé entre 6 et 16 mois d'âge.

La plus faible stabilité de la chromatine des spermatozoïdes a été trouvée dans les éjaculats pris de lapins mâles de moins de 5 mois et plus de 20 mois d'âge (**Gogol et al., 2002**).

Les spermatozoïdes des animaux âgés ont montré des membranes moins stables qui semblent être plus vulnérable (**Castellini et al., 2003a**).

### **V-4. La température**

Mis à part la concentration du sperme, il est possible d'influencer les différents facteurs qui accompagnent la "stérilité estivale" du lapin mâle par une baisse de la température ambiante. (**Hiroe et Tomizuka, 1965**), Toutefois aucune étude ne mentionne si, indépendamment de l'accroissement de la photopériode en été et l'augmentation de la température ambiante influe directement sur le poids testiculaire. **Chou et al. (1974)** démontrent que des lapins exposés pendant 20 mn par jour à 43°C durant 3 jours successifs ne présentent plus de spermatozoïdes ni de spermatides dans leurs tubes séminifères dès le 30<sup>ème</sup> jour après le traitement thermique et que le retour à la normale ne s'effectue que vers la 10<sup>ème</sup> et la 14<sup>ème</sup> semaine.

### **V-5. L'état de santé**

Il est bien connu que l'inflammation de l'appareil reproducteur masculin (**O'Bryan et al., 2000**) aggrave diverses fonctions testiculaires et caractéristiques séminales en affectant la biosynthèse des eicosanoïdes pro-inflammatoires (prostaglandines et leucotriènes) et des cytokines (**knapp, 1990**).

Une forte concentration de leucocytes au cours de la spermatogenèse ou après l'éjaculation provoquée par une inflammation ou une infection, peut profondément réduire l'intégrité de l'acrosome en augmentant la production des radicaux libres. La santé des mâles doit être contrôlée régulièrement principalement chez les individus âgés.

### **V-6. La fréquence de collecte**

L'effet de la fréquence de collecte sur les caractéristiques du sperme est considérable et doit être consignés dans le détail. Deux éjaculats recueillis une fois par semaine (en une période d'au moins de 15 min) donne la meilleure production de sperme en termes de qualité et de quantité à la fois (**Bencheikh, 1995 ; Moce et al., 2000**). A l'inverse, si la fréquence de collecte prend plus de temps (tous les 14 jours) elle exerce un effet dépressif sur la production du sperme, probablement à cause de la diminution des stimuli sexuels suivis d'une réduction des androgènes. La fréquence de collecte affecte non seulement la production des spermatozoïdes, mais aussi la concentration des granules séminales (**Castellini et al., 2006 b**).

### **V-7. Le comportement**

Il existe des corrélations entre le comportement sexuel et le volume de l'éjaculat ainsi que la concentration en spermatozoïdes.

Les mâles les plus agressifs ont un plus grand volume d'éjaculat, un taux de spermatozoïdes vivants plus élevé mais une concentration en spermatozoïdes moindre (**Hafez, 1960 ; Degerman et Kihlstrom, 1961**).

### **VI- La Collecte du sperme**

#### **VI-1. Le vagin artificiel (VA)**

C'est un appareil simple et pratique. Il comporte deux parties : un cylindre en caoutchouc dur et épais (isolation thermique) ou en plastique muni d'une ouverture fermée par un bouchon (**Hansen, 2011-2012**). Sa longueur est d'environ 3 à 5cm et son diamètre externe compris entre 2 et 7cm. Une chemise intérieure en latex ou en caoutchouc est introduite dans le cylindre et ses extrémités rabattues et maintenues par un élastique (**Bredderman et al., 1994**).

Le type de vagin artificiel influence l'adaptation du mâle à la collecte. Un vagin avec un orifice plus large facilite l'adaptation. Pour chaque collecte un vagin artificiel différent devrait être utilisé, il y a généralement beaucoup de contamination bactérienne à partir de l'environnement et il est important de rassembler l'échantillon de sperme dans des conditions hygiéniques (**Mercier et Rideaud, 1990**).

#### **VI-2. Technique de récolte**

Le sperme du lapin est collecté à l'aide d'un vagin artificiel rempli de liquide chaud (environ 45°C). Une femelle est équipée de ce dispositif et présentée au mâle. Quelques auteurs ont rapporté que la stimulation précédente du mâle augmente la concentration du sperme, on laissant une femelle sur le camp du mâle pendant quelques minutes. (**Boiti et al., 2005**).

La collecte de sperme ne doit pas stresser l'animal. Il faut veiller à ne pas le bousculer et faire en sorte à ce qu'il s'adapte au collecteur. L'utilisation d'une femelle réceptive favorise l'excitation du mâle, et il faut toujours ramener la femelle dans la cage du mâle (**Boussit, 1989**).

Il est possible de substituer un mannequin ou une peau de lapine tannée à la femelle boute-en-train. L'opérateur recouvre l'avant-bras qui collecte, d'un leurre sur lequel le mâle saute. La personne qui collecte guide le VA vers le pénis du lapin. (**Boussit, 1989**).

### **VII- Méthodes d'évaluation du sperme**

Les caractéristiques de la qualité du sperme représentent le potentiel propre du mâle ; il reflète l'activité fonctionnelle du testicule. Toutes les méthodes bien connues qui sont employées pour la confirmation de la qualité du sperme évaluent les processus essentiels des spermatozoïdes, des caractéristiques morphologiques et de la composition chimique. Les résultats de cette information fixent la supposition de la qualité et la fertilité du sperme. (El-Sherbiny, 1987).

L'évaluation du sperme doit fournir des informations sur les possibilités de fertilisation des spermatozoïdes. Les paramètres les plus importants concernant la fertilité sont le nombre de spermatozoïdes inséminés et leur motilité (Castellini et Lattaioli, 1999 ; Brun et al., 2002).

En règle générale, les conditions devraient être soigneusement commandées pour éviter la contamination de l'échantillon (la température, produit chimique) pendant la manipulation du sperme.

#### **VII-1. Évaluation macroscopique**

##### **VII-1.1. La couleur**

Un échantillon normal de sperme a un aspect opalescent blanc homogène. La présence des globules rouges (rougeâtres) ou de l'urine (jaune) est facilement détectée. Les échantillons anormaux de sperme sont généralement jetés (Boiti et al., 2005). De façon générale, le sperme est inodore (Fontbonne, 1995), sauf en cas de contamination par du pus, des bactéries ou plus simplement de l'urine.

##### **VII-1.2. Le volume**

Le volume de l'éjaculat est mesuré, après élimination du gel au moyen d'une pipette en verre, par une lecture directe sur le tube gradué (Bencheikh, 1995). Le volume du sperme de lapin varie entre les valeurs extrêmes de 0.25 à 1 ml avec une moyenne de 0.6 ml par éjaculat (Francisco et Luis, 2003).

### **VII.1.3. Le pH**

Le pH devrait être mesuré juste après la collecte par un pH-mètre puisqu'il est modifié par le métabolisme (**Boiti et al., 2005**).

### **VII-2. Evaluation microscopique**

L'analyse microscopique permet une évaluation de la concentration, de la motilité, des éventuelles anomalies de morphologie et de la présence des éléments autres que des spermatozoïdes (d'autres cellules, gouttelettes, ou particules). Le sperme de lapin présente une série de quantités de particules, qui interfère le compte de cellules en employant un spectrophotomètre (**Boiti et al., 2005**).

#### **VII-2.1. La mobilité**

Cet examen est réalisé sur une plaque chauffante (température fixée à 37°C). On note une corrélation importante entre la mobilité et la fertilité, d'où l'intérêt de l'évaluation de ce critère. On considère que si plus de 70% des spermatozoïdes sont fléchant (c.à.d. ont une mobilité normale), alors on pourra considérer la semence comme étant de bonne qualité. En revanche, si l'on compte moins de 50% des spermatozoïdes fléchant, on pourra craindre une baisse de fertilité. Lorsque la mobilité est réduite, on parle alors d'asthénozoospermie, et il conviendra de mesurer le pH spermatique. En effet lorsque le pH du sperme augmente (par exemple lors d'inflammation de type cystite, urétrite ou encore prostatite), la mobilité sera réduite (**Fontbonne et Dumont, 1992 ; Fontbonne, 1995**).

##### **a) motilité massale**

D'après, **Boussit (1989)** La motilité massale est appréciée en plaçant une goutte de semence pure entre lame et lamelle observée au grossissement (X10) avec un microscope à contraste de phase. Une note est attribuée au mouvement de la masse des spermatozoïdes observés selon l'échelle de **Petitjean (1965)** (voir annexe N°1).

### b) motilité individuelle

L'évaluation de la motilité individuelle vise à évaluer le pourcentage des spermatozoïdes mobiles. Elle se fait après une dilution (10 à 40 fois) du sperme dans un sérum physiologique (**Hanzen, 2011-2012**). La motilité sera déterminée au moyen d'un microscope optique au grossissement 400 en plaçant une goutte de sperme dilué entre lame et lamelle (**Cabannes, 2008**). Une note de 0 à 4 est attribuée d'après l'échelle d'**Andrieu (1974)** (voir annexe N°2).

Un taux élevé de dilution (plus de 1/100) a un effet néfaste sur la motilité et cause la dilution excessive du plasma séminal, qui joue un rôle important et réduit les caractéristiques cinétiques des spermatozoïdes (**Minelli et al., 2001**).

### VII-2.2. La concentration

Le comptage se fait habituellement à l'aide de la cellule de Thoma, après une première dilution de la semence. L'ajout d'une goutte du sperme dans un liquide hypertonique va stopper leurs mouvements, ce qui permettra ensuite un comptage au microscope optique (**Johnston et al., 2001**). Il existe deux affections de la numération: l'oligozoospermie (nombre insuffisant de spermatozoïdes) ou parfois l'azoospermie (absence totale de spermatozoïdes).

Le nombre de spermatozoïdes totaux par éjaculat est calculé en multipliant le volume du sperme par sa concentration, et que la semence du lapin est caractérisée par une faible concentration spermatique, évaluée de 150 à 500 x 10<sup>6</sup> spz/ml (**Joly et al., 2000; Jordi et al., 2005**).

### VII-2.3. La viabilité

La viabilité du sperme peut être évaluée par la réalisation d'un frottis après coloration à l'éosine-nigrosine qui permet de différencier entre les cellules mortes et les cellules vivantes (**Zambelli et Cunto, 2006; Zambelli et al., 2008**); et de calculer le pourcentage de spermatozoïdes morts (% SM).

Le frottis se réalise en mélangeant une goutte de semence avec une goutte du colorant. Le mélange est par la suite étalé délicatement le long de la lame, puis laissé quelques secondes sur la plaque chauffante à 37°C pour l'observer, sous microscope à l'agrandissement 400.

Les spermatozoïdes morts laissent diffuser le colorant à travers leur membrane endommagée, alors que les spermatozoïdes vivants, avec leurs membranes fonctionnelles, ne laissent pas diffuser le colorant et restent par conséquent incolores. Un comptage au hasard de 150 spermatozoïdes s'effectue le long du frottis pour distinguer les spermatozoïdes morts des vivants (Boussit, 1989).

### VII-2.4. La morphologie

La tête, le col, la pièce intermédiaire et le flagelle (ou queue) sont les quatre parties d'un spermatozoïde. La conformation et la fonctionnalité étant intimement liées, le nombre de spermatozoïdes anormaux sera un indicateur de la qualité de la semence. L'observation au microscope optique permet de distinguer des anomalies distinctes sur chacune des parties constitutives du spermatozoïde, que l'on qualifiera de majeures ou mineures en fonction de leur impact sur la fertilité (Feldman et Nelson, 1987 ; Johnston *et al.*, 2001).

Les anomalies de morphologie sont recherchées sur un frottis réalisé à partir d'une goutte de semence coloré à l'éosine-nigrosine et observé au grossissement 100. Cette coloration permet de distinguer différentes anomalies morphologiques ( Cabannes, 2008).

La forme du spermatozoïde du lapin est semblable à celle d'autres mammifères (figure N°5). Les dimensions de la tête ovoïde sont environ de  $7 \times 4 \times 0.5 \mu\text{m}$ . La longueur de la queue est de  $45 \mu\text{m}$ . Le chapeau acrosomal est situé sur le dessus de la tête pour trois quarts de son ampleur et présente une augmentation le long de son bord (Boiti *et al.* , 2005).

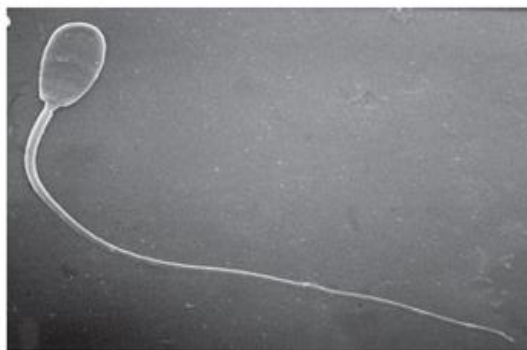


Figure N°5:vue d'un spermatozoïde complet de lapin (Boiti *et al.* , 2005)



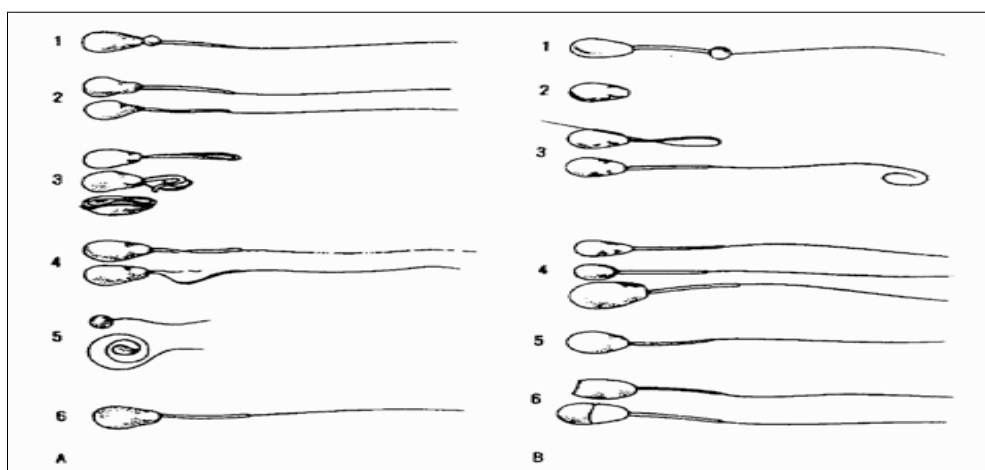
Les principales anomalies morphologiques des spermatozoïdes, d'après (Ott et al., 1987) (figure N°6) ;

**A** : Anomalies majeurs :

1. Gouttelettes cytoplasmiques proximales.
2. Têtes piriformes.
3. Queues boullées ou enroulées en chignon, queues enroulées autour de la tête.
4. Déformations de la pièce intermédiaire.
5. Mauvais développement.
6. Cratères.

**B** : Anomalies mineures :

1. Gouttelettes cytoplasmiques distales.
2. Têtes normales sans queue.
3. Queues repliées ou enroulées à l'extrémité.
4. Têtes étroites, petites ou géantes.
5. Implantation abaxiale.
6. Acrosomes anormaux (plissés ou détachés).



**Figure N°6** : Les Principales anomalies morphologiques des spermatozoïdes, d'après (Ott et al., 1987).

### VII-3. Évaluation du sperme avec le C.A.S.A

Juste après la collecte, la motilité du sperme peut être évaluée visuellement par l'opérateur, mais une telle évaluation est subjective. L'analyse assistée par ordinateur de sperme (C.A.S.A.) a été développée pour une évaluation objective du modèle de motilité (Boiti, 2005). ; Ce qui a conduit, ces dernières années, à l'augmentation de l'utilisation de ces systèmes d'évaluation de la qualité du sperme chez le lapin (Farell et al., 1993 ; Brun et al., 2002 ; Lavara et al., 2005).

Ces systèmes incluent un microscope de contraste de phase, équipé d'une plaque chauffante, reliée à une caméra vidéo à haute résolution et à un ordinateur. (Boiti et al., 2005).

Les paramètres cinétiques suivants sont généralement évalués :

Le pourcentage de spermatozoïdes motiles = (Le nombre des spermatozoïdes motiles/Le nombre des spermatozoïdes total)  $\times$ 100.

-VCL (curvilinear velocity) : c'est la distance totale parcourue par le spermatozoïde par un temps donné. Ou vitesse curviligne ( $\mu\text{m/s}$ ).

-VSL (Straight- Line Velocity) : c'est la distance entre le point de départ et celui d'arrivée du spermatozoïde indépendamment de son trajet, en ligne droite.

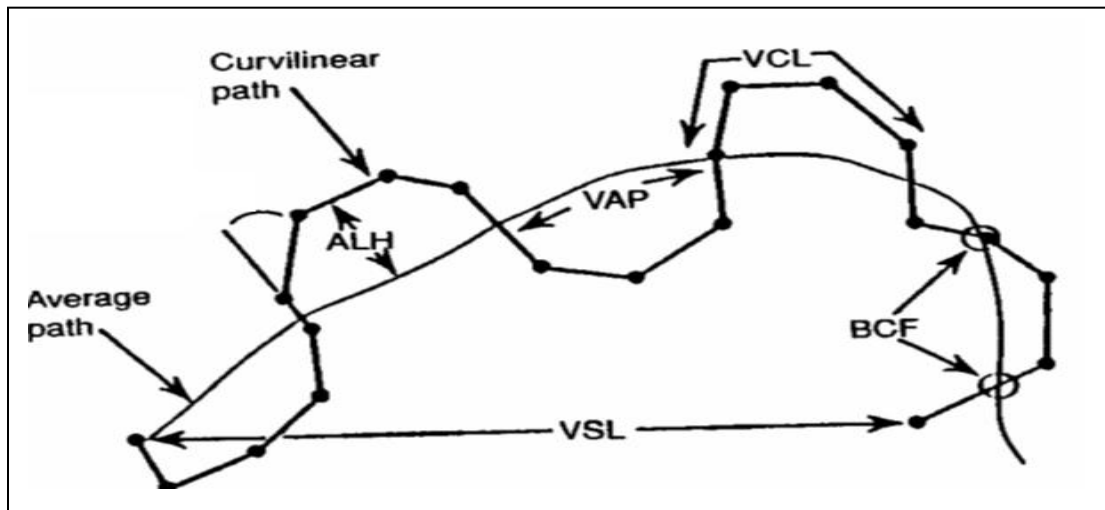
-VAP = (velocity average pathway) : c'est l'équivalent de la VCL après lissage de son trajet.

-LIN = les linéarités du chemin curviligne (VSL/VCL),

-ALH (amplitude of lateral head displacement) : c'est la distance balayée par la tête du spermatozoïde durant son déplacement.

-BCF (beat cross frequency) : c'est la fréquence par laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne, elle est mesurée en Hertz.

Pour un meilleur arrangement certains d'entre eux sont représentés sur la (figure N°7).



**Figure N°7 :** Graphique de la motilité des spermatozoïdes. (Boiti *et al.*, 2005).

Une installation spécifique doit être définie pour le sperme du lapin. Les procédures opérationnelles les plus importantes sont : le nombre de champs analysés, la température de l'échantillon pendant l'analyse et la concentration de l'échantillon.

Une concentration élevée des cellules par ml et la présence des particules de diverses tailles, comme en sperme de lapin, polariserait les évaluations du C.A.S.A. Quand des particules sont incorrectement analysées le C.A.S.A peut les considérer en tant que spermatozoïdes morts, la concentration des spermatozoïdes est surestimée et le pourcentage de la motilité est sous-estimé. Une installation précise du système de C.A.S.A examine les particules sur la base de la taille, la forme et l'éclat (Theau-Clément *et al.*, 1996).

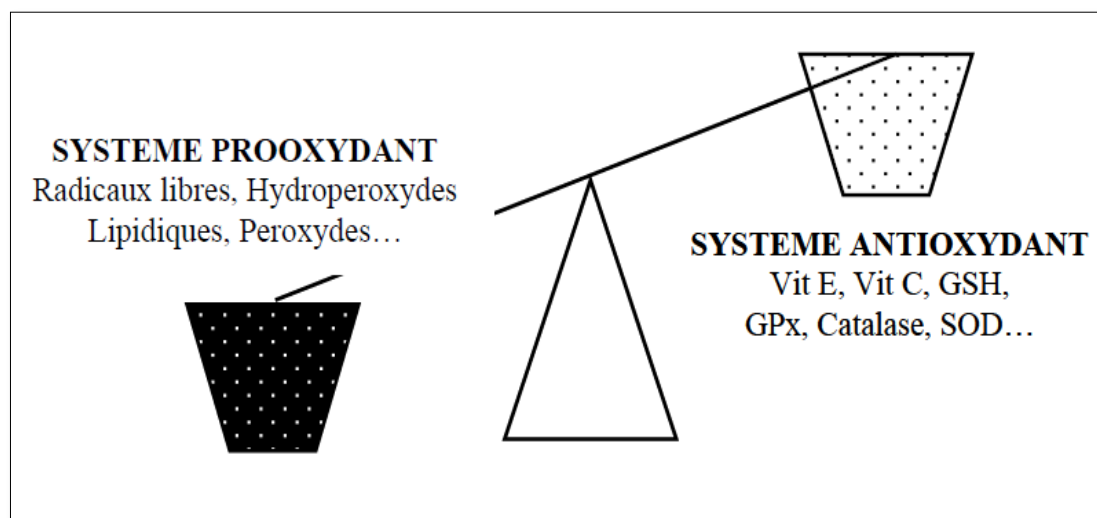
**Tableau II** : Les valeurs du sperme frais de lapin analysé avec le C.A.S.A d'après (Theau-Clément *et al.*, 1996; Castellini *et al.*, 2000).

<b>Semence</b>	<b>Valeur standard</b>
<b>Spermatozoïdes / ml (nx106)</b>	<b>250-600</b>
<b>Motilité progressive</b>	<b>30-90%</b>
<b>Volume (ml)</b>	<b>0,3-0,9</b>
<b>pH</b>	<b>7,1</b>
<b>VCL</b>	<b>80-100</b>
<b>VSL</b>	<b>30-50</b>
<b>VAP</b>	<b>50-70</b>
<b>LIN</b>	<b>35-80</b>
<b>STR</b>	<b>40-80</b>
<b>ALH</b>	<b>2.0-6.0</b>

*Chapitre II*  
*Stress oxydatif*

## I- Le stress oxydant

Apparaît dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces prooxydantes et antioxydantes est rompu en faveur de l'état prooxydant (**Gutteridge, 1995 ; Halliwell, 1996**) (**figure N°8**). La perturbation de cet équilibre endogène entre radicaux libres et antioxydants de courte ou longue durée, provoque des effets délétères dus, soit à une défense antioxydante défailante, soit à un état pro-oxydatif accru, nommé stress oxydant (**Biesalski et al., 1997**).



**Figure N°8:** Déséquilibre du statut pro/antioxydant en faveur d'un stress (**Januel, 2003**).

Le stress oxydant est aujourd'hui décrit comme une des causes majeures de l'infertilité masculine. Il induit des altérations membranaires et nucléaires, entraînant une perte de mobilité et du pouvoir fécondant des SPZ (**Pons et al., 2009**). Car un déséquilibre entre la peroxydation des lipides et des antioxydants, est la principale cause d'un fonctionnement anormal des spermatozoïdes (**Partyka et al., 2012**).

Malgré que les spermatozoïdes du lapin contiennent des superoxydes dismutase (SOD) (**Holland et al., 1982**), et des antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques au niveau du plasma séminal (**Chaborry, 2009**), le sperme du lapin aura toujours une capacité réduite à lutter contre le stress oxydatif.

## **II- Les radicaux libres (RL)**

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, partie de molécule ou simple atome qui contient un ou plusieurs électrons non apparié(s), comme conséquence de la perte d'un ou plusieurs électrons de l'orbite externe, aboutissant à la formation d'une demi-liaison qu'il faut satisfaire par un pillage local d'électron(s). (**Halliwell et Gutteridge, 1999**). Cela lui confère une grande réactivité, et donc une demi-vie très courte.

En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbite en captant un électron pour devenir plus stable (**Halliwell, 1996**).

La réactivité chimique des radicaux libres de l'oxygène est variable selon la molécule considérée, mais ce sont pour la plupart de puissants oxydants. Les principaux radicaux libres sont les radicaux superoxydes et hydroxyles, mais d'autres dérivés de l'oxygène jouent également un rôle important dans le stress oxydant. C'est pourquoi le terme d'espèces réactives de l'oxygène est préférable à celui de radicaux libres (**Puppo et Halliwell, 1988**).

Les radicaux libres sont issus du métabolisme physiologique mais ils peuvent aussi être, produits lors de "déviation" du métabolisme cellulaire (**Fulbert et Cals, 1992**). La production des radicaux libres est aussi la rupture homolytique d'une liaison covalente en deux entités possédant chacune un électron (**Bouguirne, 2012**).

Parmi ses radicaux libres, on cite les plus importants :

### **II-1. Le radical superoxyde : $O_2^-$**

Le radical superoxyde est produit à partir de l'oxygène moléculaire, principalement par les cellules phagocytaires, et il participe à l'inactivation des virus et bactéries (**Nohl, 1994**). Ces cellules sont sources d'une importante quantité de radicaux libres dans le milieu environnant et susceptibles d'entraîner des lésions tissulaires sévères. L'activation de la xanthine oxydase par l'ischémie va provoquer une formation importante de radicaux superoxydes en présence d'oxygène lors de la reperfusion (**Mc Cord, 1993**).

## **II-2. Le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Il est produit en grande partie à partir du radical superoxyde en présence de superoxyde dismutase qui catalyse la réaction. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est un produit plus stable que les radicaux superoxydes, c'est pourquoi il diffuse très facilement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. C'est un oxydant très puissant capable d'accepter deux électrons supplémentaires. Il est potentiellement toxique pour la cellule et il est utilisé par la myéloperoxydase pour produire de l'hypochlorite qui permet de tuer les micro-organismes pathogènes (**Halliwell, 1996**).

## **II-3. Le radical hydroxyle : OH<sup>°</sup>**

Il peut être produit à partir de l'eau par les radiations ionisantes dans tous les organismes vivants mais il est surtout formé par la réaction de Fenton (**Mc Cord, 1993**) à partir d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'ion ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Le radical hydroxyle formé est très oxydant. Il peut initier une peroxydation lipidique qui pourra continuer en chaîne. C'est le radical le plus dangereux pour l'organisme (**Gutteridge, 1995**).



### III- Les origine des radicaux libres (RL)

Un grand nombre de mécanismes soit endogènes, soit exogènes intervient dans la production des radicaux libres (Awatif, 2009). (Figure N° 9).

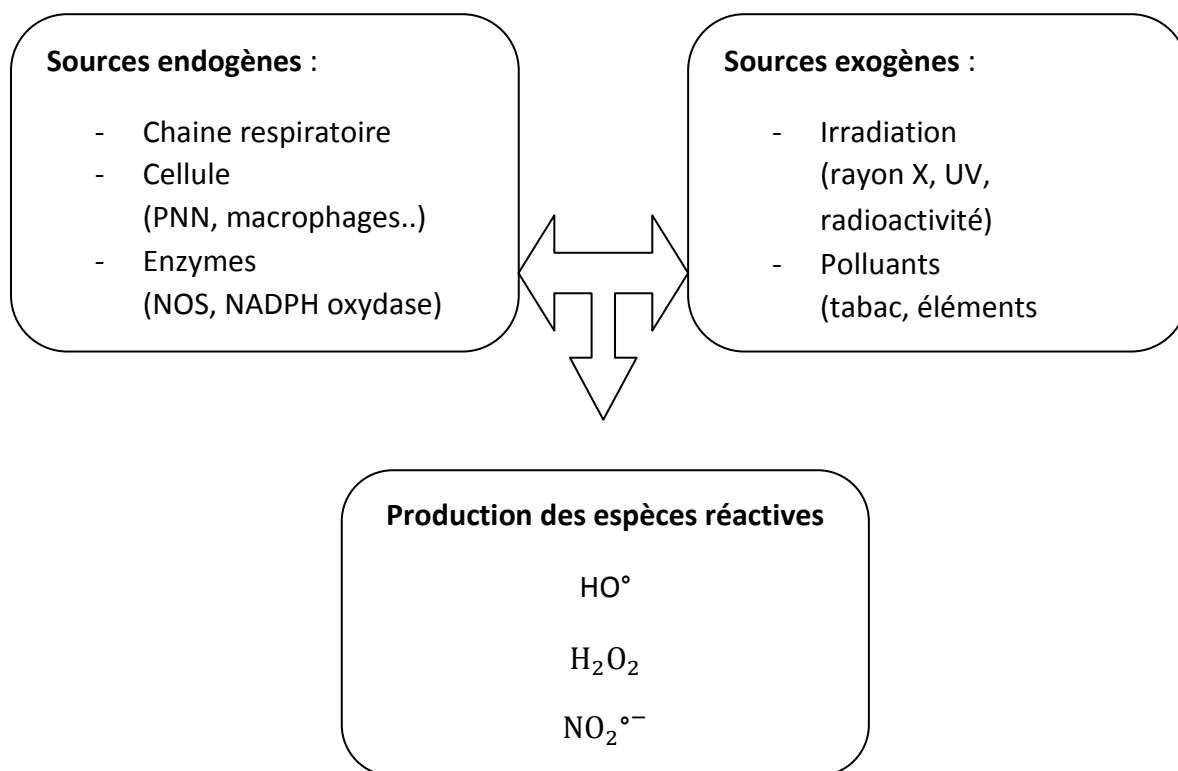
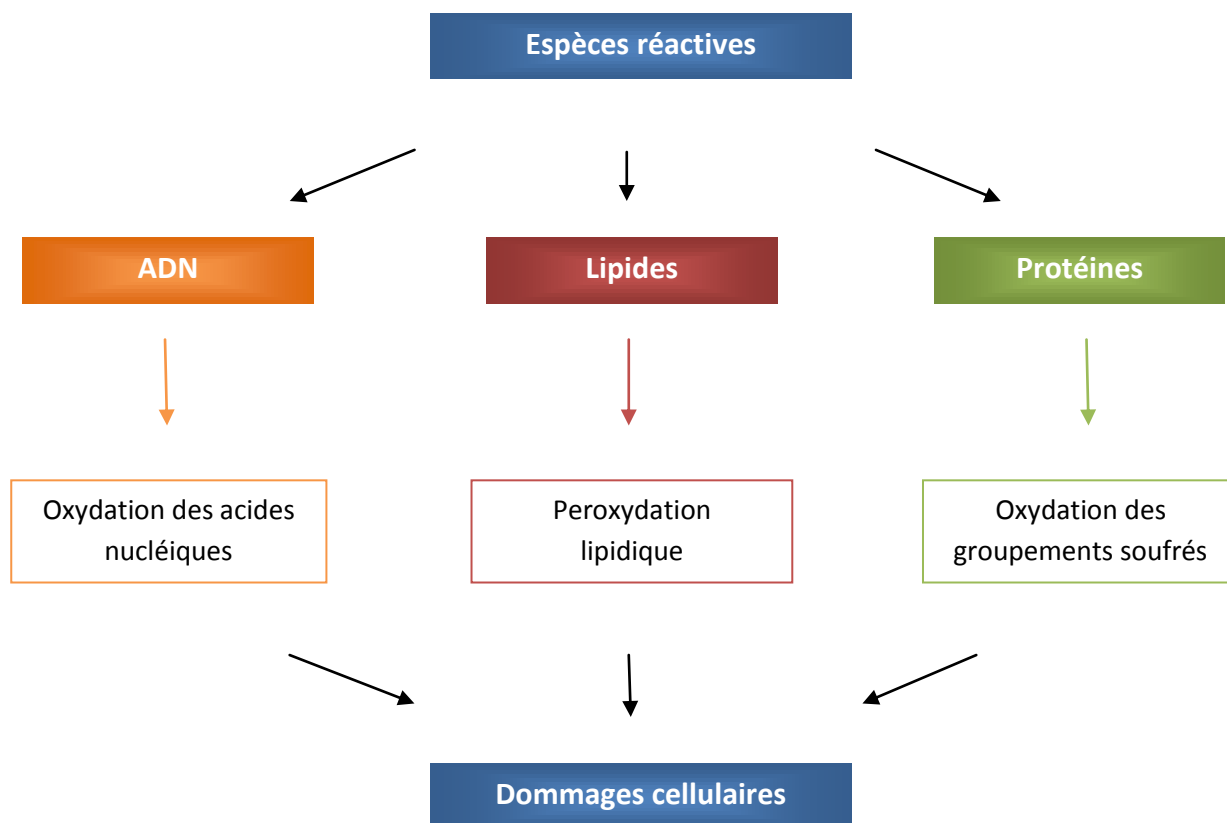


Figure N° 9: Les origines des espèces réactives (Poisson, 2013).

#### IV- Les différentes cibles des espèces réactives (ER)

Les ER se divisent en deux familles : les espèces réactives de l'oxygène (EROs) et les espèces réactives de l'azote (ERNs). Et tous les deux ont les mêmes cibles (**figure N°10**).



**Figure N°10:** Les différentes cibles des Espèces Réactives (Poisson, 2013)

Même s'ils endommagent la cellule, les espèces réactives jouent un rôle important dans le fonctionnement spermatique (Chabory, 2009).

## **V- Les antioxydants**

Notre organisme est équipé de tout un système complexe de défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques, localisé dans les compartiments intra- et extracellulaire (**Halliwell et Gutteridge, 1990**). Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (**Diplock, 1991**).

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les antioxydants cellulaires sont non-enzymatiques (**Mate, 1999 ; Comhair, 2002 ; Droge, 2002**).

Parmi les enzymes antioxydantes, la famille des glutathion peroxydases (GSHPx) est ubiquitaire : il s'agit d'un groupe de sélénoenzymes que l'on considère comme les plus importantes défenses intra- et extracellulaires contre l'oxydation.

Les antioxydants agissent de plusieurs manières. Leur mécanisme d'action peut être direct ou indirect, en tant que partie de la structure d'enzymes et/ou cofacteurs d'enzymes antioxydantes. Les mécanismes les plus fréquents sont l'interruption de la spirale oxydative (vitamines C et E, NADPH, glutathion), la prévention des dégâts par la mise à disposition d'électrons (céruloplasmine, vitamine C, superoxyde dismutase, GSHPx), et la réparation des molécules d'ADN (Zn, acide folique, niacine).

Les antioxydants sont interdépendants. En donnant un électron, ils deviennent eux-mêmes des radicaux libres qui doivent se rééquilibrer (**Goudable et Favier, 1997**).

### **V-1. Les systèmes antioxydants enzymatiques**

Pour protéger ses tissus contre toute agression radicalaire, l'organisme possède des systèmes enzymatiques, tels que les superoxydes dismutases et la catalase qui jouent un rôle de protection, ainsi que les glutathion-peroxydases (GSH-Px) qui jouent un rôle de détoxification (**Avissar et al., 1989**).

### V-1.1. Les superoxydes dismutases (SOD)

Les SOD éliminent les radicaux superoxydes par dismutation du radical en  $H_2O_2$  et en  $OH^+$  et  $OH^-$  (Mc Cord et Fridovic, 1988). Elles permettent d'éliminer les radicaux superoxydes mais provoquent l'apparition de peroxyde d'hydrogène diffusible et dangereux à distance (Nelson et Mc Cord, 1994). La synthèse des SOD subit un rétrocontrôle négatif par les fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène.

### V-1.2. Les catalases

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en libérant de l'oxygène et de l'eau. Elles sont localisées surtout dans les peroxysomes. Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (Sehpar et Shaffer, 1993).

### V-1.3. Les glutathion peroxydases (GSHPX)

Plus efficaces que les catalases, les GSHPX réduisent le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et les hydroperoxydes lipidiques. Pour leur fonctionnement, elles utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG) (Vitoux et al., 1996). Il est important de noter que la lutte contre les radicaux libres passe par un effet complémentaire des SOD et des GSHPX.

Les SOD seules ont un effet ambigu générant du peroxyde d'hydrogène qui est très cytotoxique surtout en présence de traces de fer. Il faut donc la présence concomitante des SOD et des GSHPX pour obtenir un effet protecteur optimum contre les radicaux libres (Michiels et al., 1991 ; Escobar, 1996).

L'activité GSHPX tend à augmenter, l'activité SOD augmente puis diminue (Goudable et Favier, 1997).

### V-2. Les systèmes antioxydants non-enzymatiques

Les antioxydants non-enzymatiques réagissent directement avec les agents oxydants et les désactivent.

Toute substance capable de capter l'électron célibataire d'un radical libre sans donner elle-même un produit radicalaire est définie comme un piègeur de radicaux libres. Ces piègeurs se caractérisent par leur affinité élevée pour les radicaux libres et leur spécificité pour certains d'entre eux.

Il existe des "piégeurs occasionnels" de radicaux libres. Ce sont des molécules endogènes qui captent les électrons célibataires au dépend de leur propre intégrité, comme par exemple les acides gras insaturés, les fonctions thiols de protéines, l'ADN et les acides aminés phénoliques.

Les autres principaux piègeurs sont les chélateurs du fer et du cuivre et les antioxydants comme les caroténoïdes, l' $\alpha$ -tocophérol, la vitamine C et les flavonoïdes (**Milane, 2004**).

#### V-2.1. La vitamine E

Le terme « vitamine E » comprend deux classes : les tocophérols et les tocotriénols. Le composé principal est l' $\alpha$ -tocophérol (**Gulcin, 2012**), elle est la principale composante du système antioxydant des spermatozoïdes (**Badade et al., 2011**). Cet antioxydant liposoluble très efficace (**Nyus et al., 1991**) est fixée aux membranes et stoppe la chaîne de réaction de peroxydation des lipides en capturant un radical lipide peroxyde ( $\text{LOO}^\cdot$ ) qui devient un radical moins réactif que le  $\text{LOO}^\cdot$  et qui pourrait être pris en charge par une autre molécule antioxydante. Cependant, à forte concentration, la vitamine E oxydée peut faire office de molécule pro-oxydante (**Cillard et al., 1980**). Un déficit en vitamine E peut être à l'origine de déficiences neurologiques telles que les myopathies (**Brigelius-Flohe et al., 1999**).

Sa structure lui permet de capter les radicaux libres :

- dans les zones lipophiles des membranes cellulaires, grâce à sa chaîne phytyle,
- dans les zones hydrophiles, à la surface des membranes plasmiques, grâce à son hydroxyle phénolique.

L' $\alpha$ -tocophérol réagit avec les radicaux oxygénés lipidiques en empêchant leur propagation (**Liebler et al., 1986**).

### V-2.2. La vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est hydrosoluble et considérée comme étant l'antioxydant naturel le plus puissant. Présente sous sa forme ascorbate, elle piège les radicaux peroxydes en phase aqueuse avant qu'ils initient la réaction de peroxydation lipidique protégeant ainsi les membranes et les lipoprotéines (**Gulcin, 2012**).

La vitamine C forme donc un couple redox avec une forme intermédiaire radicalaire capable de capter l'oxygène singulier et certaines espèces radicalaires. Mais, à forte concentration, comme la vitamine E, la vitamine C peut se comporter comme un pro-oxydant générateur de radicaux libres (**Milan, 2004**).

A ces deux vitamines nous pouvons ajouter de nombreux autres antioxydants non-enzymatiques (ex :  $\beta$ -carotène, urate, glucose, bilirubine, taurine, albumine ...) (**Servais, 2004**).

### V-2.3. Le glutathion

Il fait l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydante tels que la vitamine C ou la vitamine E (**Gérard-Monnier et Chaudière, 1996**).

Le glutathion joue un rôle majeur dans la protection, des lipides, des protéines et des acides nucléiques, contre l'oxydation. En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de coenzyme des (GSHPX) (**Stamler et Slivka, 1996**).

## VI- Mesure du stress oxydatif

La mesure du stress oxydatif est difficile, car les radicaux libres ont une demi-vie très courte et leur concentration dans l'organisme est très faible (**Favier, 1994**).

Alors pour la détermination et la mesure du stress oxydatif, les chercheurs utilisent deux méthodes :

**-Chémiluminescence** : La lumière produite par la décomposition des radicaux peut être mesurée directement mais elle est très faible. L'application la plus commune de la luminescence est la mesure des radicaux produits in vitro par des cellules isolées du sang (Trush et al., 1978).

**-Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)** : La RPE détecte un radical libre par le champ magnétique induit par l'électron non apparié, caractéristique de chaque espèce. La durée de vie des radicaux libres n'est malheureusement pas compatible avec l'utilisation d'une telle technique. On peut toutefois détecter des radicaux secondaires, type ascorbyl en stabilisant les radicaux dans le prélèvement sanguin. Cette technique n'est utilisée qu'en recherches fondamentales (Pietri et al., 1994).

## VII- Le polyéthylène glycol (PEG)

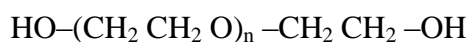
### VII-1. Définition

Les polyéthylènes glycol (PEG) sont des composés à base de pétrole largement utilisés dans les produits de beauté comme épaississants, solvants, adoucissants, et excipients d'humidité. Ces polymères hydrosolubles sont synthétisés à partir de l'oxyde d'éthylène (époxyde) et leurs applications dépendent de la longueur de leur chaîne (Betajeri, 2011).

Le PEG a une forte solubilité dans l'eau à des températures modérées quelque soit son poids moléculaire. Cela résulte d'un effet de structure des molécules d'eau le long de la molécule de PEG (Eugene, 2004).

### VII-2. La structure du PEG

Dans sa forme la plus courante de poly éthylène glycol, le PEG, est un polyéther, linéaire ou ramifié terminé par des groupes hydroxyle et ayant la structure générale représentée dans la figure N°11, C'est un enchainement d'unité structurelle répétitive de monomère d'éthylène glycol (Veronese et al., 1985) :



**Figure N°11:** structure chimique du PEG (**Roberts et al., 2002**).

### VII-3. Usage de la PEG

Le Polyéthylène glycol (PEG) possède plusieurs propriétés chimiques qui le rendent particulièrement utile dans divers paramètres, chimiques, pharmaceutiques et biologiques.

La propriété la plus importante de toutes les PEG est leur solubilité dans l'eau, ce qui les rend parfaitement adaptés pour une utilisation dans de nombreuses applications (**Hoechst ,1992b ;leininger et al.,2002**)

#### VII-3.1. Domaine médicale

Les PEG appelés également macrogol dans le domaine médical (**Akio, et al., 2007**), sont utilisés comme laxatifs osmotiques en cas de constipation. Il s'agit principalement de macrogol 3350 et de macrogol 4000 (**Dupont et al.,2006** ). Il est également utilisé dans la fabrication des gels hydroalcooliques.

La forme hélicoïdale de la chaîne du PEG augmente les liaisons hydrogènes et minimise les groupes hydrophobes. Les molécules d'eau forment ainsi 2 à 10 couches structurées autour de la molécule de PEG, celle-ci est ainsi responsable d'une diminution de l'immunogénicité du greffon par un phénomène d'immunocamouflage.

En effet, le PEG absorbé à la membrane des cellules est entouré de couches structurées d'eau qui masquent les sites antigéniques des cellules (**Eugene, 2004 et Perrin, 2009**). Cela grâce à la longueur de la chaîne hydrocarbonée  $\text{OH} (\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n \text{H}$  du PEG qui détermine l'encombrement spatial de la molécule, responsable de son rôle protecteur et immunomasquant (**Bradley et al., 2002**).

#### VII-3.2. Domaine industriel

Le PEG est utilisé dans de nombreux secteurs industriels. Ils servent généralement de base pour les crèmes de beauté jouant le rôle d'épaississant ou de gélifiant pour les crèmes hydratantes, savons liquides et shampoings...) (**Carpenter et al., 1971**).Et aussi comme



additif alimentaire, ou bien comme solvant dans les encres pour imprimantes ou pour fabriquer des billes de paint-ball(**Hoechst, 1992a**).

### VII-3.3. Domaine biologique

Le PEG est un très bon PTC (catalyseur de transfère de phase) utilisé en chimie de synthèse. Les PTC sont utilisés pour transporter un réactif aqueux dans la phase organique dans un état activé. La réaction peut avoir lieu entre un réactif aqueux et un réactif organique. (**totten et al., 1988 ; totten et al.,1998**).

Le PEG est soluble dans l'eau, le toluène, le dichlorométhane, l'alcool et l'acétone mais n'est pas soluble dans les hydrocarbures aliphatiques comme l'hexane, le cyclohexane ou le diéthyléther (**Akio et al., 2007 ; Hoechst,1992b**).

Le PEG fait baisser la polarité de la solution pour permettre une meilleure solubilité des produits organiques il peut être considéré comme un cosolvant de l'eau. La faible solubilité des réactifs organiques et de leurs intermédiaires dans l'eau est le principal obstacle au développement de la chimie en milieu aqueux.

Le PEG 400 permet une haute solubilité des sels et peut donc être utilisé pour des réactions d'oxydation et de substitution. (**Pancera et al., 2002**).

En biologie moléculaire ou en microbiologie, on l'utilise pour la transformation (insertion d'ADN plasmidique) de nombreux types de cellules, entre autres les levures et les protoplastes de plantes.

Le PEG est un polymère qui va déstabiliser (de façon réversible) les membranes plasmiques, il stabilise l'ADN à la surface des levures (adsorption) permettant donc le transfert de l'ADN au travers de la membrane, ainsi il augmente la perméabilité des cellules et donc favorise le processus de transformation. Son rôle est lié à sa capacité à interagir avec les membranes (**Daniel et al., 2011**).

#### VII-4. Les effets négatifs de la PEG

On observe que les PEG montrent des signes de génotoxicité (Wangenheim et al., 1988) et de nombreux composés à base de PEG sont nuisibles s'ils sont appliqués sur une peau abîmée, et peuvent causer irritation et toxicité générale sur la peau (Lanigan, 2001) et fonctionnent comme multiplicateur de pénétration, augmentant ainsi la perméabilité de la peau et permettant une plus grande absorption du produit, y compris des ingrédients potentiellement nocifs (Epstein, Samuel, 2009).

Selon les processus de fabrication, les PEG peuvent contenir du 1,4-dioxane en quantités mesurables (Black et al., 2001) qui est un agent cancérigène potentiel (IARC., 1999) et persistant.

Le PEG n'est pas biodégradable mais bio éliminable par filtration rénale. Le PEG est un produit dont les effets de toxicités sont connus. La pression de vapeur est très faible et diminue lorsque la masse moléculaire augmente. Le PEG n'est pas inflammable, ni volatil (Reimann, 1974).

#### VII-5. Les propriétés de quelques PEG

Tableau III : les propriétés de quelques PEG (INCI., 2006)

PM	La description à 20°C	La viscosité à 20°C	La viscosité à 98.8°C	Le pH	La densité à 20°C (g/cm)	La solubilité dans l'eau à 20°C (%m/m)
300	hydroscopique	-88-96	5,4-6,4	5-7	1,125	∞
600	Liquide et cireux	17-18	9,9-11,3	5-7	1,126	∞
1500	Cireux blanc	36-42	16-19	5-7	Masse solidifié 1.20	62
6000	Poudre	210-262	110-158	5-7	Masse solidifié 1.20	54
35000	Pale, dur, flacon cireux	110-14000	/	5-7	Masse solidifié 1.20	50

*Chapitre III*  
*La réfrigération*

Le sperme du lapin présente quelques particularités qui devraient être tenues en compte pour étudier son protocole de conservation (**Holt, 2000**). La membrane plasmique du spermatozoïde de lapin présente un taux élevé de cholestérol (**Darin-Bennet et White, 1977 ; Castellini et al. 2006a**) et un taux faible d'acide gras polyinsaturé/saturé en phospholipides, ces caractéristiques rapportent une structure de fluidité intermédiaire à la membrane qui pourrait résister à un plus grand stress environnemental (**Darin-Bennet et White, 1977**), ainsi le sperme du lapin est caractérisé par sa résistance au choc thermique.

### I- Description de la technique

La conservation du sperme par réfrigération consiste à maintenir les spermatozoïdes dans des températures permettant de réduire leur mobilité et leur métabolisme sans atteindre le seuil de température négatif. La conservation de la semence fraîche à 4°C réduit le métabolisme des spermatozoïdes ce qui permet une économie de leurs réserve énergétiques et une bonne conservation de leur mobilité qui serait restauré après réchauffement (**Decuadro, 2004**).

### II- Milieux de dilutions et leurs caractères

La survie des spermatozoïdes à basse température est réduite, il est nécessaire d'utiliser un milieu spécifique, ou dilueur, afin d'accroître leur longévité et de préserver au mieux leur capacité de fécondation. En effet, **Rota et al., (1995)** et **Tsutsui et al., (2003)** ont montré que la mobilité des spermatozoïdes réfrigérés se maintient beaucoup plus longtemps lors de l'utilisation d'un dilueur qu'en l'absence de dilueur. De plus, **Linde-Forsberg, (1995)** a prouvé que des IA de semence réfrigérée avec un dilueur donnent des taux de gestation significativement plus élevés que des IA avec une semence réfrigérée sans dilueur.

Etant donné que la semence du lapin ne survit que peu de temps à la température de 34–37 °C, la dilution de la semence se fait immédiatement après la récolte (délai récolte-dilution < 15 mn) avec un milieu permettant la survie de spermatozoïdes à une température déterminée de stockage (4°C à 20°C) et répondant à un certain nombre de critères (**Bue, 1992;Linde-Forsberg, 1995 ; Decuadro, 2004 ; Feldman et Nelson, 2004b ; Versteegen et al, 2005**) :

- avoir un pH entre 6,7–7,3.
  - contenir des éléments nutritifs pour éviter l'épuisement des spermatozoïdes (glucose, fructose, glutamine, etc.) ;
  - avoir des solutions tampons (Tes, Pipes, Hepes, Tris, etc.) et des ions minéraux permettant de maintenir le pH ;
  - avoir des antibiotiques destinés à contrôler la flore microbienne
  - isotonicité par rapport à la semence, pour lutter contre les chocs osmotiques,
  - pouvoir de protection et de stabilisation membranaire, pour protéger les membranes plasmiques des spermatozoïdes contre les chocs thermiques et mécaniques,
  - pouvoir anti-oxydant, pour lutter contre l'action néfaste des radicaux libres.
- D'après **Boiti et al., (2005)** le tris buffer (TB) utilisé pour le lapin doit contenir les composants et les propriétés suivantes (**tableau IV**).

**Tableau IV:** les composants et les propriétés adéquates du tris buffer utilisé pour le lapin (**Boiti et al, 2005**).

<b>Tris</b>	<b>3,029 g</b>
<b>L'acide citrique H2O</b>	<b>1,676 g</b>
<b>D- Glucose déshydraté</b>	<b>1.250 g</b>
<b>Streptomycine</b>	<b>75.000 UI</b>
<b>G-pénicilline</b>	<b>166.200 UI</b>
<b>L'eau distillée à</b>	<b>100 ml</b>
<b>pH</b>	<b>7,14</b>
<b>Osmolarité</b>	<b>299 mOsm / kg</b>

### II-1. Les différents dilueurs utilisés pour le lapin

Plusieurs dilueurs ont été mis au point par des chercheurs, Il est reconnu que le jaune d'œuf et le lait contiennent des protéines qui assurent une protection et une stabilisation des

membranes des spermatozoïdes (**Feldman et Nelson, 2004b**). D'ailleurs, **Bouchard et al., (1990) et Bue, (1992)** ont montré que l'utilisation d'un dilueur à base de lait écrémé permet d'obtenir de bons résultats en terme de mobilité et de vitalité des spermatozoïdes après leur réfrigération.

**Iguer-ouada et Versteegen, (2001c)** ont également montré que le jaune d'œuf permet de maintenir la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes au cours de leur réfrigération.

**Ponglowhapan et al., (2004a)** ont montré que l'ajout de sucres (glucose ou fructose) au dilueur permet de maintenir une mobilité supérieure à 70 % jusqu'à 8 jours de conservation à 5°C.

La caféine elle aussi a un effet évident sur la motilité des spermatozoïdes conservés à 18°C entre 0 et 48 h, mais cette augmentation de la motilité n'a pas conduit à une amélioration des paramètres de la reproduction de la femelle (**Aitken et Kelly, 1985 ; El-Gaafary, 1994**).

### II-2. Le taux de dilution

Le taux de dilution varie généralement entre 1:3 et 1:5. Mais, la dilution ne doit pas être trop importante car cela risque d'affecter la mobilité des spermatozoïdes (**Paméla et Virginie, 2008**). Elle provoque une diminution de mobilité et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes, la dilution doit pourtant être suffisante pour assurer l'efficacité du dilueur (pouvoir tampon, dispersion des spermatozoïdes, dilution ou annulation de l'effet de catabolite toxique) (**Sauveur et de Revières, 1988**).

On appelle taux de dilution le rapport :  $T = \frac{\text{volume du sperme pur}}{\text{volume du sperme diluer}}$

Le degré de dilution du sperme est variable en fonction d'un nombre important de paramètres, comme la concentration du sperme lui-même et, la durée de conservation (**Seed et al., 1996**).

### III- Conservation par réfrigération

#### III-1. Effet de la température

Levilain, (2005), a montré que la diminution de la température entraîne une diminution de l'activité métabolique des spermatozoïdes, et par ce biais une diminution de leur mobilité. Pendant la phase de conservation, plus la température de conservation est basse, plus la mobilité des spermatozoïdes est conservée au cours du temps, la baisse de la mobilité observée lors de conservation à 4°C ou à 5°C est réversible au cours du réchauffement ; cette aptitude est ainsi mise à profit pour prolonger la durée de survie des spermatozoïdes en prolongeant leur vie fonctionnelle.

Une diminution de la température permet d'augmenter la durée de conservation tout en préservant la capacité fécondante du sperme (Lavara et al., 1999).

De nombreux travaux ont étudié cet effet sur la conservation de la motilité, Mathur et al., (1992) ; Gottardi, (1993) et Lôpez et al., (1996) ont observé qu'une température de conservation comprise entre 15 et 19°C est la plus favorable à la survie des spermatozoïdes.

De bons résultats de fertilité et de prolificité ont aussi été obtenus avec du sperme conservé pendant 24h à 72h (Alvarino et al., 1996 ; Lôpez et al., 1996 ; Perrier et al., 1998), d'ailleurs Lopez et Alvarino (1998) ont confirmé ces informations (tableau V et VI).

**Tableau V** : influence de la semence conservée sur la prolificité d'après (Lopez et Alvarino, 1998) :

Traitement	Nombre de portées	Total né/portée	Mort né/portée
2h	287	8.92 ± 0.16	0.59 ± 0.09
24h	274	8.48 ± 0.17	0.42 ± 0.07
48h	242	8.02 ± 0.18	0.37 ± 0.07
72h	125	7.04 ± 0.27	0.33 ± 0.08
96h	36	5.58 ± 0.44	0.30 ± 0.15

**Tableau VI** : influence de la semence conservée sur la fertilité d'après (Lopez et Alvarino, 1998) :

Traitement	Nombre d'AI	% de fertilité	Analyse statistique	
			$X^2$	Prob
2h	372	84.14	111.74	0.0001
24h	359	83.56		
48h	370	79.73		
72h	216	67.59		
96h	103	39.23		

### III-2. Le choc thermique

Lorsque la température descend trop rapidement, les spermatozoïdes subissent des changements, parfois irréversibles qui sont regroupés sous le nom de «cold shock» ou choc thermique.

Le cold shock est un ensemble de phénomènes non entièrement connus, communs à toutes les cellules refroidies dont les conséquences sont : la diminution de la production d'énergie, l'augmentation de la perméabilité membranaire, l'apparition des mouvements circulaires de spermatozoïdes et la perte de mobilité. Le contrôle et le maintien d'une température constante pendant toute la durée d'utilisation de la semence sont primordiaux et des progrès sensibles ont été réalisés récemment avec l'emploi d'enceintes thermo-régulées (Decuardo, 2004).

### III-3. Protocole de la réfrigération

Lors de la réfrigération, il ne faut pas que la vitesse de refroidissement de la semence soit trop rapide ou trop lente. Pour cela, différents protocoles existent (Bue, 1992) :

- placer la semence diluée directement au réfrigérateur ou dans une chambre froide (Bue, 1992)
- placer la semence diluée dans un verre d'eau à température ambiante et mettre le tout au réfrigérateur (Linde-Forsberg, 1995).



- placer la semence diluée dans un dispositif qui permet une diminution de la température constante et programmable (**Bue, 1992 et Verstegen et al., 2005**).

Selon le protocole employé, la vitesse de refroidissement est plus ou moins rapide et la semence atteint 4°C en 30 minutes à quelques heures.

Lors de la conservation de la semence réfrigérée, il faut veiller à ce que la température ne s'abaisse pas en-dessous de 4 °C. Et il faut veiller à ce que, la semence réfrigérée doit être réchauffée lentement à température ambiante à l'aide d'un bain-marie à 37°C, avant chaque utilisation (**Linde-Forsberg, 1995**).

### III-4. Effet de la réfrigération sur les spermatozoïdes :

L'un des avantages principaux de l'utilisation du sperme réfrigéré est la facilité du transport et des échanges du sperme ainsi conservé, il suffit d'envoyer le sperme dans un simple thermos pour maintenir la température aux alentours de 4°C pendant la durée de transport (**katila et al., 1997**).

La longévité des spermatozoïdes est significativement plus importante à 4°C qu'à 22°C ou à 37°C (**Bouchard et al., 1990 ; Linde-forsberg, 1995**). En effet, conserver la semence à 4°C permet de ralentir le métabolisme des spermatozoïdes et donc de prolonger leur longévité. De plus, la croissance bactérienne est plus importante à 22°C ou à 37°C qu'à 4°C. Pour ces différentes raisons, la semence est, en général, réfrigérée et conservée à 4°C.

La conservation à 4°C présente le double avantage d'être aisément accessible et réalisable dans les conditions de la pratique vétérinaire courante et de ne pas faire appel aux méthodes sophistiquées ou complexes. De plus cette technique est d'un cout nettement moindre que celui de la congélation (**Levilain, 2005**). Elle permet aussi d'obtenir les meilleurs résultats de fertilité comparativement à la technique de congélation (**Pinto et al., 1999**).

Toutefois, L'inconvénient majeur de cette technique est la courte période de conservation de la viabilité et de la fertilité des spermatozoïdes rendant extrêmement difficile à gérer l'application de cette technique dans les conditions de la pratique vétérinaire. Lors de

la réfrigération, les spermatozoïdes subissent des agressions qui sont susceptibles d'altérer leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles :

- choc thermique lors de leur réfrigération, de leur conservation et de leur réchauffement pour utilisation (**Ponglowhapan et al., 2004a**).
- acidification du milieu extra-cellulaire (**Bue, 1992**).
- choc osmotique lors de la dilution (**Hermansson et Linde-Forsberg, 2006**).
- choc mécanique lors de leur transport.

**Ponglowhapan et al., (2004a)** ont prouvé que la mobilité, l'intégrité membranaire et acrosomiale des spermatozoïdes décroissent progressivement au cours de leur conservation à 5°C. De même, **Hermansson et Linde-Forsberg, (2006)** ont montré que la mobilité des spermatozoïdes après réfrigération est réduite. Dans leur étude, la mobilité initiale de 81,7 % passe à 60 % après 24 heures de réfrigération et à 35 % après 48 heures en fonction du dilueur utilisé. Mais **Kumi-Diaka et Badtram, (1994)** n'ont pas trouvé d'effet néfaste sur la vitalité ni sur l'intégrité membranaire des spermatozoïdes.

**Verstegen et al., (2005)** ont montré que la mobilité des spermatozoïdes n'est pas significativement affectée par une conservation à 4°C durant les 10 premiers jours et qu'elle commence à diminuer à partir du 11<sup>ème</sup> jour pour être nulle au bout de 16 ou 17 jours.

Enfin, **Rota et al., (1999a)** ont prouvé que le pourcentage de spermatozoïdes capotés de la semence réfrigérée est plus élevé que celui de la semence fraîche ; et, **Strom-Holst et al., (2000)** ont montré que la capacité de fixation à la zone pellucide des spermatozoïdes est plus faible après une réfrigération de 4 jours qu'après une réfrigération d'1 jour.

En effet, **England et Ponzio, (1996)** ont montré que la qualité de la semence (mobilité, vitalité, intégrité membranaire et acrosomiale, et morphologie des spermatozoïdes) réfrigérée sur de courtes périodes (inférieures à 2 jours), est supérieure à celle de la semence congelée. Ils ont également prouvé que plus le temps de réfrigération augmente, plus la qualité de la semence se dégrade. Ainsi, après 4 jours de réfrigération (sans changement de dilueur), la qualité de la semence réfrigérée devient équivalente à celle de la semence congelée après décongélation.

# *Partie expérimentale*

*Materiels*  
*et*  
*Methodes*

## **Objectif du travail**

Dans notre travail, nous avons essayé de nouveaux milieux à base de PEG, dans le but d'améliorer la réfrigération du sperme du lapin.

## **I- Collecte de la semence du lapin**

Notre étude a commencé par l'analyse du sperme de 8 lapins de race mixte, situés dans deux milieux différents ; l'Institut National de la Recherche Agronome (INRAA de Oued Ghir de Bejaia) et l'Université de Bejaia, afin de rechercher la semence de bonne qualité.

### **I-1. Description de l'INRAA**

L'Institut Nationale de la Recherche Agronomique d'Algérie, elle se situe à Oued Ghir à 20km du centre de la wilaya de Bejaia. Le centre s'étend sur une Surface Agricole Totale (SAT) de 22 ,06 ha dont : 15,5 ha de Surface Agricole Utile (SAU), de 5,5 ha de terres incultes et 1,5 ha de surface bâtie. Parmi les élevages du centre, on peut trouver l'élevage des ovins, des caprins, des abeilles (apicultures) et l'élevage des lapins (cuniculture).

La région reçoit annuellement 600 à 1100mm de pluie, les températures sont douces sur le littoral et un peu moins dans la vallée.

### **I-2. Matériel de la collecte**

#### **I-2.1. Matériels biologiques**

Les 4 lapins de l'université de Bejaia sont maintenus dans des cages individuelles.

Ils présentent un bon état sanitaire et leur poids varie entre 2,33 Kg et 3,47 Kg (**tableau VII**). Ils sont nourris avec une alimentation variée : fourrage, paille et granulé du commerce et disposés de l'eau fraîche Ad libitum (**Figure N° 12**).



**Figure N°12** : Photographie des cages des lapins de l'université de Bejaia.

**Tableau VII** : les caractéristiques des lapins mâles de l'université de Bejaia :

Males	Couleur	Poids
Male1	Noir avec nez blanc	3,28
Male2	Marron	2,335
Male3	Noir	3,42
Male4	Gris	3,47

Les lapins de l'INRAA que nous avons étudiés sont maintenus dans un clapier qui dispose d'une température optimale (16° à 18° C) et un bon système de ventilation, avec des cages individuelles pour éviter les batailles et les chevauchements (**figure N°13**). Chaque cage est munie d'une tétine placée sur un tuyau qui sert de l'eau. Ces lapins sont nourris avec un granulé du commerce, leurs poids varie entre 2,95 Kg et 3,7Kg (**tableau VIII**).



**Figure N° 13** : photographie du clapier de l'INRAA de Bejaïa.

**Tableau VIII** : les caractéristiques des lapins mâles de l'INRAA de Bejaïa :

<b>Males</b>	<b>Couleurs</b>	<b>Poids(Kg)</b>
Male1	Noir	3,03
Male2	Noir ave nez blanc	2,95
Male3	Blanc	3,7
Male4	Blanc	3,5

### **I-2.2. Matériels techniques**

- Eau chaude.
- Aiguille.
- Seringue.
- Ciseaux.
- balance.
- Vagin artificiel constitué de **(Figure N° 14)** :
  - Cylindre externe.
  - Bouchon.
  - Gant en plastique.
  - Elastiques.
  - Tube de collecte.



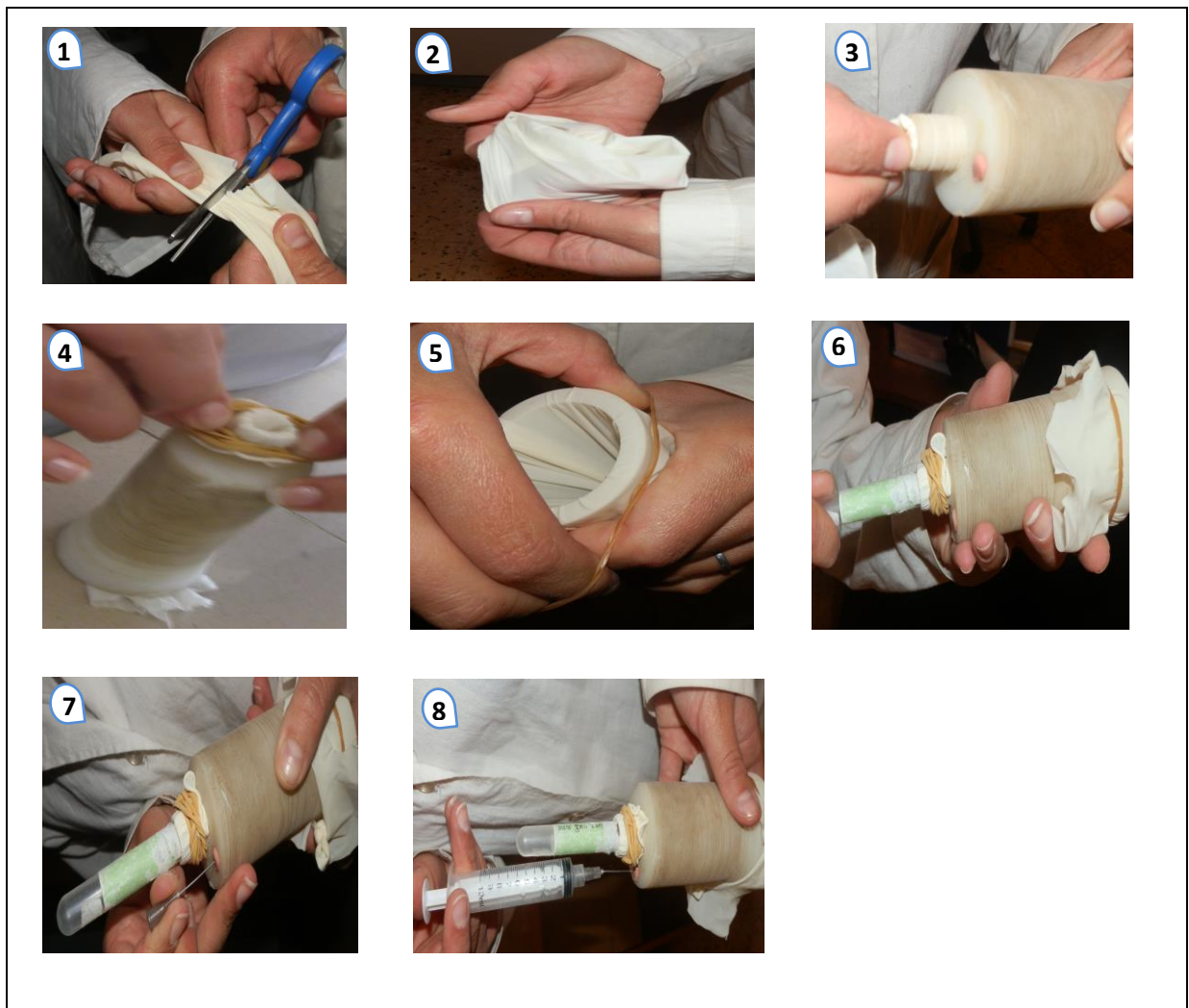
**Figure N° 14** : Photographie du matériel utilisé pour la collecte du sperme

### **I-2.3. Etapes de la préparation du vagin artificiel (figure N° 15)**

La préparation du vagin artificiel(VA) nécessite le passage par les étapes suivantes :

Couper le gant au niveau des doigts (1),le renverser pour que le sperme ne soit pas en contact avec la poudre du gant (2), introduire le gant dans le cylindre externe (3) puis le plier sur la petite( 4) et la grande extrémité ( 5) du cylindre en le fixant avec un élastique après avoir fait un  $\frac{1}{4}$  de tour du gant. Placer le tube de récolte dans la petite extrémité du cylindre (6) injecter, à travers le bouchon, de l'eau chaude dans la cavité formée entre le cylindre externe et le gant à l'aide d'une seringue introduite dans ce bouchon (7 ; 8).





**Figure N°15** : Les différentes étapes de la préparation du vagin artificiel.

### **I-3. Méthodes de la collecte**

Une lapine est introduite dans la cage du mâle. Le vagin artificiel, maintenu à la température de 40 à 42 °C avant usage de manière à être à 39°C au moment de son emploi et muni d'un tube de récolte, est tenu entre les pattes de la lapine. L'éjaculation a généralement lieu immédiatement après présentation de la femelle.

Une autre manière de récolter consiste à mettre une lapine dans la cage du mâle et au moment où ce dernier essaye de la saillir, nous introduisons rapidement le VA (**figure N° 16**). Lorsque le pénis du mâle entre dans la grande extrémité du vagin artificiel, l'éjaculation se produit et le sperme est récolté (**figure N°17**).

Si le mâle ne réagit pas après un temps de 5min de présentation de la femelle nous l'enlevons pour changer un autre mâle.



**Figure N°16** : photographie de la méthode de la collecte du sperme.



**Figure N°17** : photographie du sperme collecté.

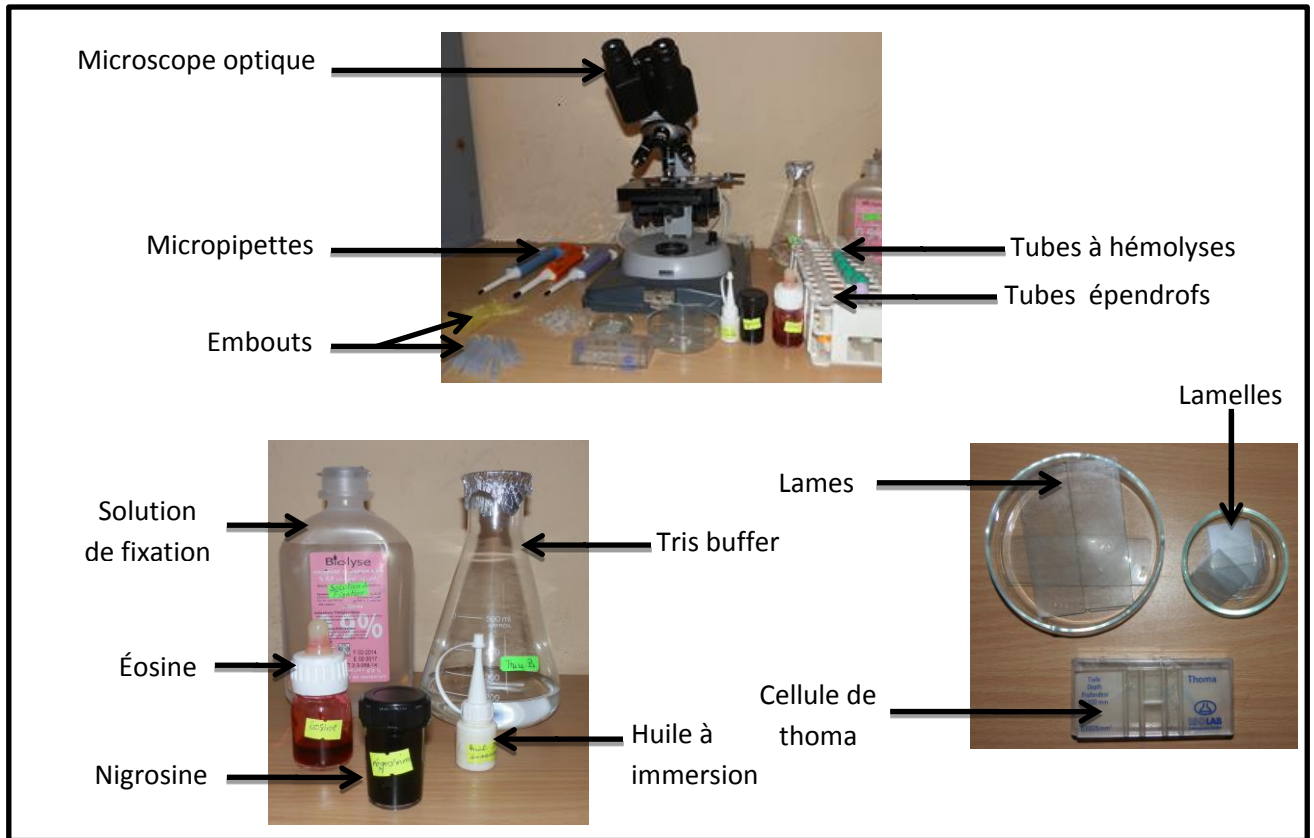
## II- Analyse du sperme

La fertilité du mâle est intrinsèquement liée à la qualité de la semence, c'est pour cela que nous sommes amenés à caractériser la semence par les critères qui doivent être facilement mesurables, répétables et représentatifs. Certains sont mesurables directement, d'autres font intervenir du matériel.

### II -1. Matériels de l'analyse (figure18)

- Des micropipettes.
- Des lames.
- Des lamelles
- Des tubes à hémolyses.
- Des tubes eppendrofs.
- Des colorants : éosine à 1%, Nigrosine à 10%.
- Huile à immersion.
- Solution de fixation (Eau physiologique (Na Cl à 9 %) + formol à 35%).
- Tris buffer (D-glucose +acide citrique+ tris).

- Cellule de thoma.
- Un microscope optique.



**Figure N° 18** : photographie du matériel utilisé pour l'analyse du sperme.

## **II .2. Techniques d'analyse**

Immédiatement après la collecte, le tube est enlevé du VA et maintenu dans la main de façon à le garder à une température de 37° C ou dans un bain marie réglé à 37°C. On procède ensuite aux analyses macroscopiques et microscopiques de l'échantillon.

Un contrôle de la qualité biologique de la semence est effectué de manière à ne retenir que les meilleurs éjaculats: absence d'urine, de sang, et les volumes supérieur ou égal à 0,4 ml.

## **II-2.1. Examen macroscopique**

### **II.2.1.1. La couleur**

Elle est déterminée par l'observation de la semence dans le tube de collecte.

### **II.2.1.2. Le volume(V)**

Après élimination du gel du sperme, nous avons déterminé le volume du sperme en mettant côte à côte le tube contenant la semence et un autre vide, sur lequel nous marquons le niveau correspondant au niveau de la semence. Ensuite nous remplissons le tube vide avec de l'eau jusqu'au trait marqué, et nous mesurons le volume à l'aide d'une micropipette.

## **II-2.2. Examen microscopique**

### **II-2.2.1. La motilité massale**

Juste après la collecte, nous commençons par mettre une goutte de la semence sur une lame pour déterminer la motilité massale en l'observant sous microscope, au grossissement ( $\times 10$ ). Une note de 0 à 9 est ensuite attribuée, selon l'échelle de (**Petitjean, 1965**), voir annexe N°1.

### **II-2.2.2. La motilité individuelle**

Une goutte de la semence diluée (1 : 5) par le tris buffer est mise entre une lame et une lamelle. Elle est observée sous microscope au grossissement ( $\times 40$ ) et une note comprise entre 0 et 4 d'après l'échelle d'**Adrieu, (1974)** est attribuée, voir annexe N°2.

### **II-2.2.3. La concentration spermatique**

Après dilution de la semence à  $1/200^{\text{ème}}$  dans une solution de fixation (10 ml de formol à 35% dans 1 L de NaCl à 0.9%), nous déposons une goutte de semence diluée à la bordure de chaque chambre de la cellule de « thoma » à l'aide d'une micropipette, puis nous laissons la cellule reposer 10 min.

Nous calculons le nombre de spermatozoïdes dans les 8 grands carreaux diagonaux sous grossissement  $\times 40$ ).

❖ pour le calcul de la concentration nous avons appliqué la formule suivante:

$$C=N \times D/64 (10^6 \text{ Spz}).$$

Avec :

**C** : la concentration des spermatozoïdes par ml.

**N** : l'ensemble des spermatozoïdes comptés, dans les huit carreaux diagonaux.

**D** : le taux de dilution (200).

#### **II-2.2.4. La morphologie et la vitalité**

Pour rechercher les éventuelles anomalies de morphologie et le taux de viabilité des spermatozoïdes, nous avons préparé un frottis selon les étapes suivantes ;

- Déposer une goutte de sperme sur une lame.
- Ajouter une goutte de la solution d'éosine 1%.
- Mélanger avec un embout et laisser quelques secondes.
- Ajouter 2 gouttes de solution Nigrosine à 10% et mélanger.
- Etalé avec une autre lame.
- Laisser sécher.
- Observer le frottis, sous microscope optique (x100) avec l'ajout d'une goutte de l'huile à immersion.
- Compter 200 spermatozoïdes en changeant le champ de vision, et en comptant le nombre de spermatozoïdes qui présentent des anomalies ainsi que celui des spermatozoïdes vivants et morts. Les spermatozoïdes morts se teintent en rose et les vivants restent incolores.

Les spermatozoïdes sont classés selon les anomalies de leur tête, de leur pièce intermédiaire, et de leur flagelle. Pour calculer le pourcentage de chaque anomalie spermatique nous avons utilisé la formule suivante de (**Boussit, 1989**).

$$\frac{\text{Nombre des spz normaux}}{\text{Nombre total des spermatozoïdes (200)}} \longrightarrow \frac{\% \text{ des spz}}{100\%}$$

La même règle de trois est utilisée pour calculer le pourcentage des anomalies de la tête, pièce intermédiaire et de la queue, ainsi que le nombre des spermatozoïdes morts et vivants.

### III- Conservation de la semence avec réfrigération

Pour la conservation avec réfrigération nous avons opté pour la semence de deux mâles de l'INRAA, celle du male 2 et du male 4 qui se caractérisent par les caractéristiques représentés dans le **(tableau IX)** et une couleur blanchâtre,

**Tableau IX** : les caractéristiques de la semence des deux males utilisés pour la réfrigération :

♂	Volume (ml)	Motilité massale	Motilité individuelle	concentration $\times 10^6$ spz/ml	Morphologie(%)			Viabilité(%)		
					Normaux	Anormaux			Vivants	Morts
						Anomalie de la tête	Anomalie de la pièce intermédiaire	Anomalie de la queue		
N°2	0,47	7	3	91,80	86	1	7	6	23,5	76,5
N°4	0,4	4	2,25	101	90,5	0	3,5	6	13,5	86,5

Nous avons utilisés (6) milieux de conservation que nous avons comparés à un témoin, composé uniquement de tris buffer (TB) préparé au laboratoire **(tableau IIX)** : Les nouveaux milieux que nous avons préparés, ont comme base le TB associé soit au Polyéthylène glycol (PEG), au cholestérol (CHL), à la vitamine E (vitE), aux complexes PEG-CHL, PEG-vitE, ou PEG-CHL-vitE. Les complexes sont préparés au niveau du laboratoire de génie des procédés pharmaceutiques de l'Université de Bejaia en utilisant la méthode de Co-évaporation.

**Tableau IIX** : les composantes de tris buffer (milieu de **Strazinger, 1971**) :

**Tris buffer(TB)**

Tris (hydroxyméthylaminométhane) : 3,028g
-D-glucose : 1,250g
-Acide citrique monohydrate : 1,675g

**III-1. Matériel de la réfrigération**

- spermes
- les milieux de conservations.
- les tubes à hémolyse.
- Les tubes eppendorfs.
- les micropipettes.
- les étiquettes.
- Antibiotique pénicilline (1miloin /unité).
- stréptosulfate (0,1g).
- réfrigérateur.

**III-2. Préparation des milieux (traitements)**

- Milieu 1 (TB) : Tris buffer.
- Milieu 2 (CHL): 40 mg de cholestérol + 10 ml de tris buffer.
- Milieu 3 (vit E) : 1.2 mg de vitamine E + 10 ml de tris buffer
- Milieu 4 (PEG) : 180 mg de PEG + 5 ml de tris buffer.
- Milieu 5 (PEG/vit E) : 12 mg du complexe (90% de PEG + 10% de vitamine E) + 10 ml de tris buffer.
- Milieu 6 (PEG/CHL) : 400 mg du complexe (90% de PEG + 10% de cholestérol) + 10 ml de tris buffer.
- Milieu 7 (PEG/CHL/vit E) : un volume du PEG-CHL et un volume PEG-vit E

### **III-3. Conservation du sperme par réfrigération**

Immédiatement après la récolte :

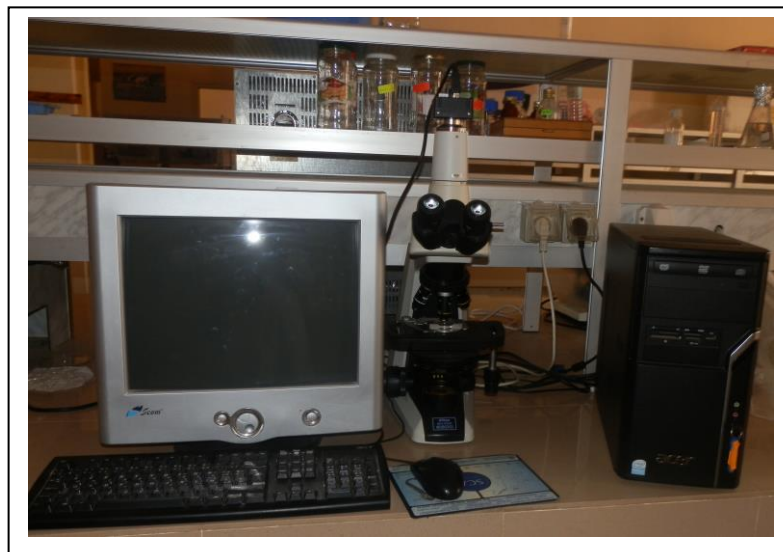
Nous avons analysé la couleur du sperme, le volume et la motilité massale au microscope optique ensuite nous avons ;

-dilué la semence avec le tris buffer + antibiotique, à la dilution de 1 : 5<sup>ème</sup>.

-préparé une série de 7 tubes pour une conservation à 4°C.

-Mis dans chaque tube un volume du sperme dilué avec un volume du traitement.

- Analysé la mobilité spermatique à T0 avec l'analyseur informatique (CASA) Computer Assisted Semen Analyser (**figure19**).
- Mis la série de 7 tubes dans un réfrigérateur à 4°C.
- Analysé la série de tube, avec le CASA, chaque 2 ou 3heures jusqu'à 24h.



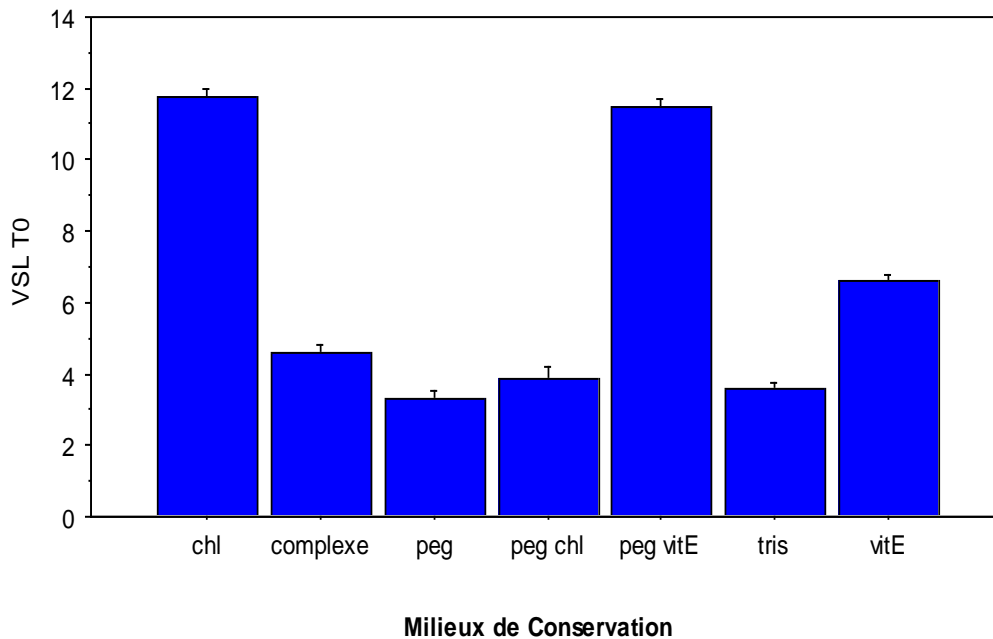
**Figure 19** : Photographie du microscope CASA (computer assisted semen analyser)



*Résultats*  
*et*  
*discussions*

Après avoir préparé la série à réfrigérer, en ajoutant le sperme dilué aux différents milieux utilisés, nous avons procédé à l'analyse de la mobilité des spermatozoïdes dans les sept traitements au CASA, 15 min après, cela juste avant la réfrigération. Ce moment d'analyse T0 correspond, en réalité, à 15 min de conservation à T ambiante.

### I-Interprétation des résultats de la VSL

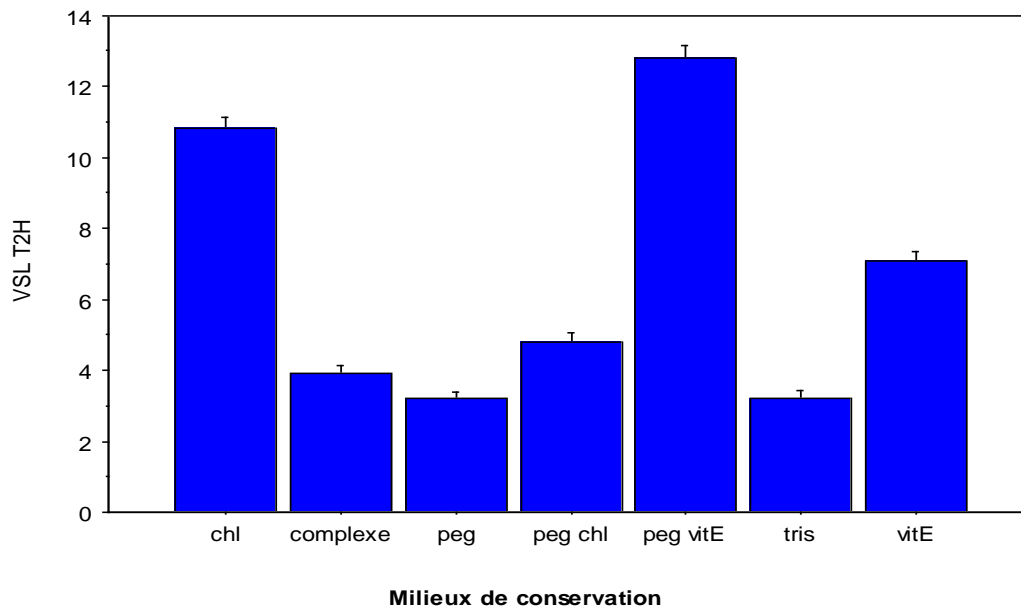


**Figure N° 20** : Histogramme représentant la VSL des SPZ à T0 dans les différents milieux utilisés.

L'analyse de la mobilité à T0 (**Figure N° 20**), nous a permis de constater que, pratiquement, tous les milieux testés présentent une VSL supérieure à celle du control (3,61 µm/sec), à l'exception du milieu PEG. Cela signifie qu'à 15 min de conservation à T° ambiante, l'effet des différents traitements sur la mobilité des spermatozoïdes est déjà constaté. Avec un effet des deux traitements, CHL (11,74 µm/sec) et PEG/Vit E (11,45 µm/sec) plus remarquable.

Le cholestérol contrôle la structure de la membrane plasmique, en entrant en interaction avec les phospholipides membranaires, pour la renforcer et la stabiliser (**Mocé et al., 2010**). La Vit E est connue pour son effet antioxydant (**Watanab et al., 2009**) qui se manifeste surtout lors de la conservation à basses températures ; à T0 son association avec le PEG a amélioré son effet puisque la VSL dans cette association est meilleure que celle notée dans le

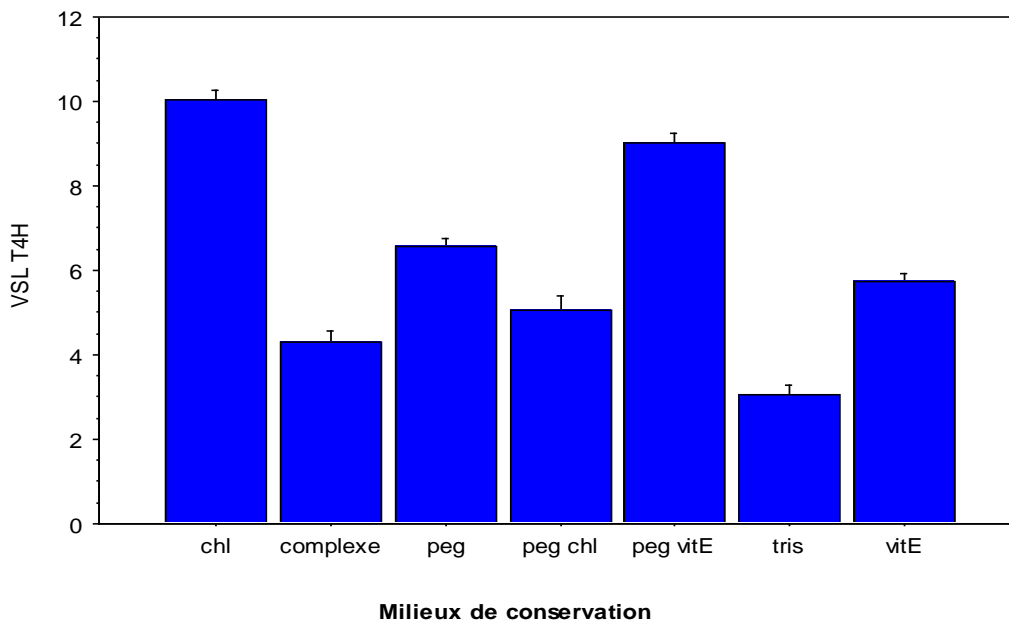
milieu vit E seule (11,45  $\mu\text{m}/\text{sec}$  vs 6,62  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ). Le PEG a, donc, amélioré la solubilité de la VitE, ce qui a permis aux spermatozoïdes d'en profiter.



**Figure N° 21** : Histogramme représentant la VSL des SPZ à T 2h dans les différents milieux utilisés.

Après deux heures de réfrigération (**Figure N° 21**), le contrôle montre toujours une VSL inférieure à celle des autres traitements (3,23  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ). Les milieux qui se distinguent sont le PEG/Vit E, CHL et Vit E, avec une nette supériorité du PEG/Vit E dont la VSL est égale à 12,8  $\mu\text{m}/\text{sec}$  et qui a évolué par rapport à T0. Nous remarquons aussi une légère augmentation de la VSL dans le complexe PEG/CHL (4,8  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ).

L'amélioration de la VSL dans les deux traitements contenant du PEG signifie que ce dernier a solubilisé les deux molécules, CHL et Vit E qui ont exercé leur effets respectifs de protection de la membrane plasmique (**Mocé et al., 2009**) et de lutter contre les réactifs oxydants (**Watanab et al., 2009**).

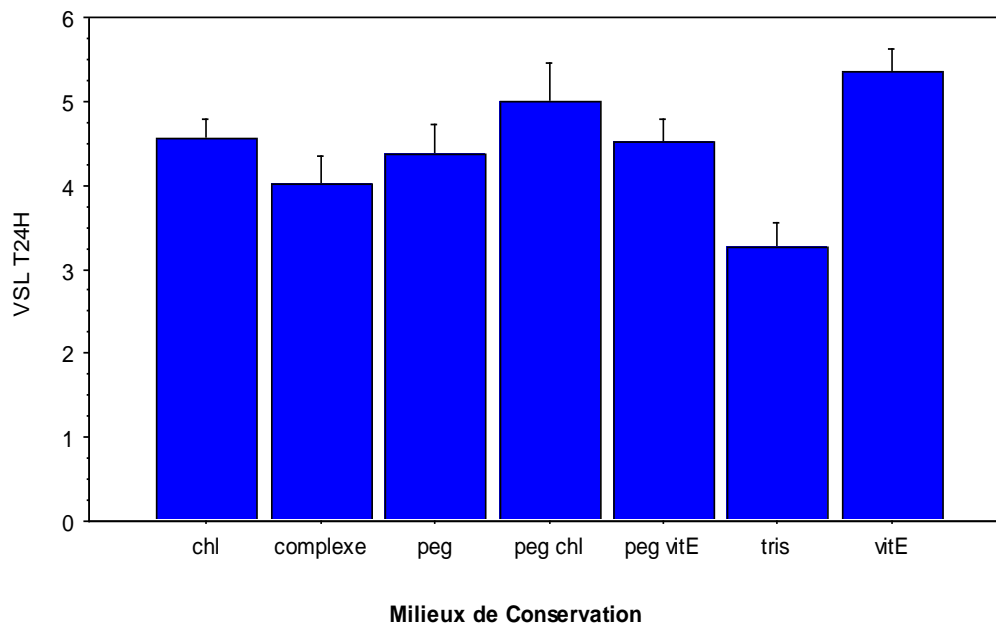


**Figure N° 22** : Histogramme représentant la VSL des SPZ à T4h dans les différents milieux utilisés.

Après 4h de réfrigération (**Figure N° 22**), la VSL dans le contrôle (3,06 µm/sec) est la plus basse par rapport au reste des traitements. Le CHL et le PEG/Vit E gardent leur distinction (10,04 et 9,01 respectivement) malgré que le dernier milieu a montré une légère diminution de VSL. Ce qui est remarquable c'est que nous avons noté une amélioration de VSL surtout dans le milieu de PEG seul (6,57 µm/sec), mais aussi dans les complexes PEG/CHL (5,07 µm/sec) et PEG/CHL/Vit E (4,3 µm/sec) après avoir assisté à une baisse de VSL à 2h de réfrigération dans ce dernier traitement par rapport à T0.

L'amélioration de la VSL dans ces trois milieux contenant le PEG est probablement liée à l'effet de cette molécule sur la membrane des spermatozoïdes puisque selon (**Togo et al., 1999**) le PEG favorise la restauration des membranes cellulaires lésées.

Sachant que le PEG a le pouvoir de solubiliser les produits organiques et les sels (**Pancera et al., 2002**), nous pouvons conclure que le CHL et la Vit E ont été solubilisés par le PEG grâce à son pouvoir hydrophilisant et sa mouillabilité (**Gaur et al., 2012**). Ces deux molécules sont, donc, rendues plus disponibles pour les spermatozoïdes ce qui leur a sûrement permis d'exercer leurs actions.



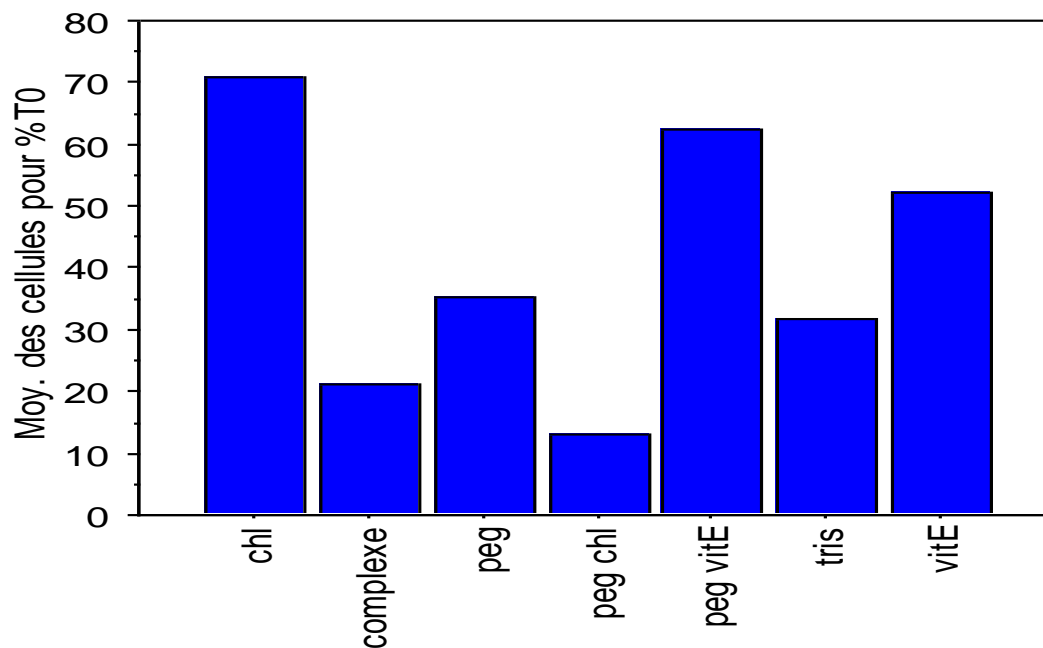
**Figure N° 23:** Histogramme représentant la VSL des SPZ à T24h dans les différents milieux utilisés.

Nous remarquons sur la (**figure N° 23**), que la VSL des spermatozoïdes a subi une chute dans les sept milieux, malgré que la plus faible VSL est celle notée dans le control (3,26 µm/sec).

A 24h la meilleure VSL est observée dans le traitement à base de Vit E seule (5,36 µm/sec) suivie par PEG/CHL (4,99 µm/sec).

Nous devons signaler que le complexe PEG/CHL/Vit E a pratiquement maintenu la VSL des spermatozoïdes jusqu'à 24h de réfrigération par rapport à T0 (4,02 µm/sec vs 4,6 µm/sec) malgré que la VSL de départ n'été pas importante, cela est du à la qualité médiocre de la semence avant réfrigération.

## II- Interprétation des résultats du pourcentage de la mobilité



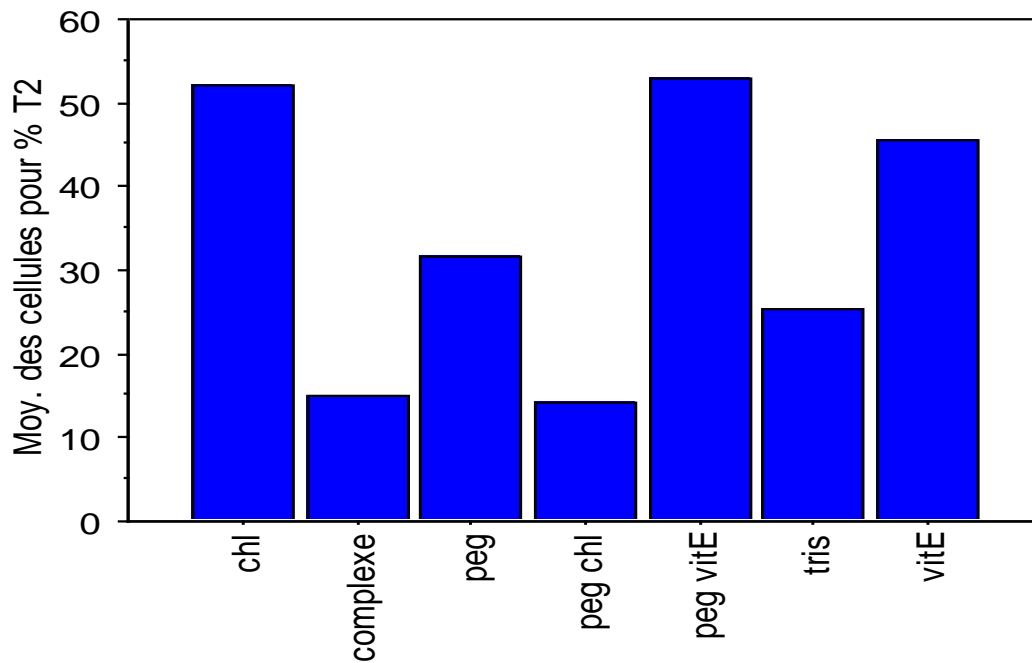
**Figure N° 24:** Histogramme représentant le pourcentage des SPZ mobile à T0 dans les différents milieux utilisés.

La (**figure N° 24**) montre qu'à T0, le pourcentage des spermatozoïdes mobiles dans les milieux CHL, PEG/Vit E, Vit E et PEG est meilleur que celui noté dans le contrôle (31,58%). Le meilleur pourcentage est celui du traitement à base de CHL (70,8%) et à base de PEG/Vit E (62,5%). Cela signifie que l'effet des trois molécules, utilisées dans notre étude sur les spermatozoïdes, est exercé dès 15 min de conservation à T ambiante.

La Vit E protège la membrane des spermatozoïdes en la stabilisant (**Pancera et al., 2002**) et en luttant contre les pro-oxydants (**Watanab et al., 2009 ; Badade et al., 2011**).

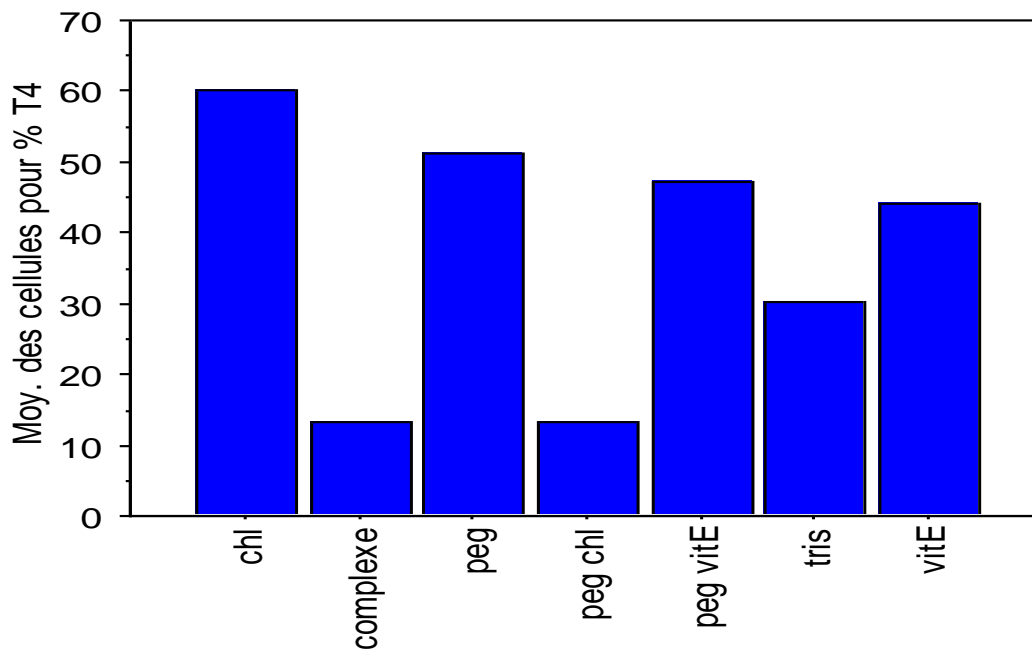
Le cholestérol est connu pour son rôle structurel dans l'architecture cellulaire qui permet le renforcement de la membrane plasmique (**Mocé et al., 2010**).

Le PEG augmente l'activité enzymatique grâce à ses favorables interactions avec la coenzyme NADP+. Sachant que, le NADP+ est présent dans plusieurs processus biologiques responsables de la production de l'ATP (**Pancera et al., 2002**), le PEG permet de rendre ce dernier plus disponible aux spermatozoïdes.



**Figure N° 25:** Histogramme représentant le pourcentage des SPZ mobile à T2h dans les différents milieux utilisés.

A 2h de réfrigération (**figure N° 25**) le pourcentage de mobilité a diminué dans tous les milieux, à l'exception du traitement PEG/CHL dans lequel il a augmenté de 12,88% à 14,91%. Le meilleur pourcentage est celui du complexe PEG/Vit E (53%). A ce temps de réfrigération, l'amélioration de l'action du cholestérol et de la Vit E sur les spermatozoïdes, suite à leur solubilité par le PEG, est notée. Ainsi que l'effet combiné du PEG et du CHL qui ont les deux un pouvoir réparateur de la membrane plasmique (**Togo et al., 1999**).

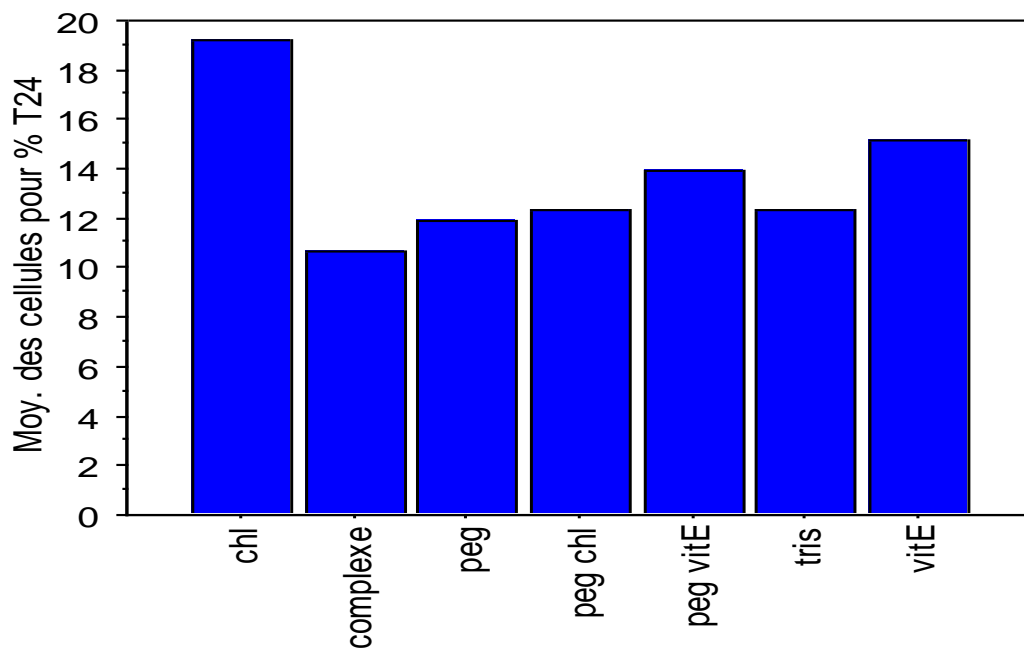


**Figure N° 26 :** Histogramme représentant le pourcentage des SPZ mobile à T4h dans les différents milieux utilisés.

Nous constatons dans la (**figure N° 26**), que dans le milieu de PEG, le pourcentage de la mobilité des SPZ augmente de manière significative de 31,63 % (T2h) à 51,21 % (T4h). Ainsi que dans le CHL où le pourcentage est passé de 52,03% (T2h) à 60,15% (T4h). Cette augmentation est probablement due au renforcement de la membrane spermatique par le cholestérol, puisque ce dernier est une molécule idéale pour réparer une paroi endommagée (**Matthias Rath et al.**). Et pour renforcer les barrières membranaires du SPZ et réduire la sensibilité de ces membranes aux dommages de refroidissement (**Mocé et al., 2009**). Elle est due, aussi, à la restauration de la membrane cellulaire lésée par le PEG (**Togo et al., 1999**).

Il est important de signaler que les quatre traitements (CHL, PEG/Vit E, Vit E et PEG) ont toujours donné des pourcentages de mobilité supérieurs à celui du control de T0 à T4h de réfrigération. Ce qui prouve l'effet améliorateur de ces milieux sur la mobilité des spermatozoïdes réfrigérés.





**Figure N° 27:** Histogramme représentant le pourcentage des spermatozoïdes mobile à T24h dans les différents milieux utilisés.

Après 24h de réfrigération (**Figure N° 27**), nous assistons à une importante dégradation du pourcentage de mobilité dans la quasi-totalité des milieux. Ce qui est remarquable c'est que le CHL reste toujours le milieu qui présente le meilleur pourcentage de mobilité (19,18 %). Et que les traitements à base de Vit E et PEG/Vit E ont conservé la mobilité mieux que le milieu contrôle (15,14%, 13,88% et 12,13% respectivement).

### **III- Discussion générale :**

Après interprétation les résultats, nous pouvons dire que même avant réfrigération, une grande variation des paramètres de mobilité est constatée dans les sept milieux utilisés.

Le fait d'avoir le meilleur pourcentage de mobilité et de VSL dans le milieu traité par le CHL, tous le long de la réfrigération (24 heures), prouve que ce dernier a renforcé les barrières membranaires cellulaires des SPZ, ce qui a permis une meilleure protection de la cellule lors de la réfrigération. D'ailleurs, le traitement du sperme avec le cholestérol avant la conservation à 4°C, pourrait réduire la sensibilité des membranes des SPZ aux dommages de refroidissement, en éliminant ou en réduisant la séparation de phases latérales des lipides (**Mocé et al., 2009**).

Il est cependant intéressant de souligner que le complexe PEG-VitE présente un effet protecteur des spermatozoïdes supérieur à celui de la vitamine E. Nous pouvons conclure qu'il y a une synergie entre ces deux molécules, le PEG pourrait donc, solubiliser la vitamine E qui est un puissant antioxydant (**Watanab et al., 2009**), qui pourrait mieux exprimer ce potentiel.

Pour le PEG seul, il donne à T0 des modestes résultats équivalents à ceux du contrôle, mais après réfrigération, il montre une sensible augmentation des paramètres de la mobilité à T2h et à T4h puis une dégradation après 24h. Les raisons de cette variation des paramètres de mobilité pourraient être expliquées par l'effet restaurateur du PEG sur la membrane spermatique (**Togo et al., 1999**).

Tandis que les plus faibles résultats en terme de paramètres de mobilité se distinguent dans les milieux PEG/CHL et le complexe. Ces résultats nous laissent penser qu'il y a une mauvaise coordination entre ces deux molécules (PEG et CHL) et cela par le fait que le PEG augmente la perméabilité de la membrane (**Daniel et al., 2011**) et que le cholestérol de son côté la réduit (**Needham et al., 1990**).

*Conclusion et perspectives*

Notre objectif était d'améliorer la conservation du sperme de lapin par réfrigération. Ceci en passant par un objectif intermédiaire, qui réside dans l'amélioration de la solubilité de la vitamine E et du cholestérol en milieu aqueux pour lutter contre le stress oxydatif. Pour cela, nous avons optés pour le PEG (polyéthylène glycol) qui est un polymère hydrosoluble, autrement dit, il a une forte solubilité dans l'eau.

Nos résultats ont montré, clairement, l'efficacité de la VitE, du cholestérol et du complexe PEG-VitE, mais aussi l'effet du PEG dans la solubilité de la vitamine E, car nous avons observé que la mobilité des spermatozoïdes est meilleure dans le milieu traité avec PEG-VitE par rapport à celui de la vitamine E seule. De plus, à 4h de réfrigération, nous avons constaté une amélioration des paramètres de mobilité dans le milieu PEG, probablement par son pouvoir de réparer la membrane plasmique.

Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes, elles nous ont permis de juger que le PEG-CHL ou le complexe PEG-CHL-VitE utilisés à la proportion de volume/volume avec le milieu tris serait défavorable à la conservation des spermatozoïdes à 4°C. Une amélioration de la mobilité est obtenue, après 4h de réfrigération, avec le traitement PEG/Vit E utilisé à la proportion de 50% avec le sperme dilué.

D'autres concentrations de PEG-VitE devraient être testées pour déterminer la concentration optimale permettant une meilleure conservation des spermatozoïdes à 4°C. et d'autres essais à d'autres températures surtout de 15°C à 19°C, la température la plus favorable à la survie des spermatozoïdes d'après (**López F.J. et al., 1996**).

Des essais *in vivo* d'insémination artificielle seront ensuite nécessaires pour vérifier si les spermatozoïdes conservés dans ce milieu de PEG-VitE, donnent une bonne fertilité et prolificité. Ce qui le rendrait utilisable dans la routine de l'insémination artificielle.

*Références  
bibliographiques*

**Abraham L., Kierszenbaum.,2002**, Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l'anatomie pathologique, Paris : éd médicales internationales. p 619.

**Aitken R.J., Kelly B.W., 1985**, Analysis the direct effects of prostaglandins on human sperm function. J.Reprod. Fertil. 73, p 139–1

**Akio T., Jittima C., Terumi M., Mayuko T., Kazuhide K. et Fusako K., 2007**, Structure and conservation of a polyethylene glycol-degradative operon in sphingomonads., Institute for Bio resources, Okayama University, 2-20-1 Chuo, Kurashiki 710-0046, Okayama, Japan.; 153, p 338–346.

**Alvarino J.M.R., Lopez F.J., Del Arco J.A. et Delgado F., 1996**, Artificial insemination of rabbit with diluted semen stored for 24 hours. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, Vow 2.pp 37 – 40.

**Andrieu R., 1974**, Physiologie de la reproduction chez le lapin domestique. Conservation du sperme de lapin sous forme liquide. Mémoire de fin d'études, E.N.S.A. de Montpellier, Station de Physiologie de la Reproduction, I.N.R.A. p 60.

**Apel-Paz M., Vanderlick T.K., Chandra N. et Doncel F.G., 2003**, A hierarchy of lipid constructs for the sperm plasma membrane. Biochemical Biophysical Research Communications, 309, p 724-732.

**Avissar N., Whitin J.C. et Allen P.Z., 1989**, Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. J. Biol. Chem, 2: p15850-15855.

**Awatif N., 2009**, Effet de l'extrait méthanoïque de *Zygophyllum cor nutum coss* contre le stress oxydant associé au diabète sucré et les organes en relation. Thèse de doctorat. Université Mentouri-Constantine.

**Badade Z.G., Samant P.M., 2011**, Role of oxidative stress in male infertility, 3(2), p385-391.

**Barone R., 1976**, Anatomie comparée des mammifères domestiques : Tome 4 : Splanchnologie : Laboratoire d'anatomie. Lyon, ENV.-879p.

**Barone R., 1978**, Anatomie comparée des Mammifères domestiques : Tome 3 : Splanchnologie 2 : Appareil uro-génital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale.-Paris : Vigot.-896p.

**Barone R., 1984**, Anatomie comparée des Mammifères domestiques : Tome 3 : Splanchnologie 1 : Appareils digestif et respiratoire.- Paris : Vigot.- 896p.

**Bencheikh N., 1995**, Effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme. *Ann. Zoot.*, 44, 263-279.

**Betajeri V., 2011**, water soluble polymers for pharmaceutical applications, 3, 1972-2009 ; doi : 10.3390/polym3041972.

**Biesalski H.K., Böhles H., Esterbauer H., Fürst P., Gey F. et Hundsdörfer G., 1997**, Antioxidant vitamins in prevention. Consensus statement. *Clin Nutr* ; 16:151–5.

**Black R.E., Hurley F.J. et Havery D.C., 2001**, «Occurrence of 1,4-dioxane in cosmetic raw materials and finished cosmetic products», *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 84,no.66670.

**Boiti C., Castellini C., Theau-Clément M., Besenfelder U., Liguori L., Renieri T. et Pizzi F., 2005**, Guidelines For The Handling Of Rabbit Bucks And Semen. 13: p 71 – 91.

**Bonnes G., Desclaude J., Drogoul C., Gadoud R., Jussiau R., Leloc'h A., Montmeas L. et Robin G., 1988**, Reproduction des mammifères d'élevage.-Paris : Ed. FOUCHER.-237p.- (collection INRAP).

**Bouchard G., Moris J., Sikes J. et Youngquist R., 1990**, Effect of storage, temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa mobility. *Theriogenology*, 34, 147-157.

**Bouguirne B., 2012**, Conception et synthèse des dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires : thèse de doctorat .Université Toulouse III. P330

**Boussit D., 1989**, Reproduction et insémination artificielle en cuniculture chez le lapin. Edité par l'association française de cuniculture : diffusion Lavoisier TEC et DOCpp6-8.

**Bradley A.J., Murad K.L., Regan K.L. et Scott M.D., 2002**, Biophysical consequences of linker chemistry and polymer size on stealth erythrocytes: size does matter. *Biochemical and Biophysical acts*, 1561 : p 147-158.

**Brambell F.W.R., 1944**, The reproduction of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Proc. Zool. Soc. London*. 114, 1-114.

**Bredderman P.J., Foot R.H., Yassen A.M., 1994**, An improved artificial vagina for collecting rabbit semen .Department of animal Husbandry, Cornell University, Ithaca New York,U.S.A.PP401-403.

**Brigelius-Flohe R., Traber M.G., 1999**, "Vitamin E: function and metabolism." *FASEB J.*, 13(10): p1145-1155.

**Brun J.M., Theau-Clément M. et BOLET G., 2002**, The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 70, p 139-149.

**Bue P., 1992**, Contribution à l'étude de la conservation d'une semence de chien pendant 48 h à +4°C : choix d'un milieu et influence du glycérol. Thèse Méd. Vét., Nantes, n°127, p 81.

**Cabannes C.R.A., 2008**, Comparaison des méthodes d'évaluations de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine .thèse:03-tou 3-4108 à l'université Paul-Sabatier de Toulouse .p37-44.

**Carpenter C.P., 1971**, Response of Dogs to Repeated Intravenous Injection of Polyethylene Glycol 4000, *Tox. Appl. Pharmac.* 18 p 35-40.

**Castellini C. et Lattaioli P., 1999** , Effect of motile sperms inseminated on reproductive performance of rabbit does. *Anim. Sci.*, 57, p 111-120.

**Castellini C., Lattaioli P., Bernardini M. et Dal Bosco A., 2000**, Effect of dietary  $\alpha$ -tocopheryl acetate and ascorbic acid on rabbit semen storage at 5 °C. *Theriogenology*, 54, p 523-533.

**Castellini C., Boiti C., Dal Bosco A., Lattaioli P. et Zampini D., 2003a**, Effet de la supplémentation en acides gras n-3 et vitamine E sur les caractéristiques de la semence de lapins d'âges différentes. In Proc. 10èmes Journées Recherche Cunicole, Novembre 2003, Paris, France, p 77-80.

**Castellini C., Lattaioli P., Dal Bosco A., Minelli A. et Mugnai C., 2003b**, Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acids. *Repro. Nutr. Dev.*, 43, p 91-103.

**Castellini C., Dal Bosco A., Cardinali R. et Mugnai C., 2004**, Effect of dietary  $\alpha$ -linoleic acid on semen characteristics of rabbit bucks. In Proc. 8th World Rabbit Congress, September 2004, Puebla, Mexico, p 245-250.

**Castellini C., Cardinali R., Lattaioli P. et Dal Bosco A., 2005**, Comparison of different dietary sources of PUFA n-3 on semen characteristics of rabbit bucks. *Reprod. Dom. Animal.* (Abstr. 386), p180.

**Castellini C., Cardinali R., Dal Bosco A., Minelli A. et Camici O., 2006**, Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology* 65, p 703–712.

**Castellini C., Lattaioli P., Cardinali R. et Dal Bosco A., 2006b**, Effect of collection rhythm on spermatozoa and droplet concentration of rabbit semen. *World Rabbit Science*, 14, p 101-106.



**Castellini C., 2008**, Comparaison des méthodes d'évaluations de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canines, et humaine. Thèse : 03-TOU 3-4108 à l'université Paul-Sabatier de Toulouse. p 37-44.

**Chabory E., 2009**, Caractérisation fonctionnelle de la glutathion peroxydase 5 murine.

**Chou J.P., Yi-Ch'uan L. et Chen-Ch'ao C., 1974**, Effect of heating on rabbit spermatogenesis. *Chin. Med. J.* 6, p 365-367.

**Cillard J., Cillard P., 1980**, Provident effect of alpha-tocopherol on essential fatty acids in aqueous media, *Ann .nutr. Aliment* -34, p579- 59.

**Colas G., Dauzier I., Courot M., Ortavant R. et Signoret JP., 1968**, Résultats obtenus au cours de l'étude de quelques facteurs importants de l'insémination artificielle ovine. *Ann. Zootechnie. Paris* ; 16 :p 47-57.

**Cole H.H., Cupps P.T., 1977**, Reproduction in domestic animals, third edition, Academia Press, p 265, 290.

**Comhair S.A., Erzurum, S.C., 2002**, Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol.* 283: L246-L255;

**Daniel J., Schlingman, Andrew H. et Mack Simon G.J., 2011**, Mochrie, Lynne Regan. A new method for the covalent attachment of DNA to a surface for single-molecule studies., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 83, p 91–95.

**Darin-Bennet A., White I.G., 1977**, Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold. shock. *Cryobiology* 14, p 466–470.

**Dauzier L., 1956**, Quelques résultats sur l'insémination artificielle des brebis et des chèvres en France. *Proc. 3rd Int Congr Anil Reprod Artif Insemin. Cambridge.* 3:p 12-14.

**Davis B.K., 1974**, Decapacitation and recapacitation of rabbit spermatozoa treated with membrane vesicles form seminal plasma. *J. Reprod. Fertile*, 41, p 241-244.

**De Blas C., Wiseman J., 1998**, In: De Blas C., Wiseman J. (Eds). *The Nutrition of the Rabbit*. CABI Publishing. CAB International, Wallingford Oxon, UK, p 241-253.

**Decuadro-Hansen G., 2004**, La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal Chilled and frozen semence: the animal experience, p 887–893.

**Degerman G., Kihlstrom J.E., 1961**, Brief cyclic variations in some sexual functions of the male rabbit. *Act Physiological Scandinavia* 51, p 108-115.

**Diplock A.T., 1991**, Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am J Clin Nutr.* 53 (suppl): 189S-93S.

**Dorge W., 2002**, Free radicals in the physiological control of cell function *physiol. Rev.*82: p 47-95.

**Dupont C., Lelnyer B., Amarf., 2006**, a dose determination study of polyethylene glycol 4000 in constipated children, factors influencing the maintenance dose. *J pediatre astroentrol utr*, 42,P 178-185.

**El-Gaafary M.N., 1994**, Quality and Fertility of cooled rabbit semen supplemented with cyclic-AMP stimulators. *Animal reproduction. Sci.* 34, p 307–313.

**El-Sherbiny A.M., 1987**, Seasonal variation in seminal characteristics of rabbits. M.Sc. Thesis, Fac. of Agric., Ain-Shams University.

**England G., Ponzio P., 1996**, Comparison of the quality of frozen-thawed and Cooled rewarmed dog semen. *Theriogenology*, 46, p 165-171.

**Epstein., Samuel S., 2009**, *Toxic Beauty* (Dallas: BenBella Books), 158-9.

**Escobar J.A., Rubio M.A. et Lissi E.A., 1996**, Superoxide dismutase and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Rad Biol Med*; 20: p 285-90.

**Eugene M., 2004**, Polyethylene glycols and immune camouflage of the cells tissues and organs for transplantation. *Cell. Mol. Biol.* 50 : p 209-215.

**Eva Moce., Jose S., Vicente. 2009**, Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Animal Reproduction Science* 110.p 1–24.

**Fabiani R., Johansson L., Lundkvist O. et Ronquist G., 1995**, Prolongation and improvement of prostasome promotive effect on sperm forward motility. *European J. of Obstetrics gynecology and Reproductive Biology*, 58, p 191-198.

**Feldman, E.C., Nelson, R.W., 1987**, Disorders of the canine male reproductive tract. *Canine and feline endocrinology and reproduction.* W.B. Saunders Company, Philadelphia, p 481-524.

**Feldman E., Nelson R., 2004b**, Artificial insemination, fresh extended semen, and frozen semen in Canine and feline endocrinology and reproduction. 3rd ed Philadelphia : WB Saunders, p 1005-1013.

**Farrell P.B., Foote R.H., Simkin M.E., Clegg E.D. et Wall R.J., 1993**, Relationship of semen quality, number of sperm inseminated, and fertility in rabbits. *J. Androl.*, 14, p 464–71.

**Favier A., 1994**, Biological indicators of oxidative stress in humans. AOCs Press, p 57-80.

**Fontbonne A., Dumont C., 1992**, Prélèvement et examen de la semence chez le chien. In : Pages J.P. (eds.). *Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat.* PMCAC Edition, Paris, p 251-260.

**Fontbonne A., 1995**, Infécondité du chien mâle. In : *Encyclopédie vétérinaire. Pathologie de la reproduction.* Elsevier, Paris, Volume 5, p 1-13.

**Francisco D.A.A., Luis F.A.R., 2003**, analyses of seminal quality tool in fertility experimental toxicology study. p 44-46.

**Frolich A., 1948**, Some factors affecting semen production in rabbits. *Primo. Congo intern. Physiopat. Reprod animal Fecund. artif*, Milano.

**Fuertes P.V., 2008**, Congelation De La Semence De Chien Prealablement Refrigeree : Etude Experimentale, thèse pour le diplôme d'état de docteur vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. P113.

**Fulbert J.C., Cals M.J., 1992**, Les Radicaux libres en biologie clinique. *Pathol. Biol.*, 49(1), p 66-77.

**Ganr S., Chen T., Yen Y., Wang B., Zhou M. et Davis Y., 2012**, préclinical study of the cyclodéxtrin-polymère conjugate of camptothecin CRLX101 for the treatment of gastric cancer. 8.72-730.2012.

**Gérard-Monnier D., Chaudière J., 1996**, Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion. *Path Biol*; 44: p 77-85.

**Gogol P., Bochenek M. et Smora Z., 2002**, Effect of rabbit age on sperm chromatin structure. *Reprod. Dom. Anim.*, 37, p 92-95.

**Gottardi L., 1993**, Conservazione a medio-lungo periodo de materiale seminale di coniglio. Mezzi di diluzione e temperature, *Rivista de Coniglicoltura* 5 ; p 31-38.

**Goudable J., Favier A., 1997**, Radicaux libres oxygénés et antioxydants, *Nutr Clin Medtabol*; 11: p 115-120.

**Grasse P.P., 1971**, Traité de Zoologie : Tome 17, Fasc 6 : Mamelles, Appareil génital, Gamétogénèse, Fécondation, Gestation.- Paris : Masson et Cie.1156 p.

**Gulcin I., 2012**, "Antioxidant activity of food constituents: an overview." Arch Toxicol. 86(3): p 345-391.

**Gutteridge J.M.C., 1995**, Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 41: p 1919-1928.

**Hansen C., 2011-2012**, La propédeutique de l'appareil de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme des ruminants. Université de Liège Faculté de Médecine Vétérinaire service de Thériogénologie des animaux de production. p12-25.

**Hafez E.S.E., 1960**, Sex drive in rabbits. *Southwestern Veterinarian*14, p 46-49.

**Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1990**, The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys ; 280: p 1–8.

**Halliwell B., 1996**, Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie*; 44:p 6-13.

**Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1999**, Free radicals in biology and medicine. 3rded. Oxford: Oxford University Press.

**Hermansson U. et Linde-Forsberg C., 2006**, Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*, 65, p 584-593.

**Hiroe K., Tomizuka T., 1965**, Effets d'un environnement à température élevée sur la production de sperme chez les animaux domestiques. (Jap.) – Bulletin of the National Institute of Animal Industry, Japan N° 9, 27-3S.

**Hoechst., 1992a**, Polyéthylenglykole. Communication of the Hoechst AG to the Deutsche Wissenschaftliche Gesellschaft für Erdöl, Erdgas und Kohle.

**Hoechst, 1992b**, Polyéthylenglykole. Product information, Hoechst AG.

**Holland M.K., Alvarez Juan G. et Storey Bayard T., 1982**, Production of Superoxide and Activity of Superoxide Dismutase in Rabbit Epididymal Spermatozoa; *Biology of reproduction* 27, p 1109-1118.

**Holt W.V., 2000**, Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, p 47–58.

IARC, 1999, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, vol. 71.

**Iguer-ouada M., Verstegen J., 2001c**, Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55,p 671-684.

**INCI., 2006**, International nomenclature of cosmetic ingredients, the International Cosmetic ingredients dictionary and hand book, 11<sup>th</sup> Edition, CTFA, Washington DC.

**Januel C., 2003**, stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabete. Etude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4, DEA de Biochimie (Université Lyon I / INSA-Lyon), N° 03 ISAL 0024.

**Johnston S.D., Root Kustriz M.V. et Olson P.N.S., 2001**, Semen Collection, Evaluation, and Préservation. In: Johnston S.D. (eds.). *Canine and feline theriogenology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, p 287- 306.

**Joly T., Theau C.M., 2000** , Reproduction et physiologie de la reproduction au 7ème Congrès Mondial de cuniculture, ISRA-FESIA ,31 place Bellecourt -69288 Lyon.

**Jordi R, Silvia M, Juan O, Inma P, Juan M., Vázquez, Emilio A. et Martineza. 2005**, Influence of constant long days on ejaculate parameters of rabbits reared under natural environment conditions of Mediterranean area.

**Katila T., Combes G.B., Varner D.D. et Blanchard T.L. 1997**, Comparison of three contains used for transport of cooled stallion semen. *Theriogenology*. 48: p 1085-1092.

**Knapp H.R., 1990**, Prostaglandins in human semen during fish oil ingestion, evidence for in vivo cyclooxygenase inhibition and appearance of novel therienoic compounds. *Prostaglandins*, 39, p 407-423.

**Kumi-Diaka J., Badtram G., 1994**, Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology*, 41, p 1355-1366.

**Lanigan R.S., 2001**, (CIR Expert Panel), «Final report on the safety assessment of PPG-11 and PPG-15 sterile ethers», *International Journal of Toxicology* 20 Suppl. 4 : p13-26.

**Lavara R., Maria P., Vidus De Castro, vicente J.S., 1999**, effet de nombre de spermatozoïdes sur la fertilité de la semence conservé 24h chez le lapin p 407-412.

**Lavara R., Mocé E., Lavara F., Viudes de Castro M.P., Vicente J.S., 2005**, Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*, 64, p 1130-1141.

**Lebas F., 1996**, Document Cuniculture : Biologie des lapins. Recherche INRA. [En ligne]. Accès internet : [www.cuniculture.info/Docs/.../biologie-01.htm](http://www.cuniculture.info/Docs/.../biologie-01.htm) (page consulté le 23/03/2014).

**Leeson C.R., Leeson T.S., 1970**, The postnatal development of the ductus epididymitis in the rabbit. *Canadian Journal of Zoology* 48, p 1147-1153.

**Leininger N.F., Clontz R., Gainer J.L. et Kirwan D.J., 2002**, in *Clean Solvents, Alternative Media for Chemical Reactions and Processing*, ed. M. A. Abraham and L. Moens, ACS Symposium Series 819, American Chemical Society, Washington, DC, p 208.

**Levilain P.N.M., 2005**, Essai d'optimisation de la conservation de la semence équine par réfrigération : étude comparative de deux protocoles de réfrigération à 15°C et 5°C. thèse pour le diplôme d'état de docteur vétérinaire, école national vétérinaire de nantes, 52 pages.

**Liebler D.C., Kling D.S. et Reed D.J., 1986**, Antioxidant protection of phospholipids bilayers by atocopherol. *J. Biol. Chem.* 2(51):p12114-12119.

**Linde-Forsberg C., 1995**, Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, 10, p 48-58.

**López F.J., Alvarino J.M.R., Del Arco J.A., Delgado F. et Ramiro J.L., 1996**, Effect of cooling temperature on 24 hours stored semen for artificial insemination of rabbits, t 6h World Rabbit Congress, Toulouse, Vo1. 2, p 79-81.

**Lopez F.J., Alvarino J.M.R., 1998**, ARTIFICIAL INSEMINATION OF RABBITS WITH DILUTED SEMEN STORED UP TO 96 HOURS. *World Rabbit Science*, VOL. 6(2), p 251-253.

**Lopez F.J., Alvarino J.M.R., 2000**, Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerated rabbit semen. *Animal Reproduction Science* 58. P 147-154.

**Lopez-Gatius F., Sances G., Sancho M., Yaniz J., Santolaria P., Gutie´rrez R., Nunez M., Nunez J. et Soler C., 2005**, Effect of solid storage at 15 8C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen; *Theriogenology* 64. P 252-260.

**Luzi F., Maertens L., Mijen P. et Pizzi F., 1996**, Effect of feeding level and dietary protein on libido and semen characteristics of bucks. In *Proc. 6th World Rabbit Congress*, July 1996, Toulouse, France, vol. 2, p 87-92.

**Mann T., Lutwak-Mann C., 1981**, Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids; application to andrological problems. In: Mann T., Lutwak-Mann C. (Eds.), *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p 269-326.

**Martinet L., 1973**, Quelques aspects de la physiologie de la reproduction du lapin. Conférence, Session ITAVI Toulouse, sept.

**Mates J.M., Perez-Gomez C. et Nunez De Castro I., 1999**, antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32: p 595-603.

**Mathur A.K., Srivastava R.S., Anil Joshi, et Rawat P.S., 1992**, Effect of pH and temperature on in vitro preservability of rabbit semen, *Indian J. Animal Sci.*62, p 144-146.

**Matthias Rath B.V., Frank kock, Sabine Dieks.** Etude clinique pilote sur la diminution naturelle du taux de cholestérol ; editeur : MR Publishing B.V.

**Mathur A.K., Srivastava R.S., Anil Joshi. et Rawat P.S., 1992**, Effect of pH and temperature on in vitro preservability of rabbit semen, *Indian J. Animal Sci.* 62. P 144-146.

**May D., Simpson B. et Kathleen., 1975**, Reproduction in the rabbit. *Animal Breeding Abstracts* vol. 43, n° 6, p 253-261.

**Mc Cord J.M., Fridovich I., 1988**, Superoxide dismutase: the first twenty years. *Free Rad Biol Med*; 5: p363-369.

**Mc Cord J.M., 1993**, Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem*; 26: p 351-357.

**Mercier P. et Rideaud P., 199**, Bactériologie du sperme frais de lapin. *Prod. Anim.*, 3(3), p 215-221.

**Michiels C., Raes M., Houbion A. et Remade J., 1991**, Association of antioxidant systems in the protection of human fibroblasts against oxygen derived free radicals. *Free Rad Biol Med*; 14: p 323-334.

**Milane H., 2004**, La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Université Louis Pasteur StrasbourgI.

**Minelli A., Moroni M. et Castellini C., 2001**, Isolation of the IGF-I protein complex from rabbit seminal plasma: effects on sperm mobility and viability. *J. Exp. Zoology*, 290: p 279-290.

**Mocé E., Lavara R., Lavara F. et Vicente J.S., 2000**, Effect of reproductive rhythm on seminal parameters from a rabbit line selected with high growth rate. In *Proc. 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain, Vol. A*, p 197-201.

**Mocé E., Purdy P.H. et Grahama J.K., 2009**, treating ram sperm with cholestérol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. published by Elsevier B.V.

**Mocé E., Vicente J.S., Lavara R., Viudes De Castro M.P., Lopez M. et Bolet G., 2005,** Characteristics of fresh semen from eight rabbit breeds. *Reprod. Domest. Anim.*, 40, p 388-398.

**Mocé .F., Pindy P.M. et Grahama J.K., 2010,** treating ram sperm with cholesterol- loaded cyclodextrins improves cryosurvival.

**Mukherjee B.P., Johari, 1951,** The Gelatinous Mass in Rabbit Semen. ISSN: 0028-0836. Volume 168. p 422-423.

**Needham D., Nunn R.S., 1990,** *Biophys J* ;58(4): p 997–1009.

**Nelson S.K., Bose S.K. et Mc Cord J.H., 1994,** The toxicity of high dose superoxide dismutase suggests that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the reperfused heart. *Free Rad Biol Med*; 16: p 195-200.

**Nohl H., 1994,** Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration. *Ann Biol Clin*; 52: p199-204.

**Nunes J.F., 1982,** Etude des effets du plasma séminal sur la survie “in vitro ” des spermatozoïdes de bouc, Paris. Université Pierre et Marie Curie ; (Thèse de Doctorat).

**Nyus D., et Kelly M., 1991,** Vitamin C and E donates single hydrogen atoms in vivo. » *FEBS letters* 284, (2), p 147- 151.

**O'Bryan M.K., Schlatt S., Phillips D.J., De Kretser D.M. et Hedger M.P., 2000,** Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinol.*, 141, p 238-246.

**Orgebin – Crist J., 1968,** *qeprod. Fertil.* 15 : S.

**Ott R.S., Goffaux M. et Thibier M., 1987,** Examen morphologique des spermatozoïdes. *El. et Ins.*, 221, p 15-20.

**Pancera Sabrina M., Luis H.M. Da Silva, Watson Loh, Rosangela Itri, Adalberto Pessoa J., Denise F.S. et Petri., 2002,** The effect of poly(ethylene glycol) on the activity and structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase in solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 26. p 291–300.

**Partyka A., Lukaszewicz E. et Nizanski W., 2012,** Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen, *Theriogenology* 77 : p 1497–1504.



**Perrier G., Thau-Clément M., Poujardieu B. et Delhomme G., 1998**, Essai de conservation de la semence de lupin pendant 72 h, 7<sup>e</sup> Journées de la recherche Cunicole en France, Lyon, pp. 237-240.

**Perrin H., Thaunat O., Malcus C., Badet L., Hennino A. et Codas R., 2009**, Touraine-Moulin F, Nicolas J et Morelon E. Immunoprotection by polyethylene glycol in organ preservation solutions is not due to an immunomasking effect. *Nephrol Dial Transplant* 1 of 4.

**Petitjean M., 1965**, Recherches sur l'estimation du pouvoir fécondant des coqs. Mémoire Ingénieur DPE, CNAM, Paris.

**Pietri S., Seguin J., D'Arbigny P. et Ulcasi M., 1994**, Ascorbyl free radical: a non invasive marker of oxidative stress in human open-heart surgery. *Free Rad Biol Med*; 16: p 523-528.

**Poisson C., 2013**, Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique.; innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué.

**Ponglowhapan S., Essen-Gustavsson B. et Linde-Forsberg C., 2004a**, Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*, 62, p 1498-1517.

**Pons H., Sion B., Saey F., Brugnion F. et Tonny L., 2009**, Rôles des dérivés actifs de l'oxygène(DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine. Quarantième journée thématique de la SFEF (37) , p 529- 535.

**Puppo A., Halliwell B., 1988**, Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. In homoglobin and biological Fenton reagent *Biochem*; 249: p 185-90.

**Pinto C.R., Paccamonti D.L., 1999**, Eilts BE: Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*. 52: p 609-616.

**Reimann J., 1974**, *Archiv d. Pharmacie*, 307, 321u. 328.

**Roberts M.J., Bentley M.D. et Harris J.M., 2002**, Chemistry for peptide and protein pegylation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: P 459 –476.

**Roca J., Martinez S., Vazquez J.M., Lucas X., Parrilla I. et Martinez E.A., 2000**, Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15 °C. *Anim. Reprod. Sci.* 64, p 103–112.

**Roger T., 2002**, *Anatomie comparée des Animaux de Laboratoire.*- Lyon : ENV. p 20.

**Rota A., Strom B. et Linde-forsberg C., 1995**, Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, 44, p 885-900.

**Rota A., Iguer-Ouada M., Verstegen J. et Linde-Forsberg C., 1999**, Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology*, 51, p 1045-1058.

**Salamon S., Robinson T.J., 1962**, Studies on the artificial insemination of Merino sheep. II. The effects of semen diluents and storage on lambing performance. *Aut. J. Agric. Res*; 13:271-81.

**Salles M.G.F., 1989**, Agua de coco (*cocus nucifera*) "in natura" sob forma de gel e estabilizada, como diluidor do sêmen caprino. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Mestrado(52p).

**Sauveur B. et De Riviers M., 1988**, Reproduction des volailles et reproduction d'œufs. INRA Edition, Paris :449 p.

**Sebbagh M., 1983**, Etude de la sexualité et de la reproduction du lapin domestique (*Oryctolagus cuniculus*) à des températures élevées en corrélation avec la régulation thermique, le comportement alimentaire et le fonctionnement thyroïdien et surrénalien en période d'adaptation au stress thermique.- Thèse : Méd vét : Dakar ; p 32 - 33.

**Seed J., Chapin R.E., Clegg E.D., Dostal L.A., Foote R.H., Hurtt M.E., Klinefelter G.R., Makris S.L., Perreault S.D., Schrader S., Seyler D., Sparando R. et Treine K.A., Veeramacheneni D.N.R., Wise L.D., 1996**, Method for the assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod. Toxicol.* 10: p237-244.

**Sehpard B., Shaffer J., 1993**, Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxidative damage. *Free Rad Biol Med*; 15: p 581-588.

**Servais S., 2004**, Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effet de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. L'université Claude Bernard – Lyon I.

**Shinkichi T. et Akira Y., 2004**, VEIN (Veterinary Exotic Information Network System) appareil uro-génital du lapin

**Stamler J.S., Slivka A., 1996**, Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr Rev*; 54: p 1-30.

**Stegmayr B., Ronquist G., 1982**, Stimulation of sperm progressive motility by organelles in human seminal plasma. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 16:p 85-90.

**Strazinger G.F., Maurer R.R. et Paufler S.K., 1971**, fertility of frozen rabbit semen. *J. reproduction. fertility*, 24, p 111-117.

**Strom-Holst B., Larsson B., Linde-Forsberg C. et Rodriguez-Martinez H., 2000**, Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zone pellucid binding assay. *Journal of Reproduction and Fertility*, 119, p 201-206.

**Togo T., Alderton J.M., Bi G.Q. et Steinhardt R.A., 1999**, The mechanism of facilitated cell membrane resealing. *J. Cell Sci.*, 112, p 719-731.

**Theau-Clément M., Lattaioli P., Roustan A. et Castellini C., 1996**, Reliability and accuracy of a computerized semen image analyses to evaluate various biological parameters in rabbit semen. in: *Proc. 6th World Rabbit Congr.*, Toulouse, Jul., vol. 2, p 139-143.

**Theau-Clément M., Brun J.M., Sabbioni E., Castellini C., Renieri T., Besenfelder U., Falières J., Esparbié J. et Saleil G., 2003**, Comparaison de la production spermatique de trois souches de lapins: moyennes et variabilités. In *Proc. 10èmes Journées Recherche Cunicole*, Paris, France, p 81-84.

**Totten G.E. et Clinton N.A. et Macromol J., 1988**, *Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.*, C28, 293.

**Totten G.E., Clinton N.A. et Matlock P.L. et Macromol J., 1998**, *Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.*, C38, 77.

**Trush M.A., Wilson M.E. et Van Dyke K., 1978**, The generation of chemiluminescence by phagocyte cells. *Method Enzymol*; p 57: 462.

**Tsutsui T., Tezuka T., Mikasa Y., Sugisawa H., Kirihara N., Hori T. Et Kawakami E., 2003**, Artificial insemination with canine semen stored at low temperature. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 65, p 307-312.

**Van Praag E., 2002**, Appareil reproducteur mâle du lapin et Orchidectomie (castration chirurgicale)., [http://www.medirabbit.com/FR/Skin./Fusobacterium\\_fr.pdf](http://www.medirabbit.com/FR/Skin./Fusobacterium_fr.pdf) (page consulté le 26/03/2014).

**Veeramacheneni D.N.R., Wise L.D. 1996**, Method for the assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod. Toxicol.* 10: p237-244.

**Veronese F.M., Largajolli R., Boccu E., Benassi C.A. et Schiavon O., 1985**, Activation of monomethoxy poly(ethylene glycol) by phenylchloroformate and modification of ribonuclease and superoxide dismutase, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 11 (1985) p 141–152.

**Verstegen J., Onclin K. et Iguer-ouada M., 2005**, Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender : in vitro and in vivo studies. *Theriogenology*, 64, p 720-733.

**Vitoux D., Chappuis P., Arnaud J., Bost M, Accominotti M. et Roussel A.M., 1996**, S616nium, glutathion peroxydase, peroxydes et fonctions plaquettaires. *Ann Biol Clin*; 54: p 181-187.

**Viudes De Castro M.P., Vicente J.S. et Lavara R., 1999**, Effet du nombre de spermatozoides sur la fertilité de la semence conservée 24 heures chez le lapin. *Ann. Zootech.* 48, p 407-412.

**Walter M.R., Martinet L. et Moret, Thibault C., 1968**, Régulation photopériodique de l'activité sexuelle chez le lapin mâle et femelle. *Archives d'Anatomie, d'Histologie et d'Embryologie normales et expérimentales*, Tome SI, Fasc.1/8, 77S-780.

**Wangenheim J. et Bolcsfoldi G., 1988**, «Mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase locus assay of 50 compounds», *Mutagenics* 3, no. 3: p 193-205.

**Watanab Y., Yamashita T., Yamashita M.I. et Adachi S., 2009**, Suppressive Effect of  $\alpha$ -Tocopherol Complexed with B-Cyclodextrin on the oxidation of Methyl Linoleate. *Food Sci. Technol.*

**Welsch U., 2002**, Précis D'histologie. Cytologie, Histologie, Anatomie Microscopique.- Tournai (Belgique) : éd Médicales internationales.- 260 p.

**Yamamoto Y., Shimamamoto K., Sofukitis N. et Miyagawa I., 1999**, Effect of hypercholesterolemia on Leydig and Sertoli cell secretory function and the overall sperm fertilizing capacity in the rabbit. *Human Reprod.*, 14, p 1516-1521.

**Zambelli D., Cunto M., 2006**, Semen collection in cats: Techniques and analysis. *Theriogenology*, 66, p 159-165.

**Zambelli D., Pratti F., Cunto M., 2008**, Quality and *in vitro* fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral cauterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, 69(4), p 485-490.

# *Annexes*

**Annexe N° 1 : Echelle utilisé pour déterminer la Motilité Massale d'après PETITJEAN, 1965.**

- 0- Pas de spermatozoïdes.
- 1- Spermatozoïdes immobiles.
- 2- Quelques spermatozoïdes agités, oscillants surplace.
- 3- Beaucoup de spermatozoïdes agités sans déplacement notable.
- 4- Quelques spermatozoïdes immobiles, quelques spermatozoïdes surplaces, quelques spermatozoïdes mobiles.
- 5- Comme(4) mais plus de spermatozoïdes mobiles, mobilité assez bonne mais pas homogène.
- 6-La quasi-totalité des spermatozoïdes se déplacent, motilité bonne et homogène.
- 7-Comme (6) avec amorce de mouvements de vagues.
- 8- Comme (7) avec mouvement de vagues lentes.
- 9-Vagues énergétiques, aspect de tourbillons, motilités excellente.

**Annexe N° 2 : Echelle utilisé pour déterminer la Motilité Individuelle d'après ADRIEU, 1974.**

- 0- Spermatozoïdes immobiles.
- 1- Les spermatozoïdes ont des mouvements de flagelles sans déplacement.
- 2- Les spermatozoïdes se déplacent lentement, les mouvements circulaires dominant.
- 3- Les spermatozoïdes ont des mouvements heurtés, leurs déplacements s'effectuent le long d'une hélice de diamètres sensiblement égale à leur longueur.
- 4- Les spermatozoïdes se déplacent rapidement le long d'une hélice de faible.

### **Résumé**

Un nouveau milieu de conservation contenant du Polyéthylène Glycol (PEG) a été étudié dans notre travail. Le but a été de définir le milieu optimal pour une meilleure conservation de la semence du lapin à une température de 4°C, pendant une durée de 24h.

Dans notre travail nous avons utilisé le Tris comme dilueur, et nous avons préparé des solutions contenant du PEG, de la VitE, et du CHL seuls ou associés en complexe (PEG-VitE, PEG-CHL et PEG-CHL-VitE). Le pourcentage de la mobilité des SPZ et leur vitesse en ligne-droite (VSL) dans ces six milieux sont comparés à ceux du Tris (milieu control).

Nous avons obtenu une meilleure conservation à 4°C avec les traitements : CHL, VitE et PEG-VitE qui ont toujours donné de meilleurs résultats de mobilité par rapport au control.

L'association de la Vit E avec le PEG a amélioré son effet antioxydant, en augmentant sa solubilité, ce qui s'est répercuté sur la mobilité des spermatozoïdes qui est mieux conservée dans ce milieu par rapport à celui de la Vit E seule.

**Mots-clés** : sperme, réfrigération, lapin, PEG.

### **Abstract**

A new medium of conservation containing the Polyethylene Glycol (PEG) was studied in our work, the goal was to define the optimal medium for a better conservation of the semen rabbit's at a temperature of 4°C, one duration of 24h.

In our study we have used the Tris like extender, and we have prepared solutions containing the PEG, the VitE, and the CHL alone or associated in complex (PEG-VitE, PEG-CHL and PEG-CHL-VitE). The percentage of the mobility of the SPZ and their straight- line velocity (VSL) in these six mediums are compared with those of the Tris (control medium).

We have obtained a better conservation at 4°C with the treatments: CHL, VitE and PEG-VitE which are always given better results of mobility compared to the control.

The association of Vit E with the PEG improved its antioxydant effect, by increasing its solubility, which was reflected on the mobility of the spermatozoïdes that is preserved better than in this medium compared to that of Vit E only.

**Key words**: sperm, refrigeration, rabbit, PEG.