

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**UNIVERSITÉ ABDERRAHMANE MIRA - BEJAIA**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département 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**

## *Thème*

*Optimisation de la conservation du  
Sperme de Lapin par  
Congélation*

*Présenté par :*

**M<sup>elle</sup> : BOUHALA Samia**

**M<sup>elle</sup> : BOUKERRAM Nouria**

*Membres de jury :*

**Président: M<sup>r</sup> NAÏT MOULOUD -M.**

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

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

**Examinatrice: M<sup>me</sup> MOUHOUB -C.**

**Examinatrice: M<sup>me</sup> KEBBI -M**

**2013-2014**



# *Remerciements*

*Nos sincères remerciements à Dieu le tout puissant pour le courage, la force, la volonté, la persévérance, et la santé qu'il nous a donné afin de réaliser ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier du fond du cœur nos parents qui ont su nous donner une bonne éducation qui nous a permis d'arriver à ce stade d'études.*

*Comme nous remercions notre Promotrice M<sup>me</sup>TALBI pour son encadrement, pour toutes les choses qu'elle nous a appris, ses efforts, son aides, ses précieux conseils, ses exigences de faire un vrai travail de recherche scientifique, ainsi que notre Co-promoteur M<sup>s</sup> IGUER-OUADA pour les informations qu'il nous a communiquées tout au long de notre travail.*

*On tien également à remercier les membres de jury : Mr Nait mouloud, M<sup>me</sup> Mouhoub, M<sup>me</sup> Kebbi d'avoir accepté de juger ce modeste travail.*

*Nos s'incères remerciement à Mr Fatmi S. du département de génie des procédés de l'université de Béjaia, à Mr Nabi B. du l'université de Médea et au directeur de l'Institut National de La Recherche Agronomique d'Algerie-Bejaia-Oued-Ghir "Mr TARIKT A.Z." et à tous l'ensemble du personnel du centre.*

*Nous ne manquerons pas de remercier particulièrement Mr MANSOURI H.*

*Sans oublier l'ensemble du corps enseignant de l'université de Bejaia qui nous a encadrés tout au long de notre cycle universitaire*

*Enfin, nous remercions tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*



*Samia et Nouria*

# Dédicaces

*En ce moment chaleureux dans ma vie, je tiens à remercier*

*Tout d'abord le bon DIEU le tout*

*Puissant qui ma procuré du courage et de la volonté pour réaliser*

*Ce modeste travail que je dédié :*

*A mon cher père qui a été un exemple pour moi, et qui a veillé à ma réussite*

*A ma chère maman qui m'a appris à être une femme,*

*Je la remercie pour ses sacrifices à réussir notre éducation.*

*A mes chers frères : Mounir, Habib, Ferhat et Djahid.*

*Qui m'ont beaucoup soutenu, sans oublier mes très chères sœurs :*

*Wahiba (Son marie Toufik) et Dina*

*Que j'aime pour leurs encouragements et leur aide*

*A mon fiancé Hakim pour sa confiance, son encouragements*

*Et Sa patience et toute sa famille.*

*A ma binôme SAMIA et sa famille,*

*A toutes mes cousines et à mes amies: Nozha, Bicha, Samia, Kahina, Mamel, Dalal, Algia et Lamia.*

*Khali Ldjoudi, Athmane, Salwa, Chafia, Yassmina,*

*ET surtout Khalti Farida et mon ancle Pour leur aide,*

*A toutes la promotion de biotechnologie et de reproduction animale*

*2013/2014 et à toutes qui ont aidé de près ou de loin.*

NOURIA  
NOURIA



# *D*edicaces

*Avec les sentiments de la plus profonde humilité, je dédie ce modeste travail :*

*À mes très chers parents, symbole de courage, de patience et de tendresse. Je ne saurais vous rendre le centième de ce que vous m'avez donné. Et que ce travail est en partie le fruit de leur soutien, encouragement. que dieu les protège et les garde pour nous.*

*À mon très cher mari <<Ammar>>, je ne pourrai jamais assez te remercier pour la joie que tu me fais sentir, pour ton énergie, ton humour et ton soutien, je te souhaite tout le bonheur de monde et que dieu le guide toujours dans le bon chemin.*

*À mes chères sœurs : Nadia, Nouara,*

*Louisa et chère mari Saddek,  
Karima et cher mari Ghani.*

*À mes chers frères : Salah et sa fiancée Sabrina.*

*Zahir, sa femme Noura.*

*À mes chères nièces : Niniche, Niha, Douda, Thiziri, Siham.*

*À mes chers neveux : Alinas et Anis.*

*À tout ma 2<sup>ème</sup> famille.*

*À mes amies : Nozha, Karima, Malika, Naima, Zahia, Sabrina, Bahia, siham,*

*Dalila, Rbiha, Widad, Touta, Nissa, Wissam.*

*À mon chère binôme, amie et sœur Nouria la personne dont j'ai partagée la réalisation de ce travail.*

*À toute la promotion de 2<sup>ième</sup> année Master R.B.A. 2014 surtout mes meilleurs amis*

*Nawel et Alla-eddin.*

# SAMIA







## **SOMMAIRE**

<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Listes des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Introduction</b>	<b>1</b>

### **Partie 1: Partie bibliographique**

#### **Chapitre I: Généralité sur la reproduction des lapins**

<b>I. Généralité sur les lapins</b>	<b>2</b>
I.1. Définition des lapins	2
I.2. L'alimentation et l'eau	2
I.2.1.L'alimentation	2
I.2.2.L'eau	2
<b>II. la reproduction chez le lapin</b>	<b>2</b>
II.1.Généralité	2
II.2.Anatomie et physiologie de l'appareil génitale du mâle	2
II.2.1.Les testicules	3
II.2.2.Les épидидymes	3
II.2.3.les canaux déférents	3
II.2.4.Les glandes annexes	3
II.2.5.Les voies externes d'excrétion et l'organe copulateur	4
II.3. La physiologie de la reproduction	5
II.3.1. Le développement des gonades et la puberté	5
II.3.2.La spermatogenèse	5
II.3.3.La fertilité du mâle	5
II.4.Le sperme du lapin	5
II.4.1.La composition du sperme	6
II.4.1.1.Les spermatozoïdes	6
II.4.1.2.Le plasma séminal	6
II.4.1.3.Le gel	7
II.4.2.Les caractères du sperme	7
II.4.2.1.La couleur	7

## *Sommaire*

---

II.4.2.2.Le volume	7
II.4.2.3.Le pH	7
II.4.2.4.La motilité massale	7
II.4.2.5.La motilité individuelle	7
II.4.2.6.La concentration	8
II.4.2.7.La viabilité	8
II.4.2.8.La morphologie	8
<b>III. Les méthodes de collecte du sperme</b>	<b>10</b>
III.1. La collecte par électro-éjaculat	10
III.2. La collecte par vagin artificielle	10
<b>IV. Les facteurs influençant sur la production et la qualité du sperme</b>	<b>10</b>
IV.1.La fréquence de la collecte	11
IV.2. L'âge et la race	10
IV.3. La santé	11
IV.4.L'alimentation	11
IV.5. La photopériode	11
IV.6. La température	12

## **Chapitre II : Le stress oxydatif**

<b>I. Définition de stress oxydatif</b>	<b>13</b>
I. Définition de stress oxydatif	13
I.1. L'espèce réactive oxygène(ERO)	13
I.1.1.Un radical libre	14
I.1.1.1. Un radical libre superoxydé ( $O_2^{\cdot-}$ )	14
I.1.1.2. Un radical libre hydroxyle ( $\cdot OH$ )	14
I.1.2. Les peroxydes d'hydrogènes ( $H_2O_2$ ) non radicalaire	14
I.1.3. La sources des espèces réactives oxygénées	14
I.2. Système antioxydant	14
I.2.1. Système antioxydant enzymatique	15
I.2.2. Système antioxydant non enzymatique	15
<b>II. Le stress oxydatif et le sperme</b>	<b>16</b>

## **Chapitre III: Conservation de sperme du lapin**

<b>I. Polyéthylène-glycol (PEG)</b>	<b>18</b>
-------------------------------------	-----------

## *Sommaire*

---

I.1. Définition	18
I.2. Structure et propriété	18
a. Structure	18
b. Propriété	19
I.3. La toxicité	20
a. Toxicité les animaux	20
b. Toxicité pour l'homme	20
I.4. Le rôle de PEG	21
I.5. Application de PEG	21
a. Domaine pharmaceutique	21
b. Domaine cosmétique	21
c. Environnement	21
<b>II. La vitamine E</b>	<b>22</b>
II.1. Définition et structure	22
II.2. Rôle de la vitamine E	22
a. Rôle antioxydant	22
b. Stimulation des défenses immunitaires	23
c. Synthèse de l'hème	23
d. Respiration cellulaire	23
<b>III. Cholestérol</b>	<b>23</b>
III.1. Définition et rôle	23
III.2. La structure du cholestérol	23
III.3. Le cholestérol et la membrane	24
<b>IV. Conservation de sperme</b>	<b>24</b>
IV.1. A l'état frais " réfrigération "	24
IV.2. La congélation	25
IV.2.1. Historique	25
IV.2.2. Principes généraux	25
IV.2.2.1. Utilisation des dilueurs	25
IV.2.2.1.1. Les caractéristiques du milieu de dilution	25
IV.2.2.1.2. La composition des dilueurs	26
a. Le jaune d'œuf	26
b. Les antibiotiques	26
d. Ethylène-glycol(EG)	27

## *Sommaire*

---

e. Glycérol	27
IV.2.3. Les étapes de la congélation	27
II.2.3.1. Equilibration	27
II.2.3.2. Conditionnement	27
II.2.3.3. Congélation	27
a. La vitesse de refroidissement	27
b. La position des paillettes	28
II.2.3.4. Décongélation	28
IV.2.4. Les conditions de la congélation-décongélation	28
a. La nature du sperme	28
b. La température	28
c. Dilution	28
d. Incubation	28
IV.3.5. Protocole de la congélation chez le lapin	29
IV.3.6. Les différents protocoles de la congélation du sperme de lapin	29

## **Partie 2: Partie expérimentale**

### **Chapitre I: Matériels et méthodes**

<b>I. Objectif</b>	<b>31</b>
<b>II. Matériel et méthodes</b>	<b>31</b>
II.1. Animaux et condition d'élevage	31
<b>III. La récolte de semence</b>	<b>33</b>
III.1. la récolte au Vagin artificiel	33
III.1.1. Préparation du vagin artificiel	33
a. Le matériel	33
b. La méthode de préparation du vagin artificiel	33
III.1.2. La collecte du sperme	34
a. Matériel	34
b. Méthode de la collecte	34
III.2. La dissection de l'épididyme	35
a. Le matériel	35
b. La méthode de dissection	35
c. La récolte de la semence	36

<b>IV. L'analyse du sperme</b>	<b>36</b>
IV.1. Analyse macroscopique	37
IV.2.L'analyse microscopique	37
a. Matériel	37
b. Les méthodes	39
<b>V. La conservation du sperme du lapin</b>	<b>40</b>
a. Les milieux de la conservation du sperme	40
b. La préparation des milieux de conservation	41
V.1. La congélation	41
a. Matériels	41
b. Méthode	42
V.2. Décongélation des paillettes	42
a. Le matériel	42
b. La méthode	42
V.3. L'Analyse de la semence décongelée	<b>42</b>
<b>Chapitre II: Résultats et discussions</b>	
<b>I. Caractéristique du sperme frais</b>	<b>44</b>
I.1. Analyse macroscopique	44
I.2. Analyse microscopique	45
<b>II. Caractéristiques de sperme conservé</b>	<b>47</b>
II.1. Température ambiante	48
II.2. congélation-décongélation	53
<b>Conclusion générale</b>	<b>55</b>
<b>Référence bibliographique</b>	

*Liste des abréviations*

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**C**: concentration

**°C**: Degré Celsius

**CAT**: La Catalase

**CHL** : Cholestérol

**Cu/Zn-SOD**: Superoxyde dismutase aux ions cuivre et zinc

**ERO**: Espèces réactifs d'oxygène(ROS : Reactive Oxygen Species)

**I.N.R.A.A** : Institut National de la recherche Agronomique Algérie

**PI**: Pièce Intermédiaire

**Spz** : Spermatozoïde

**T** : Temps

**VIT E** : Vitamine E

**VSL**: vitesse progressive linéaire

**µm/sec**: micromètre/seconde

**µl**: microlitre

**♂**: Mâle

## ***LISTE DES FIGURES***

<b>N°</b>	<b>TITRE</b>	<b>PAGE</b>
1	Structure interne du testicule et de l'épididyme des lapins	3
2	L'appareil génital du lapin male (vue dorsale)	4
3	Diagramme représentant la structure de la tête du spermatozoïde du lapin	6
4	Spermatozoïde du lapin	8
5	les anomalies de la tête	9
6	les anomalies de la pièce intermédiaire	9
7	les anomalies de la queue	10
8	Composantes de la balance entre les molécules anti- et pro-oxydantes	13
9	Système de défenses enzymatiques présentes au niveau des spermatozoïdes et du plasma séminal	16
10	Les différentes structures de PEG : 1-PEG ramifié. 2-PEG linéaire se terminant par une ramification. 3-PEG ramifié se terminant par des ramifications secondaires	18
11	Structure des tocotriénols	22
12	Structure du cholestérol	24
13	Mécanismes de la protection du spermatozoïde avec le jaune d'œuf	26
14	Le clapier de l'I.N.R.A	31
15	Les cages individuelles des lapins gardés à l'université.	32
16	Le matériel nécessaire pour la préparation du vagin artificiel	33
17	La collecte de la semence	34
18	Photographie des étapes de préparation de vagin artificiel.	35
19	La trousse de dissection	35
20	L'épididyme et le canal déférent nettoyés	36
21	La collecte du sperme épидидymaire	36
22	Photographie d'un bain marie.	37
23	Matériel nécessaire pour l'analyse microscopique	38
24	Les solutions nécessaires pour l'analyse	39
25	Le matériel nécessaire pour la congélation	42
26	Photographie de l'analyseur informatique du sperme.	43
27	Histogramme représentant les vitesses progressives (VSL) des spermatozoïdes à une température ambiante à T <sub>0</sub> dans les milieux de conservation utilisés	48

## *Liste des figures*

---

<b>28</b>	Histogramme représentant les vitesses progressives (VSL) des spermatozoïdes à une température ambiante à T=1H30 mn dans les milieux de conservation utilisés	49
<b>29</b>	Histogramme représentant les vitesses progressives (VSL) des spermatozoïdes à une température ambiante à T=17h mn dans des milieux de conservation utilisés	50
<b>30</b>	Histogramme représentant les vitesses progressives (VSL) des spermatozoïdes à une température ambiante à T=24h mn dans des milieux de conservation utilisés	50
<b>31</b>	Histogramme représentant les vitesses progressives (VSL) des spermatozoïdes à une température ambiante à T=48H mn dans les milieux de conservation utilisés	51
<b>32</b>	Histogramme représentant le pourcentage des spermatozoïdes mobiles conservés à T ambiante dans les sept milieux utilisés, analysés à différent temps	52
<b>33</b>	Histogramme représentant les vitesses(VSL) des spz après la congélation-décongélation dans les milieux de conservation utilisés	53

## ***LISTE DES TABLEAUX***

<b>N°</b>	<b>TITRE</b>	<b>PAGE</b>
<b>I</b>	Les caractéristiques du PEG à différentes masses molaires	19
<b>II</b>	Les caractéristiques des lapins de l'INRA	32
<b>III</b>	Les caractéristiques des lapins de l'université	32
<b>IV</b>	Caractères macroscopiques de sperme des lapins étudiés	44
<b>V</b>	Caractéristiques microscopiques du sperme des lapins étudiés	45
<b>VI</b>	Caractéristiques morphologique du sperme des lapins étudiées	46

## *Introduction*

---

La biotechnologie animale est un ensemble de techniques mises au point à partir des connaissances acquises sur le génome, la reproduction et le développement embryonnaire. Les biotechnologies de la reproduction incluent des techniques comme, la fécondation in vitro, le clonage ou la transgénèse, l'insémination artificielle, le transfert d'embryons, le sexage et la cryoconservation d'embryons et de gamètes (**Bidanel et al., 2003**).

La cryoconservation correspond à la préparation d'une suspension de cellules en vue de son stockage à une température inférieure à -80°C. Cette procédure permet la conservation de cette suspension pendant plusieurs années et son utilisation après réchauffement à la température corporelle (**Amann, 1998**). Au cours des 50 dernières années, la réfrigération et la congélation des spermatozoïdes ont donné lieu à un nombre important de travaux permettant d'améliorer nos connaissances en matière de conservation in vitro du sperme. Les méthodes de réfrigération et de congélation vont encore évoluer : nouvelles techniques, nouveaux dilueurs, nouveaux conditionnement de la semence, etc (**Decuadro- Hansen, 2004**).

La cryoconservation du sperme de lapin est une méthode très intéressante car elle a des bénéfices. Elle permet, tout d'abord, la conservation du matériel génétique des reproducteurs, ainsi que des échanges internationaux des espèces, car dans certains pays, il est difficile d'introduire des animaux à cause des règles sanitaires et du coût, elle peut être acheminée sur de longues distances dans des petits containers d'azote liquide qui conservent la semence à -196°C.

Enfin, cette méthode permet d'éviter le contact physique entre deux partenaires ce qui limite la transmission de maladies telles que l'herpès (**Boiti et al., 2005**).

Dans une première partie, nous présentons des rappels bibliographiques sur l'appareil génital du lapin, sur sa semence et sur les protocoles de la cryoconservation de cette semence. Dans la deuxième partie, nous proposons d'essayer de nouveaux milieux dans la conservation du sperme du lapin, mis à la température ambiante et congelé.



## **I. Généralités sur les lapins**

### **I.1. Définition des lapins**

Le lapin est un mammifère lagomorphe, herbivore et très prolifique. Il vivait et vit encore à l'état sauvage en Europe de sud et il a été domestiqué depuis environ 500-600 ans seulement (Yaou et al., 2007).

### **I.2. L'alimentation et l'eau**

Tous les lapins doivent avoir un régime alimentaire complet qui répond à leurs besoins nutritionnels le long de leur vie (Pagé et al., 2013).

#### **I.2.1. L'alimentation**

Les lapins doivent avoir accès à de la nourriture saine et de qualité chaque jour. Le régime alimentaire des lapins ne doit pas contenir d'aliments pouvant occasionner des maladies ou des souffrances.

Les mâles reproducteurs doivent avoir un régime alimentaire équilibré qui permet de les maintenir en bon état physique (Pagé et al., 2013), Ces mâles doivent recevoir un aliment granulé de commerce avec un anticoccidien à raison de 170g par animal et par jour, cette quantité est proche de celle consommé lorsque l'aliment est distribué ad libitum. L'aliment titre en moyenne 16% de matière azotés totale et 16% de cellulose brutes (Benchiekh, 1995).

#### **I.2.2. L'eau**

A côté de la nourriture les lapins doivent avoir de l'eau potable et fraîche (inférieure à 30 °c) en tout temps. Le pH de l'eau doit être légèrement acide (6,2 à 6,8) (Page et al., 2013).

## **II. la reproduction chez le lapin**

### **II.1. Généralité**

La reproduction joue un rôle privilégié, elle rassemble un grand nombre de caractères qui se combinent de manière spécifique pour former la carrière reproductive (Bolet et Bodin, 1992).

### **II.2. Anatomie et physiologie de l'appareil génitale du mâle**

L'appareil génital du mâle situé postérieurement s'exteriorise par des bourses peu marqué par rapport à d'autres mammifères, cet appareil est essentiellement composé de: voies externes d'excrétion, organe copulateur, épидидymes, canaux déférents, glandes annexes et testicules.

### II.2.1. Les testicules (Figure1)

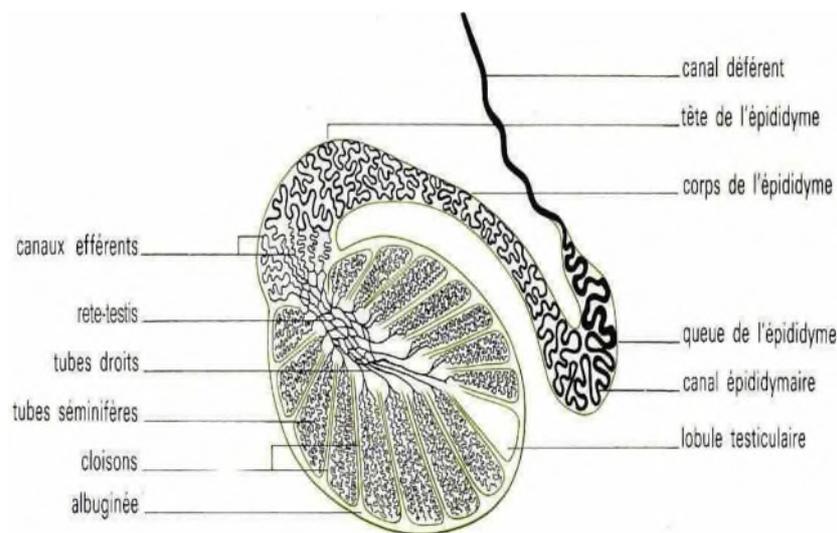
Les testicules sont placés dans des sacs scrotaux qui sont restés en communication avec la cavité abdominale, où ils étaient à la naissance (**Lebas et al., 1996**).

Ils sont volumineux, ovoïdes et très allongés. Pendant l'accouplement, ils sont fortement tuméfiés et font saillie. Ils ont pour rôle d'élaborer les spermatozoïdes.

Les testicules peuvent monter dans la cavité abdominale (lors de frayeurs notamment) et redescendre dans la bourse grâce à un tissu musculaire: le crémaster (**Boussit, 1989**).

### II.2.2. Les épидидymes (Figure1)

Ils sont contigus au bord, supérieur des testicules et permettent le transport et la maturation des spermatozoïdes. Chaque épидидyme est constitué de trois parties : la tête, le corps et la queue. La tête volumineuse coiffe le pôle antérieur du testicule. Le corps est également accolé au testicule jusqu'à sa partie postérieure. L'épididyme se termine par la queue, libre, légèrement renflée qui est le lieu de stockage des spermatozoïdes (**Boussit, 1989**).



**Figure 1** : Structure interne du testicule et de l'épididyme des Lapins (**Bonnes et al., 1988**).

### II.2.3. les canaux déférents

Le canal déférent est la suite de la queue des épидидymes. Il permet d'acheminer les spermatozoïdes vers un renflement fusiforme, l'ampoule différentielle couchée au dessus de la vessie (**Boussit, 1989**).

### II.2.4. Les glandes annexes (figure 2)

Elles ont pour rôle de sécréter différents milieux constituant le liquide séminal lors de l'éjaculation. Elles ont plusieurs types :

-une vésicule séminale impaire mais bilobée à son extrémité antérieure. 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 séminalis (**Sabbagh, 1983**).

-Une glande vésiculaire, située dorsalement à la vésicule séminale et possède deux canaux excréteurs qui s'ouvrent dans l'urètre (**Boussit, 1989**).

-La prostate, glande accessoire de l'appareil génital, oblongue et volumineuse, située sous la glande vésiculaire, s'ouvrant par quatre à six conduits dans l'urètre.

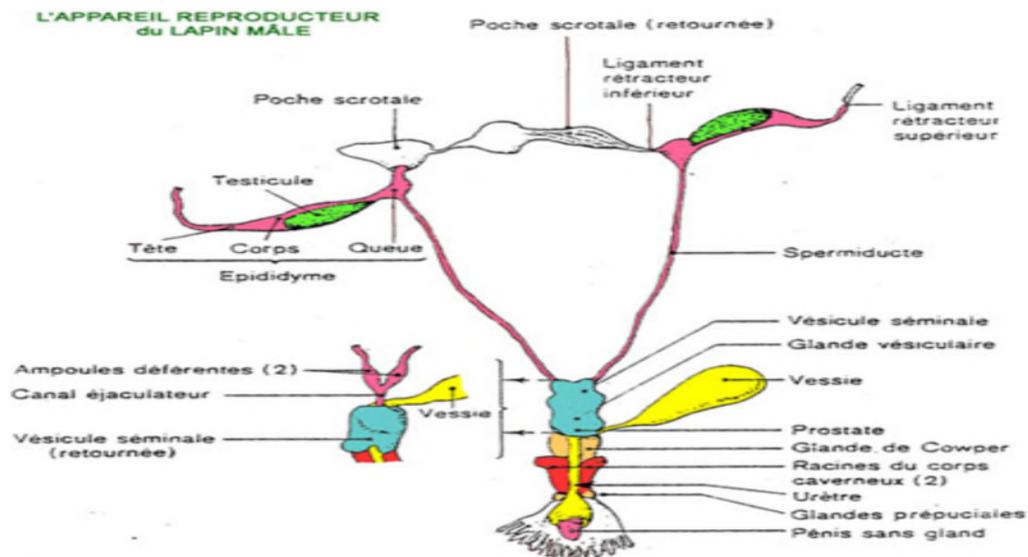
-Les glandes para prostatiques, situées latéralement aux ampoules différentielles et même parfois, à la vésicule séminale (**Boussit, 1989**).

-Enfin, la glande bulbo-urétrale ou glande de COWPER, bilobée, située postérieurement à la prostate, s'ouvrant par deux paires de canaux dans l'urètre caverneux (**Boussit, 1989**).

### II.2.5. Les voies externes d'excrétion et l'organe copulateur (figure 2)

Le pénis est court, dirigé obliquement en arrière, mais se porte en avant lors de l'érection (**Lebas, et al., 1996**). Il mesure de trois à cinq centimètres de long. L'urètre extra-pelvien ne possède pas de renflement érectile (**Boussit, 1989**).

Deux glandes préputiales, sécrétant une substance très odorante, sont situées en arrière du pénis. Elles jouent un rôle dans le déclenchement de l'ovulation chez la femelle en stimulant le réflexe ovulatoire (**Boussit, 1989**).



**Figure 2:** L'appareil génital du lapin male (vue dorsale) (**Lebas et al., 1996**).

## **II.3. La physiologie de la reproduction**

### **II.3.1. Le développement des gonades et la puberté**

La différenciation des gonades commence le 16<sup>e</sup> jour qui suit la fécondation. Après la naissance, les testicules se développent moins vite que le reste du corps, puis connaissent une croissance extrêmement rapide après l'âge de cinq semaines. Les glandes annexes ont une croissance de même type mais légèrement décalée dans le temps et plus tardive (**Lebas et al., 1996**).

Pour certains auteurs, la puberté chez le mâle est le stade à partir duquel l'éjaculat possède les mêmes caractéristiques physiques et chimiques que chez l'adulte. Un tel stade est atteint à partir de l'âge de 24 semaines chez le lapin Néo-Zélandais blanc et coïncide alors, en termes de reproduction, à la maturité sexuelle ou période d'apparition de spermatozoïdes tout à fait viables dans le sperme (**Sabbagh, 1983**).

### **II.3.2. La spermatogenèse**

La spermatogenèse c'est la phase de production de spermatozoïdes matures haploïdes, (à 1n chromosomes) 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**). Elle dure entre 40 et 50 jours (**Lebas et al., 1996**).

### **II.3.3. La fertilité du mâle**

La fertilité du lapin peut être distinguée par l'évaluation de la production du sperme par le testicule ou bien par la quantité des spermatozoïdes produits par le testicule, le comportement sexuel du mâle s'il commence à chevaucher la femelle ou non et la qualité du sperme produit (**Boussit, 1989**).

## **II.4. Le sperme du lapin**

Le sperme des animaux contient essentiellement des spz et du plasma séminal mais chez certains animaux comme le lapin, contient en plus de ces composants un autre élément essentiel qui est le gel (**Boussit, 1989**).

## II.4.1. La composition du sperme

### II.4.1.1. Les spermatozoïdes

La forme du spermatozoïde du lapin est similaire à celui d'autres mammifères. La tête est ovoïde ces dimensions sont environ 7 x 4 x 0,5 µm. La longueur de la queue est de 45 µm.

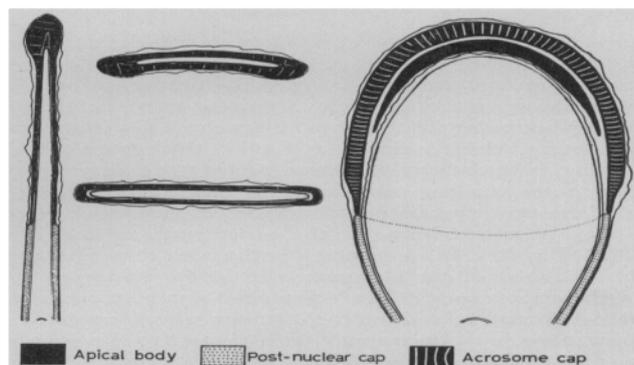
Le plafond de l'acrosome est situé sur le dessus de la tête pour les trois quarts de sa mesure et présente une augmentation le long de son bord.

La section longitudinale de la tête du spermatozoïde du lapin montre une chromatine nucléaire très compacte entourée par le complexe de l'acrosome. Le complexe anoxémie composé de deux microtubules centraux et 9 doublets périphérique de microtubules entourés de 9 fibres accessoires (**Castellini et al., 2005**).

Les spz matures se divisent en deux parties :

1- La tête (fig 3), contient l'acrosome qui est aplatie et couvre ses deux tiers antérieurs. L'acrosome est constitué essentiellement de glycoprotéines et d'enzymes intervenant lors de la fécondation.

2-la queue, divise le en deux, la pièce intermédiaire qui renferme la majorité des mitochondries de la cellule, ces constituants sont le siège de la production énergétique nécessaire au mouvement. Et le flagelle qui est l'organe moteur responsable du déplacement du spz (**Boussit, 1989**).



**Figure 3:** Diagramme représentant la structure de la tête du spermatozoïde du lapin (**Bedford, 1964**).

### II.4.1.2. Le plasma séminal

Le plasma séminal est constitué d'un mélange des sécrétions de l'épididyme et des glandes annexes. Il est composé d'une partie fluide et l'autre gélatineuse. Il assure le transport des gamètes lors de l'éjaculation et assure aussi d'autres rôles biologiques. Son pH varie entre 6,8 et 7,3 alors que la pression osmotique semble proche de 308 milliosmose.

Le plasma par sa composition peut radicalement modifier les caractéristiques de la semence (**Boussit, 1989**).

### **II.4.1.3. Le gel**

Ce gel est mico-gélatineux sécrété par les glandes annexes, il est plus ou moins consistant, transparent et peu soluble. Ce gel pose un problème lors de la dilution c'est pour cela il faut l'enlèvement de l'autre fraction spermatique par le glissement le long de la paroi du tube soit par une pipette pasteur, soit par une paille.

La présence ou l'absence de gel doit être notée pour caractériser l'éjaculat et le mâle (**Boussit, 1989**).

## **II.4.2. Les caractères du sperme**

### **II.4.2.1. La couleur**

La couleur du sperme du lapin est généralement blanchâtre, son opacité dépend principalement de la concentration spermatique. Cette couleur peut être modifiée par la présence d'autres éléments anormaux comme la couleur jaune liée à la présence d'urine, la couleur grise liée à la précipitation au fond du tube ou bien la couleur rougeâtre ou rose liée à la présence du sang (**Boussit, 1989**).

### **II.4.2.2. Le volume**

La mesure du volume du sperme s'effectue par plusieurs méthodes, certains auteurs utilisent un tube de collecte calibré ou gradué après l'enlèvement du gel (**Boussit, 1989**), Le volume de la semence varie entre 0.3 et 6.0 ml (**Alvarino, 2000**).

### **II.4.2.3. Le pH**

Le pH est mesuré directement après la collecte de la semence en utilisant un pH mètre (**Najjar et ben mrad, 2013**). Le pH de la semence varie entre 6.8 et 8.4 ; il est considéré comme un bon index pour estimation de la qualité du sperme (**Alvarino, 2000**).

### **II.4.2.4. La motilité massale**

Représente les mouvements de la masse des spz, elle s'évalue par observation microscopique d'une goutte de sperme brute sur une lame (**Bencheikh, 1995**), l'observation se fait au grossissement (x10) (**Najjar et Ben Mrad, 2013**). Une note de 0 à 9 est attribuée selon l'échelle de **Petitjean (Boussit D., 1989)**.

### **II.4.2.5. La motilité individuelle :**

La motilité individuelle est le mouvement de chaque spz. Pour mesurer la motilité, la semence fraîche sera diluée par la solution Tris-buffer (Tris- acide citrique –glucose). La dilution est de (1:5), La motilité est mesurée à 37°C sous microscope à grossissement (x40) (**Najjar et Ben Mrad, 2013**). Une note est de 0 à 4 attribuée selon l'échelle d'Adrieu de 0-4 (**Boussit, 1989**).

#### II.4.2.6. La concentration

La concentration du sperme est le nombre de spz dans un ml de sperme. La dilution se fait par une solution de fixation contenant 10 ml de formol à 35% v/v dans 1 L de NaCl à 0,9% (Ariola J. et al., 2001). Boussit D., 1989 a montré que la précision est optimale pour une dilution de 1/200. La concentration varie entre 300 et 700 x 10<sup>6</sup> spz/ml. Le comptage se fait par une cellule hématométrique, exemple cellule de Thoma (Raphaël et al., 2004).

#### II.4.2.7. La viabilité :

Une coloration vitale à l'éosine-nigrosine permet de classer les spermatozoïdes qui sont morts ou vivants après de dénombrement de 200 spz. Les spermatozoïdes morts ont leur membrane perméable et prennent une coloration rosée. Les spermatozoïdes vivants ont une membrane imperméable et apparaissent incolores (Alvarino, 2000). Le colorant le plus utilisé est l'éosine-nigrosine car il présente l'avantage de permettre l'évaluation de la morphologie et la viabilité des spz.

La viabilité peut être testée par la méthode de HOST qui concerne principalement la membrane de la queue du spermatozoïde. C'est un test de gonflement hypo-osmotique, il mesure la réponse de la membrane des spermatozoïdes à un milieu hypo- osmotique (Theau-Clément, 2005).

#### II.4.2.8. La morphologie

La morphologie du spermatozoïde du lapin est déterminée par la réalisation d'un frottis après coloration à l'éosine-nigrosine qui permet de classer les spermatozoïdes normaux (figure 4) et anormaux. La morphologie des spermatozoïdes sera détectée par l'analyse microscopique (100x),

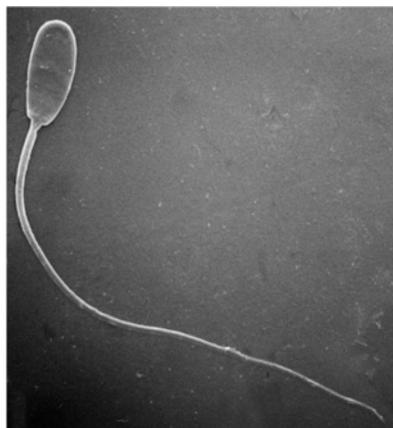
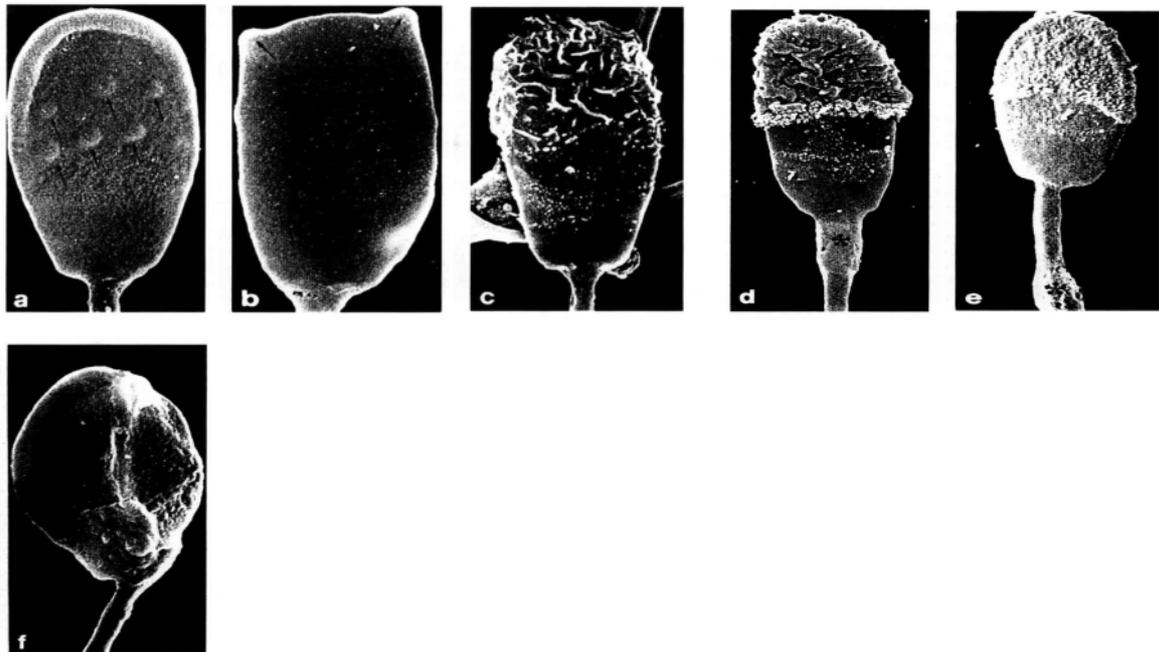
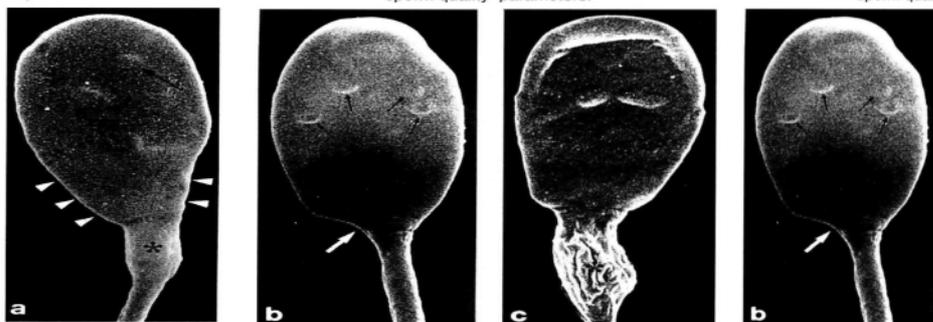


Figure 4 :Spermatozoïde du lapin (LEBAS, 2010)

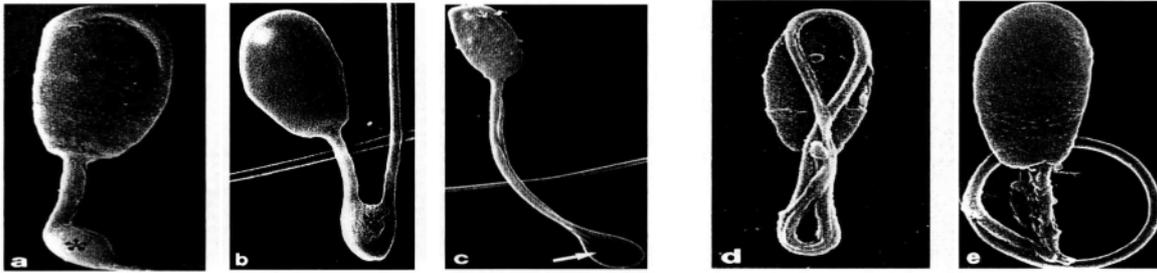
Les anomalies morphologiques sont classées comme primaire et secondaire (**Johnston et al., 2001**) comme il est cité dans les figures suivantes :



**Figure 5:** les anomalies de la tête: **a**-acrosome contient plusieurs gonflement, **b**-double acrosome, **c**-acrosome déformé, **d**-acrosome rétracté avec des cordes gonflé, **e**-acrosome vésiculaire contient des gouttelettes, **f**-double têtes. (**Morera et al., 1996**)



**Figure 6:** Les anomalies de la pièce intermédiaire : **a-b** PI déformé, **c**- PI réduit, **d**-gonflement de la PI. (**Morera et al., 1996**)



**Figure 7:** les anomalies de la queue: **a, b-** la queue contient des gouttelettes, **c-** l'extrémité de la queue ressemble à une spatule, **d-** la queue contient double cordes, **e-** la queue particulièrement enroulée, **f-** double queue (Morera et al., 1996).

### III. Les méthodes de collecte du sperme

plusieurs techniques permettent la récolte du sperme du lapin:

#### III.1. La collecte du sperme par électro-éjaculat

L'électro-éjaculation permet d'obtenir l'éjaculation par stimulation électrique des nerfs sympathiques éjaculatoires et est réalisée sous anesthésie. Le pénis est devaginé par une pression manuelle et un tube en plastique est placé à son extrémité pour récolter la semence. Mais cette technique reste moins réussit par rapport au prélèvement par vagin artificiel (Dooley, 1986).

#### III.2. La collecte du sperme par vagin artificielle

La collecte de sperme s'effectue par utilisation d'un vagin artificiel rempli d'eau chaude (environ 45 ° C).

Les animaux doivent être habitués dès leur jeune âge à la stimulation manuelle. Les mâles doivent être entraînés pendant deux ou trois semaines pour donner un bon éjaculat, le succès de la collecte dépend de plusieurs facteurs par exemple la stimulation générée par la femelle. Le vagin contient deux extrémités, la plus large est en contact avec le pénis, l'autre extrémité est reliée à un tube en plastique (Smith, 1989).

### IV. Les facteurs influençant sur la production et la qualité du sperme

La production du mâle est sous le contrôle de plusieurs facteurs (Bencheikh, 1995) comme la fréquence de la collecte, l'âge, la race, la santé du mâle, l'alimentation, la photopériode et la lumière.

### **IV.1. La fréquence de la collecte**

La fréquence de la collecte a un effet important sur les caractéristiques du sperme : deux éjaculats collectés une fois par semaine avec un intervalle de 15 minutes, permettent la meilleure production de sperme (**Bencheikh, 1995 ; Mocé et al., 2002**).

Un rythme élevé de récolte peut réduire la durée de transit épидидymaire alors le processus de maturation épидидymaire des spermatozoïdes peut être affecté (**Bencheikh, 1995**).

### **IV.2. L'âge et la race**

La maturité sexuelle du lapin commence à partir de 5 mois, elle varie selon la souche, mais la qualité du sperme diminue chez les lapins âgés (**Boiti et al., 2005**).

Certains auteurs ont montré que la structure de la chromatine de semence change significativement entre l'âge de 5 à 28 mois. Le pourcentage des spz avec la chromatine endommagée (1.7 à 2.4 %) a été observé entre l'âge de 6 et 16 mois (**Castellini, 2008**).

### **IV.3. La santé**

Une forte concentration des leucocytes, provoquée par une infection, peut modifier la spermatogenèse (**Castellini C., 2008**). L'inflammation de l'appareil reproducteur masculin touche les fonctions testiculaires et séminales (**Boiti et al., 2005**).

### **IV.4. L'alimentation**

Le niveau alimentaire influence sur la sortie du libido (desir sexuel) et le volume du sperme, mais il n'a pas d'effet sur la qualité du sperme et son pH (sauf un léger effet sur le pH initial). Chez un mâle qui se nourrit ad libitum le désir est meilleur et le volume du sperme augmente (**Alvarino J.M.R., 2000**). Par exemple, un régime alimentaire avec plus de 15% de protéines brutes assure la production de spermatozoïdes (**Boiti et al., 2005**).

### **IV.5. La photopériode**

La longueur du jour (16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) qui agit sur l'axe hypothalamo-hypophysaire permet la production des hormones et des spermatozoïdes (**Castellini, 2008**).

La saison a des effets sur les caractéristiques du sperme (**Theau-Clement et al., 2009**), le volume d'éjaculat et la concentration en spermatozoïdes sont maximum au mois de mars et minimum au mois de juillet (**Sabbagh, 1983**). Un autre travail est effectué par **Najjar et ben Mrad** porte sur les facteurs de variations de la qualité du spermogramme du lapin

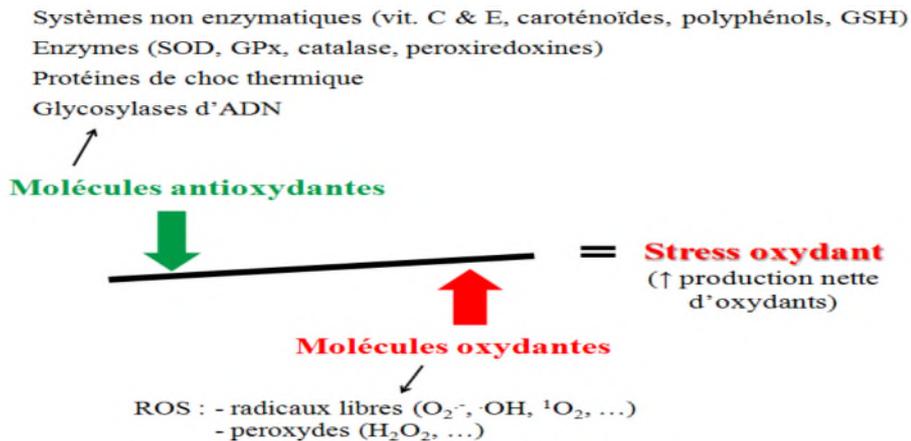
reproducteur à l'issue de ce travail les paramètres de spermogramme des lapins reproducteurs de souche INAT, en particulier pour les paramètres volume du gel, pH, motilité massale, motilité individuelle et concentration en spermatozoïde ont été améliorés en mois de la saison printanière (**Najjar et Ben Mrad, 2013**).

Par contre certains auteurs ont montré dans leur travail en **2004** que l'intensité de la lumière n'a pas d'effet de façon significative sur les caractéristiques du sperme mais elle a des effets sur l'éjaculat (**Besenfelder et al., 2004**).

#### **IV.6. La température**

Les températures élevées, plus de 27C°, augmentent les valeurs du pH du sperme et les interactions morphologiques; cela conduit à l'infertilité ainsi qu'à une diminution de la mobilité des spermatozoïdes et de la libido (**Alvarino, 2000**).

L'oxygène est indispensable à la vie de la plupart des espèces, il a un énorme avantage métabolique pour la production d'énergie. Dans certain cas la molécule d'oxygène peut être toxique cela revient à sa conformation chimique, cette toxicité est induite par des éléments réactifs instables et pro-oxydants comme espèce réactive de l'oxygène. Pour réduire cette toxicité l'organisme développe un mécanisme de défense: les antioxydants (Negre-Salvayre et Salvayre, 2005) (Figure 8).



**Figure 8:** Composantes de la balance entre les molécules anti- et pro-oxydantes (Wei et al., 1998).

GPx: glutathion peroxydase, GSH : glutathion réduit,  $H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène, SOD: superoxide dismutases,  $O_2^{\cdot-}$ : superoxyde anion,  $\cdot OH$ : radical hydroxyl,  $^1O_2$ : oxygène singlet, SOD: superoxide dismutases.

## I. Définition de stress oxydatif

C'est le résultat d'un déséquilibre au sein d'un individu entre la production d'éléments oxydants et les mécanismes de défense antioxydant (Morena et al., 2002), ce déséquilibre provient soit:

- d'un excès des espèces réactives d' $O_2$ ,  $N_2$  ou  $Cl_2$ ;
- d'une défense insuffisante (endogènes et exogènes) ;
- de mécanismes de réparation insuffisants (Lausanne, 2010).

Ce déséquilibre peut induire des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires: des lipides avec une perturbation des membranes cellulaires, des protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, des acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation (Segent et al., 2000).

### I.1. L'espèce réactive oxygène (ERO)

Se sont des molécules qui contiennent d' $O_2$  qui est plus réactif que l' $O_2$  présent dans l'air (Laren, 2007), Elles proviennent de la réduction incomplète de l'oxygène après capture

successive d'électrons. Elles réagissent avec les molécules environnantes de leur site de formation (Chabory, 2009).

### I.1.1. Un radical libre

Est un atome, une molécule ou une espèce chimique qui contient un ou plusieurs électrons non appariés (Allen et Tresini, 2000), capable d'une existence indépendante, il est très réactif c'est un puissant oxydant (Halliwell, 2001), sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes, nanosecondes) (Massart et al., 2011).

#### I.1.1.1. Un radical libre superoxydé ( $O^{\cdot-}_2$ )

C'est un radical chargé négativement, il provient du fait que l'oxygène dans son état fondamental possède 2 électrons non appariés et doit recevoir un électron à la fois, ce qui est le cas lors de la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire. Le radical superoxyde peut agir comme un oxydant ou un réducteur (Béguel, 2012).

#### I.1.1.2. Un radical libre hydroxyle ( $\cdot OH$ )

Il est plus réactif que les autres, il peut réagir avec tout types de molécule et il est responsable de: la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines de l'ADN nucléaire et mitochondriale et aussi des ARN (Béguel, 2012). Sa demi-vie très courte ( $T_{1/2} = 9$  à  $10$  seconde) (Pré, 1991).

### I.1.2. Les peroxydes d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) non radicalaire

Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  n'est pas une espèce radicalaire, il n'est pas chargé et peut donc diffuser très facilement à travers les membranes. De ce fait son action n'est pas restreinte à son lieu de production mais peut se dérouler dans différents compartiments cellulaires tel que le noyau, ce qui en fait un ERO assez toxique. C'est un oxydant impliqué notamment dans la voie de l'apoptose (Halliwell et Gutteridge, 1999).

### I.1.3. La sources des espèces réactives oxygénées

La principale source d'ERO est la chaîne de transfert d'électron des mitochondries; la production d'oxydant par les neutrophiles et les macrophages est également une source importante qui dépend de l'activité enzymatique de la NADPH-oxydase pendant l'emballage oxydatif « respiratory burst » des cellules inflammatoires (Wang et al., 2009).

## I.2. Le système antioxydant

Est un réseau de molécules varié, qui réagissent entre elles. Elle sont produites par l'organisme ou par l'alimentation, pour empêcher ou limiter les dommages cellulaires, c'est un système de défense de l'organisme (Béguel et al., 2013).

### I.2.1. Système antioxydant enzymatique

Ce sont des enzymes dont la séquence est très conservée au cours de l'évolution et qui agit de manière coordonnée. Parmi les enzymes antioxydants on cite :

- **La superoxyde dismutase (SOD)**: Elle transforme l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$



Il existe 3 isoformes de SOD chez les mammifères (Li et al., 1995) :

-**La catalase (CAT)**: la majorité de cette enzyme est présente dans les peroxysomes et dans les mitochondries du cœur. Elle assure la réduction du peroxyde d'hydrogène en libérant de l'oxygène selon l'équation suivante :  $H_2O_2 \xleftarrow{CAT} 2H_2O + O_2$ .

Il est présent en faible concentration dans le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques mais à forte concentration dans le foie et les érythrocytes (Catapano, 1997).

-**La glutathion peroxydase (GPx)**: elle existe sous une forme de GP<sub>x</sub> cytosolique, une forme plasmatique, une forme gastro-intestinale ainsi qu'une iso-enzyme. Elle est considérée comme une enzyme de structure très proche ayant la propriété de réduire les peroxydes (Ursini et al., 1999).

- **La glutathion réductase (GR)**: n'est pas une enzyme antioxydante à proprement dite, dans le sens où elle n'a pas d'action directe sur les ROS. En revanche, elle a un rôle très important dans la réduction du glutathion, puissant antioxydant et co-substrat de la GP<sub>x</sub>. Elle fut identifiée la première fois chez les plantes (Mapson et Goddard, 1951), puis chez les animaux (Rall et Lehninger, 1952).

- **La glutathion S-transférase (GST)**: a également une action indirecte sur la détoxification des ROS puisqu'elle permet le transport du GSH vers les compartiments cellulaires subissant des dommages oxydatifs. Elle permet la liaison du GSH à certains xenobiotiques ainsi qu'aux aldéhydes issus de la peroxydation lipidique. La GST a donc un rôle de transport intermembranaire, de liaison et de détoxification des cellules (Tan et al., 1986).

### I.2.2. Système antioxydant non enzymatique

Ce sont des enzymes qui piègent directement les radicaux libres et les désactivent, parmi ces antioxydants :

- **Vitamine E**: est une molécule liposoluble, qui réduit les radicaux peroxydes et réagit avec l' $O_2^{\cdot-}$ , HOCl et le ONOO $^{\cdot-}$ . Elle se transforme en radical hydroxyle après l'échange d'un électron libre.

La vitamine E existe sous 8 formes naturelles: 4 tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) et 4 tocoprienol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) (Bilaspuri et al., 2011).

-**Vitamine C**: est une molécule soluble dans l'eau (Béguel, 2012), elle capte directement l' $O_2^{\cdot-}$  et l' $OH^{\cdot}$  comme elle peut avoir des propriétés pro-oxydant (Li et al., 1995).

-**GSH** : un antioxydant majeur de la cellule (**Béguel, 2012**).

-**Caroténoïde** : ont une capacité comme les tocophérols. Ce sont des excellents piègeurs de radicaux pyroxyles et d'oxygène singulet grâce à leurs longue chaîne carbonée qui est riche en double liaison (**Stahl et Sies, 1997**).

Des concentrations tissulaires normales d'antioxydants suppriment le processus oxydatif et protègent les tissus. Quand cette première ligne de défense antioxydant n'est pas suffisante, des mécanismes secondaires sont recrutés pour réparer les dommages subits et préparer les tissus contre les futures attaques oxydantes (**Wei et al., 1998**).

## II. Le stress oxydatif et le sperme

Les ERO jouent un rôle important dans des fonctions spermatiques : la maturation post-testiculaire, la compaction de l'ADN et dans le phénomène de la capacitation. Ces ERO proviennent des spermatozoïdes et de l'environnement épидидymaire, mais l'excès de la présence des ERO Peut provoquer le stress oxydatif (**Chabor, 2009**).

Le stress oxydatif qui se produit dans le sperme est un phénomène associé à l'augmentation du taux d'oxydation des composantes cellulaires et la production excessive des ERO, plusieurs études ont montré que la cause principale du fonctionnement anormal des spermatozoïdes est due à un déséquilibre entre la peroxydation des lipides et des antioxydants qui sont le résultat du stress oxydatif (**Partyka et al., 2012**). Le stress oxydatif a été reconnu comme l'une des causes les plus importantes de l'infertilité masculine (**Lanzafame, 2009**), qui est la conséquence de:

-La peroxydation lipidique qui entraîne la rigidité de la membrane spermatique et une perte de la mobilité;

-L'oxydation de l'ADN qui conduit à des mutations et à des fractures simple de double brin (**Godeas, 1997**).

Pour assurer les fonctions spermatiques et ne pas endommager le spermatozoïde, il ya la première protection qui est assurée par le système antioxydant. Les molécules de ce système sont présentes au niveau du spermatozoïde et du fluide épидидymaire.

### ➤ **Système de défense cellulaire:**

Les spz ont une capacité réduite à lutter contre les attaques radicalaires mais ils possèdent des composantes antioxydants comme: glutathion (GP<sub>X1</sub> et GP<sub>X4</sub>) et l'acide ascorbique ou la vitamine E (présente chez le rat). Au niveau de l'épididyme se trouve la C<sub>U</sub>-Z<sub>n</sub> SOD qui est capable de se lier à des spz.

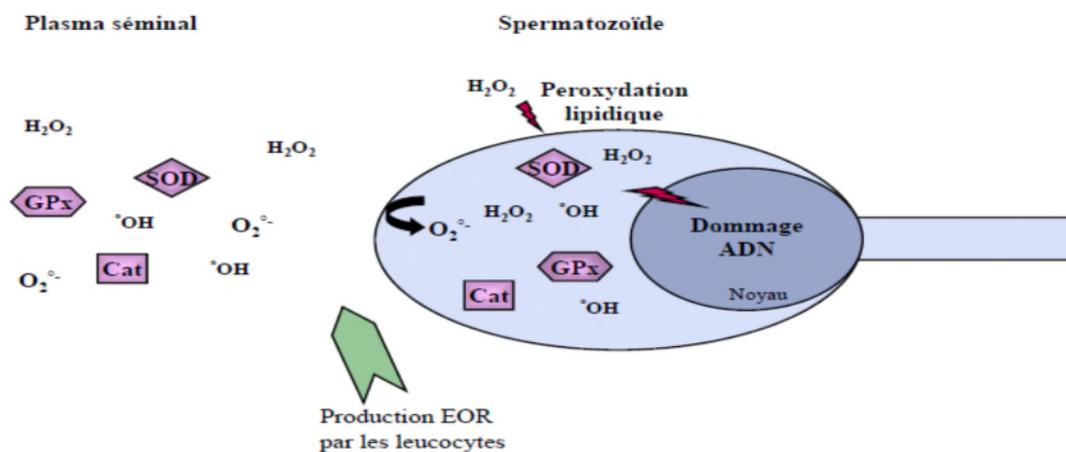
La catalase est seulement présente chez certaines espèces (**Chabor, 2009**).

### ➤ **Système de défense du fluide épидидymaire:**

Les antioxydants sont produits par les glandes annexes (prostate) comme ils peuvent être produits par le fluide epididymaire parmi ces enzymes :

- La catalase** : qui est peu trouvée ou bien absente;
- GPx**: présent dans les testicules, l'epididyme et les spz;
- SOD**: qui est présent dans le sperme de certaines espèce. **Holland** et ses collaborateurs ont montré La présence d'un superoxyde dismutase (SOD) au niveau des spermatozoïdes du lapin. Il entraîne la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$  et la production de l' $H_2O_2$  (**Holland M.KNet al., 1982**).

En plus des antioxydants enzymatique il ya des antioxydants non enzymatiques qui sont dans le plasma séminale (**Chabory, 2009**) (voir la figure 9).



**Figure 9**: système de défenses enzymatiques présentes au niveau des spermatozoïdes et du plasma séminale (**Garrido et al., 2004**). GPx: Glutathion peroxydase / Cat: Catalase / SOD: Superoxyde dismutase.

## La conservation de sperme du lapin

### I. Polyéthylène-glycol (PEG)

#### I.1. Définition

C'est un polymère biocompatible, non ionique et non toxique utilisé dans les domaines biomédical, biotechnologique et pharmaceutique (Annunziata et al., 2002). Il est appelé également macrogol dans le domaine médical (Tani et al., 2002).

#### I.2. Structure et propriétés

##### a. Structure

Le PEG est un enchainement d'unités structurales répétitives de monomère d'éthylène glycol :

Monomère HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH Ethylene glycol

Dimère HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH Diéthylène glycol

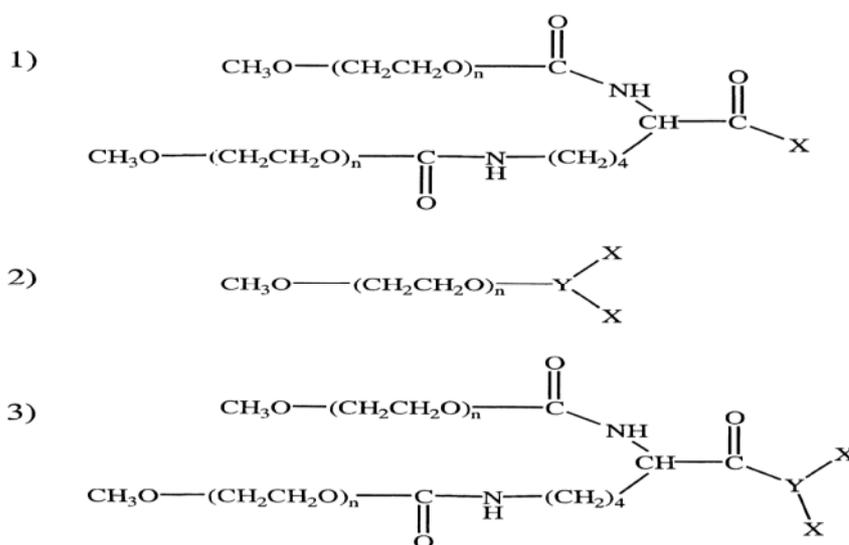
Polymer (-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub> polyethylene glycol (Roberts

et al., 2002)

\*La plupart des formes de PEG sont linéaires ou ramifiés, se terminent toujours avec un groupe hydroxyle, et ont une structure générale comme suit :

HO- (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> O)<sub>n</sub> -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> -OH, n est le nombre d'électron optique (EO)

\*Le PEG a plusieurs structures ramifiées (figure 10) :



**Figure10:** Les différentes structures de PEG : 1-PEG ramifié. 2-PEG linéaire se terminant par une ramification. 3-PEG ramifié se terminant par des ramifications secondaires (Roberts, 2002).

\*Le PEG peut être synthétisé par l'interaction d'oxyde d'éthylène avec l'eau ou d'oligomère d'éthylène glycol (**Kadajji et Betageri, 2011**).

### b. Propriétés

Le PEG a plusieurs propriétés :

-Il n'est ni absorbé, ni fermenté.

-Il est soluble dans l'eau et dans beaucoup de solvants organiques comme: le toluène, le chlorure de méthylène, l'éthanol et dans l'acétone (**Tani et al., 2002**). Bien que la solubilité dans l'eau diminue légèrement avec l'augmentation de la masse molaire (**Neumann et Nadeau, 1963**) (Tableau I).

- la plus importante propriété est qu'il résiste à la reconnaissance du système immunitaire (**Britton Keys, 1998**).

-Il est hydrophile (**Kadajji, 2011**).

**Tableau I:** les propriétés de PEG à différents masses molaires ( **Anonyme, 2006**).

	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)
200usp	Clair, visqueux	60-67	3,9-4,8	5-7	1,124	∞
300	hygroscopique	88-96	5,4-6,4	5-7	1,125	∞
400	liquide	112-124	6,8-8,0	5-7	1,126	∞
600	Liquide et cireux	17-18	9,9-11,3	5-7	1,126	∞
800	Doux	21-23	12,5-14,5	5-7	Masse solidifiée 1.126	80
1000	Cireux	24-28	16-19	5-7	Masse solidifiée 1.126	75
1500	Cireux blanc	36-42	26-32	5-7	Masse solidifiée 1.20	62
2000	Flocon	50-58	38-49	5-7	Masse solidifiée 1.20	58
3000	/	75-95	67-93	5-7	Masse solidifiée 1.20	56
3350	Cireux blanc	85-115	76-110	5-7	Masse solidifiée 1.20	56
4000	Flocon	114-142	110-158	5-7	Masse solidifiée 1.20	55

6000	Poudre	210-262	250-390	5-7	Masse solidifié1.20	54
8000	/	290-450	470-900	5-7	Masse solidifié1.20	54
10000	Pale, dur	550-750	/	5-7	Masse solidifié1.20	53
12000	flocon Cireux	1100-1400	/	5-7	Masse solidifié1.20	53
20000	Poudre	2700- 3500	/	4,5-7,5	Masse solidifié1.20	25
35000	Pale, dur, flocon cireux	110-14000	/	5-7	Masse solidifié1.20	50

### I.3. La toxicité :

#### a. Toxicité pour les animaux

-Les polyéthylènes glycols ayant une moyenne des poids moléculaires de 400, 1500 et 4000 ne causent aucun effet indésirable chez les chiens lorsqu'ils sont nourris de deux pour cent dans leur régime alimentaire pendant un an.

-Plusieurs macrogols peuvent être toléré dans l'alimentation des rats sans effets appréciables.

-Le poids et l'humidité des fèces sont doublés chez des rats qui boivent de l'eau contenant 5% de PEG. Ceci dilue les éventuels agents promoteurs du contenu intestinal, notamment les acides biliaires et les agents cytotoxiques détectés dans l'eau fécale.

-La sensibilisation de la peau a été observée chez les cobayes testés avec certains macrogols.

-Des études ultérieures montrent qu'actuellement l'utilisation des macrogols n'entraînent ni irritation ni sensibilisation.

-Aucune biotransformation dans L'excrétion de macrogols par les fèces n'a été noté (**Smyth, 1955**).

#### b. toxicité pour l'homme

Des doses orales de 10 grammes de macrogol ont été tolérées par des volontaires humains ayant reçu ces doses sans l'expression symptômes toxicologiques ou cliniques (**Shaffer, 1947**).

-Des études ont montré qu'aucun effet négatif sur les yeux humains n'a été signalé.

La sensibilisation de la peau a été observée dans quelques sujets humains testés avec certains Macrogols (**Smyth, 1955**).

## 1.4. Le rôle de PEG

- Il augmente l'activité enzymatique en raison des favorables interactions entre la coenzyme NADP et PEG.
- Le PEG 400 permet une haute solubilité des sels et peut être utilisé dans des réactions d'oxydation et de substitution (**Pancera, 2002**).
- Le PEG augmente le volume et l'hydratation du contenu intestinal,
  - Il tapisse et lubrifie la muqueuse,
  - Il attire l'eau hors de la muqueuse
- Le PEG enlève les cellules précancéreuses de la muqueuse et agit pratiquement comme les anticancéreux cytotoxiques classiques, à ceci près qu'il n'est ni absorbé, ni toxique, ni coûteux (**Corpet et al., 2003**).
- Le PEG protège les épithéliums contre les agressions physiques et chimiques du flux fécal, un effet joué de façon physiologique par les mucines endogènes.
- De plus le PEG par ses propriétés de polymère amphiphile favorise la restauration des membranes cellulaires lésées (**Togo et al., 1999**).
- Le PEG augmente la pression osmotique des milieux où il est dissous. *In vitro*, le PEG inhibe la prolifération et bloque des cellules cancéreuses humaines HT29 en phase G0/G1 (**Pernaud et al., 2001a**).

## I. 5. Application de PEG

### a. Domaine pharmaceutique

Les macrogols sont utilisés sous formes suivantes :

- a. à bases de liquides utilisation des poids moléculaire de PEG de 200 à 400 dans les préparations des liquides tels que les parentérale pour des capsules de gélatine.
- b. à bases de pommade : les PEG solides ne sont pas solubles dans les PEG liquides
- c. à base de comprimé : transformés sous forme d'une masse fondue et supporte un chauffage à environ 70 ° C (**AL Nasassrah, 1998**).

### b. Domaine cosmétique

Utilisé dans la préparation des :

- Crèmes : agit comme un agent de nettoyage (**Martin, 1981**), déodorant, parfum (**Turney, 1981**), rouges à lèvres, dentifrices produits de soins des cheveux et les huiles de bain (**Miles et Demasi, 1986**).

### c. Environnement

- Le PEG est utilisé dans la transformation des métaux.

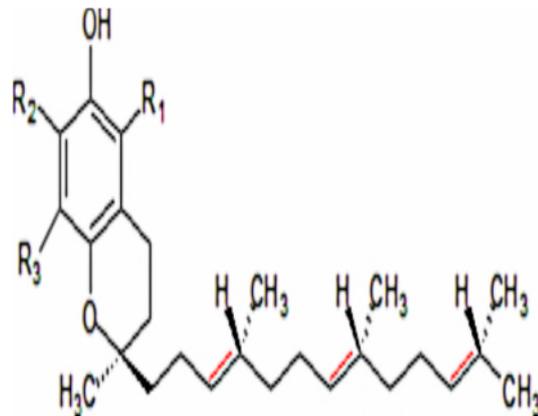
-Le taux de la biodégradation des PEGs diminue avec l'augmentation de sa masse molaire. Par exemple, le PEG à masse molaire 1500 est considéré comme biodégradable facile.

-Le PEG n'est pas inflammable (**Remann, 1974**).

## II. La vitamine E

### II.1. Définition et structure

Elle a été découverte en 1922 par Evans et Bishop. Il existe au moins 8 tocophérols à action vitaminique E (**Kakuk et Darnas, 1973**). Sa structure est représentée sur la figure 11.



**Figure 11** : Structure des tocotriénols (**Larbier et Leclercq, 1992**).

### II.2. Rôle de la vitamine E

#### a. Rôle antioxydant

La vitamine E se trouve au niveau des membranes cellulaires et intracellulaires. Elle a plusieurs rôles:

-Elle protège les acides gras insaturés des membranes contre l'oxydation.

-Elle garde la stabilité des membranes cellulaires riches en acides gras insaturés des hématies, et l'intégrité des capillaires sanguins (**Kakuk et Darnas, 1973**).

-Elle protège également la membrane des spermatozoïdes pendant la dilution et la conservation du sperme par le froid. En augmentant l'apport alimentaire de vitamine E chez le dindon, le coq, le jars, on augmente la quantité de vitamine E dans le sperme, et par conséquent la stabilité des membranes des spermatozoïdes (**Surai, 1992**).

-Elle protège aussi de l'oxydation d'autres vitamines (dont la vitamine A), des hormones et des enzymes. Un manque de sélénium et de vitamine E affecte la conversion de la méthionine en cystéine (**Combs et al., 1981**).

En cas d'une carence en vitamine E, on note la formation et l'accumulation anormale de peroxydes qui provoquent l'oxydation des acides gras et des phospholipides membranaires ce qui conduit à la désorganisation des feuilletts lipidiques, c'est-à-dire la lyse des membranes (**Larbier et Leclercq, 1992**).

#### **b. Stimulation des défenses immunitaires**

La vitamine E agit sur la thyroïde et les glandes surrénales en synergie avec le sélénium (**Larbier et Leclercq, 1992**).

#### **c. Synthèse de l'hème**

La vitamine E participe à l'absorption intestinale et au transport du fer, lequel entre dans la structure de l'hème (**Mikulets, 1996**): la concentration plasmatique de transferrine, et donc la capacité de transport de fer par le sang, augmente avec la quantité de vitamine E dans la ration (**Larbier et Leclercq, 1992**).

#### **d. Respiration cellulaire**

La vitamine E intervient dans la synthèse des protéines hémiques, dont les cytochromes et l'hémoglobine (**Larbier et Leclercq, 1992**).

### **III. Cholestérol**

#### **III.1. Définition et rôle**

Il a été découvert en 1969, par Poulletier, Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques, il est présent dans tous les tissus des animaux et il est indispensable pour ses multiples fonctions :

- Un rôle structurel dans l'architecture cellulaire;
- Un rôle dans le transport des graisses hépatiques et sanguines;
- Un rôle métabolique capital en tant que précurseur des hormones stéroïdes (hormones sexuelles du mâle et de la femelle, des hormones corticosurrénales et des acides biliaires);
- Un rôle antitoxique (**Pacheco, 1969**).

#### **III. 2. La structure du cholestérol (figure 12)**

Les caractéristiques de cette structure sont;

- Présence de 4 cycles;
- Présence d'une fonction alcool en 3;
- Présence en C<sub>17</sub> une chaîne latérale assez longue à caractère lipophile;
- Présence d'une double liaison en 5-6 (**Pacheco, 1969**).

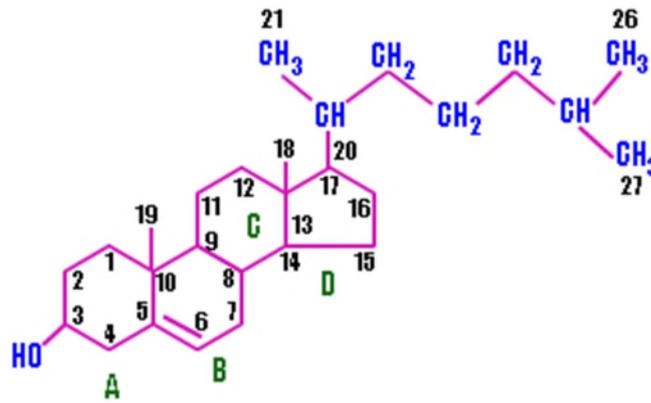


Figure 12: structure du cholestérol (Pacheco, 1969).

### III.3. Le cholestérol et la membrane

Le cholestérol a plusieurs effets sur la membrane, il stabilise la membrane et réduit sa perméabilité.

Le rapport du cholestérol au phospholipide est une cause déterminante et importante de la fluidité et de la stabilité de la membrane à basse température.

Le cholestérol module la fluidité des membranes par l'interaction avec des chaînes grasses d'acyle des phospholipides et maintient les phospholipides dans un arrangement aléatoire et lamellaire pendant que la température diminue.

Dans des membranes modèles, l'augmentation du rapport du cholestérol au phospholipide élargit la phase de transition, réduit la fuite de membrane et les séparations de ses phases.

Par conséquent, le traitement du sperme avec le cholestérol avant la cryopreservation pourrait réduire la sensibilité des membranes du sperme aux dommages de refroidissement, en éliminant ou en réduisant la séparation de phase latérale des lipides (Mocé *et al.*, 2010b).

## IV. Conservation du sperme

### IV.1. A l'état frais "réfrigération"

La conservation de la semence animale à l'état frais passe par sa dilution immédiate après le prélèvement du sperme. La conservation de la semence fraîche à 4° C réduit le métabolisme des spermatozoïdes ce qui permet une économie de leurs réserves énergétiques et une bonne conservation de leur mobilité qui est restaurée après réchauffement (Decuadro-Hansen, 2004).

## IV.2. La congélation

La cryoconservation correspond à la préparation d'une suspension de cellules en vue de son stockage à une température inférieure à -80°C. Cette action permet la conservation de cette suspension pendant de nombreuses années et son utilisation après décongélation à une température corporelle (Amann, 1998).

### IV.2.1. Historique

En 1789, Spallanzani a remarqué, au cours de ses expériences, que le sperme de la grenouille stocké dans la neige gardait ses propriétés fécondantes (Amann, 1998).

Mais ce n'est qu'en 1942, quand Hoagland et Pincus ont observé que le sperme de lapin ne pouvait guère survivre après immersion dans l'azote liquide contrairement au sperme de l'homme qui est très actif après décongélation (Mocé et Vicente, 2009).

Après la découverte des cryoprotecteurs, l'effet du glycérol sur le sperme par Polge et son équipe en 1943, des recherches ont été menées sur la conservation du sperme en utilisant des cryoprotecteurs (England, 1993 ; Amann, 1998).

### IV.2.2. Principes généraux

#### IV.2.2.1. Utilisation des dilueurs

Les spermatozoïdes conservés par réfrigération ou par congélation doivent être dilués dans des bons dilueurs (England, 1993), parce que ces derniers jouent un rôle important: protègent les spermatozoïdes de l'effet négatif de la baisse des températures et permet l'obtention d'une concentration finale, précédemment établie, de spermatozoïdes (Peña et al., 2000 ; Stănescu et Alin, 2010).

##### IV.2.2.1.1. Les caractéristiques du milieu de dilution

Un milieu permettant la survie des spermatozoïdes et répondant à un certain nombre de critères:

- Avoir un pH entre 6,7 et 7,3 chez les mammifères domestiques;
- 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;
- Contenir des lipoprotéines animales ou végétales qui ont un rôle protecteur des membranes durant le processus de congélation- décongélation;

-Avoir des antibiotiques destinés à contrôler la flore microbienne banale et les pathogènes opportunistes (**Decuadro- Hansen, 2004**).

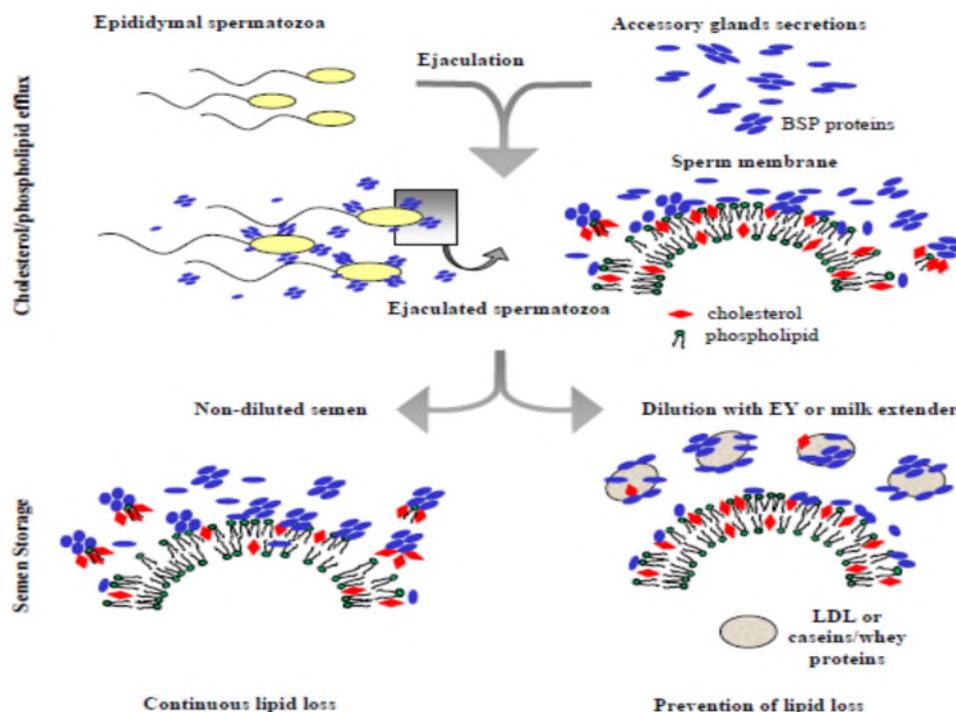
#### IV.2.2.1.2. La composition des dilueurs

Parmi les constituants des dilueurs les plus utilisés il ya :

##### a. Le jaune d'œuf

Son utilisation a montré une augmentation de pouvoir fécondant. Il est généralement utilisé à la des concentrations de 20% V/V (**Foulkes, 1977**).

Le jaune d'œuf contient des phospholipides et des lipoprotéines (LDL) qui assurent une protection efficace de la membrane des spz et qui constituent un soutien nutritionnel pour elle (**Manjunath et al., 2002**) (Figure 13).



**Figure 13:** Mécanismes de la protection du spermatozoïde avec le jaune d'œuf (**Manjuath et al., 2002**).

##### b. Les antibiotiques

Ont un effet nefaste sur les spz, ils freinent la propagation de bactéries car la plupart des ejaculats sont contaminés par des bacteries (**Althouse, 2000**).

##### c. le diméthyl sulfoxide (DMSO)

Il a été decouvert en 1959 par **Loverlok** et **Bishop M**. C'est un cryoprotecteur intra-cellulaire, à pénétration rapide, ce qui permet de limiter la durée de l'équilibration (**Billard et Legendre, 1980**).

#### d. Ethylène-glycol (EG)

Les chercheurs ont montrés que l'EG est un cryoprotecteur (Ana et al., 2006). En 2011, Swelum et ses collaborateurs ont trouvés que l'éthylène glycol améliore la qualité des spermatozoïdes (la viabilité, l'intégrité de l'acrosome, et de la membrane et une faible anomalie à l'expression de la mobilité).

#### e. Glycérol

C'est le plus utilisé des cryoprotecteurs dans le monde. Il possède une action à la fois intra- et extracellulaire, Il pénètre à l'intérieur des spermatozoïdes et modifie la configuration des cristaux de glace qui s'y forment en les rendant plus arrondis, ce qui diminue le risque de perforation des membranes (Stănescu et Alin, 2012).

### IV.2.3. Les étapes de la congélation

**II.2.3.1. Equilibration:** consiste à mettre le sperme dans le réfrigérateur à 4°C avant la congélation, pour permettre au cryoprotecteur d'agir et de limiter le choc thermique pour les spz (Mocé et al., 2003b).

**II.2.3.2. Conditionnement:** son but est de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement stockable, utilisable et identifiable (Decuadro- Hansen, 2004).

Nothling et SHuttleworth en 2005 ont montré que la congélation en paillettes de 0.5 ml améliore le pourcentage de spz mobiles 60 minutes après décongélation et réduit le nombre de spz endommagés par rapport à des pailles de 0.25 ml.

Dans les dernières années, les paillettes les plus couramment utilisés sont celles de 0,5 ou 0,25 ml (Mocé et vicente, 2009).

**II.2.3.3. Congélation:** Elle consiste à mettre les paillettes horizontalement à 2 -10 cm au dessus de l'azote liquide pendant 10minutes (en vapeur de l'azote liquide), puis les plonger dans l'azote liquide (Mocé et al., 2003a).

La congélation se fait, donc, en deux étapes: le refroidissement dans la vapeur d'azote liquide et l'immersion des paillettes dans l'azote liquide.

**a. La vitesse de refroidissement:** Elle joue rôle important pour la qualité des spermatozoïdes après décongélation. Si elle est lente, le sperme est amélioré (Chen et Foote, 1994), si elle est trop rapide, des changements irréversible seront notés sur les spermatozoïdes, suite à un choc thermique. Ces changements consistent en une diminution de la production d'énergie, une augmentation de la perméabilité membranaire, un mouvement circulaire et une perte de mobilité (Decuadro-Hansen, 2004). Plusieurs chercheurs ont montré que la diminution de la

motilité des spermatozoïdes associée à des taux de refroidissement plus rapides étaient dus à une baisse de la viabilité qui résulte de la congélation (**Liu et al., 2007**).

**b. La position des paillettes:** il ya des auteurs qui disent que placer les paillettes horizontalement serait préférable que de les mettre verticalement, mais ils n'ont pas comparés les deux types de position (**Pena et Linde-Forsberg, 2000**).

**IV.2.3.4. Décongélation:** c'est la dernière étape de la congélation, est une étape critique pour la survie, la mobilité et la capacité fécondante des spz cryoconservés. Une décongélation rapide est préférable afin de prévenir la possibilité de recristallisation des molécules d'eau pouvant êtres très dommageable pour la membrane (**Forthier, 2010**).

La décongélation consiste à mettre les paillettes dans un bain marie à 45°C pendant 10 secondes (**Mocé. et al., 2005**).

## II.2.4. Les conditions de la congélation-décongélation

Le succès de la congélation dépend de :

### a. La nature du sperme

Des différences dans la fertilité étaient observées entre les mâles, ce qui pourrait indiquer une différence dans la résistance des spermatozoïdes à la congélation-décongélation (**Mocé et al., 2005**).

### b. La température

En ce qui concerne la température de stockage, elle est généralement entre 15 et 18°C, elle constitue un bon état de stockage des semences du lapin. Néanmoins, la température optimale peut dépendre de la dilution utilisée (**Boiti et al., 2005**).

Il ya d'autres chercheurs qui ont trouvé que les températures de décongélation jouent un rôle important dans la qualité de sperme après décongélation (**Mocé et al., 2003b**).

Selon **Liu et al (2012)** la réfrigération diminue la motilité des spermatozoïdes suite à une baisse de leur viabilité.

### c. Dilution

Le taux de dilution joue un rôle important dans la survie des spz, le taux de dilution élevé (plus de 1/100) a un effet néfaste sur la motilité des spz (**Boiti et al., 2005**).

### d. Incubation

Le sperme destiné à l'IA, nécessite de maintenir sa vitalité et sa capacité physiologique de fertilisation sur un intervalle de temps défini.

Le sperme doit être dilué ou bien les spermatozoïdes doivent être séparés et placés dans un milieu final. Pour la semence diluée ainsi que pour les spermatozoïdes qui sont dans

le milieu, les conditions optimales doivent être assurées par la sélection des tampons adaptés aux organes de reproduction; l'incubateur « dioxyde de carbone (5%) maintient à long terme la vitalité des spermatozoïdes en réduisant leur contact avec l'oxygène (**Boitti et al., 2005**).

#### **IV.3.5. Protocole de la congélation chez le lapin**

Le sperme du lapin présente quelques particularités qui devraient être tenues en compte pour étudier son protocole de conservation (**Holt, 2000**).

De façon générale, la congélation du sperme du lapin comprend les étapes suivantes décrites par **Strazinger** en **1971**:

- 1-Taux de dilution 1/4.
- 2-Le refroidissement à 5 ° C pendant environ 3 heures.
- 3-Ajout de glycérol 6% 30 minutes avant de les congeler.
- 4- Emballage du sperme dilué dans des paillettes en plastique et les faire refroidir.
- 5- Congélation dans la vapeur d'azote pendant 6 à10 min, puis Stockage dans l'azote liquide.
- 7-La décongélation est effectuée pendant 20 secondes à l'aide d'une solution de décongélation à 37 ° C.

#### **IV.3.6. Les différents protocoles de la congélation du sperme de lapin**

La congélation du sperme de lapin est un obstacle principal à la diffusion à grande échelle de l'insémination artificielle, car le sperme de lapin est moins sensible à la réfrigération (30-0°C) mais il est très sensible à la congélation (**Castellini et al., 1992**).

En **1986**, **Parrish et Foote** ont étudié la fertilité du sperme de lapin réfrigéré à 5°C et du sperme congelé-décongelé, avec l'utilisation de différents traitements (13,3% de jaune d'œuf et un cryoprotecteur acétamide 0,667M). Ils ont remarqué que la fertilité du sperme réfrigéré à 5°C n'est pas affectée par rapport à la fertilité du sperme frais. Par contre pour le sperme congelé-décongelé, la fertilité est réduite à 20%. La survie et la capacitation du sperme congelé jouent un rôle dans sa fertilité, cependant malgré tous les efforts qui ont été fournis, cette fertilité reste encore réduite.

Les amides ont été utilisés comme des agents cryoprotecteurs diminuant les dommages des spermatozoïdes lors de la congélation et du stockage.

La mobilité des spermatozoïdes n'est élevée que lors de l'utilisation combinée de DMSO avec le glycérol (**Chen et al., 1989**).

En **2011**, **Serin** et ses collaborateurs ont étudié l'effet du prétraitement des cellules spermatiques du lapin avec différentes concentrations de cholestérol chargé dans les cyclodextrines, notamment sur l'occurrence de réaction acrosomiale au bout de 72h de

stockage. Ils ont constaté que le cholestérol empêche la réaction acrosomique prématurée des spermatozoïdes du lapin.

En **2012**, **Safaa** et ses collaborateurs ont étudiés l'effet de différents dilueurs de décongélation sur la qualité du sperme, la fertilité et la prolificité dans 2 lignées de lapin. Ils ont utilisé trois différents milieux de dilution:

1-3 M DMSO +0,1 M saccharose;

2-Tris à base de : 0,25 M tris +3,0 DMSO +20% jaune d'œuf;

3-2 M acétamide +20% jaune d'œuf;

Aux quels ils ont ajouté le sperme à raison de V:V pour remplir les paillettes à congeler; ces dernières sont d'abord refroidis à 5°C pendant 45mn, mises horizontalement à la vapeur d'azote liquide pendant 10 min.

Ils ont obtenu une meilleur fertilité et prolificité avec les dilueurs 1 et 2.

## I. Objectif

Les processus de cryoconservation sont encore très étudiés afin de diminuer les pertes en spermatozoïdes. Nous proposons dans la partie expérimentale d'étudier la congélation du sperme de lapin en testant de nouveaux milieux dans le but de conserver les caractéristiques de la semence lors de la congélation et de limiter l'effet du stress oxydatif.

## II. Matériel et méthodes

### II.1. Animaux et condition d'élevage

Durant la période allant de 5 jusqu'à 15 mai nous avons récolté et analysé le sperme de 7 lapins mâles de race mixte, 04 de l'INRA de Bejaïa (tableau I) et 03 gardés à l'université.

-A l'INRAA, les animaux sont gardés dans des cages individuelles (Figure 14); dans un clapier qui a:

- \* Une température optimale (de 16 à 18°C).
- \* Une humidité moyenne de 60% à 70%.
- \* Un système de ventilation avec absence de courant d'air.
- \* 20 cages munies de mangeoires et de tétines fixées sur un tuyau qui sert de l'eau.

Les lapins sont alimentés avec du concentré.



**Figure 14:**Le clapier de l'INRAA.

(Photo personnelle)

**Tableau II:** les caractéristiques des lapins de l'INRA

Les lapins	Les caractères des lapins	Le poids (kg)
Mâle 1	Noir	3,03
Mâle 2	Noir et Blanc	2,95
Mâle 3	Blanc aux yeux rouges	3,7
Mâle 4	Blanc aux yeux rouges	3,5

-A l'université; nous avons analysé la semence de 3 mâles (tableau III) placés dans les mêmes conditions que ceux du clapier de l'INRA. Ces lapins sont alimentés avec des aliments naturels comme l'herbe, la paille, la salade, les navets...etc. en plus d'un aliment concentrés dans les mangeoires. Leurs cages sont munies de biberons qui servent de l'eau (figure 15).

**Figure 15:** Les cages individuelles des lapins gardés à l'université.**Tableau III :** les caractéristiques des lapins de l'université

Les lapins	La couleur de pelage	Le poids (kg)
Mâle1	Noir avec nez blanc	3.28
Mâle2	Gris	2.335
Mâle3	Noir	3.42

### **III. La récolte de semence**

Nous avons récolté le sperme de deux manières ; la récolte des mâles vivants avec un vagin artificiel, et la récolte du sperme épидидymaire d'un lapin mort après dissection de l'épididyme.

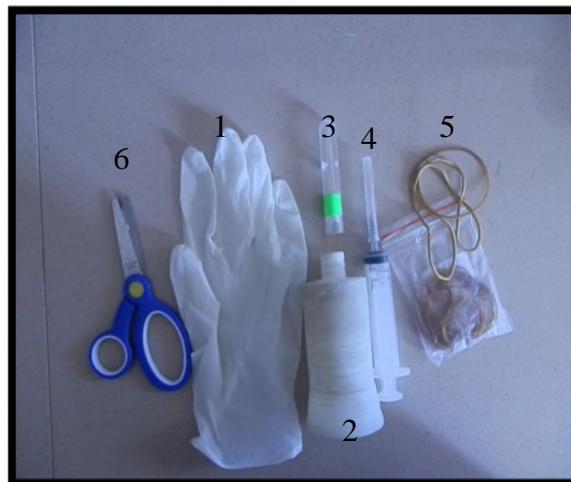
#### **III.1. La récolte au Vagin artificiel**

##### **III.1.1. Préparation du vagin artificiel**

###### **a. Le matériel**

Le matériel nécessaire pour la préparation du vagin artificiel est le suivant (figure16)

- 1-Le gant
- 2-La capote
- 3-Le tube de collecte
- 4-La seringue
- 5-Les élastiques
- 6-Les ciseaux



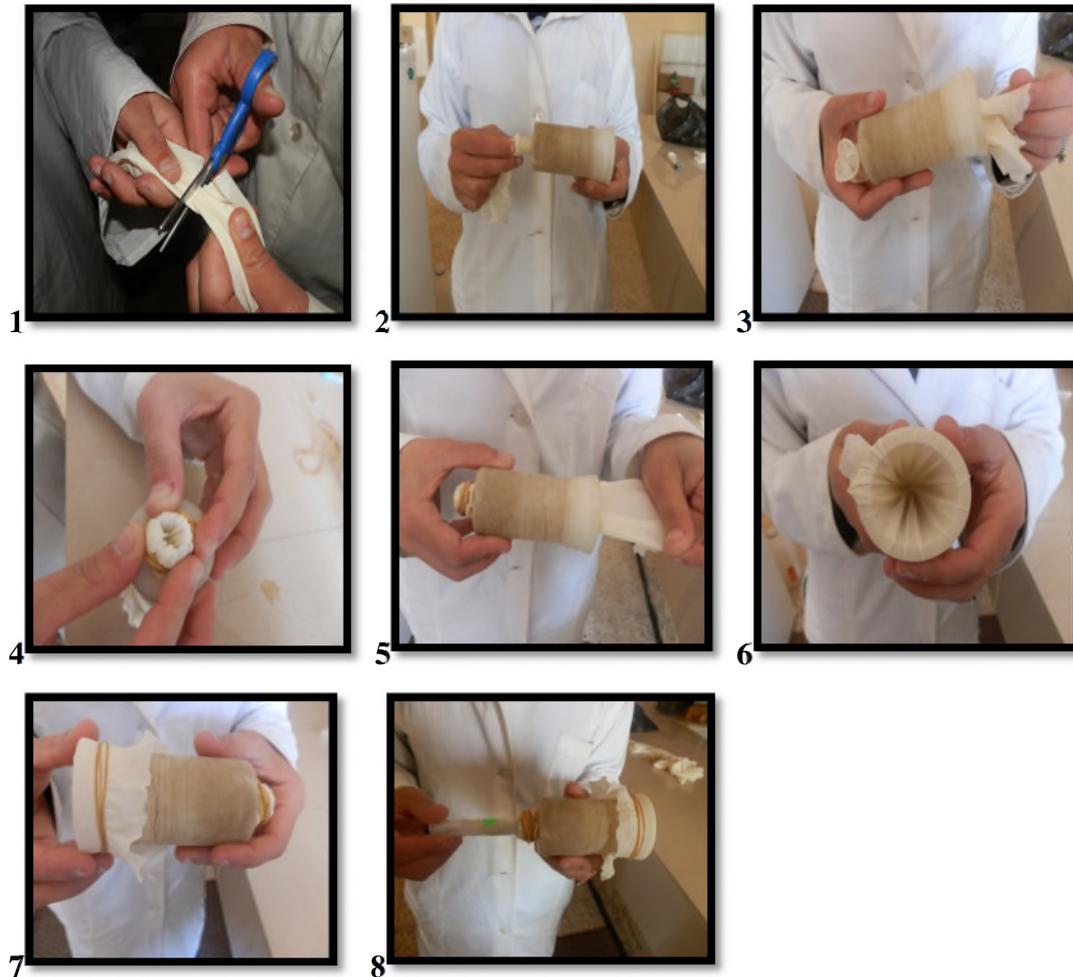
**Figure 16:** Le matériel nécessaire pour la préparation du vagin artificiel

###### **b. La méthode de préparation du vagin artificiel**

Pour préparer un vagin artificiel nous avons suivis ces étapes (figure 17) :

- Couper le gant au niveau des doigts et le renverser (1).
- Mettre le gant dans la capote à travers la petite extrémité (2).
- Faire sortir le gant de l'autre extrémité (3).
- Attacher le gant à la petite extrémité avec un élastique (4).
- Faire un  $\frac{1}{4}$  de tour pour obtenir des plis imitant les replis du vagin et permettant d'éliminer le gel (5, 6).

- Attacher le gant à la grande extrémité (7).
- Placer le tube dans la petite extrémité (8).



**Figure17:** Photographie des étapes de préparation de vagin artificiel.

### **III.1.2. La collecte du sperme**

#### **a. Matériel**

- Un vagin artificiel
- De l'eau chaude

#### **b. Méthode de la collecte (Figure 18)**

- Nous remplissons le vagin artificiel avec l'eau chaude (35° à 40°) en utilisant une seringue avec aiguille introduite dans le site d'insertion (1).
- Mettre la femelle dans la cage du mâle tout en évitant de faire du bruit (2).
- Insérer, sous le mâle, le vagin artificiel du côté de la grande extrémité, dès que celui-ci essaye de saillir la femelle, et ramener son pénis dans cette grande extrémité (3)
- Obtenir la collecte après éjaculation (4)

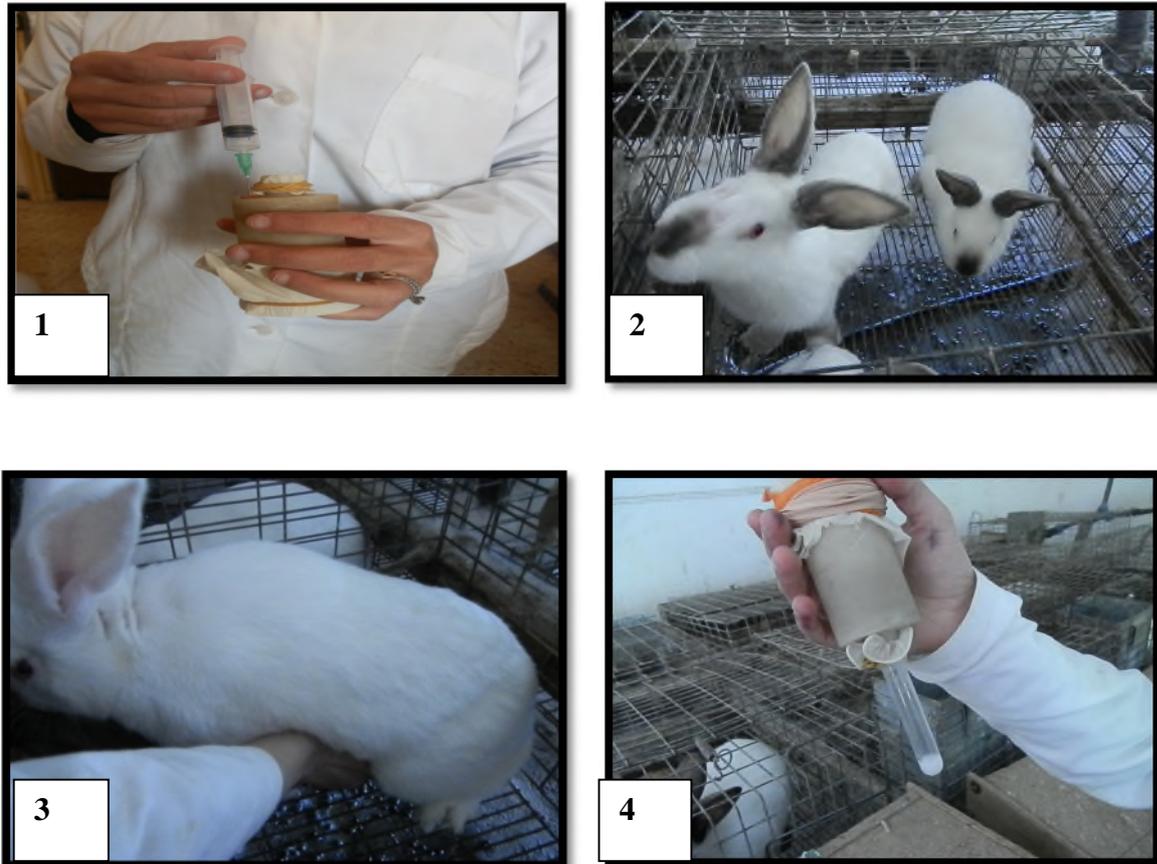


Figure 18: La collecte de la semence

### III.2. La dissection de l'épididyme

Nous avons procédé à la dissection de l'épididyme juste après la mort de l'animale.

#### a. Le matériel

Dans cette trousse de dissection, nous avons utilisé: une pince, des ciseaux et un bistouri (Figure 19).



Figure19: La trousse de dissection

#### b. La méthode de dissection

1-Enlever la gaine des testicules et de l'épididyme.

2-Isoler l'épididyme et le canal déférent du testicule (figure 20).

3-Nettoyer le pour éviter les contaminations.



**Figure 20:** L'épididyme et le canal déférent nettoyés

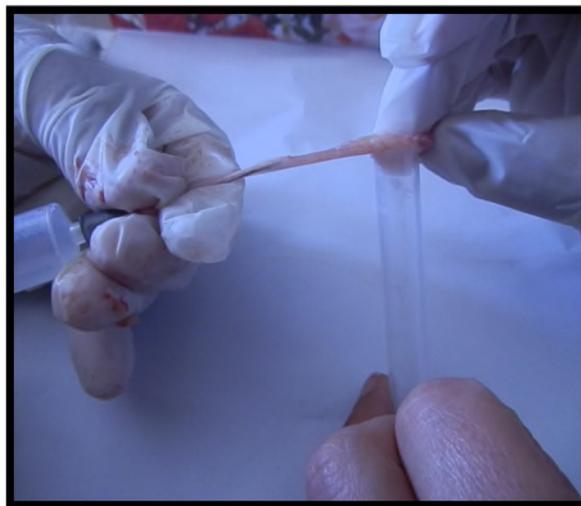
### **c. La récolte de la semence (Figure 21)**

-Introduire une seringue remplie d'air dans la lumière du canal déférent.

-Réaliser une incision au niveau de la queue de l'épididyme.

-Placer un tube gradué au niveau du point de l'incision.

-Vider l'air de la seringue dans la lumière du canal déférent pour créer une pression qui conduit à l'écoulement de la semence dans le tube de collecte.



**Figure 21:** la collecte du sperme épидидymaire

## **IV. L'analyse du sperme**

Dés que la collecte est terminée, la température de la semence est maintenue à 37°C en mettant le tube de collecte dans un bain-marie réglé à 37°C (figure22), ou en le tenant dans la paume de la main pendant toute l'analyse.



**Figure 22:** Photographie d'un bain marie.

Nous avons commencés par l'analyse macroscopique du sperme. Nous avons noté sa couleur et son volume puis l'analyse microscopique en utilisant un microscope optique, pour la recherche de la motilité massale, la motilité individuelle, la concentration, la morphologie et la viabilité des spermatozoïdes.

## **IV.1. Analyse macroscopique**

### **Méthode**

Directement après la collecte, nous avons analysé la **Couleur** par observation à l'œil nu. Et le **volume** en comparant le tube de collecte à un tube gradué, après élimination du gel.

## **IV.2. L'analyse microscopique**

### **a. Matériel**

Nous avons utilisé pour l'analyse microscopique du sperme le matériel suivant (figure23)

- Des lames
- Des lamelles
- Des tubes
- Des micropipettes de 100 $\mu$ l, de 25 $\mu$ l, de200 $\mu$ l et 10 $\mu$ l
- La cellule de THOMA



**Figure 23:** Matériel nécessaire pour l'analyse microscopique

**Les solutions (Figure 24) :**

Nous avons utilisé dans notre étude des solutions que nous avons préparées nous même ;

1-Le tris buffer préparé à base:

\*Du tris (hydroxyméthylaminométhane): 3,028g

\*De l'Acide-citrique: 1.250g

\*Du D-glucose: 1.675g

\*De l'Eau distillé: 100ml

2-La solution de fixation préparée à base de:

\*10ml de formol à 35% dans 1L de Na Cl à 0,9%

3-Les colorants: éosine-nigrosine contenant :

\*Éosine 1%

\*Nigrosine10%

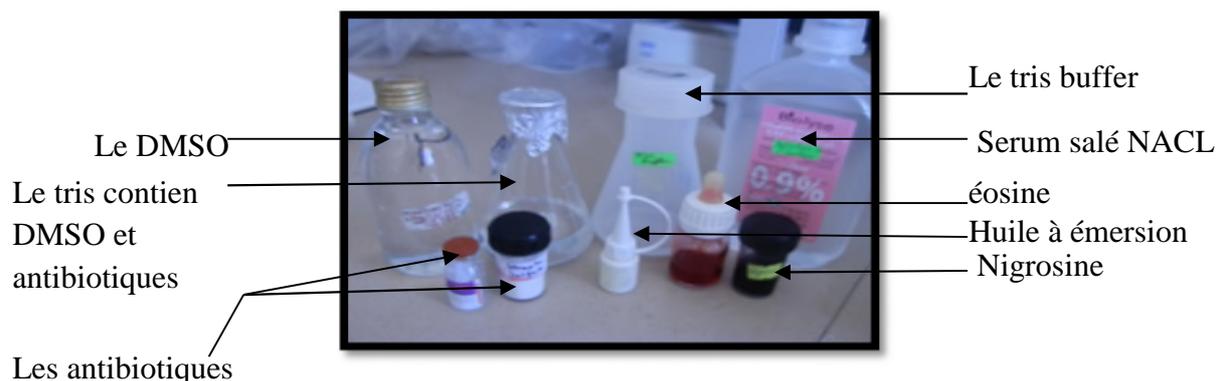
4-Les antibiotiques:

\*Gectapen (péniciline (1000000UI))

\*Streptosulfate: 0.1g

5-Le glucose

6-Sérum salé NaCl



**Figure 24:** Les solutions nécessaires pour l'analyse

## b. Les méthodes

### Motilité massale

La motilité massale est le mouvement d'ensemble des spermatozoïdes. Cette dernière est estimée directement après la collecte par observation d'une goutte de sperme déposée sur une lame sous microscope optique au grossissement X10. Une note est attribuée selon l'échelle de **Petitejean (1965)** de 0 à 9 (**voir l'annexe I**).

### Motilité individuelle

La motilité individuelle est le mouvement de chaque spermatozoïde. Pour estimer cette motilité nous avons suivi les étapes suivantes :

- Diluer le sperme à 1/5<sup>ème</sup> avec le tris buffer, (10µl de sperme avec 40µl de tris).
- Déposer une goutte de sperme dilué entre lame et lamelle.
- Observer sous microscope optique la motilité au grossissement X40.
- Donner une note selon l'échelle d'ADIEU de 0 à 4 (**voir l'annexe II**).

### Morphologie

La morphologie des spz est observée après coloration à l'éosine-nigrosine selon les étapes suivantes :

- Sur une lame, mélanger une goutte de sperme et une goutte d'éosine avec un embout.
- Laisser reposer quelques secondes.
- Ajouter deux gouttes de nigrosine et mélanger le avec un embout.
- Avec une autre lame, réaliser un frottis et le laisser sécher à l'air libre.
- Observer sous microscope au grossissement x100 à immersion.
- Classifier les spz normaux et anormaux, et classer les spz selon les anomalies: de la tête, de la pièce intermédiaire et du flagelle.
- Appliquer la formule de **BOUSSIT 1989** :

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

### **Viabilité**

La viabilité est le pourcentage des spermatozoïdes vivants, nous l'avons estimé par observation sous microscope d'un frottis réalisé après la coloration à l'éosine-nigrosine sus cité. Les spermatozoïdes colorés en rose sont morts tandis que les spermatozoïdes incolores sont vivants. Pour calculer les pourcentages, nous avons appliqué la formule de **Boussit D., (1989)**.

Nombre total des spermatozoïdes (200)	—————>	100%
Nombre des spz vivants	—————>	% des spz vivants

### **La concentration**

C'est le nombre de spz par ml ; nous l'avons déterminé comme suit:

- Diluer le sperme à 1/200 avec une solution de fixation.
- La mise au point de la cellule de thoma sous microscope à 3.2X puis à 10X ensuite à 40X jusqu'à l'observation des carreaux de la cellule.
- Déposer la lamelle sur la cellule de thoma.
- Introduire une goutte de sperme dilué dans chaque bordure de la cellule de thomas.
- Laisser reposer quelques minutes.
- Compter le nombre de spermatozoïdes dans 8 grandes carreaux diagonaux.
- Pour le calcul de la concentration nous avons appliqué la formule suivante :

$$C = N \times 200 / 64 \text{ (} 10^6 \text{ Spz)}$$

Avec :

C : la concentration des spermatozoïdes par ml.

N : Le nombre des spermatozoïdes comptés, dans les huit carreaux diagonaux.

D : le taux de dilution (200).

## **V. La conservation de sperme du lapin**

Parmi les semences analysées, nous avons choisis le meilleur sperme disponible en termes de mobilité et de concentration, celui du lapin 2 de l'université, que nous avons récolté par dissection épидидymaire.

### **a. Les milieux de la conservation du sperme**

Nous avons utilisé 7 milieux, un contenant du tris-buffer, qui est considéré comme contrôle, et six autres milieux que nous avons, nous même, préparé (milieux à base de PEG, CHL, Vit E, PEG/CHL, PEG/Vit E et le complexe PEG/CHL/Vit E).

Les complexes PEG/CHL, PEG/Vit E sont préparés au laboratoire de génie des procédés.

### **b. La préparation des milieux de conservation**

Ces milieux sont préparés au niveau du laboratoire de biologie animale, comme suit :

#### **Préparation de la solution du vitE :**

Nous avons utilisé la vit E pharmaceutique, commercialisé sous forme de capsules. Nous avons pris une goutte de vit E après incision de la capsule, nous l'avons pesé puis calculé la quantité du tris buffer à rajouter selon la règle de trois suivante ;

1.2mg de vitE —————> 10ml de tris

38mg (pois pesé de la goutte de la vitE) —————> X ml

$$X=38 \times 10 / 1.2 = 316.66 \text{ml}$$

#### **La préparation de la solution de CHL:**

40mg de CHL —————> 10ml de tris buffer.

#### **La préparation de la solution PEG/vit E:**

12mg (90% de PEG+10%de vit E) —————> 10ml de tris buffer.

#### **La préparation de la solution PEG/CHL:**

200 mg (90% de PEG+10% de CHL) —————> 5ml de tris buffer.

#### **La préparation de la solution PEG/vit E/CHL:**

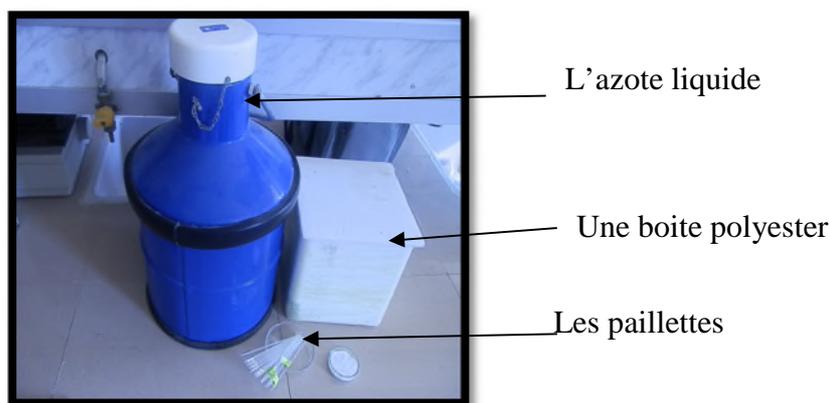
Nous avons mélangé un volume de la solution PEG/Vit E et un volume de celle de PEG/CHL.

## **V.1. La congélation**

### **a. Matériels**

Le matériel que nous avons utilisé pour la réalisation de la conservation du sperme par congélation est le suivant (figure 25):

- Des paillettes de 0.25ml
- De l'azote liquide
- Une boîte polyester
- Un réfrigérateur
- Des micropipettes
- Des tubes
- Un portoir
- Des étiquettes
- Les 7 milieux
- Le sperme



**Figure 25:** Le matériel nécessaire pour la congélation

### **b. Méthode**

Nous avons congelé le sperme en suivant les étapes suivantes:

- Mettre le sperme, juste après la collecte, dans le réfrigérateur à 5°C pendant 90 min afin d'éviter le choc thermique.
- Diluer le sperme à 1/5<sup>ème</sup> avec (tris buffer + 10% DMSO+antibiotiques).
- Préparer 2 séries de traitement (1 pour la T° ambiante et 1 pour la congélation)
- Mettre le sperme dilué dans les 14 milieux à raison d'1volume /1volume (7 pour la congélation et 7 pour la T° ambiante).
- Remplir les paillettes de 0,25 ml par aspiration à travers le bouchon de l'extrémité.
- Mettre les paillettes dans le réfrigérateur pendant 45min à 5°C.
- Déposer Les paillettes horizontalement, à 5 cm au-dessus de l'azote liquide, pendant 10 minutes. Puis les immerger complètement dans l'azote liquide à -196°C pendant 10mn.

## **V.2. Décongélation des paillettes**

### **a. Le matériel (Figure 22)**

- Un bain-marie

### **b. La méthode**

Lors de la décongélation, plonger les paillettes dans un bain-marie à 50°C pendant une minute et placer le contenu de chaque paillette dans un tube contenant 1 ml du dilueur de décongélation à 37°C.

## **V.3.L'Analyse de la semence décongelée**

Nous avons analysé le sperme décongelé avec un analyseur informatique CASA (computer-assisted sperm analysis). Ce système permet de mesurer objectivement des

paramètres tel que la motilité, et permet de mesurer des paramètres tel que la concentration et la morphologie (Figure 26).



**Figure 26:** Photographie de l'analyseur informatique du sperme.

Dans ce chapitre nous allons exposer et discuter les résultats obtenus dans notre travail. L'objectif de notre travail est de proposer un milieu de conservation à  $-196^{\circ}\text{C}$  convenable pour le sperme du lapin. Le meilleur milieu sera donc, celui qui assurera une meilleure conservation de la mobilité du sperme.

## I. Caractéristique du sperme frais

La qualité du sperme avant la congélation joue un rôle important dans sa conservation, c'est pour cela que nous avons commencé par l'analyse des caractéristiques du sperme frais juste après la collecte. Cette étape est importante car elle nous permet d'évaluer le degré des changements apportés par la congélation.

### I.1. Analyse macroscopique

Les caractéristiques macroscopiques de chaque mâle sont révélées dans le tableau IV.

**Tableau IV:** caractères macroscopiques du sperme des lapins étudiés

	♂	Couleur du sperme	Le volume
I.N.R.A.A	1	blanc opaque	0.35
	2	Blanchâtre	0.47
	3	blanchâtre	0.24
	4	Blanchâtre	0.4
Université	1	blanc nacré	0.4
	2	blanc nacré	0.56
	3	blanc nacré	0.5

Moyenne de volume = 0.417 ml

#### a. Le volume :

La moyenne des volumes des éjaculats est de 0.417 ml. Cette valeur correspond aux valeurs décrites par **Boiti** en **2005** qui varient de 0.3 à 0.9, par contre reste très loin de celle donnée par **Bencheik** en **1995** qui a rapporté un volume de 0.83ml et du résultat de **Boulbina** en **2011** qui est de 0.86 ml.

Ces différences peuvent être liées à l'action de la photopériode (**Sabbagh, 1983**), aux différences entre les races (**Boiti et al., 2005**) ou à la fréquence de la collecte (**Bencheik, 1995**). Dans notre travail, nous avons collecté les mâles une fois par semaine ce qui nous a permis d'avoir un bon volume.

## I.2. Analyse microscopique

Le tableau V regroupe les caractéristiques (la mobilité et la concentration) du sperme des 7 lapins étudiés.

**Tableau V:** Caractéristiques microscopiques du sperme des lapins

	♂	La mobilité massale	La mobilité individuelle	La mobilité individuelle (%)	La concentration x10 <sup>6</sup> spz/ml
INRA	1	9	3,5	87,5	856
	2	7	3	75	734,32
	3	9	3.5	87.5	656 ,24
	4	7	2.5	62.5	808
Université	1	6.5	3.5	87.5	400.9
	2	8.5	3.5	87.5	117
	3	8.5	3.5	87.5	256,27
Moyenne		<b>7.928</b>	<b>3.357</b>	<b>83.928</b>	<b>546,96</b>

### a. La Mobilité

- **Mobilité massale**

La moyenne de la mobilité massale est de 7,92 elle est très proche de 7,86 rapportée par **Bencheik , 1995**, mais supérieure à la valeur trouvée par **Boulbina en 2011** qui est de 3.04.

- **Mobilité individuelle**

La moyenne de la mobilité individuelle dans les semences que nous avons analysé est de 3,35. Cette valeur est inférieure à celle trouvée par **Bencheik (1995)** qui est de 3.67, comme elle est supérieure à la valeur de 1.96 obtenue par **Boulbina** et ses collaborateurs en **2012**.

Ces différences de résultats peuvent, probablement, être liées à la différence d'âge entre les mâles récoltés et à la fréquence de la collecte. En effet, deux éjaculats, à 15min d'intervalle, recueillis une fois par semaine (notre rythme de collecte), donne la meilleure production de sperme en termes de qualité et de quantité (**Bencheikh 1995 ; Mocé et al., 2000**).

## b. Concentration

La concentration en spermatozoïdes, des semences analysées dans notre étude, est en moyenne de  $546,96 \times 10^6$  spz/ml (tableau V). Notre résultat est meilleur que celui obtenu par **Abd-El-Azim et El-Kamash (2011)** ( $340.59 \times 10^6$  spz/ml). Mais faibles par rapport au résultat de **Boulbina , (2011)** qui a trouvé une concentration de  $734,9 \times 10^6$  spz/ml.

La variation de la concentration en spermatozoïdes entre les semences de différents mâles peut être influencée par plusieurs facteurs. **Castilini (2008)**, rapporté que les mâles adultes ont une semence de concentration en spermatozoïdes plus élevée que celle des jeunes adultes. Et **Boulbina et al., (2012)** ont noté une faible concentration chez les mâles qui naissent en hiver.

## c. La morphologie et la viabilité

Le tableau IV indique les caractéristiques microscopiques (morphologie et viabilité) du sperme des lapins étudiées.

**Tableau VI** : Caractéristiques microscopiques (morphologie et viabilité) du sperme des lapins étudiées

	O	Morphologie (%)			Viabilité (%)		
		Normaux	Anormaux		vivants	Morts	
			Anomalie de la tête	Anomalie de la pièce intermédiaire			Anomalie de la queue
I.N.R.A.A	1	86	0	10	4	47	53
	2	86	1	7	6	23.5	76.5
	3	91.5	1	4	3.5	92	8
	4	90.5	0	3.5	6	13.5	86
Université	1	90	2.5	6	1.5	39	61
	2	88	5.5	1.5	5	61.5	38.5
	3	84.5	1	3.5	11	63	37
Moyenne		<b>88.071</b>	<b>1.57</b>	<b>5.07</b>	<b>5.285</b>	<b>48.5</b>	<b>51.49</b>

**-La vitalité:** nous avons noté une moyenne des pourcentages des spz vivants de **48.5%**. **Boulbina et al., en 2012** ont rapporté les pourcentages de **42%** et de **36%**. Mais **Bencheik (1995)**, dans des conditions proches des nôtres, a obtenu un pourcentage de viabilité de **83,2**.

Ces différences sont, probablement, liées à la saison de naissance des mâles. Les mâles nés en hiver ont un nombre faible de spz vivants (**Boulbina et al., 2012**), ou même liées au problème de consanguinité, fréquent dans nos élevages.

**-Les anomalies des spermatozoïdes:** En analysons les anomalies rapportées dans le tableau VI, nous pouvons remarquer que la majorité des spermatozoïdes sont normaux avec une moyenne de 88.07%. La plupart des anomalies sont liées à la queue (5.28%) et à la pièce intermédiaire (5.07%). Ces résultats sont légèrement inférieurs à ceux obtenue par **Abd El-Azim (2011)** (91,21%, et 90,85%).

La forte consanguinité existante entre les animaux surtout ceux de l'INRAA, provenant du même élevage et reproduits entre eux, a probablement, conduit à l'apparition et à l'augmentation des pourcentages des anomalies de morphologie ainsi qu'à la diminution de la viabilité.

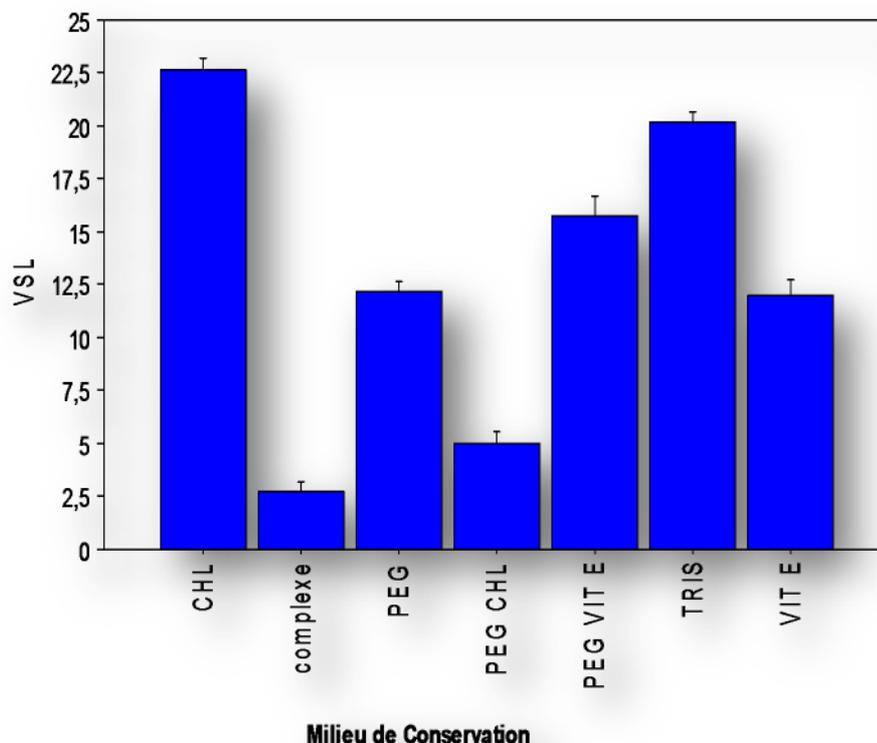
**Boulbina et al. (2012)**, ont rapporté, dans leur étude sur l'effet de la saison sur les caractéristiques de la semence des lapins en Algérie, que la saison de naissance a un effet sur la viabilité et la morphologie des spermatozoïdes. Ils ont noté que les lapins nés en hiver présentent plus d'anomalies de morphologie par rapport aux autres.

## **II. Caractéristiques du sperme conservé**

Pout illustrer nos résultats, nous avons utilisé l'analyseur informatique de la mobilité spermatique. Il s'agit du système SCA (Sperm Class Analyzer), connu pour son pouvoir de générer des valeurs objectives (**Verstegen et al., 2002**). Ce système permet notamment de mesurer des vitesses de progression des gamètes.

## II.1. Température ambiante

### a. A T0



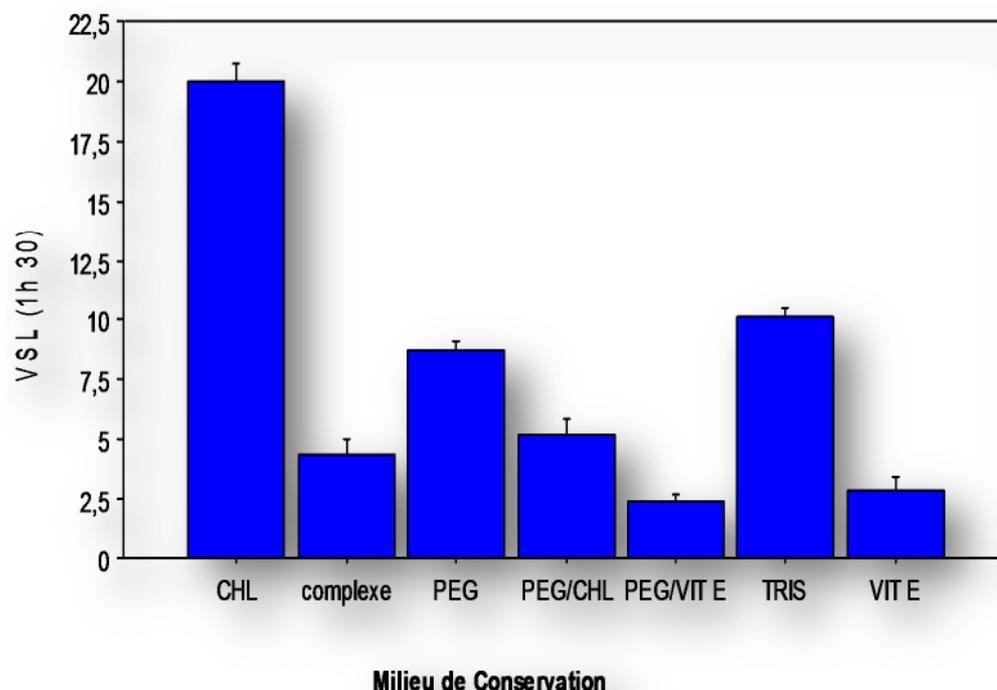
**Figure 27 :** Histogramme représentant les vitesses (VSL en  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) des spermatozoïdes à une température ambiante à T0 dans les 7 milieux de conservation utilisés.

A T0 (figure 27), juste après avoir mélangé le sperme dilué et les différents milieux, l'analyse de la mobilité des spermatozoïdes avec le CASA, a indiqué que le milieu contenant du cholestérol est le seul qui a montré une VSL supérieure à celle des spermatozoïdes conservés dans le milieu contrôle (TRIS) et mieux que celle du milieu PEG -CHL.

La haute valeur retrouvée dans le milieu CHL signifie que l'effet de ce dernier sur la membrane plasmique des spermatozoïdes est rapide, contrairement aux autres milieux où nous remarquons une baisse de viabilité et de vitesse de progression comparativement au contrôle. En effet, le cholestérol contrôle la structure de la membrane plasmique, en entrant en interaction avec les phospholipides membranaires, il la renforce et la stabilise (Mocé *et al.*, 2010).

La Vit E est connue pour son effet antioxydant (Kakuk et Darnas, 1973) 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. Le PEG a donc amélioré la solubilité de la VITE, ce qui a permis aux spermatozoïdes de l'utiliser efficacement.

## b. A T=1H30

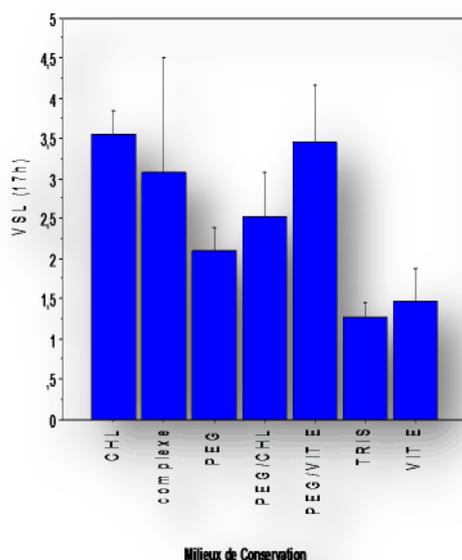


**Figure 28 :** Histogramme représentant les vitesses progressives (VSL en  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) des spermatozoïdes à une température ambiante à T=1h30 mn dans les milieux de conservation utilisés.

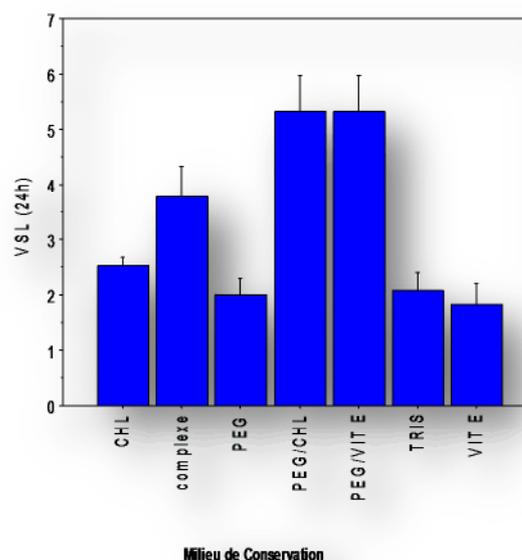
Les résultats de la mobilité dans les différents milieux conservés pendant 1h30 à la température ambiante sont représentés dans le diagramme de la figure 28, sur cette dernière nous remarquons que le milieu à base de CHL se distingue avec une nette supériorité de la VSL des spz, comparativement à celle notée dans le milieu contrôle et surtout par rapport au reste des milieux.

Ces résultats s'expliquent par l'effet protecteur du CHL exercé sur la membrane plasmique des spz.

## c. T-17h et T-24h



**Figure 29 :** Histogramme représentant les vitesses progressives (VSL en  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) des spermatozoïdes à une température ambiante à T=17h dans les milieux de conservation utilisés

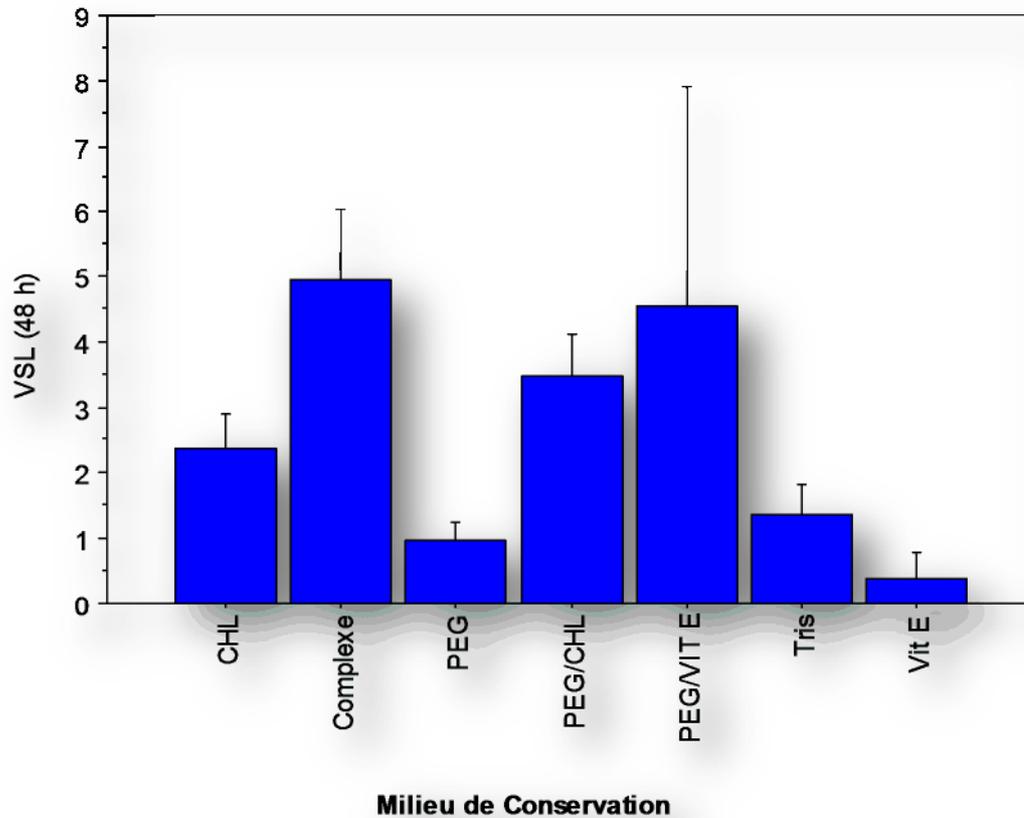


**Figure 30 :** Histogramme représentant les vitesses progressives (VSL en  $\mu\text{m}/\text{sec}$  des spz) à une température T=24h dans les milieux de conservation utilisés.

A 17h ainsi qu'à 24h (Figure 29 et 30 respectivement), nous remarquons une chute importante des valeurs de VSL dans les différents milieux à l'exception de celle notée dans les complexes PEG/Vit E et PEG/CHL. Dans le premier, la VSL augmente à 17h ( $3,45\mu\text{m}/\text{sec}$ ) puis d'avantage à 24h ( $5,32\mu\text{m}/\text{sec}$ ); et dans le deuxième, elle augmente à 24h ( $5,32\mu\text{m}/\text{sec}$  par rapport à  $4,97\mu\text{m}/\text{sec}$  à T<sub>0</sub>).

La présence du PEG dans les deux milieux a probablement augmenté la solubilité des deux molécules, CHL et VIT E après leur piégeage. Ce qui les a rendu plus disponibles pour les spermatozoïdes et leur a permis, donc, d'exercer leurs actions. Cette solubilité est liée au pouvoir hydrophile et à la mouillabilité du PEG rapportés par **Gaur et al., (2012)**. Par ailleurs, l'amélioration de la solubilité des produits organiques et des sels par le PEG est notée par **Pancera et al., (2002)**.

## d. t=48H

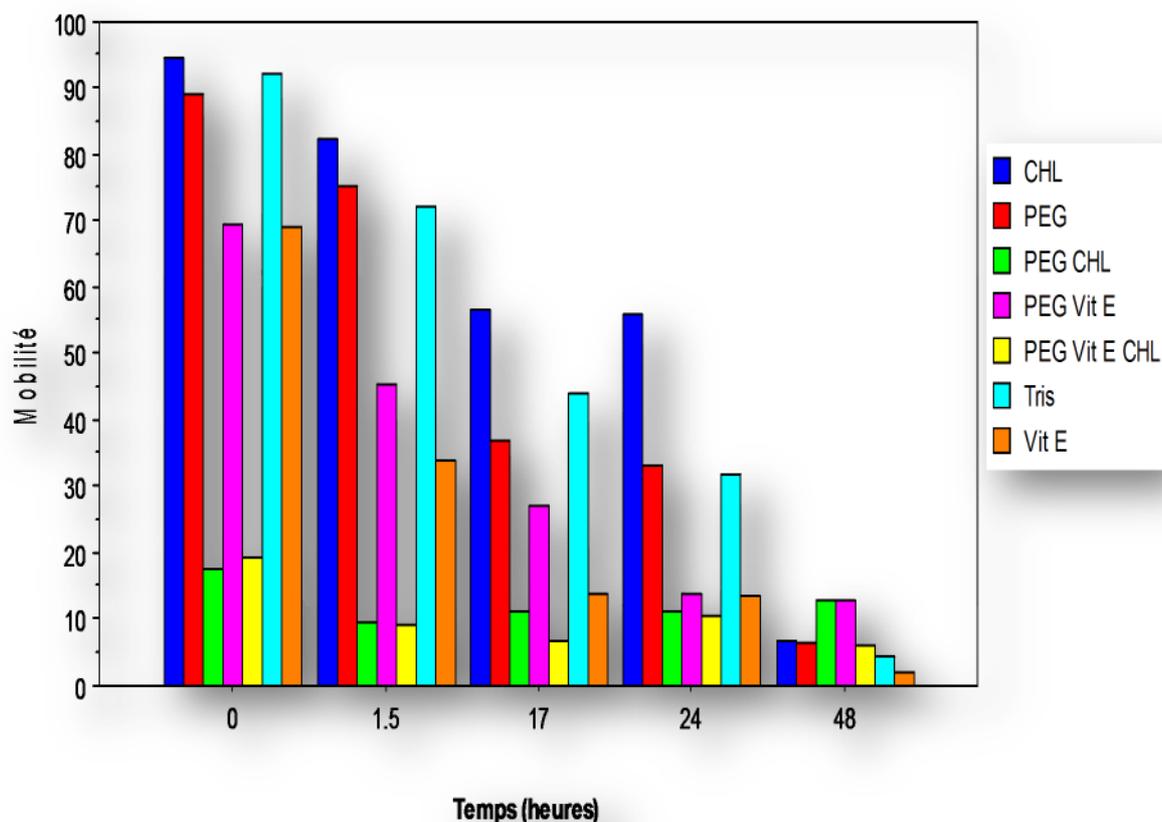


**Figure31:** Histogramme représentant les vitesses progressives (VSL en  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) des spermatozoïdes à une température ambiante à T=48h dans les milieux de conservation utilisés.

Après 48h de conservation à T° ambiante, la supériorité du complexe est claire avec une VSL meilleure que celle notée à T0 dans le même milieu ( $4,93\mu\text{m}/\text{sec}$  vs  $2,72\mu\text{m}/\text{sec}$ ) et à celles notées dans le reste des milieux testés (Figure 31). Il est important de signaler qu'à ce moment, la VSL du contrôle a énormément baissé par rapport à T0 ( $1,38 \mu\text{m}/\text{sec}$  vs  $20,17 \mu\text{m}/\text{sec}$  respectivement).

L'augmentation de la VSL dans le complexe PEG/CHL/Vit E après 48h de conservation à T ambiante, nous laisse penser qu'un effet combiné entre les trois molécules a conduit à cette amélioration de la VSL. Le cholestérol a probablement renforcé la solidité de la membrane cytoplasmique, et la VIT E a lutté contre le stress oxydatif, le PEG a permis à ces deux molécules d'exprimer leur potentiel en augmentant leur solubilité.

c. Le pourcentage de la mobilité des spz conservés à la température ambiante (à t<sub>0</sub>, 1h30, 17h, 24h et 48h)



**Figure 32:** Histogramme représentant le pourcentage des spermatozoïdes mobiles conservés à T ambiante dans les sept milieux utilisés, analysés à différent temps.

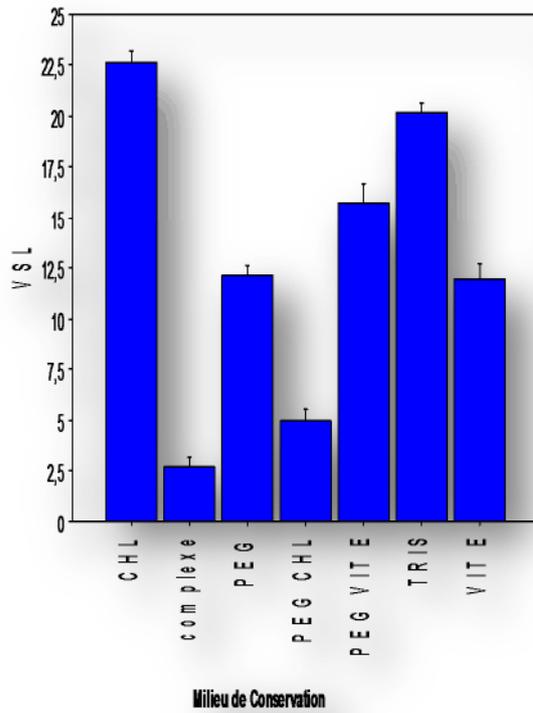
Le pourcentage des spermatozoïdes mobiles diminue progressivement de t<sub>0</sub> à 48. Comparativement au contrôle et aux autres milieux, le CHL est le milieu qui présente le meilleur pourcentage de mobilité de t<sub>0</sub> jusqu'à 24h. A 1h30 et à 24h, le pourcentage de mobilité dans le PEG est meilleure que celle du contrôle. A 48h, malgré que les pourcentages sont trop faibles, la distinction des complexes PEG/CHL et PEG-Vit E est évidente.

Par ailleurs, la mobilité dans le milieu PEG-Vit E est meilleure que celle du milieu Vit E seul, et ce à 1h30, à 17h et à 48h. Cela indique que le PEG améliore l'effet de la Vit E, probablement, en augmentant sa solubilité.

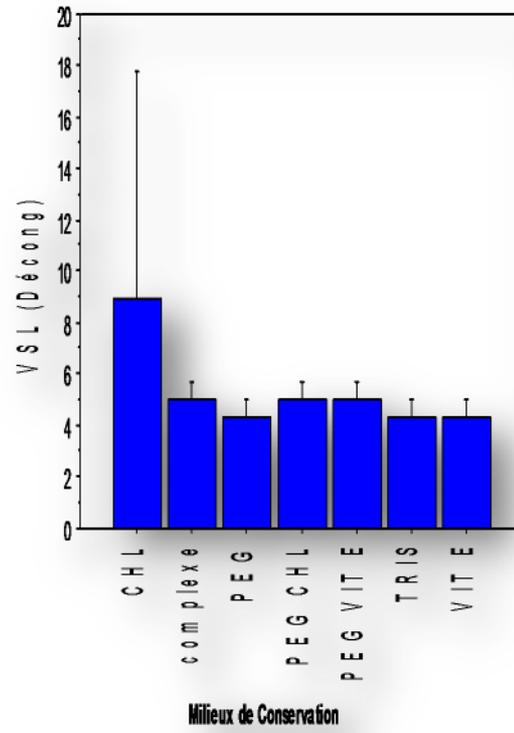
## II.2. congélation-décongélation

### a. Résultats et discussion

L'analyse du sperme traité a généré les résultats joints en histogrammes suivants :



**Figure 27:** Histogramme représentant les vitesses (VSL en  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) des spz à T0 dans les milieux de conservation utilisés.



**Figure 33:** Histogramme représentant les vitesses (VSL en  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) des spz après la congélation-décongélation dans les milieux de conservation utilisés

L'analyse du sperme congelé-décongelé, a montré une baisse importante de la VSL, par rapport à  $t_0$ , à l'exception des complexes PEG-CHL et PEG-CHL-VITE, dans lesquels nous avons noté une augmentation de la VSL de  $4,97 \mu\text{m}/\text{sec}$  à  $5,03 \mu\text{m}/\text{sec}$  et de  $2,72 \mu\text{m}/\text{sec}$  à  $5,03 \mu\text{m}/\text{sec}$  respectivement. .

Dans ces deux milieux le PEG a probablement amélioré l'effet du cholestérol sur la membrane plasmique des spermatozoïdes, un effet de renforcement, de stabilisation et de restauration des membranes lésées. Par ailleurs, le PEG protège les membranes cellulaires contre les agressions physiques et chimiques (Togo, 1999).

En comparant la VSL des six milieux testés et du control après congélation-décongélation, nous remarquons que le milieu qui a conservé le mieux les spermatozoïdes est celui à base de CHL ( $8,9 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) qui a le pouvoir de réduire la sensibilité de la membrane des

spermatozoïdes aux dommages de la congélation (**Mocé et al. 2009**). Tous les autres milieux ont présenté une VSL proche de celle du control (4,37µm/sec) avec une égalité entre les trois complexes (5,03 µm/sec).

Nous avons remarqué que le pourcentage des spermatozoïdes mobiles a diminué après congélation-décongélation dans les sept milieux; cette diminution est due à la forte sensibilité des spermatozoïdes du lapin aux processus de congélation-décongélation (**Castellini, 1992**) Comme il peut être liée à la concentration des cryoprotecteurs, puisque les concentrations élevées de ces derniers rendent le milieu toxique même avant la congélation, le DMSO par exemple, n'est utilisé qu'à une concentration de 4%, niveau auquel il détruit déjà une part importante du pouvoir fécondant des spermatozoïdes, avant même leur congélation (**Sauveur et Reviers, 1988**).

# ***ANNEXES***

**Annexe I :** Echelle utilisé pour déterminer la MM d'après PETITJEAN H, 1965.

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

**Annexe II :** Echelle utilisé pour déterminer la MI d'après ADRIEU., 1974.

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

*A*

- ❖ **Abd El-Azim A et EL-Kamash E M., 2011**, Evaluation of semen quality and its relation to mating système for some breeds of rabbit under environment conditions to middle of EGYPT ; poul. Science (3)1 II: p 467 -480.
- ❖ **Allen R.G. et Tresini M., 2000**, Oxidative stress and gene regulation. Free Radic.Biol.Med 28, 463-499.
- ❖ **Al Nasassrah M., 1998**, The effect of an increase in chain length on the mechanical properties of polyethylene glycols, Europ. J. Pharm. Biopharm. 46: p 31-38
- ❖ **Althouse G.C., Kuster C., Clark S.G, Weisiger R.M, 2000**, Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. Theriogenology, 53, 1167, 1176
- ❖ **Alvariño J.M.R. 2000**, Reproductive performance of male rabbits. In Proc. 7th World Rabbit Congress, July 2000, Valencia,Spain, Vol. A, 13-35.
- ❖ **Amann R.P, 1998**, Cryopreservation of sperm. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 1. Academic press, San Diego, 773-783.
- ❖ **Ana Martins-Bessa, Antó nio Rocha , A. Mayenco-Aguirre, 2006**, Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders, Theriogenology 66 ,2047–2055.
- ❖ **Anonyme**, International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI), The International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 11th Edition, CTFA, Washington DC, 2006.
- ❖ **Arriola J. et Foote R. H., 2001**, Accessory Sperm as an Indication of Fertilizing Ability of Rabbit Spermatozoa Frozen in Egg Yolk–Acetamide With Detergent.

*B*

- ❖ **Bansal A.K. et Bilaspuri G. S., 2011**, Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions.
- ❖ **Barry Halliwell, 2001**, Free Radicals and other reactive species in Disease, encyclopedia of life sciences.
- ❖ **Bedford J. M., 1964**, Fine structure of the sperm head in ejaculate and uterine spermatozoa of the rabbit, I.Reprod.Fertil.7, p (221-228)
- ❖ **Béguel J.P., 2012**, Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, Thèse: Université de bretagne occidentale

## *Références bibliographiques*

---

- ❖ **Béguel J.P., Arnaud Huvet , Virgile Quillien , Christophe Lambert, Caroline Fabioux, 2013**, Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 157 (2013) 63–71.
- ❖ **Benchiekh N., 1995**, Effet de la fréquence de la collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoïdes récoltés chez le lapin, *Ann Zootech* 44, 263-274
- ❖ **Besenfelder U., Theau-Clément M., Sabbioni E. , Castellini C., Renieri t., Havlicek V. , Huber T. , Wetscher F. , Mösslacher G. , Brem G., 2004**, Effects of different light intensities on quality of spermatozoa in rabbits, *world rabbit sci.* 2004, 12: 227 – 234.
- ❖ **Betajeri V., 2011**, Water soluble polymers for pharmaceutical applications, , 3, p:1972-2009 ;doi : 10.3390/polym3041972.
- ❖ **Billard R, Legendre M, 1980**, cryoconservation du sperme de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* R.).
- ❖ **Bidanel J.P., Riquet J., Chardon P., François H.P.R., 2003**, Denismilan ,apport des nouvelles biotechnologies aux programmes d'amélioration génétique du porc,(p356)
- ❖ **Boiti C., Castellini C., Theau-Clément M., Besenfelder U., Liguori L., Renieri T. et Pizz F., 2005**, Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen, *world rabbit sci.*, 13: 71 – 91.
- ❖ **Bolet G. et Bodin L., 1992**, Les objectifs et les critères de sélection: Sélection de la fécondité dans les espèces domestiques, *INRA Station d'Amélioration Génétique des animaux BP 277 31326 Castanet-Tolosan Cedex*, 129-134.
- ❖ **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).
- ❖ **Boulbina I., 2011**. Caractéristique de la semence du lapin de population locale (*Oryctolagus cuniculus*). These de magister. Ecole nationale supérieure d'Alger.
  
- ❖ **Boulbina I., Ain-Baziz H., Ilès I., Zenia S., Belabbas R., Temim S., 2012**, Effect of birth season on onset of puberty and semen characteristics in male rabbit of Algerian population (*Oryctolagus cuniculus*), *Proceedings 10 th World Rabbit Congress - September 3 - 6, 2012- Sharm El- Sheikh -Egypt*, 335- 339.
- ❖ **Boussit D., 1989**. Reproduction et insémination artificielle en cuniculture chez le lapin. Edité par l'association français de cuniculture : diffusion Lavoisier TEC et DOC

## Références bibliographiques

---

### C

- ❖ **Castellini C., 2008**, Semen production and management of rabbit bucks, 9th World Rabbit Congress – June 10-13, Verona – Italy.
- ❖ **Castellini C., Battaglini M. et Lattaioli P., 1992**, Effects of cryoprotecteurs and freezing on rabbit semen quality, *J.Appel. Rabbit Res.* 15:431-438.
- ❖ **Castellini C., Cardinali R., Lattaioli P., Dal Bosco A., 2005**, Comparison of different dietary sources of PUFA n-3 on semen characteristics of rabbit bucks. *Reprod. Dom. Animal.* (Abstr. 386), 180.
- ❖ **Catapano A.L., 1997**, Antioxidant effect of flavonoids, *Angiology* **48**, 39-44
- ❖ **Chabory E., 2009**, Caractérisation fonctionnelle de la glutathion peroxydase 5 murine. Thèse : Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de doctorat.
- ❖ **Cicoella A., 2006**, Effets des éthers de glycol sur la reproduction glycol ethers reproductive risks, *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*.34, p (955–963).
- ❖ **Combs G.F. Jr, Bunk M.J., Lavorgna M.W. 1981**, Vitamin E and selenium important in chick diet, *Feedstuffs USA*, 1981, **53**: 19, p 20.
- ❖ **Corpet D. E., Parnaud G, Tache S., Pierre F., 2003** le polyéthylène glycol, un puissant suppresseur du cancer colorectal, découvert en étudiant l'effet promoteur 26 , p :291–300.

### D

- ❖ **Decuadro-Hansen G., 2004**, La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal Chilled and frozen semen: the animal experience, *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 32 (2004) 887–893.
- ❖ **Djago A. Yaou, Kpodekon Marc et Lebas François, 2007**, Le guide pratique de l'éleveur de lapins en Afrique de l'ouest, 2<sup>ème</sup> édition, éditeur : association "cuniculture" 31450 corronsac – France.

### E

- ❖ **England G.C.W., 1993**, Cryopreservation of dog semen: a review, *Journal of Reproduction and Fertility Supplements* 4, 243-255.

### F

- ❖ **Forthier M., 2010**, La cryométrie en flux comme outil pour caractériser et évaluer le potentiel de fertilité des spermatozoides bovins, Thèse pour l'obtention du grade de maitre en science. Faculte de médecine. Université Laval.

## *Références bibliographiques*

---

- ❖ **Foulkes J.A., 1977**, The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa, *J Reprod Fertil*, 49:277-284.
- ❖ **François Seigneurin et Elisabeth Blesbois , 2005**, Mise au point d'une méthode de congélation de la semence de pintade, Station de Recherches Avicoles - INRA - 37380 Nouzilly.

### *G*

- ❖ **Garrido, N., M. Meseguer, C. Simon, A. Pellicer and J. Remohi, 2004**, "Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility." *Asian J Androl* 6(1): 59-65.
- ❖ **Godeas, C., F. Tramer, F. Micali, M. Soranzo, G. Sandri et E. Panfili, 1997**. "Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa." *Biol Reprod* 57(6): 1502-8.

### *H*

- ❖ **Halliwell, B., Gutteridge, J., 1999**, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press.
- Hansen C.H., 2011-2012**, La propédeutique 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
- ❖ **Holland, M. K., J. G. Alvarez and B. T. Storey (1982)**. "Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa." *Biol Reprod* 27(5): 1109-
- ❖ **Holt W.V., 2000**, Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47–58.

### *J*

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

### *K*

## *Références bibliographiques*

---

- ❖ **Kadajji V.G et Guru V. Betageri, 2013**, Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications, p 1972-2009.
- ❖ **Kakuk T., Darnas A. 1973**, Biotin deficiency, Magyar Allatorvosok Lapja, 95: 9, 477-482.
- ❖ **Kuzminsky G., Fausto A.M., Morera P., 1996**, Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope, 36 p(565-575).

### *ℒ*

- ❖ **Lanzafame F., 2009**, Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility, Vol 19. No 5. 638–659 Reproductive BioMedicine Online; [www.rbmonline.com/Article/4182](http://www.rbmonline.com/Article/4182) on web 30 September 2009.
- ❖ **Larbier M., Leclercq B, 1992**, Nutrition et alimentation des volailles, Paris, France : ESTEM, 1992. 352 p.
- ❖ **Laren M.D., 2007**, Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier.
- ❖ **Lausanne A.R.L., 2010**, Le Stress Oxydatif, Dr Méd. Dany Mercan Unilab [dany.mercan@unilabs.com](mailto:dany.mercan@unilabs.com).
- ❖ **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, 1130-1141.
- ❖ **Lavara R., Viudes de Castro M-P. et Vicente J-S, 1999**, Effet du nombre de spermatozoïdes sur la fertilité de la semence conservée 24 heures chez le lapin, 48(407-412).
- ❖ **Lebas F., Coudert P., H. de Rochambeau et Thébault R.G., 1996**, le lapin : Elevage et pathologie (Collection FAO: Production et santé animales, N° 19, ISBN 92-5-203441-2).
- ❖ **Legendre M., Billard R., 1980**, cryoconservation du sperme de truite arc-en-ciel (*salmo gairdneri* r.), Laboratoire de Physiologie des Poissons, I.N.R.A.78350 IOUY-EN-JOSAS. France
- ❖ **Li Y., Huang T.T., Carlson E.J., Melov S., Ursell P.C., Olson J.L., Noble L.J., Yushimura M.P., Berger C., Chan P.H. et al., 1995**, Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase, Nat, Genet 11 376-381.
- ❖ **Liu E, Kitajima SH, Wiese E, Reifenerg K, Morimoto M, Watanabe T et Fan J, 2007**, Re-Establishment of complement C6-Deficient rabbit colony by cryopreserved sperme transported from abroad.

## *Références bibliographiques*

---

- ❖ **Lopez F.J. et Alvarino J.M.R 2000**, Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerated rabbit semen. *Animal Reproduction Science* 58: 147–154.
- ❖ **Lovelock J.E, Bishop M, 1959**, Prevention of freezing injury to cells by dimethyl sulfoxide. *Nature* 183, 1394, 1395.

### *M*

- ❖ **Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. 2002**. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod*, 67: 1250–1258.
- ❖ **Mapson, L.W., Goddard, D.R., 1951**. The reduction of glutathione by plant tissues. *Biochem J* 49, 592-601.
- ❖ **Martin 1981** J.O. U.S. 4, 268, 502 (Eli Lilly and Co.) May 19.
- ❖ **Mikulets Yu, 1996**, The action of vitamin E on iron utilization and functional activity of thyroid gland in broiler chicks, *Mezhdunarodnyi Sel'skokhozyaistvennyi Zhurnal*, 1, 55-59.
- ❖ **Miles J. J. et Demasi D.F., 1986**, U.S. 4, 599, 363 (Lever Brothers Co.) July 8, made in Germany 44: p. 43-45
- ❖ **Mocé E., Lavara R., Lavara F. et Vicente J. S., 2000**, effect of reproductive rhythm on seminal parameters from a rabbit line with high growth rate, volume A, pages 197-201.
- ❖ **Mocé E. , Lavara R. et Vicente J.S., 2005**, Influence of the Donor Male on the Fertility of Frozen-Thawed Rabbit Sperm after Artificial Insemination of Females of Different Genotypes, *Reprod Dom Anim* 40, 516–521.
- ❖ **Mocé E. et Jose S. Vicente, 2009**, rabbit sperm cryopreservation: a review, *animal reproduction science* 1101–24.
- ❖ **Mocé E., Vicente J.s, Lavara R., Viudes De Castro M.P., Lopez M, Bolet G. 2005**, Characteristics of fresh semen from eight rabbit breeds. *Reprod. Domest. Anim.*, 40, 388-398.
- ❖ **Mocé E., Purdy P.H., et Grahama J.K., 2010**, Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. Published by Elsevier B.V.
- ❖ **Morena M., Martin-Mateo M., Cristol J.P. et Canaud B., 2002**, Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours (p201).

## *Références bibliographiques*

---

- ❖ **Morera P., Kuzminsky G., Fausto A.M., 1996**, Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope, 36 P (565-575).

### *N*

- Negre-Salvayre A. et Salvayre R., 2005, Effet protecteur des acides gras contre les stress oxydatifs: Implication en physiopathologie vasculaire, OCL VOL. 12 N° 5-6.
- ❖ **Neumann E. W et Nadeau H.G, 1963**, Anal. Chem. 35, 1454.
- ❖ **Nothling J. et Shuttleworth R., 2005**, The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. Theriogenology, 63, 1469-1480.

### *P*

- ❖ **Pagé J., Pierre-Luc Blais, Dominique Trudel, Stéphanie Demers, Jean-Pierre Kack, Maxime Tessier et Stéphanie Ménard, 2013**, Guide de bonnes pratiques en production cyniculaire.
- ❖ **Pancera S.A, Luis H.M, Silva D.B., Watson Loh B, Itri R.C, Pessoa A .Jr D., Petri D.F.S, 2002**, The effect of poly(ethylene glycol) on the activity and structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase in solution p:291–300
- ❖ **Partyka A., Ewa Łukaszewicz et Wojciech Niz'an'ski, 2012**, Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen, Theriogenology 77 (2012) 1497–1504.
- ❖ **Peña A.I. , Linde-Forsberg C., 2000**, Effects of Equex, one- or two- steps dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. Theriogenology, 53, 859, 875.
- ❖ **Pharm J., 1947**, Assoc. Sci. Ed. 36 p 152.
- ❖ **Polge C., A. U. Smith, A. S. Parkes, 1949**, Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. Nature, 164 (4172), 666.
- ❖ **Pré J., 1991**, La lipoperoxydation, Path Biol 39, 716-736.

### *R*

- ❖ **Rall, T.W., Lehninger, A.L., 1952**, Glutathione reductase of animal tissues. J Biol Chem 194, 119-130.
- ❖ **Raphaël .B., Maud.B, Pierre.B, Pierrick H, Catherine J L, Gérard J M, Elise M, René R, Luc J.J.R, 2004**, Projet cryooster: optimisation, standardisation et validation de la

## *Références bibliographiques*

---

congélation de laitance d'huitre creuse *crassostrea gigas* a des fins de conservation et de diffusion génétique

- ❖ **Reimann J., 1974**, Archiv d. Pharmacie, 307, 321u. 328.
- ❖ **Roberts M.J., Bentley M.D., Harris J.M., 2002**, Chemistry for peptide and protein pegylation. Advanced Drug Delivery Reviews 54; 459 –476.

### *S*

- ❖ **Sabbagh M., 1983**. «Etude de la sexualité et de la reproduction du lapin domestique *Oryctolagus cuniculus* à des températures, le comportement alimentaire et fonctionnement thyroïdien et surrénalien en période d'adaptation au stress thermique » .thèse de doctorat. Université de Dakar Ecole Inter –état des Science Et médecine Vétérinaire .p12-50.
- ❖ **Safaa H.M., Lavara R., Viudes-de-Castro M.P.,Elsayed D.A.A.1, Mehaisen G.M.K., Marco-Jiménez F.2, Vicente J.S., 2012**, Effect of different freezing extenders on semenquality, fertility and prolificacy in two selected lines of rabbit bucks, Proceedings 10 th World Rabbit Congress – September 3 - 6, 2012– Sharm El- Sheikh –Egypt, 325 – 329.
- ❖ **Sauveur B. et de Riviers M., 1988**, Reproduction des volailles et reproduction d'œufs. INRA Edition, Paris: 449 p.
- ❖ **Sehpard B, Shaffer J. 1993**,Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxidative damage. Free Rad BiolMed; 15: 581-8.
- ❖ **Sergent O., Griffon B., Cillard P., Cillard J., 2000**, **Alcool et stress oxydatif**, Pathol Biol 2001 ; 49 : 689-95, 2001 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS.
- ❖ **Serin I, Mlih, Aksoy A, Ceylen., 2011**: Cholesterol-loaded cyclodextrin inhibits premature acrosomal reactions in liquid-stored rabbit spermatozoia. Animal reproduction science 123 .Department of ArtificialInsemination, Faculty of Veterinary Medicine, University of Anan Menderes, 09016 Aydın, Turkey .P106-111.
- ❖ **Shaffer C. B., 1947u**. F. H. Critchfi eld, Analytical Chemistry 19, 32
- ❖ **Shaffer C.B.J., 1947**, Pharm. Assoc. Sci Ed.36: p 152
- ❖ **Silva A.R., R. DE Cássia Soares Cardoso, D.C. Uchoa, D.A. Machado, L.D. Silva, 2002**, Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. Vet. J., 164, 3, 244, 246.
- ❖ **Smole I., Thomann A., Frey J., Perreten V., 2010**, Repression of common bull sperm flora and in vitro impairment of sperm motility with *Pseudomonas aeruginosa* introduced by contaminated lubricant. Reprod. Dom. Anim., 45, 737, 742).

## *Références bibliographiques*

---

- ❖ **Smyth H.F.,1947**, The toxicity of high molecular weight Polyethylene glycols, J. Am Pharm. Assoc. Sci. Ed. 36, p 157-160.
- ❖ **Smyth H.F.J., 1942** Ind. Hyg. Toxicol.,24 () p 281 C.B. Schaffer et al.,
- ❖ **Smyth H.F. J., 1950**,Am. Pharm. Assoc. Sci.Ed. 39 p 349
- ❖ **Stahl, W., Sies, H., 1997**, Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. Diabetes, 1997, vol 46 (2), p S14-S18.
- ❖ **Stănescu P. M. et Alin I. B., 2010**, Comparative Studies of ISSN 1843-5270; Electronic ISSN 1843-5378.
- ❖ **Strazinger, G.F., Maurer, R.R., Paufler, S.K., 1971**, Fertility of frozen rabbit Semen, J. Reprod. Fertil., 24: 111-117.
- ❖ **Surai P.F., 1992**, Vitamin E feeding of poultry males, In : Proceedings of the 19th World's Poultry Congress, Amsterdam, Netherlands, 19-24,September 1992, Beekbergen, Netherlands: World's Poultry Science Association, volume 1, p 57.

### *T*

- ❖ **Tan, K.H., Meyer, D.J., Coles, B., Ketterer, B., 1986**, Thymine hydroperoxide, a substrate for rat Se-dependent glutathione peroxidase and glutathione transferase isoenzymes. FEBS Lett 207, 231-233
- ❖ **Theau-Clement M., Sanchez A., Duzert R., Saleil G., Brun G.M., 2009**, Etudes de factures de variation de la production spermatique chez le lapin,
- ❖ **Turney-M. E. 1981**, U.S. 4, 280, 994 (Union Carbide Corp.) July 28,

### *U*

- ❖ **Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, et Flohe L. ,1999**, Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. Science 285: 1393-1396,

### *V*

- ❖ **Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K., 2002**, Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice, Theriogenology 57:149-179.

## *Références bibliographiques*

---

- ❖ **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 : invitro and in vivo studies. *Theriogenology*, **64**, 720-733.

### *W*

- ❖ **Wang H. J., Pan Y. X., Wang W.Z., Zucker I. H., Wang W., 2009**, NADPH Oxidase Derived Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Modulates the Exercise Pressor Reflex. *J Appl Physiol*. Jun 4.
- ❖ **Wei, Y.H., et al., 1998**, Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann N Y Acad Sci.*, **854**: p. 155-70.

## Résumé

L'objectif de notre travail est d'améliorer la conservation de sperme du lapin à température ambiante et par congélation (-196°C), en luttant contre les deux causes majeures qui risquent la survie des spz à savoir le stress oxydatif et la formation des cristaux de glaces, lors du processus de congélation.

Nous avons utilisé trois milieux essentiels qui sont connue par leurs rôles protecteurs pour la membrane cellulaire. Le cholestérol qui renforce la membrane et la stabilise, la vitamine E qui a un effet antioxydant et le polyéthylène glycol qui solubilise ces deux molécules et améliore leur action.

Nos résultats montrent que l'effet des molécules utilisées dans ces traitements : PEG/CHL, PEG/VIT E et PEG/CHL/VIT E sur les spermatozoïdes est exprimé par une meilleure VSL par rapport aux autres traitements à température ambiante, mais Après congélation/décongélation le complexe PEG/CHL/VIT E a amélioré la VSL. Nous concluons, donc, que les complexes PEG/CHL, PEG/VIT E, PEG/CHL/VIT E ont exprimé leur rôle protecteur et que le PEG a amélioré l'action du CHL et de la VIT E.

Mots clés : sperme, congélation, T°ambiante, lapin, PEG.

### Abstract

The objective of our studies is to improve the semen storage at room temperature and freeze at (-196) fighting against the two major causes that risk survival spz which are oxidative stress and the formation of ice crystals during the freezing process.

We have used three treatments that are known for their protective roles for the membrane. Cholesterol reinforces and stabilizes the membrane; vitamin E has an antioxidant role and polyethylene glycol which dissolves the CHL and VIT E in order to exercising their role, as well as used combinations of PEG-CHL, PEG-VIT E and PEG-CHL-VIT E.

Our results show that the effect of the molecular used in this treatment: PEG/CHL, PEG/Vit E and PEG/CHL/Vit E on the spermatozoids are expressed better VSL compared to other treatments at room temperature, but after freezing-thawing, the complex PEG/CHL/VitE has improved VSL. We conclude, that the complex has expressed their protective roles and the PEG improved the action of the two other molecular.

Keywords: semen, freeze, room temperature, rabbit, PEG.