

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche**  
**Université Abderrahmane Mira de Bejaia**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département des Sciences Biologiques de l'Environnement**

## **MÉMOIRE**

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

## **THÈME**

**Optimisation de la congélation du sperme du lapin**

**Réalisé par :**

**CHEURFA Sabrina**

**LARABI Zahia**

**Membre du jury**

Président Mr **AYAD A**

Examineurs : Mr **NAIT MOULOUD**

Mr **BOUGAHAM A**

Promoteur : Mr. **IGUEROUDA M**

Co-promoteur : Mr **NABI B**

Année Universitaire 2012-2013

# Remerciements

*Avant de commencer, nous tenons à remercier le BON DIEU, le puissant de nous avoir guidé sur la bonne voie : du savoir et de la lumière.*

*Nous adressons tout d'abord nos remerciements, à nôtres promoteur Monsieur le Professeur IGUER-OUADA.M, pour ses orientation, son aide, sa disponibilité et.*

*Surtout pour ses précieux conseils.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à Monsieur NABI.B, le*

*Co- promoteur qui nous a orientées durant la pratique.*

*A monsieur FATMLS, du département de génie des Procédés et pharmaceutique pour leur aide lors de la pratique*

*Nos adressons nous remerciements aux membres du jury en acceptant de*

*Jugé ce travail.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à toutes les personnes qui nous ont aidées de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*

# Dédicaces

*J'exprime mon profond respect et ma sincère gratitude au être qui me sont les plus chères, je leur offre ce modeste travail.*

*A mes parent :*

*Maman, je te remercie pour m'avoir soutenue, d'avoir cru en moi et pour m'avoir encouragée pendant toutes les années universitaires. Tu m'as donné tout d'amour qui suffit pour nourrir la terre entière.*

*A mon père qui m'a toujours été d'un soutien sans failles dans mes études.*

**« QUE DIEU LES PROTEGES ET LES GARDES POUR NOUS ».**

*A mon très cher unique frère SALEM, sa femme DJAZIA et leur fils MEHDI.*

*A mes adorables sœurs : NADIRA, MERIAMA, ZAHIA, LYNDA, et NABILA.*

*A mes amies : NABILA, NASSIMA, RABIHA.LYDIA, Mohamed, Mourad, Yasmína,*

*A mon binôme ZAHIA.*

*A Toute la promotion de 2<sup>ème</sup> année MASTER RBA.*

**SABRINA**

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes deux très chers parents à qui je ne manifesterai jamais assez,  
tout mon amour et Ma gratitude envers eux.*

*Mes sœurs : Naïma, Nassima, Ibtissame, Lynda, Sara.*

*Mon cher frère : Coceïla.*

*Mes ami(e)s : Fatima, Raïma, Kaka, Hafida, Samia, nacer,  
Moh, Mourad.*

*A tout mes cousins et cousines.*

*A toute promotion de 2<sup>me</sup> année MASTER RBA.*

*Enfin à mon binôme **SABRINA** et sa famille.*

**ZAHIA**

# SOMMAIRE

Liste des abréviations

Listes des figures

Liste des tableaux

**Introduction .....1**

## **1<sup>ère</sup> partie : Etude bibliographique**

### **Chapitre I :Cyclodextrine.**

1. Introduction .....	2
2 Historique .....	2
3. Structure et propriété des cyclodextrines .....	3
3.1 Structure .....	3
3.2 Propriété des Cyclodextrine.....	4
4 Modification sélectives des CDs .....	5
4.1. But de modification .....	5
4.2. Difficultés de la modification.....	5
4.3. Exemple de CDs modifiant .....	6
5 Toxicité .....	6
6 Complexe d'inclusion.....	6
7 Application des cyclodextrines .....	7
7.1. Domaine pharmaceutique .....	7
7.2. Domaine cosmétique .....	7
7.3. Domaine alimentaire.....	8
7.4 .Domaine chimique et agricole.....	8
7.5. Environnement .....	8
8 Diagramme de solubilité.....	9
9. Préparation de complexe d'inclusion.....	10

### **Chapitre II : sperme du lapin.**

1-La reproduction chez le male.....	11
1.1. L'anatomie du tractus génitale mâle.....	11
-Les testicules.....	11
- Pénis ou verge .....	11
- Les glandes annexes .....	11

1.2. Le développement des gonades et la puberté .....	12
1.3. Spermatogenèse.....	13
1.4. Sperme de lapin et ces caractéristique .....	13
1.4.1 Sperme de lapin.....	13
1.4-2 Caractéristique du sperme de lapin .....	13
-Volume.....	13
-Concentration .....	13
-Viabilité .....	13
-Mobilité.....	14
-Morphologie des spermatozoides .....	14
1.5. La fluidité membranaire et sa composition en phospholipides et en cholestérole.....	15
1.6. La particularité de la réaction acrosomique des spermatozoïde chez lapin .....	15
1.7. Les facteurs influençant sur la production et la qualité de sperme de lapin.....	16
-La fréquence de la collecte .....	16
-L'alimentation.....	16
-L'état sanitaire .....	16
-La photoperiode .....	16
- L'âge.....	16
- La température.....	17

**Chapitre III : Stress oxydatifs.**

1. Définition .....	18
2. Définition de quelque notion.....	18
3. Origine du stress oxydatif .....	18
3.1. Les radicaux libres .....	18
3.1.1. Production des radicaux libre .....	19
3.1.2. Radicaux libres en biologie.....	19
3.1.4. Origine des radicaux libres.....	19
4. Les antioxydants.....	20
4.1. Système antioxydant enzymatique.....	20
4.1.1. Rôles des enzymes antioxydants .....	20

4.2. Antioxydant non enzymatique.....	20
4.2. a. Vitamine E .....	20
5. Altérations cellulaires .....	21
5.1. Peroxydation lipidique .....	21
5.2. Oxydation de l'ADN.....	21
5.3. Oxydation des protéines.....	22
6- Méthodes de mesure du stress oxydant dans le sperme .....	22
<b>Chapitre IV : Congélation du sperme du lapin</b>	
1. Congélation du sperme.....	23
<b>2<sup>ème</sup> Partie : Etude expérimentale</b>	
<b>I-matériel et méthodes.....</b>	<b>26</b>
I. Collecte de la semence du lapin.....	26
1-1.Matériel de la collecte.....	26
a. Matériel biologique .....	26
b- matériel non biologique.....	26
1.2. Méthodes de la collecte .....	27
a. Etapes de préparation du vagin artificielle.....	27
b. Technique de la récolte .....	28
<b>II. Analyse du sperme.....</b>	<b>28</b>
II.1. Matériel.....	28
I. 2. Méthode d'analyse.....	29
II. 2.1.Examen macroscopique .....	29
a. La couleur.....	29
b. Le volume.....	29
II.2.2. Examen microscopique .....	29
a.la motilité massale.....	29
b. Motilité individuelle.....	29
c. La concentration spermatique.....	30
d. La morphologie.....	30
<b>III. Conservation de la semence du lapin.....</b>	<b>31</b>
1. Milieux de conservation .....	31

1.1. Préparation des complexes .....	31
1.2. Préparation des milieux de conservation.....	32
2. Conservation sans congélation .....	32
2.1. Conservation à température ambiante et réfrigération .....	32
a . Matériel utilise .....	32
b. Méthode .....	32
2.2. la congélation du sperme.....	33
a-Matériel .....	33
b-Protocole de congélation .....	34
.2.3- décongélation des paillettes .....	35
3. Analyse statistique.....	35
<b>IV. Résultats et discussion.....</b>	<b>36</b>
1. Caractéristique du sperme frais .....	36
1.1. Analyse macroscopique.....	36
a. Volume.....	38
1.2. Analyse microscopique .....	38
a. Concentration .....	38
b- mobilité .....	39
b.1.mobilité massale .....	39
b.2.Mobilité individuelle .....	39
c. Hypo osmotique .....	39
d. Les anomalies des spermatozoïdes.....	39
2 .Caractéristiques du sperme conservé.....	40
2.1. Température ambiante et réfrigération.....	40
2.2 .congélation-décongélation.....	42
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>45</b>

**Référence bibliographique.**

**Annexe.**

**La liste des abréviations**

<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>
CDs	Cyclodextrins
$\alpha$ -CDs	Alpha cyclodextrin
$\beta$ -CDs	Beta cyclodextrins
$\gamma$ -CDs	Gamma cyclodextrins
Spz	Spermatozoïde
RA	Réaction acromosomique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMA	Diméthylacétamide
LNV	Liquide nitrogène vapeur
LPC	Lysophosphatidylcholin
TB	Tris buffer
ROS	Radicaux libres oxygènes
RNS	Radicaux libre azotés
VA	vagin artificielle
HOST	Hypo-osmotique swelling test
CHL	Cholestérol
VIT E	Vitamine E
MbCD	Méthyle beta cyclodextrine
SCA	Sperm class analyze
CF	Single freezing
DF	Double freezing
BSA	Addition of bovin serum albumen
TCG-C	Tris acide citrique
VSL	Vélocity straight line

## Liste des figures

N°figure	Partie bibliographique	Page
1	- Structure chimique de l' $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ cyclodextrine.....	3
2	-Représentations schématiques de la cavité hydrophobe .....	3
3	-Structure conique des CDs.....	5
4	-Représentation schématique de complexe d'inclusion de stœchiométries Différentes.....	7
5	-Répartition des publications concernant les CDs par domaine de recherche en 2001.....	8
6	-Diagramme de solubilité des cyclodextrines.....	9
7	-Appareil génital male de lapin.....	12
8	-Spermatozoïde lapin.....	14
9	-Anomalies majeurs et mineurs des spermatozoïdes.....	15
10	- Définition du stress oxydatif.....	18
11	- Mécanismes des liens entre le stress oxydatif et les lésions de l'ADN de sperme	22
<b>Partie expérimentale</b>		
12	Photographie des cages des mâles.....	26
13	-Photographie du vagin artificiel utilisé.....	27
14	- Les étapes de préparation du vagin artificiel.....	28
15	-Photographie de la récolte de semence.....	28
16	- Photographie de sperme collecté.....	29
17	-Photographie du matériel d'analyse utilisé.....	
18	- Etapes de préparation des échantillons.....	33

## Listes des figures

19	- Photographie des matériels utilisés dans la congélation.....	34
20	- Photographie d'obturation des paillettes.....	34
21	- photographie de l'analyseur informatique du sperme .....	35
22	- présentation de la distribution des données en termes de volume, concentration, mobilités et taux spermatozoïdes normaux, et hypo osmotique.....	37
23	- Histogramme représentant la mobilité des spermatozoïdes conservés à température ambiante dans les 7 milieux (contrôle, CD, CHL,VITE ,CD-VITE,CD-CHL,CD-CHL-VIT E .....	41
24	-Histogramme représentant la mobilité des spermatozoïdes au réfrigération dans les 7 milieux (CD, Control, CHL,VIT E,CD-CHL,CD-VIT E,CD-CHL-VIT E).....	42
25	- Histogramme représentant les vitesses de VSL des spermatozoïdes avant/après congélation décongélation dans le milieu de conservation utilisés (BCD, CD-VIT E,CD-CHL,CD-CHL-VIT E,CHL, CTRL,VIT E). .....	43
26	-Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs rapides avant /après la congélation décongélation dans les 7 milieux de conservation utilisées .....	44
27	-Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes statiques avant après la congélation dans les milieux de conservation utilisées .....	44

**Liste des tableaux**

<b>N° tableau</b>	<b>Partie bibliographique</b>	<b>Page</b>
1	-Propriété physico-chimique des principales cyclodextrines.....	1
2	-Origine des radicaux libres.....	19
3	-les résultats de la fertilité et de mobilité par différent protocoles de congélation.....	25
4	-Les caractéristiques des males étudiés .....	26
5	-Les composants de tris buffer.....	31
6	-Composition des milieux de conservation.....	31
7	- Caractéristiques macroscopique du sperme des lapins étudiées...	36
8	- Caractéristiques microscopiques du sperme des lapins étudiées...	38
9	- Caractéristiques morphologique du sperme des lapins étudiées....	40

## Introduction

---

La congélation de la semence présente de nombreux intérêts dont la possibilité de conserver à très long terme les potentialités des spermatozoïdes en vue d'une utilisation ultérieure (**TAUX CLEMENT, 2001**). La cryoconservation de la semence est un outil efficace pour conserver les ressources génétiques de l'animal et pour le progrès génétique, cependant, cette technique reste encore peu maîtrisée chez le lapin (**SALVETTI et al, 2005**).

Les premiers rapports documentés sur la conservation du sperme du lapin datent de 1942 lorsque Hoagland et Pincus ont observé que le sperme de lapin ne pouvait survivre à immersion dans l'azote liquide. Emmens et Blackshaw en 1950, ont testé différentes combinaisons d'alcools et de sucres, et constaté que ces produits sont plus toxiques pour le lapin que pour le taureau. Dans les années soixante, d'autres expériences faites sur la conservation du sperme du lapin sont publiées pour d'autres espèces (**MOCE et al., 2009**).

Actuellement, plusieurs milieux de cryoconservation ont été développés pour la semence du lapin, cependant la congélation –décongélation pose un problème de diminution de fertilité et de prolificité en comparaison avec le sperme frais (**MOCE et al, 2009**).

Pendant le processus de conservation, le sperme souffre de nombreuses contraintes : une diminution de température, l'ajout de cryoprotecteur et la formation de cristaux de glace intracellulaires avec l'installation d'intenses processus oxydatifs (**WASTON, 2000**). Cet ensemble de facteurs entraîne une diminution du pourcentage des spermatozoïdes mobiles et vivants avec des problèmes de capacitation prématurée et une réduction du pouvoir fécondant du sperme (**GRAHAM et al, 2005**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail avec l'objectif final d'améliorer la technique de conservation des gamètes chez les lapins, en limitant les phénomènes oxydatifs survenant lors de la congélation –décongélation et de la réfrigération.

Notre approche a été de développer des milieux de conservation avec un pouvoir antioxydant notable. Nous avons agi sur deux niveaux complémentaires, un premier a consisté à renforcer la membrane cytoplasmique par l'ajout du cholestérol et un deuxième par l'ajout de la vitamine E, connue comme un puissant antioxydant. Cependant, comme la solubilité de ces deux molécules lipophiles reste faible dans les milieux de conservation, qui sont de nature hydrophile, nous les avons associés aux cyclodextrines pour pallier à cet inconvénient. En effet, ces dernières ont une cavité hydrophobe qui permet de capter les

## Introduction

---

molécules lipophiles et une périphérie hydrophile qui permet leur solubilité dans les milieux hydrophiles.

## 1. Introduction

Une cyclodextrine (CDs) ou cycloamylose est une molécule-cage, d'origine naturelle, qui permet d'encapsuler diverses molécules.

Dans ce chapitre, nous donnons un aperçu théorique sur l'origine des CDs, leur production, leur structure et caractéristiques physicochimiques ainsi que leurs domaines d'utilisation.

## 2. Historique

L'histoire des cyclodextrines a commencé il y a plus d'un siècle, et depuis, de nombreux chercheurs ont apporté leur contribution à l'étude de ces molécules (**JACQET ,2006**). Les CDs sont appelées aujourd'hui « cellulose » décrites par Villiers en 1891(**SZEJTLI, 1988**) pour la première fois. Il a déterminé la composition de ce produit comme étant  $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O$ , qui est obtenu par dégradation enzymatique de l'amidon par une souche de micro organismes (l'amylase de bacillus macerons : cyclodextrines) (**FLEURY , 2005**).

En 1903, Shardingier identifie les trois cyclodextrines naturelles  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (figure 1), ces composés ont été ainsi appelés « sucres shardingier ». Entre 1911 et 1935, Pringsheim en Allemagne a montré que les CDs formaient des complexes stables aqueux avec de nombreux autres produits chimiques (**MOMAIR, 2008**).

De 1935 à 1936, Freudenberg et Gramer et leurs collègues identifient la structure chimique de CDs, leurs propriétés physico-chimiques et leur capacité à former des complexes, ils sont arrivés à la conclusion que les dextrines sont des oligosaccharides (**BREWSTER et al, 2007**).

Depuis les années 1970, d'importants travaux ont été menés par Szejtli, et d'autres explorent l'encapsulation par les CDs et leurs dérivés pour des applications industrielles et pharmaceutiques (**JACQIET ,2006**).



Figure 1 : Structure chimique de l' $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  cyclodextrines (MOMAIR, 2008)

### 3. Structure et propriétés des cyclodextrines.

#### 3.1 Structure.

Les CDs sont des oligosaccharides cycliques, issues de la dégradation enzymatique de l'amidon, constitués par l'assemblage de 6 à 12 motifs de glucose reliés par des liaisons  $\alpha$  (1-4) (CRINI et al 2001). On distingue :  $\alpha$  CDs,  $\beta$  CDs et  $\gamma$  CDs qui comprennent respectivement 6, 7 et 8 unités glucopyranosiques (figure 2). Ces molécules ont une structure conique, comportent une cavité centrale hydrophobe de diamètre entre 0,5 et 0,9 nm (CHREIM ,2006). Cette cavité présente des carbones apolaires, tandis que l'extérieur présente de nombreux groupements hydroxyles, conduisant à une bonne solubilité des CDs en milieu aqueux. Grâce à cette cavité apolaire, les CDs sont capables de former des complexes d'inclusion en milieu aqueux, avec une grande variété de molécules-hôtes hydrophobes (MARCOPOULOS, 2011).

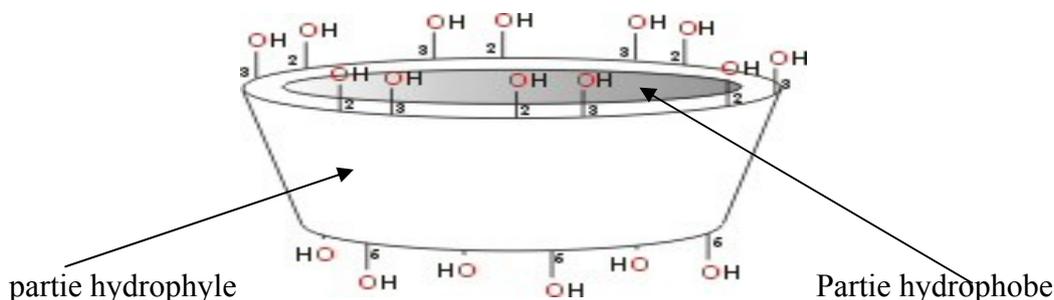


figure2 : représentation schématique de la cavité hydrophobe et la périphérie hydrophile (MOMAIR, 2008).

### 3.2 Propriétés des Cyclodextrines.

Le diamètre de la cavité et la masse moléculaire (Tableau 1) augmentent avec le nombre d'unités glycopyranose constitutives (figure 3), bien que tous les cyclodextrines soient solubles en milieu aqueux, leur solubilité dans l'eau augmente dans le sens  $\beta < \alpha < \gamma$  CD (CHALLA *et al*, 2005).

La solubilité de la B- CD est faible par rapport de celle d'a-CD et de la y-CD. Cette perte de solubilité, dont les causes n'ont pas été totalement éclaircies, semble être due au réseau de liaisons hydrogènes particulières dans le cas de CD à 7 unités (SZJETLI, 1988).

**Tableau 1** : propriétés physico-chimiques des principales cyclodextrines (MARTIN DEL VALLE ,2003) et (KANAKA DURGA DEVIL *et al* ,2010).

	$\alpha$ -CD	B-CD	$\gamma$ -CD
Nombre d'unités glucose	6	7	8
Formule brute	C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> O <sub>40</sub>
M (g/mol)	972	1135	1297
Solubilité dans l'eau à 298K (g/L)	145	18,5	232
Volume approximatif de la cavité (106 pm <sup>3</sup> )	174	262	427
Diamètre de la cavité (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Volume de la cavité (Å <sup>3</sup> )	174	262	427
Pka, 25°C	12,332	12,202	12,018
Point de fusion	275	280	270
La constante de fusion à 40°C	3,443	3,224	3,000
Solubilité dans l'eau à 25°C	14,5	1,85	23,2

Solubilité (eau, 25°C), ml <sup>-1</sup>	0,1211	0,0163	0,168
H (ionisation), kcal ml <sup>-1</sup>	8,36	9,98	0,168
S(ionisations) .Cal .mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	-28,3	-22,4	-14,7
H(solution) ,cal.mol ,k	13,8	11,7	14,7

Les  $\alpha$ -CDs possèdent une ceinture de liaisons H incomplète, l'une des unités étant dans une position distordue, il n'y'a donc que 4 liaisons formées (au lieu de 6 prévues) (SZJETLI, 1988).

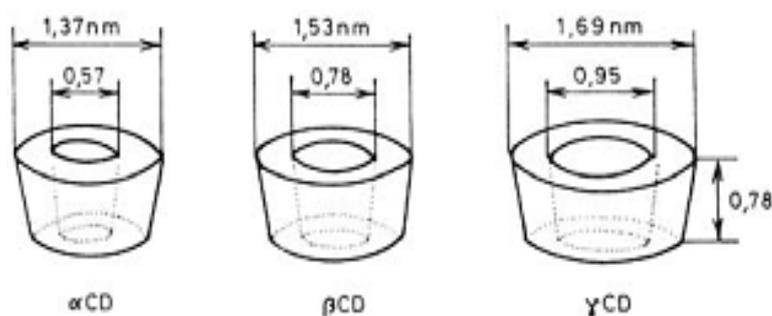


Figure3 : structure conique des CDs. (CHREIM et al, 2006).

## 4. Modifications sélectives des CDs.

### 4.1 But de la modification.

La modification des CDs permet :

- D'améliorer la solubilité des CDs (en particulier, celle de la B-CDs)
- L'amélioration de la capacité de complexation.
- La fixation d'un groupe spécifique (KHAN et al 1998).

### 4.2. Difficultés de la modification

La difficulté des modifications des CDs, est liée à la présence de nombreux groupes hydroxyles aux positions 2, 3 et 6, de chaque unité de glucose), ainsi qu'à leur réactivité qui rend les modifications sélectives difficiles (JACQUET, 2006).

### 4.3 Exemples de CDs modifiés.

Les CDs les plus importantes sont les dérivées ayant une grande solubilité dans l'eau, en particulier :

- Les B-CDs méthylées.
- les B et  $\gamma$ -CDs hydroxy propylées.
- les B-CDs sulfobutylées (**SZENTE et al, 1999**).

### 5. Toxicité.

En général, les CDs naturels et leurs dérivés hydrophiles, traversent difficilement la membrane (**MARTIN DEL VALLE, 2003**), même la B-CD méthylée qui est plus ou moins lipophile, ne passe pas facilement la membrane biologique lipophile (**UEKAMA et al, 1982**).

Les CDs présentent une très faibles cytotoxicité, qui peut être éliminée par modification chimique des CDs, cette toxicité à haute concentration entraîne une hémolyse par adsorption des molécules de cholestérol et de phospholipides présentes dans les membranes cellulaires (**UEKAMA et al1998**).

### 6. Complexes d'inclusion.

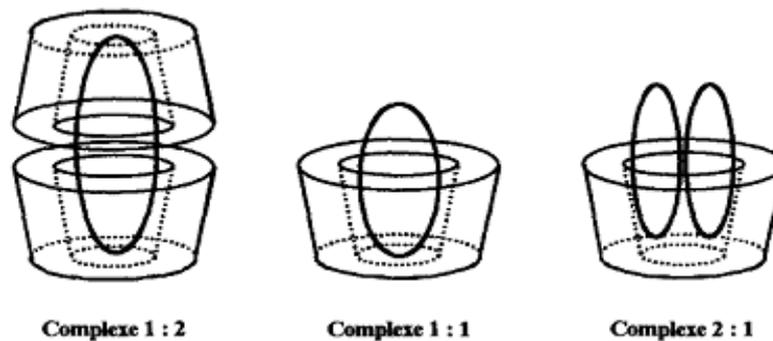
Les CDs sont capables d'augmenter la solubilité aqueuse de composés en formant des complexes d'inclusion grâce à leur structure particulière et à la dualité de leur polarité ; elles possèdent une cavité hydrophobe qui permet d'encapsuler des substances ou des parties de molécules à caractère lipophiles (**BREWSTER et al, 2007**).

La formation de complexes d'inclusion est le résultat de plusieurs effets agissants simultanément, qui comprennent :

- Des interactions hydrophobes entre l'hôte et l'invité
- Des interactions de van der Waal.
- Des liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles des CDs et certains invités (**GLANT ,2003**).

On parle de:

- ✓ Complexe **1 :1** lorsqu'un invité interagit avec une molécule de CD.
- ✓ Un complexe **1 :2** est formé, si la molécule invitée est de grande taille et si, plusieurs molécules de CD peuvent interagir avec elle.
- ✓ Complexe **2 :1** est obtenu dans le cas où la cavité de la CD est suffisamment spacieuse pour accueillir deux molécules (**SZJETLI, 1988**) (figure 4).



**Figure4** : représentation schématique de complexes d'inclusions de stœchiométries différentes (BARILLARO, 2006)

La principale force provoquant la formation des complexes est la stabilisation énergétique du système par le remplacement dans la cavité des molécules d'eau par des molécules hydrophobes ce qui génère l'association apolaire- apolaire. (MARTIN DALLE VAL, 2004).

## 7. Application des cyclodextrines.

### 7.1. Domaine pharmaceutique.

L'intérêt des CD dans le domaine pharmaceutique est :

- L'amélioration de la solubilité.
- Amélioration de la biodisponibilité.
- Amélioration de la stabilité.
- Réduction de l'irritation.
- Masquage d'odeur et de goût (BARBOTA et al 2003).

### 7.2. Domaine cosmétique

Les CD sont utilisés dans le domaine cosmétique pour supprimer la volatilité des parfums, utilisés dans les dentifrices et les crèmes pour la peau ou autres tissus. La compilation des molécules de parfum dans la cavité permet de les libérer lentement (HEDGES, 1998).

### 7.3. Domaine alimentaire.

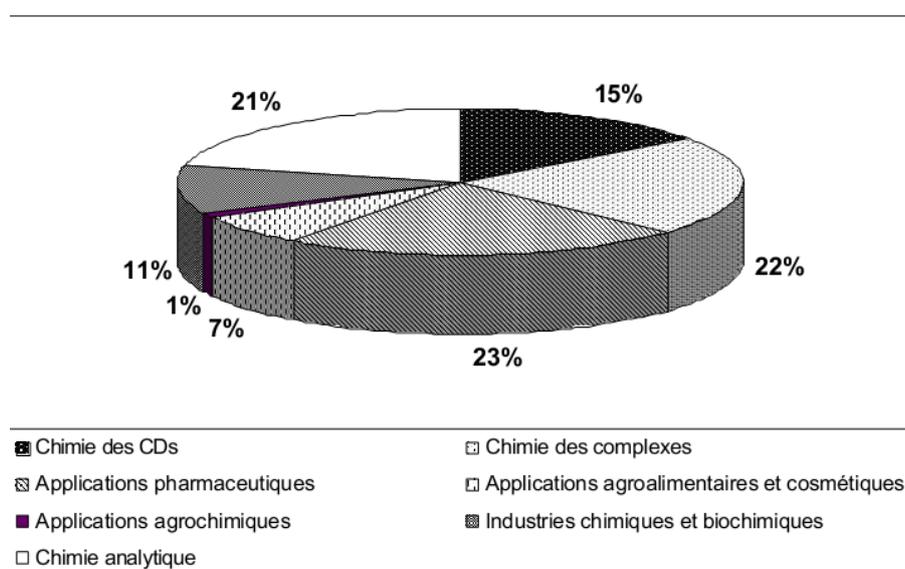
Les CDs sont utilisés dans l'industrie alimentaire pour la protection du goût. Elles sont capables d'établir des complexes avec tout genre de molécules (acides gras, vitamines...), (MARCOPOULUS, 2011).

### 7.4. Domaine chimique et agricole.

Dans l'industrie chimique et agricole, les CDs sont importantes pour séparer les isomères et les énantiomères, enlever et désintoxiquer les déchets. (MARTINE DEL VAL, 2003).

### 7.5. Environnement :

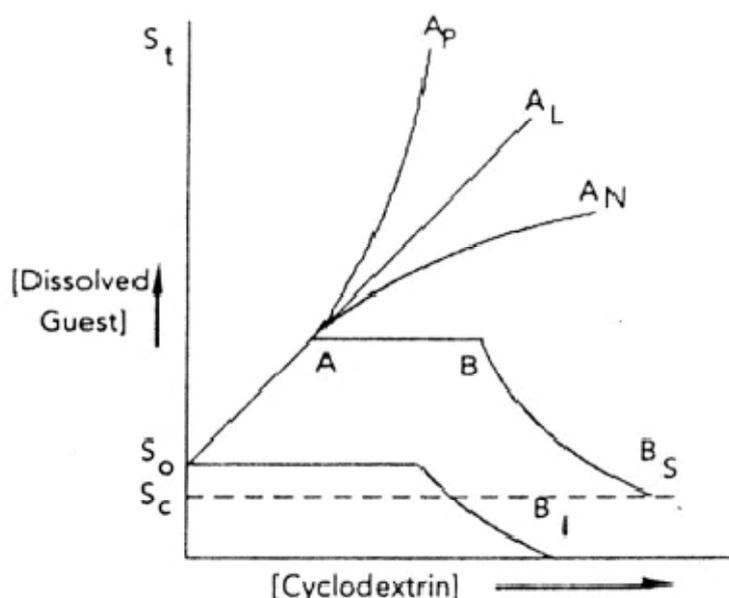
Les silices greffées et les polymères réticulés sont utilisés pour piéger des molécules toxiques, ces matériaux porteurs de CDs sont des filtres pour la dépollution des eaux usées (CRINI *et al*, 2001).



**Figure 5:** répartition des publications concernant les CDs par domaine de recherche en 2001. (JACQIET ,2006).

## 8. Diagramme de solubilité :

Le Diagramme de solubilité est construit, en traçant la concentration molaire de substrat sur l'axe des ordonnées et le totale la concentration molaire de légant ou cyclodextrine, sur l'axe des abscisses (Figure6).



**Figure 6:** diagramme de solubilité des cyclodextrines (BREWSTER et LOFTSSON, 2007).

Le diagramme de solubilité est préparé dans deux grandes catégories, A et B. Des courbes du type A, sont en indicative pour la formation de complexe d'inclusion soluble, tandis que le type B sont évocateurs de la formation de complexes d'inclusion en faible solubilité (MARTIN DEL VAL ,2003).

Type A :\_est obtenu quant la solubilité de la substance augmente avec des concentrations croissantes en CDs.

- Profit  $A_L$  : augmentation linéaire de la solubilité en fonction de la concentration en CD (CHALLA et al, 2005), les complexes d'ordre supérieur sont généralement attribués à la formation de complexe (1 :1) (CONNORS et al ,1997).
- Profit  $A_p$  : traduit la formation de complexes de stœchiométries différentes (1 :1 à l'origine puis, 1 :2 ou 1 :3).

- Un profit  $A_N$  : est difficile à interpréter, il peut être associé avec la modification diélectrique ou à l'association de molécules de CDs entre elles (**MARTIN DEL VAL, 2003**).

Type B : Indique la formation de complexe à solubilité limitée dans le milieu. Deux sous -classes ont été décrites comprenant des systèmes Bs et BI (**BREWSTER et al, 2007**).

### 9. Préparation du complexe d'inclusion :

Plusieurs méthodes sont soulignées pour la préparation des complexes hôte-invité. Les méthodes

Préférées sont:

- ✓ Pétrissage.
- ✓ Mélange physique.
- ✓ Précipitation.
- ✓ Co-evaporation (**MOMAIR, 2008**).

## 1. La reproduction chez le mâle :

Le cycle de vie du mâle est assez simple, l'âge du premier accouplement dépend de la race et du développement corporel. La reproduction proprement dite dépend de la chaleur, de l'âge, du stress et de l'alimentation.

### 1.1. L'anatomie du tractus génital mâle.

Le système reproducteur du mâle est très similaire à celui des autres mammifères (VAN, 2003-2013), l'appareil génital est formé pendant la phase embryonnaire (figure 7). Il se compose essentiellement de :

**Les testicules:** Sont des organes pairs, de forme ovoïde, placés dans des sacs scrotaux, et qui sont restés en communication avec la cavité abdominale par un large canal inguinal par lequel peuvent transiter les testicules. Ainsi, le lapin peut rentrer ses testicules sous l'effet de la frayeur, lors de combats avec d'autres mâles (LEBAS et al, 1996).

Les testicules présentent les glandes reproductrices, composées de boucles tubulaires, et d'un plexus tubulaire central pour la production de spermatozoïdes et assurent également une fonction endocrine (VAN, 2003-2013).

**Pénis ou verge :** Est dirigé vers l'arrière au repos, mais se porte vers l'avant en érection (LEBAS, 2010). Il est court, dépourvu de glande et mesure 3 à 5 cm (DOMINIQUE, 1989).

#### Les glandes annexes :

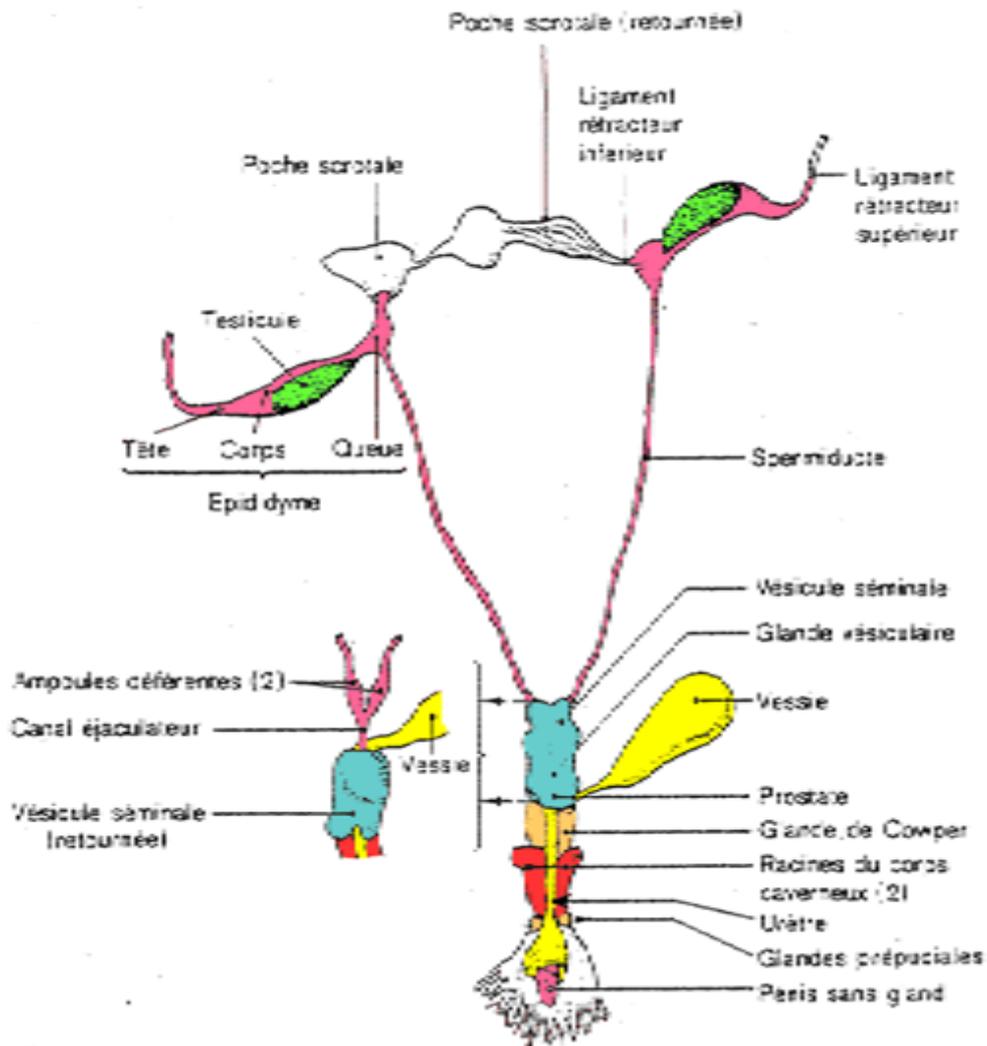
Elles sont nombreuses, on peut distinguer :

-La vésicule séminale, impaire, bilobée à son extrémité antérieure (BULLETTIN, 2009). La partie caudale fusionne avec les canaux déférents pour former un canal éjaculateur qui s'ouvre dorsalement dans l'urètre.

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

-Une glande de Cowper ou la glande bulbo-urétrale bilobée, postérieure à la prostate et dorsalement à l'urètre, s'ouvrant par au moins quatre canaux (SABBAGH, 1983).

-Une glande prostatique est divisée en trois lobes principaux : un lobe antérieur, un lobe au milieu et un lobe postérieur, elle est située sous la glande vésiculaire. Elle possède 4 à 6 canaux qui s'ouvrent dans l'urètre (CASTELLINA et al, 2012).



**Figure7** : Appareil génital du lapin (LEBAS et al, 1996)

### 1.2 .Le développement des gonades et la puberté.

C'est la phase de la différenciation des gonades, commence le 16<sup>ème</sup> jour qui suit la fécondation, et la production d'hormones dès le 19<sup>ème</sup> jour de la gestation. A la naissance, les testicules se développent moins vite que le reste du corps. On peut remarquer l'accélération de croissance testiculaire entre 70 et 110 jours (LEBAS et al, 1996).

La puberté c'est la période où les organes reproducteurs du mâle soient capables de produire des spermatozoïdes de façon constante, et apte à féconder un ovule. Elle apparait vers 4 à 5 mois, mais varie selon la saison de la naissance et la race (BOULBINA et al, 2012).

### 1.3 .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 (**DOMINIQUE ,1989**). Elle dure entre 40 et 50 jours (**LEBAS et al ,1996**).

### 1.4. Sperme du lapin et ses caractéristiques :

#### 1.4.1. Sperme du lapin :

Le sperme du lapin est un liquide contenant les spermatozoïdes , le plasma seminal et aussi un gel. Le plasma seminal est composé de glycoprotéines, fructose, sorbitol, acide citrique, acide gras, des ions (Na,K,Ca,Mg) et de l'inositol, mais il est très pauvre en glucose. Ce plasma seminal a un rôle dans le transport des gamètes lors de l'éjaculation (**DOMINIQUE ,1989**).

#### 1.4.2. Caractéristiques du sperme du lapin :

**Volume :** La méthode la plus précise pour l'estimation du volume de l'éjaculat chez lapin, est de le mesurer dans un tube gradué après la collecte (**CASTRO et al, 2003**). Le volume des éjaculats est de l'ordre de 0,3 à 1 ml et varie en fonction de la race, l'état physiologique et la fréquence de la collecte (**LEBAS et al, 1996**).

**Concentration :** La concentration est le nombre de spermatozoïdes par ml, elle est donnée par  $10^6$  spz/ml avec un volume significatif par éjaculat (**NIZZA et al 2000**). Elle est caractérisée par une faible concentration spermatique, évaluée de  $150-500 \times 10^6$  spz/ml ( **JOLY et al, 2000**). Elle peut être mesurée à l'aide d'un compteur de cellules de thoma-zeiss. On procède au comptage des spermatozoïdes suite au dépôt d'une goutte de sperme entre lame et lamelle (**MALLEM et al , 2007**).

**Viabilité :** elle se mesure par le comptage des spermatozoïdes vivants qui se colorent pas en rose par la coloration éosine nigrosine, elle est déterminée après observation de 200 spermatozoïdes (**JUAN et al, 2012**).

Il est possible aussi de déterminer l'intégrité de la membrane plasmique par l'intermédiaire du test hypo-osmotique (HOST). Il donne des informations sur l'intégrité de la membrane cellulaire de la queue de spermatozoïde . 100ul de sperme sont mélangés avec une solution HOST(60mOsmol) hypotonique pour une période d'incubation de 30 min à 37°C. Le

pourcentage de spz avec un segment enroulé (gonflés) de la queue sont déterminés comme vivants (GOGOL *et al*, 2009).

**Mobilité :** La mobilité des spermatozoïdes est une caractéristique commune à travers le règne animal. Elle est basée sur l'observation des spermatozoïdes au microscope, on peut les classer en plusieurs catégories (excellente, modérée, vitesse non progressive, avec peu ou pas de chemins droits, aucune mobilité) (HOLT *et al*, 2004). Le pourcentage de la mobilité des spermatozoïdes est estimée subjectivement. (CHEM *et al*, 1989).

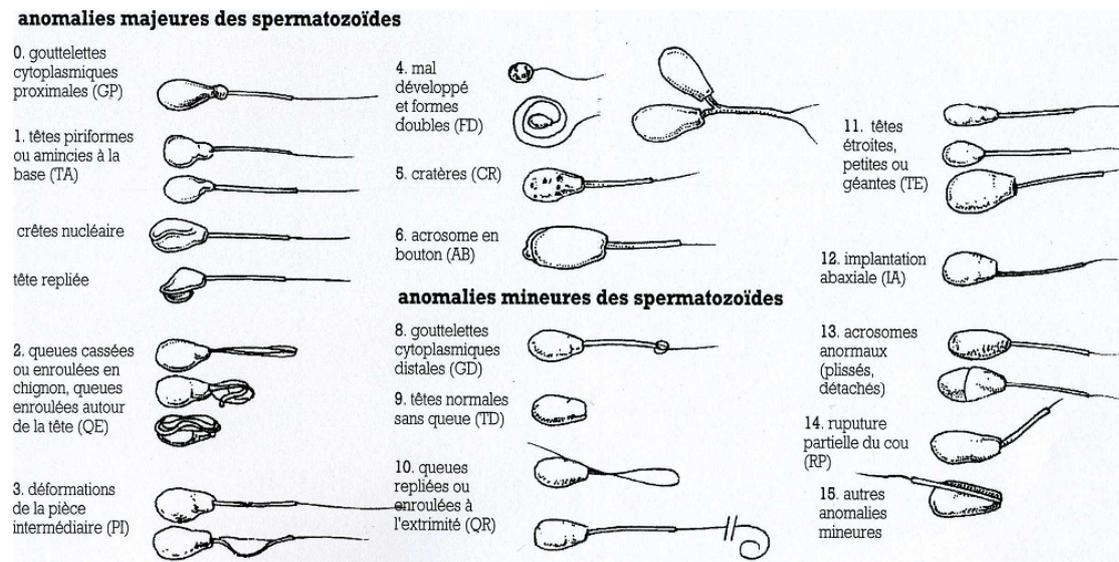
Un sperme mobile est nécessairement vivant, mais le contraire n'est pas tout le temps vrai (FROMAN *et al*, 2005).

**Morphologie des spermatozoïdes :** La forme du spermatozoïde du lapin est similaire à celui des autres mammifères qui possèdent une structure effilée, divisée en trois régions distinctes : la tête ovoïde, la pièce intermédiaire et le flagelle (BOIT, 2005). Chez le lapin (figure 8) un spermatozoïde fait environ 59 µm, la tête fait 28 µm, et le flagelle fait 45 µm (LEBAS, 2010).



**Figure 8 :** Spermatozoïde du lapin (LEBAS, 2010)

L'analyse morphologique des spermatozoïdes du lapin est réalisée par microscope optique en utilisant des techniques de coloration éosine-nigrosine. Une goutte de semence est mélangée à deux gouttes de colorant. On réalise ensuite un frottis avec observation au grossissement 100. Cette coloration permet de distinguer différentes anomalies morphologiques qui sont de deux catégories, majeures et mineures (figure 9) (CABANNES, 2008).



**Figure9 :Anomlies majeures et mineures des spermatozoides (CABANNES, 2008)**

### 1.5. La fluidité membranaire et sa composition en phospholipide et en cholestérol :

La fluidité membranaire joue un rôle important dans les échanges membranaires, elle est un critère important dans le succès de la congélation du sperme. La mesure de la fluidité membranaire des spermatozoides se fait par mesure de la valeur d'anisotropie de la lumière après l'insertion d'un fluorochrome dans la bicouche lipidique, plus la valeur d'anisotropie est forte, plus la membrane est rigide (DUBOS *et al*,2006).

La composition en acide gras est donnée par les caractéristiques fonctionnelles appropriées de la membrane cellulaire des spermatozoides (SERIN *et al*, 2011).

Le cholestérol est un module de la fluidité des membranes en étant intégré avec les chaînes des phospholipides. La membrane plasmique des SPZs de lapin présente un taux élevé en cholestérol (MOCE *et al* , 2009).

### 1.6.La particularité de la réaction acrosomique des spermatozoides chez le lapin :

La réaction acrosomique est un processus que les spermatozoides déclenchent par le contact avec l'œuf avant d'aller pénétrer l'ovocyte au moment de la fécondation (MOCE *et al* 2010).

L'inhibition de la réaction acrosomique des spermatozoides est une fonction importante dans la reproduction animale. Mais chez les lapines l'ovulation est induite après l'accouplement.

La libération du cholestérol de la membrane spermatique est obligatoire pour activer le signal transmembranaire au moment de la capacitation des SPZ et de la réaction acrosomique (CASTILLINA *et al*, 2012).

### **1.7. Les facteurs influençant la production et la qualité de sperme de lapin :**

La production spermatique de lapin est influencée par divers facteurs tels que la fréquence de la collecte, le régime alimentaire, la santé, l'âge ainsi que le programme d'éclairage (FLANDRIERE, 2007).

**La fréquence de la collecte :** Les caractéristiques biologiques de la semence sont influencées par la fréquence de la collecte. En principe deux collectes par semaine avec un interval de 15 minutes entre deux éjaculats à chaque fois permettent la meilleure production de sperme (CASTILLINI, 2008). Un rythme de collecte trop intense augmente le nombre de spermatozoïdes immatures et diminue les résultats de fertilité (JOLY *et al*, 2000).

**L'alimentation :** Le système alimentaire des mâles affecte les caractéristiques de la semence lorsque le niveau des apports nutritionnels est insuffisant. En effet, un régime alimentaire ne contenant que 13 % de protéines brute entraîne une diminution du volume de l'éjaculat et la concentration des spermatozoïdes (JOLY *et al*, 2000).

**L'état sanitaire :** Une forte concentration des leucocytes, provoquée par une infection, peut altérer la spermatogenèse (CASTILLINI, 2008). L'inflammation de l'appareil reproducteur masculin touche les fonctions testiculaires et séminales (BOITI, 2005).

**La photopériode :** La spermatogenèse de lapin est affectée par la photopériode. La quantité des spermatozoïdes présents dans les gonades soumis à un éclairage artificiel 8 h sur 24 h est plus importante que celle des mâles soumis à un éclairage de 16 h sur 24 h (LEBAS *et al*, 1996). La durée de l'exposition à la lumière influe sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et par conséquent sur la libération d'hormones et sur la production de spermatozoïdes (BOITI, 2005).

**L'âge :** L'âge des mâles influence sur les caractéristiques biologiques de la semence, les valeurs de ces paramètres augmentent avec l'âge. En effet, les mâles adultes de (5 à 24 mois) ont une concentration et un nombre de spermatozoïdes plus élevés que les jeunes (THEAU *et al*, 2000).

**La température :** La température a un grand effet sur le déroulement de la spermatogenèse. Une température élevée a été étudiée soit dans le cadre du stress thermique de courte durée (5h à 32°C), soit dans le cadre d'un séjour beaucoup plus long (été, hiver) (**FLANDRIERE , 2007**). Les éleveurs doivent prendre la précaution de protéger leurs lapins à des fortes chaleurs (**LEBAS et al, 1996**).

### 1. Définition :

Le stress oxydatif est l'état qui résulte d'un déséquilibre (figure 10) au sein d'un individu entre la production d'éléments oxydants (radicaux libres) et des mécanismes de défense anti oxydantes (**BERTIRIDIGE, 2000**). Le stress oxydant est aujourd'hui décrit comme une des causes majeures de l'infertilité masculine. Il induit des altérations membranaires et nucléaires, entraînant une perte de mobilité et du pouvoir fécondant des SPZS (**PONS et al, 2009**).



Figure10 : définition du stress oxydative.

### 2. Définition de quelques notions :

- ✓ **Un oxydant** : Un oxydant est défini comme toute molécule acceptant un ou plusieurs électrons pour devenir une substance réduite (**GRIEND LING et al, 2000**).
- ✓ **Espèces réactives de l'oxygène (ROS)** : Sont des atomes ou des molécules possédant un ou plusieurs électrons non appariés, formés lors du métabolisme de l'oxygène. Très instable, ils réagissent avec les molécules voisines en leur arrachant un électron, les transformant à leur tour en espèces radicalaires (**PONS et al, 2009**).

### 3. Origine du stress oxydatif :

#### 3.1. Les radicaux libres :

Ce sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (un électron non apparié), formées lors des différents métabolismes (**TOUSSAINT, 2007**).

**3.1.1. Production des radicaux libres :**

La production des radicaux libres est la rupture homolytique d'une liaison covalent en deux entités possédant chacune un électron (BOUGUIRNE ,2012).

**3.1.2. Radicaux libres en biologie :**

- ✓ Radicaux libres oxygènes (ROS) ou (DAO) : sont des produits physiologiques du métabolisme cellulaire, et sont indispensables à l'acquisition du pouvoir fécondant des SPZS (TREMELLEN, 2008). La source de ce radical est la NADPH oxydase qui est exprimée par la plupart des cellules et aussi lors de la respiration mitochondriale où le dioxygène est réduit en eau (BOUGUIRNE, 2012).
- ✓ Radicaux libres azotés (RNS) : l'oxyde azotique NO° est produit par un système enzymatique qui transforme l'arginine en citrulline en présence de NADPH.

Comme il est aussi possible de le produire par réduction des nitrites en nitrates, sans l'aide d'enzymes. Il ya aussi des radicaux libres soufrés et des radicaux libres produits à partir de flavines et de quinones (BOUGUIRNE, 2012).

**3.1.3. Origine des radicaux libres (RL) :**

Les RL sont produits par un grand nombre de mécanismes tant endogènes qu'exogènes (AWATIF , 2009). (Tableau2)

**Tableau2 : Origine des radicaux libres**

Source endogène	Source exogène
-mitochondries	- ultraviolet
- peroxyosomes	-radiation ionisante
- lip oxygénases	-agent chimiothérapie
- NADPH oxydase	-toxines environnement
- cytochrome p450-	-cytokines inflammatoires

#### 4. Les antioxydants :

Un antioxydant se définit comme toute substance présente en faible quantité, par rapport à un substrat oxydable, capable de réduire ou de retarder de manière significative l'oxydation de celui-ci. (STOCKER *et al*, 2011). Ainsi, les SPZS ont une faible activité transrationnelle et un volume cytoplasmique limité. en réponse à un stress oxydant, ils sont dans l'incapacité de produire des antioxydant (SANOCHA *et al*, 1997), qui est étudiées pour protéger cette cellule spermatique (BADADE ,2011)

##### 4.1. Système antioxydant enzymatique :

Les principales enzymes cellulaires qui forment ce système antioxydant sont : la super oxyde distimitase (SOD), la catalase(CAT), et la glutathion peroxydase(GPx) (SALAMATION, 2003). Ces enzymes régulent la production excessive d'ERO/ERN cellulaire qui augment les activités et les expressions des enzymes antioxydants lorsque la production de ces derniers augmente (HALLIWELL, 1999).

##### 4.1.1. Rôles des enzymes antioxydants :

-**(SOD)** : Accélère la dismutation des  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  et en  $O_2$

-**Catalase** : Catabolise l' $H_2O_2$  en  $H_2O$

-**GPx** : Réduisent l' $H_2O_2$  et divers hydro peroxydés lipidiques (HSIEH ,2002).

##### 4.2. Antioxydant non enzymatique :

Présents dans le liquide séminale, ils sont de différentes natures : vitamines, des acides aminés, des protéines, et peptides...ect (PONS *et al* ,2009).

##### 4.2. a . Vitamine E :

La vitamine E est un antioxydant liposoluble, très efficace, c'est un donneur d'électrons (NYUS *et al* ,1991). Il est le principe composant du système antioxydant des spermatozoïdes (BADADE *et al* ,2011). Elle est désignée par un groupe de nombreux composants présents dans la nature. Ces groupes comprennent les  $\alpha$ -, B-,  $\gamma$ -, $\delta$ -tocophérol et  $\alpha$ -, B-,  $\gamma$ -, $\delta$ -tocotriénols ( Paule, 2008).

La vitamine E est fixée aux membranes et stoppe la chaîne de réaction de peroxydation des lipides en capturant un radical lipide peroxyde ( $LOO^\cdot$ ) qui devient un radical moins réactif que le  $LOO^\cdot$  et qui pourra être pris en change par une autre molécule antioxydant (CILLARD *et al*, 1980).

Il existe aussi d'autres antioxydants non enzymatiques :

- **Protéines** : (Albumine, ceruloplasmine...).
- **Hydrosoluble** : vitamine C, glutathion, acide urique.
- **Liposoluble** :  $\alpha$ -toco phénol,  $\gamma$ -toco phérol, poly phénols, coenzyme Q 10 (**TOUSSANIT, 2012**)

### 5. Altérations cellulaires :

L'attaque des composants organiques des cellules (lipides, protéines, ou glucides) engendre la transmission d'une cascade radicalaire soit à l'intérieur d'une même molécule, soit à l'intérieur d'un même tissu (**NEUZIL et al, 1993**).

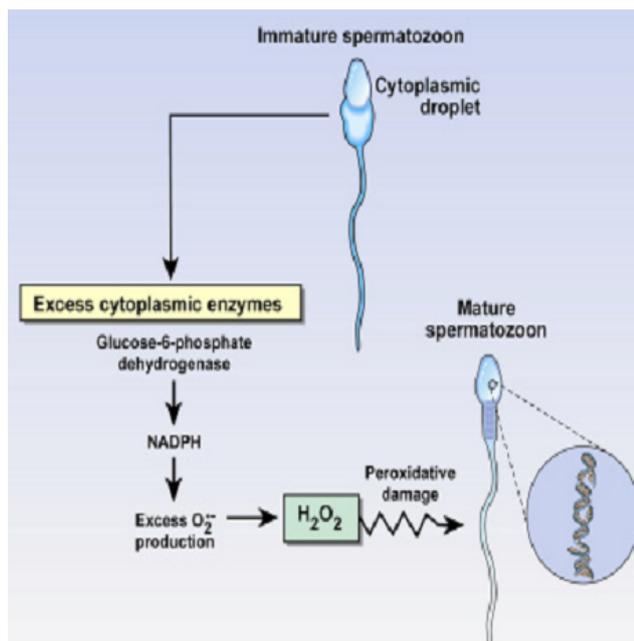
#### 5.1. Peroxydation lipidique :

Lorsque les radicaux attaquent les membranes phospholipidiques, une chaîne de réactions peroxydantes s'installe et perturbe la fluidité membranaire qui devient élevée (**HONG et al, 2004**). Cette réaction radicalaire provoque des dépôts de lipides oxydés dans les vaisseaux ou les tissus âgés (**DILLARD et al, 1987**).

#### 5.2. Oxydation de l'ADN :

Les catégories principales de dommage oxydant d'ADN sont les modifications des bases puriques (adénines, guanines), pyrimidines (cytosine, thymine, uracile), les cassures de doubles brins et l'oxydation des sites basiques (**MANETTE, 1999**).

Les spermatozoïdes immatures, caractérisés par des gouttelettes cytoplasmiques (figure 11), ont une plus grande capacité à produire des ROS. (**BADAD, 2011**).



**Figure 11:** mécanismes et liens entre le stress oxydatifs et les lésions de l'ADN du spermatozoïde (BADAD, 2011).

### 5.3. Oxydation des protéines :

La modification oxydative des acides aminés et des protéines des milieux extra et intracellulaires est causée par des ROS (STADTMAN, 1992). Ils se forment des composés carbonylés qui peuvent être dosés lors de ces oxydations et qui sont influencés par des cations métaboliques tels que  $\text{Cu}^{2+}$  et le  $\text{Fe}^{2+}$  ... (STADTMAN et al, 2000).

### 6. Méthodes de mesure du stress oxydant dans le sperme :

Plusieurs méthodes permettent d'estimer le taux de DAO et d'antioxydants dans le sperme ou indirectement en mesurant les produits d'oxydation: le cytomètre de flux ou le microscope photonique, généralement à épifluorescence, avec des sondes adaptées permettent une bonne estimation des SPZs ayant subi un stress oxydant et/ou de localisation les sites d'oxydation (PONS, 2009).

Dans ce chapitre, nous allons présenter un aperçu des travaux qui ont été réalisés dans la congélation du sperme du lapin.

### 1. Congélation du sperme :

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

En 1989, **CHEN** et ses collaborateurs ont examiné la fertilité de sperme frais et congelé, ils ont obtenu que le taux fertilité a été plus faible avec le sperme congelé que pour la semence fraîche. Et que, pour obtenir des meilleurs résultats avec le sperme congelé, il serait utile de sélectionner les mâles prés- testés pour produire un haut taux de fertilité.

En 1990, **K.BAMBA** et ses collègues ont réalisé trois expériences pour optimiser la concentration finale du DMSO(Diméthylsulfoxyde) et du glycérol dans du diluant appelé FB5 pour la congélation des spermatozoïdes du lapin.

Le sperme a été dilué 1 :1 avec le diluents A (BF5+DMSO) à 25°C et l'autre dilué 1 :1 avec le diluents B (diluent A+ glycérol), après réfrigération à 5°C, la semence diluée a été ensuite congelée immédiatement et stockée dans l'azote liquide.

Ils ont constaté que le maximum pour le pourcentage de motilité et l'intégrité de l'acrosome ont été obtenus à 12 % de DMSO et 3 % de glycérol (concentration finale après décongélation).

En 2005, **CASTRO** et ses collaborateurs ont étudié différents paramètres de spermatozoïdes après congélation à -30°C et dans l'azote liquide (-196°C).

Ils ont observé des différences significatives dans le pouvoir fécondant en in vivo et in vitro, ils ont particulièrement montré que la plus forte fertilité est obtenue à -30

En 2006, **WEISI** et leurs collaborateurs ont réalisé trois essais de congélation avec des concentrations variables de jaune d'œuf et de DMSO. Ils ont obtenu une diminution des paramètres fonctionnels du sperme cryoconservé et un taux de fertilité allant de 56,5% à 35,7%. Cependant, il n'a pas été constaté de différence importante dans les taux fertilité entre le sperme frais (87,5%) et congelé avec le jaune d'œuf à 15,3% et 0,88M de DMSO (73,9%). Ils Ont

conclu que la cryoconservation du sperme du lapin atteint des taux de fertilité comparables à ceux obtenus avec le sperme frais.

En 2008, DAADER et ZEINDAN ont étudié l'effet de différents types de milieux (tris-jaune d'œuf fructose, lactose-jaune d'œuf citrate et saccharose-jaune d'œuf citrate) avec deux types de cryoprotecteurs (glycérol ou DMSO).

Les résultats ont montré que le saccharose-jaune citrate avec 2% de glycérol et de 4% DMSO a maintenu un pourcentage de motilité et d'intégrité acrosomique très élevée.

En 2011, SERIN et ces collaborateurs ont étudié l'effet du prétraitement des cellules spermatiques de lapin avec différentes concentrations de cholestérol chargé dans les cyclodextrines, notamment sur l'occurrence de réaction acrosome au bout de 72h de stockage. Il a été constaté que le cholestérol empêche la réaction acrosomique prématurée des spermatozoïdes du lapin.

**Tableau 3** : les résultats de fertilité et de mobilité par différent protocoles de congélation.

Auteur	Protocole	Taux fertilité	Taux de motilité
<b>Mocé et al., 2003</b>	Congélation- décongélation		
	-30°/50°	32%	54%
	LNV/50°	70%	37%
	-30°/70°	42%	45%
	LNV/70°	77%	31%
<b>Cortell et al., 2008</b>	Milieu de Congélation		
	TCG-C	81%	10%
	TCG-gel	92%	7%
	MIII-C	25%	10%
	MIII-gel	34%	5%
<b>WEISI et al., 2010</b>	Technique de congélation		
	CF 2% glycérol		40, 3±1,9
	CF 5% glycerol		53,9±3,4

<b>MAEDA et al., 2012</b>	DF 2% glycerol	—	39,4±2,9
	DF 5% glycerol	—	63,7±2,8
	Taux réfrigération c°		
	-0,1	-	40,7±7,3
	-0,2	-	39,6±9,8
	-0,4	-	36,2±5,2
<b>LAFFALDANO et al., 2012</b>	-0,8	-	29,2±6,8
	Traitement de la semence :		
	Sperme frais	93%	-
	Congelé avec DMSO	91%	-
<b>ROSATO et al., 2012</b>	Congelé avec DMA	54%	-
	5°ou 15° C durent 192h de stockage		
	H C°		
	0 5/15	—	88,3±1,7/89,2±1,5
	48 5/15	—	75,8±2,0/63,3±3,3
	120 5/15	—	56,7±3,6/38,3±3,3
	192 5/1	—	37,5±6,4/15±1,80
	Semence frais dilué	84%	—
	Sperme congelé		
	BSA/saccharose	77%	—
<b>ROSATO et al, 2012</b>	BSA/tréhalose	52%	—
	Vitrification		
	BSA/saccharose	21%	—
	BSA/tréhalose	0%	—

## Objectif de congélation :

L'objectif du présent travail est d'améliorer la congélation du sperme du lapin en utilisant de nouveaux milieux de congélation et plus particulièrement en optimisant la lutte contre le stress oxydatif.

## I. Collecte de la semence de lapin :

### 1.1. Matériel de la collecte :

#### a. Matériel biologique :

Notre travail est réalisé sur 7 lapins adultes domestiques de race locale. Leur poids varie de 2, 3 kg à 3,8 kg et qui présentent tous un bon état sanitaire (tableau4).

Les animaux étudiés sont maintenus dans des cages individuelles situées dans l'animalerie de la Faculté des Sciences de la nature et de la Vie de l'université de Bejaia. Ils sont nourris avec un aliment granulé complet du commerce et avaient de l'eau Ad libitum (figure12).

**Tableau 4** : les caractéristiques des mâles étudiés

Male	Couleur	Race	Poids
M1	Noir tache blanche	locale	3,265kg
M2	noir	-	3,085kg
M3	Noir et blanc	-	3,030kg
M4	blanc	-	2,705kg
M5	blanc	-	3,170kg
M6	Gris- marron	-	2,835kg
M7	Gris- marron clair	-	3,860kg



**figure12** : Photographie des cages des

males.

#### b- Matériel non biologique

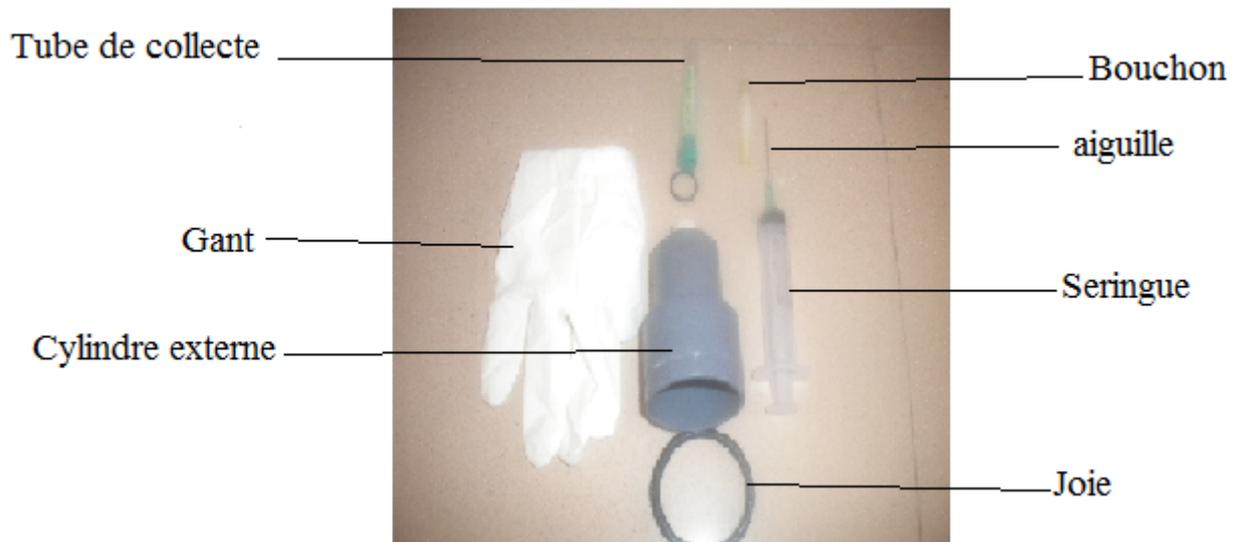
- Eau chaude

- Vagin artificiel constitué de (figure 13) :

- ❖ Cylindre externe
- ❖ Seringue
- ❖ Joint
- ❖ Aiguille
- ❖ Tube de collecte

❖ Bouchon

❖ Gant

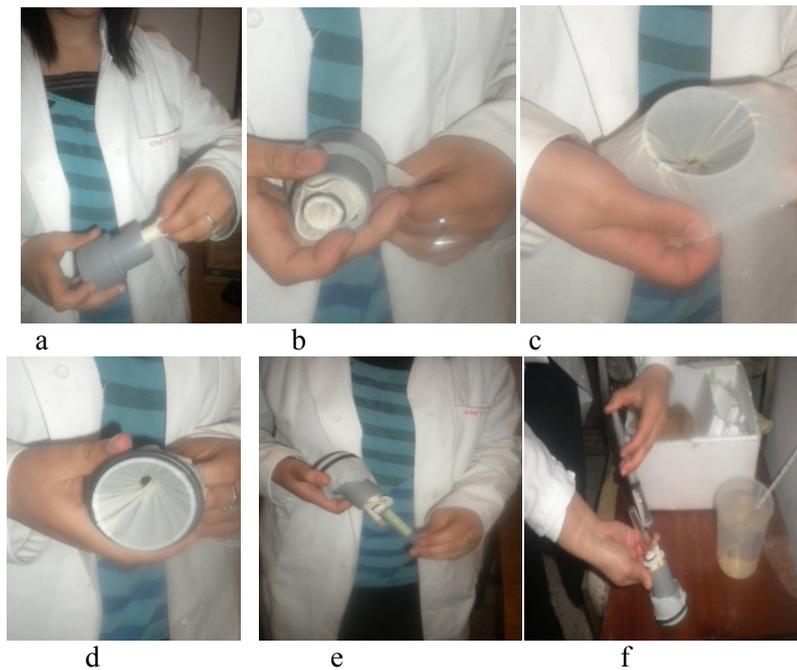


**Figure 13:** Photographie du vagin artificiel.

## I.2. Méthodes de la collecte :

### a. Etapes de préparation du vagin artificiel :

Nous introduisons un gant dans le vagin (figure 14a), puis on retourne la petite extrémité sur le vagin qu'on attache avec un élastique (figure 14b). Après avoir fait un  $\frac{1}{4}$  de tour (figure 14c), la grande extrémité est repliée et attachée avec des élastiques (figure 14d). Le tube de récolte est ensuite placé dans la petite extrémité (figure 14e). A l'aide d'une seringue on injecte de l'eau chaude dans la cavité formée entre le cylindre externe et le gant (figure f).



**Figure 14** : les étapes de préparation du vagin artificiel.

### **b. Technique de récolte du sperme :**

Nous introduisons une lapine dans la cage du mâle et au moment où le mâle essaye d'accoupler la femelle, nous insérons rapidement le VA (figure 15). Lorsque le pénis est entré dans la grande extrémité, l'éjaculation se produit et le sperme est collecté (figure 16).



**Figure15** : photographie de récolte de la semence.



**Figure 16** : photographie du sperme collecté.

## **II. Analyse du sperme**

### **II .1. Matériel (figure 17) :**

- Des tubes
- Des micropipettes.
- Des lames.
- Des lamelles.

- Des tubes ependorff.
- des colorants : éosine à 1%, Nigrosine à 10%.
- Eau physiologique (Na Cl à ,9 et à 3%).
- Un microscope optique.



**Figure17** : photographie du matériel utilisé dans l'analyse

## II.2. Méthode d'analyse :

Après la collecte, le tube de prélèvement est maintenu dans la main de façon à le garder à 37°C. Puis on procède à l'analyse des 7 paramètres spermatiques : volume, mobilité massale (celle de l'ensemble des spermatozoïdes), motilité individuelle (spermatozoïde par spermatozoïde), concentration spermatique, viabilité, morphologie et la réaction au test hypo osmotique (pourcentage de spermatozoïdes gonflés).

### II.2.1. Examen macroscopique :

- La couleur** : est déterminée par l'observation de la semence dans le tube de collecte.
- Le Volume (V)** : après élimination du gel, on détermine le volume du sperme à l'aide d'une micropipette (100µl).

### II.2.2. Examen microscopique :

- La motilité massale (MM)** : la motilité massale est estimée par observation d'une goutte de sperme sous microscope optique (x10). L'observation est faite dans le délai de 5 à 10min après collecte, une note de 0 à 9 est attribuée sur le critère de l'intensité des vagues observées selon échelle de **PETITJEAN 1965** (voir l'annexe 1)
- Motilité individuelle (MI)** : une goutte de sperme diluée par 40µl de tris tampon (1/5<sup>ème</sup>) est observée au microscope optique au grossissement x40 entre lame et lamelle, une note de 0 à 4 est attribuée aux mouvements des spermatozoïdes selon l'échelle d'**ADIEU , 1974** (voir l'annexe 2).

## C .La concentration spermatique(C) :

- ✓ Préparation de la solution de fixation : 10ml de formol à 35% dans 1L de Na Cl à 0,9%

**Méthode** : Après dilution  $1/200^{\text{ème}}$ , on dépose une goutte de semence diluée à la bordure de chaque chambre de cellule de « thomas » à l'aide d'une micropipette, puis on laisse la cellule reposer 10 min (**Mallem et al 2007**). On calcule le nombre de spermatozoïdes dans les 8 grands carreaux diagonaux sous grossissement x40).

- ✓ Formule :

$$C = \text{Somme (8 carreaux)} \times 200 / 64 (10^6 \text{ Spz})$$

Avec :

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

**N** : La moyenne des spermatozoïdes comptés, dans les huit carreaux diagonaux.

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

#### **d. La morphologie :**

- Une goutte de sperme est déposée sur une lame.
- Ajout d'une goutte de la solution d'éosine 1%.
- Mélanger avec un embout et laisser quelques secondes.
- ajout de 2 gouttes de solution Nigrosine à 10% et mélanger.
- Effectue un frottis à l'aide d'une lame.
- laisser sécher à l'air libre
- observation du frottis, sous microscope optique x100

Nous avons classé les spermatozoïdes selon les anomalies de leur tête, de leur pièce intermédiaire, et du flagelle. A la fin, nous avons calculé le pourcentage de spermatozoïdes on utilisant la formule suivante (**BOUSSIT, 1989**) :

$$\begin{array}{l} \text{Nombre total des spermatozoïdes (200)} \quad \longrightarrow \quad 100\% \\ \text{Nombre des spz normaux} \quad \longrightarrow \quad \% \text{ des spz} \end{array}$$

### III. Conservation de la semence de lapin :

#### 1. Milieux de conservation :

Nous avons utilisé six (6) milieux de congélation que nous avons comparés à un contrôle. Le contrôle est composé uniquement de tris buffer (TB) que nous avons préparé au laboratoire (tableau 5). : Les nouveaux milieux que nous avons préparés ont comme base le TB plus : cyclodextrine (CD), ou cholestérol (chl), ou vitamine E (vitE), ou complexe CD-chl, ou CD-vitE , ou CD-chl-vitE. Les complexes sont préparés au niveau du laboratoire de génie des procédés pharmaceutiques de l'Université de Bejaia en utilisant la méthode de Co-évaporation.

**Tableau 5** : les composantes de tris buffer (milieu de STRAZINGER ,1971)

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

#### 1.1.Préparation des complexes :

Complexe CD-chl :

- Peser une masse de 350 mg de chl avec 601mg de MbCD, puis ajouter 50 ml d'éthanol.
- Le mélange est mis sous agitation pendant 2h.
- mettre dans l'étuve pendant 24h pour récupérer les complexes sous forme de poudre.

Complexe CD-vitE :

- Peser 282,3mg de vit E avec 794,28mg de CD, puis ajouter 50 ml d'éthanol.
- Mettre en agitation pendant 2h, puis dans l'étuve pendant 48h.

## 1.2. Préparation des milieux de conservation :

Les différentes concentrations utilisées pour préparer les milieux de conservation à base de tris buffer sont présentées dans le tableau (6).

**Tableau 6:** Composition des milieux de congélation

CDs	Chl	Vit E	CD-Chl (1)	CD-VitE (2)	CD-Chl-Vit E
35,5mg+5ml de tris buffer(TB)	20mg+5ml de TB	1,2mg+10ml de tris b	54,3mg+5ml de TB(2)	9,2mg +10ml TB(1)	1ml de (1) +1,5ml TB+(2)

## 2. Conservation du sperme :

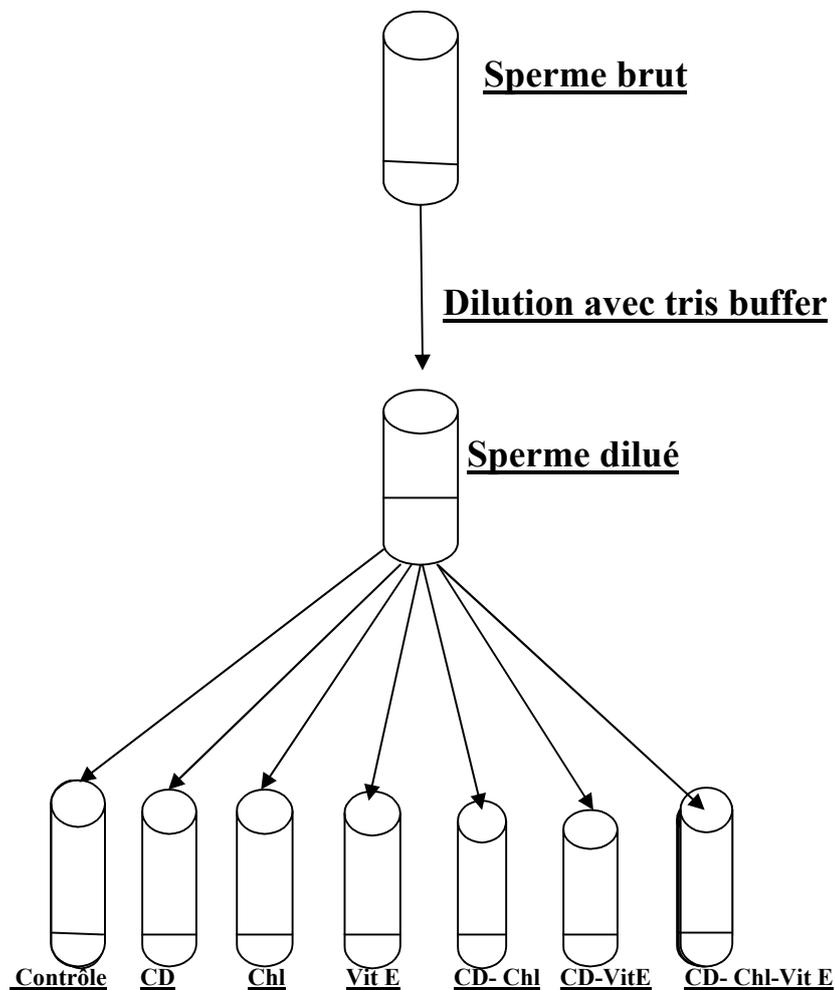
### 2.1. Conservation à température ambiante et réfrigération :

#### a. Matériel utilisé :

- réfrigérateur.
- Les tubes eppendorffs.
- les micropipettes.
- les étiquettes.
- les traitements.
- sperme

#### b. Méthode (Figure 18) :

- 1- Immédiatement après la récolte, on calcule le volume du sperme, puis on le dilue avec tris buffer (1 :5)
- 2- Préparation de deux séries (1 pour la conservation à température ambiante et 2 pour la conservation au frigidaire). Chaque série contient 7 tubes (sperme + TB), un pour le contrôle et six pour les traitements (tableau 5).
- 3-Ajouter 1 volume de sperme dilué et 1 volume de chaque traitement dans chaque tube.
- 4-Analyse des échantillons pour la mobilité à T0, à l'aide d'un analyseur informatique (SCA : sperm class analyzer) puis laissés à température ambiante.
- 5-Mettre la série 2 dans le réfrigérateur à 5°C.
- 6- Analyse des échantillons pour la mobilité toutes les deux à trois heures.



**Figure18** : étapes de préparation des échantillons.

## 2.2. La congélation du sperme

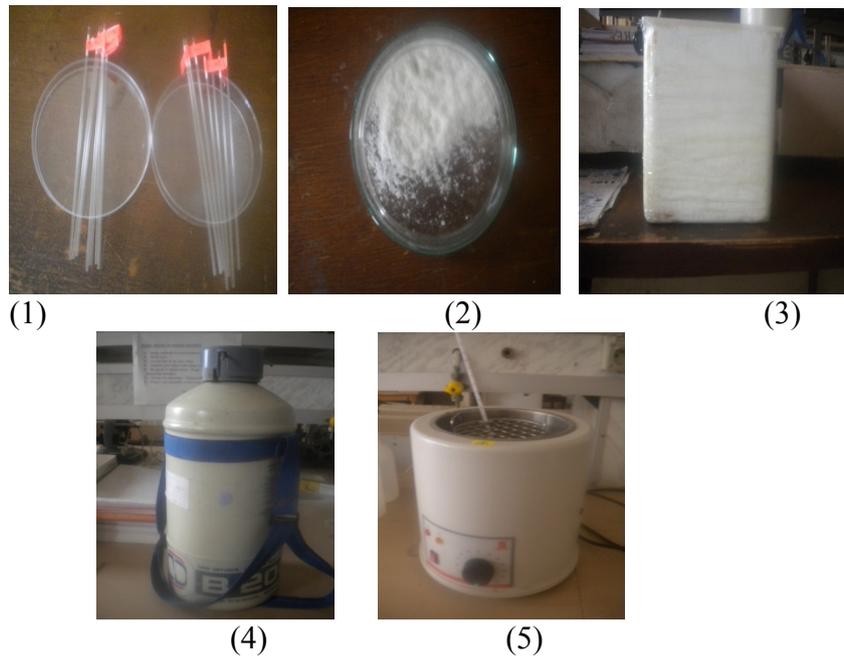
### a-Matériel (figure 19) :

L'équipement utilisé pour la congélation de la semence se compose de :

- paillettes de 0,25ml(1)
- poudre de bouchage des paillettes (polyvinyle) (2)
- une boîte polyester (3)
- une bouteille d'azote liquide (4)

- réfrigérateur

- un bain-marie(5)



**Figure19** : Photographie des matériels utilisés dans la congélation.

#### **b-Protocole de congélation :**

**1**-Immédiatement après la récolte on met le sperme en équilibration au frigidaire pendant 90 minutes à 5°C.

**2**-après 90 minutes, le sperme est dilué (1 :5<sup>ème</sup>) avec (tris buffer +10% DMSO +antibiotique).

**3**-mettre 1 volume de sperme dilué et 1volume de chaque traitement dans chaque tube (6 TRT et un contrôle).

**4**-charger les paillettes de 0,25 ml par aspiration à travers le bouchon de l'extrémité.

**5**-obturer les paillettes par une poudre polyvinylique (figure20).



**Figure 20**: Photographie d'obturation des paillettes

**6**-mise des paillettes dans le réfrigérateur pendant 45min à 5°C.

8-les paillettes sont placées horizontalement sur un support à hauteur de 5cm au dessus du niveau de l'azote liquide pendant 10 min, pour être ensuite directement plongées dans l'azote liquide à -196°C

### 2.3- décongélation des paillettes :

- décongélation des paillettes dans un bain marie à 50°C pendant 10-12 secondes.

-analyse de la semence décongelée à l'aide d'un analyseur informatique (figure 21). Ce système permet de mesurer objectivement les paramètres de mobilité notamment les vitesses de progression des gamètes.

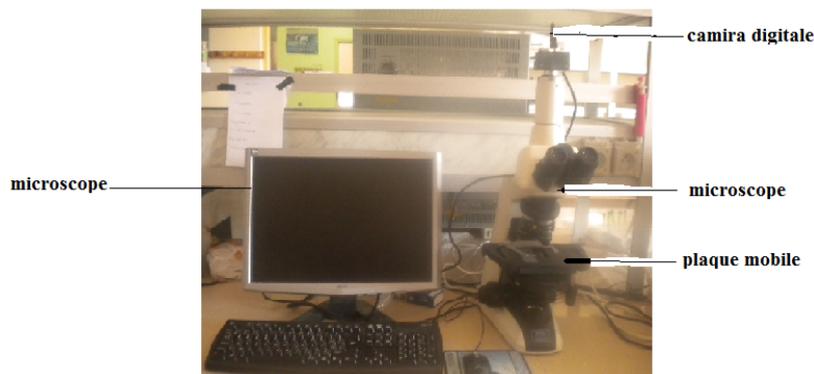


Figure 21: photographie de l'analyseur informatique du sperme.

### 3. Analyse statistique :

Les résultats sont analysés à l'aide d'un logiciel de traitements des données « statview 5.0 » et ceci pour la réalisation de statistiques descriptives.

**IV. Résultats et discussions :**

**1. Caractéristique du sperme frais :**

Avant d’entamer la conservation du sperme soit à température ambiante, réfrigération ou par congélation, nous avons commencé par l’analyse des caractéristiques du sperme frais juste après la collecte.

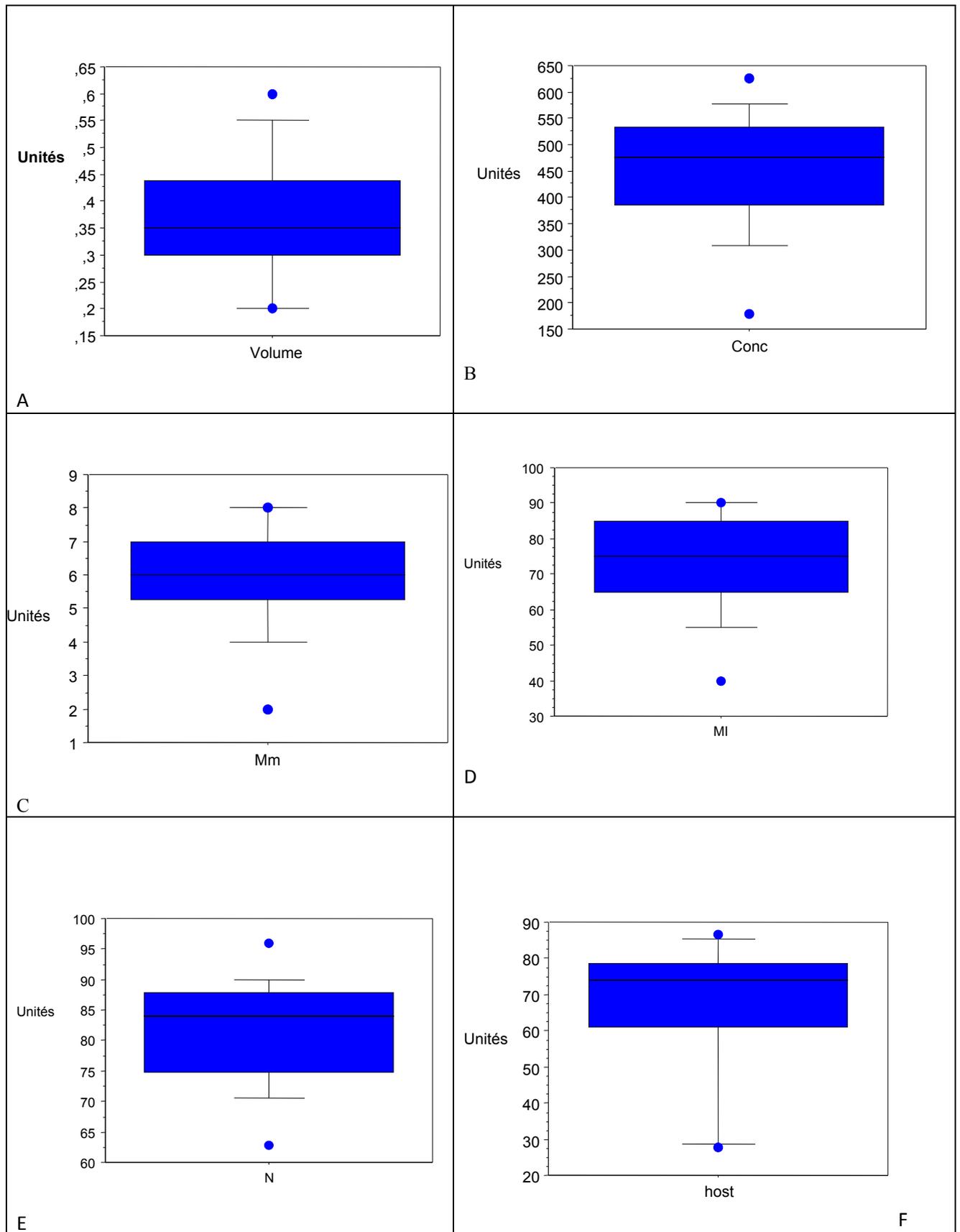
**1.1. Analyse macroscopique :**

Le tableau 7 indique les caractéristiques macroscopiques des semences récoltées chez les 7 lapins étudiés.

**Tableau 7 :** Caractéristiques macroscopique du sperme des lapins étudiées

Male	Date	Ejaculat	Couleur	volume
<b>1</b>	14.4.13	I	Blanc lait	0,3ml
<b>1</b>	14.4.13	II	Blanc lait	0,35ml
<b>1</b>	23.4.13	I	Blanc lait	0,4ml
<b>1</b>	2.5.13	I	Blanc lait	0,55ml
<b>2</b>	15.4.13	I	Blanc lait	0,3ml
<b>2</b>	15.4.13	II	Blanc lait	0,3ml
<b>3</b>	2.5.13	I	Blanc écrémée	0,2ml
<b>4</b>	22.4.13	I	Blanc jaunâtre urinée	0,35ml
<b>4</b>	29.4.13	I	Blanc jaunâtre	0,5ml
<b>5</b>	21.4.13	I	Blanc nacré	0,3ml
<b>5</b>	28.4.13	I	Blanc nacré	0,35ml
<b>7</b>	22.4.13	I	Blanc lait	0,37ml
<b>7</b>	29.4.13	I	Blanc lait	0,28ml
<b>8</b>	21.4.13	I	Blanc écrémée	0,6ml
<b>8</b>	28.4.14	I	Blanc écrémée	0,45ml
<b>Moyenne</b>				0.37 ml

Les distributions des données relatives au volume, à la concentration, à la motilité massale et individuelle, le pourcentage de spermatozoïdes normaux, et hypo osmotiques, sont présentées sur la figure 22. Toutes les valeurs retrouvées restent dans l’ordre décrit pour le sperme du lapin. .



**Figure 22 :** présentation de la distribution des données en termes de volume, concentration, mobilités et taux spermatozoïdes normaux, et hypo osmotique.

**a. Volume :**

Nous observons que la moyenne du volume des éjaculats est de 0,37 ml, ce volume se rapproche des valeurs décrites par **BOITTI, (2005)** qui est de 0,3-0,9. Par contre nos valeurs restent plus faibles que celles de **BOULBINA (2011)** qui a rapporté un volume de 0,86 ml, et **AMORIUM (2009)** qui a rapporté un volume de 0,57.

Cette différence est probablement liée à l'âge des ou à la fréquence de collecte comme rapporté par **JOLY T et THEAU, (2000)**.

**1.2. Analyse microscopique :**

Les caractéristiques microscopiques du sperme collecté sont regroupées dans le tableau 8.

**Tableau 8:** Caractéristiques microscopiques du sperme des lapins étudiés.

Male	MM	MI	MI%	Cn ( $\times 10^6$ Spz)	Host (% Spz vivants)
1	7	2,75	79%	439,6875	56,27625
2	4	1	53%	518,75	32,625
3	2	1	50%	178	28,5
4	7	3	80%	439	77,75
5	6	3	72,5%	557,75	67
7	6,5	2,5	72,5%	402,5	68,75
8	7	3,5	87,5	506	80,375
Moyenne	5,64	2,46	70,64	434,526786	60,4403333

**MM** : motilité massale , **MI** : motilité individuelle, **Cn** : Concentration , **Host** : hypo osmotique

**a. Concentration :** On a trouvé une moyenne de concentration en spermatozoïdes de  $434,52 \cdot 10^6$  Spz /ml, cette concentration est légèrement supérieure à celle obtenue par **NABI (2011,2012)** qui est de  $428,94 \cdot 10^6$  spz/ml. Cependant elle reste plus faible à celle enregistrée par **BOULBINA (2011)** (avec  $734,9 \cdot 10^6$  spz/ml. (fig b)

### **b- mobilité :**

**b.1.mobilité massale :** Nous avons noté en moyenne 5,64 de motilité massale. Ce résultat est inférieur à ceux obtenus par **THEAU et al (2011)** qui ont noté 6,7 mais reste supérieur à ceux de **NABI (2011,2012)** qui est 5,1.

Cette différence peut être liée à la fréquence de collecte ou à l'âge des males.

**JOLY T et THEAU, (2000).** Ont démontré qu'une fréquence de collecte trop intense augmente le nombre de spermatozoïdes immatures et diminue la mobilité massale des spermatozoïdes. Cependant il est à rappeler que cet analyse est effectuée au microscope par l'évaluation à l'œil et non de manière objective par un analyseur informatique et reste donc sujette à la subjectivité de l'évaluateur.

**b.2.Mobilité individuelle :** dans notre travail nous avons obtenu une moyenne de mobilité individuelle de 70,64%, ces résultats restent tout à fait en corrélation avec ceux obtenus par **PIOTOR GOGOL (2009)** et qui sont de 71,25%.

**c. Hypo osmotique :** Nous avons obtenu un pourcentage de viabilité de 60,44, ce résultat reste inférieur à celui obtenu par **ROSATO M, (2012)** et **IRAQUI (2012)** qui ont trouvé 85,3 ,83,24% respectivement.

### **d. Les anomalies spermatiques :**

Le tableau 9 présente le pourcentage des spermatozoïdes normaux et anormaux. Les SPZ anormaux peuvent être répartis en différentes classes : anomalies de tête, de la pièce intermédiaire, et du flagelle. Sur le tableau 8 nous remarquons que le pourcentage des SPZ normaux est de 82,68 ces résultats sont similaires aux résultats rapportés par **NABI (2011, 2012)** qui a trouvée 83,7.

Par contre nous avons trouvé un pourcentage de SPZs anormaux plus élevé (17,32) à ceux de **IRAQUI (2012)** (11,79% ) et **ABD EL-AZIM (2011)** (8,79%, et 9,15% ).

Cette différence est probablement liée à la différence raciale entre les études réalisées.

**Tableau 9** : Caractéristiques morphologique du sperme des lapins étudiées

anomalie Male	N	T	PI	F
1	71,08%	1%	1%	17,42%
2	87%	0%	0%	14%
3	87,5%	1%	0%	11%
4	88%	1%	2%	10%
5	92%	0%	1%	8%
7	77%	2%	2%	20%
8	81%	0%	0%	21%
Moyenne	82,68%	1%	1,83%	14,49%

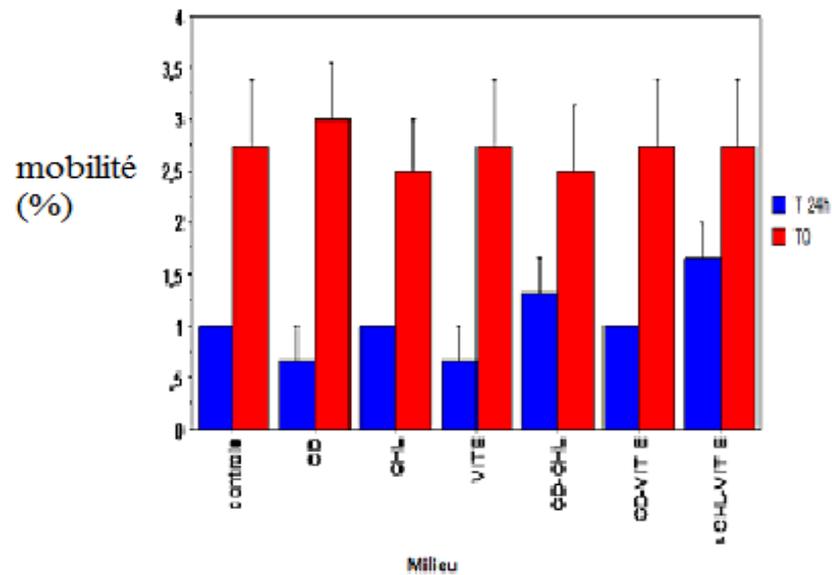
N : Spz normaux , T : Anomalie de la tête, PI : Anomalie de la pièce intermédiaire, F : Anomalie de flagelle

## 2 .Caractéristiques du sperme conservé :

### 2.1. Température ambiante et réfrigération :

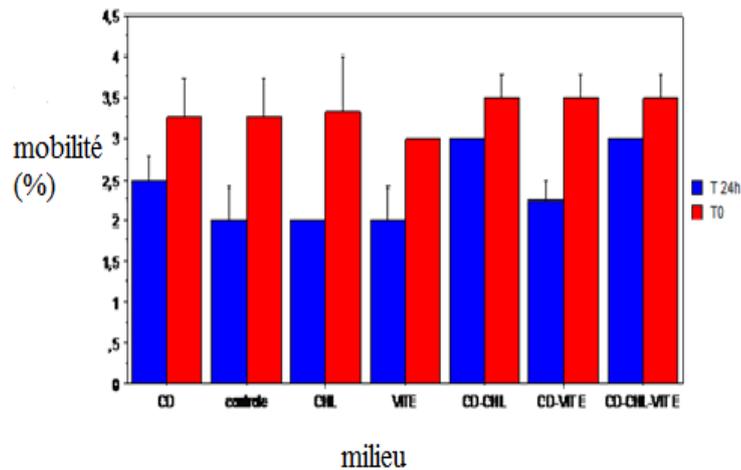
La variation de mobilité des spermatozoïdes pour l'ensemble des milieux utilisés pour la conservation à températures ambiante est représentée sur la figure 23.

Les résultats obtenus donnent des valeurs presque similaires pour l'ensemble des milieux à T0. Après 24h de conservation deux milieux se distinguent, il s'agit du CD-CHL et du CD-CHL-VIT E avec cependant une nette supériorité du dernier. La mobilité est mieux conservée dans le milieu CD-CHL comparativement au milieu CHL, cela signifie que les cyclodexytrines sont amélioré la solubilité du cholestérol avec comme conséquence une meilleure disponibilité de ce dernier pour les spermatozoïdes et donc une meilleure conservation des membranes par intégration du cholestérol dans les feuilletts membranaire. Dans le milieu CD-CHL-VIT E, en plus de cet effet protecteur lié au cholestérol, un autre effet est lié à la vitamine E, qui elle exerce sont action via un pouvoir antioxydant pur empêchant ainsi les molécules oxydantes d'arriver au niveau des membranes cytoplasmiques et de les attaquer.



**Figure 23** : Histogramme représentant la mobilité des spermatozoïdes conservés à température ambiante dans les 7 milieux utilisés (contrôle, CD, CHL, VIT E, CD-VIT E, CD-CHL, CD-CHL-VIT E (dernier à droite)).

Dans la réfrigération (figure 24), on retrouve les mêmes évolutions constatées à température ambiante, l'association cyclodextrines, cholestérol et vitamine E permet donc de lutter efficacement contre le stress oxydatif à 4° C en agissant sur la membrane par le cholestérol, en luttant contre les molécules oxydantes par la vitamine par un effet potentialisateur des cyclodextrine. Il est cependant important de noter qu'une meilleure conservation de la mobilité est observée, quelque soit le milieu conservation utilisé, à la réfrigération qu'à température ambiante. Cette constatation reste tout à fait évidente et signifie de moindres actions délétères sur les spermatozoïdes quand ils sont conservés à 4°C avec limitation notamment des phénomènes oxydatifs. Comparativement aux résultats de **GRISPILHO (2012)** qui a travaillé chez le cheval avec un milieu CD-CHL, nos résultats apparaissent supérieurs. Ceci pourrait être lié à l'espèce étudiée mais aussi aux concentrations des molécules utilisées. Il est cependant important de signaler que l'évaluation de la mobilité aussi bien dans la conservation à température ambiante qu'à 4°C est réalisée par la méthode classique au microscope sans l'utilisation d'un analyseur informatique plus objectif.



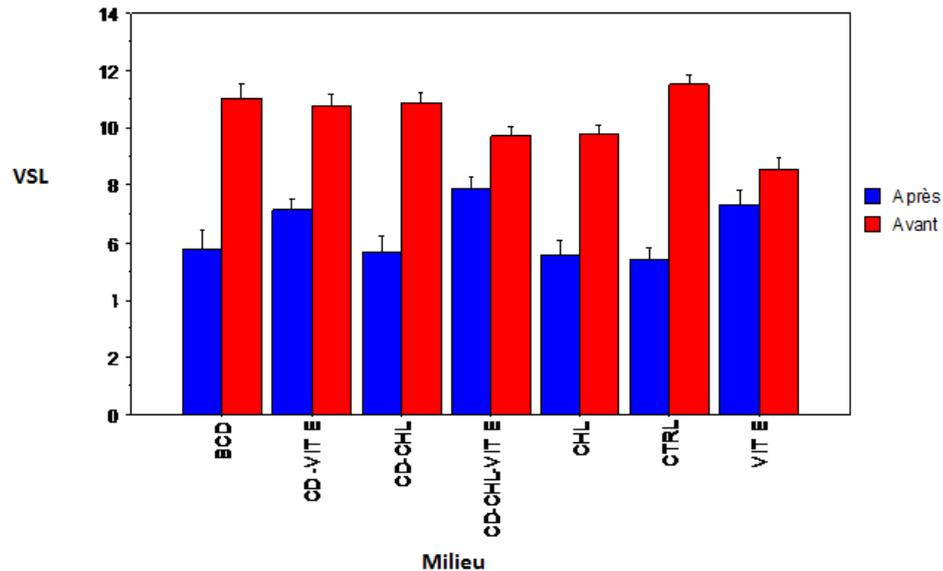
**Figure 24** : Histogramme représentant la mobilité des spermatozoïdes conservés au réfrigérateur (4°C) dans les 7 milieux utilisés (contrôle, CD, CHL, VIT E, CD-VIT E, CD-CHL, CD-CHL-VIT E (dernier à droite)).

## 2.2. Congélation –décongélation :

Pour évaluer l'impact des différents milieux de conservation sur la mobilité spermatique avant et après congélation dans l'azote liquide, nous avons utilisé l'analyseur informatique de la mobilité spermatique. Il s'agit du système SCA (Sperm Class Analyzer) connu pour générer des valeurs objectives. Ce système permet notamment de mesurer des vitesses de progression des gamètes. Sur la figure 25 est représenté la VSL (Straight Line Velocity), vitesse qui prend en considération la distance parcourue par le spermatozoïde en traçant une ligne droite entre le point de départ et d'arrivée.

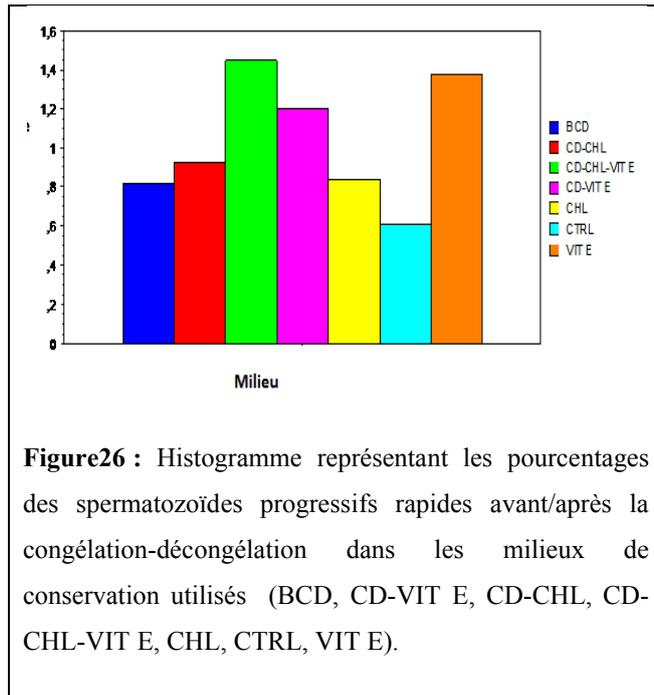
Nous pouvons constater qu'avant la congélation il n'existe pas de grandes différences entre les différents milieux, même si une tendance semble mettre les échantillons Vit E, CHL et CD-CHL-Vit E en position inférieure. Après décongélation, les vitesses les plus élevées sont retrouvées dans le milieu CD-CHL-Vit E. Il est tout à fait établi que les spermatozoïdes subissent d'intenses phénomènes oxydatifs au cours de la congélation-décongélation avec des conséquences sur les différents composants de la cellule allant de la membrane aux molécules constitutives et fonctionnelles (PONS et al., 2009). Par l'ajout du cholestérol et de la vitamine E, l'impact de ces effets délétères est réduit de deux manières : par le renforcement de la membrane cytoplasmique (cholestérol) et par la lutte contre les espèces oxydantes (vitamine E). Cet effet s'est exercé de la même manière à température ambiante, à 4°C et pendant la

congélation-décongélation dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ . Les cyclodextrines apparaissent comme des molécules prometteuses pour potentialiser et optimiser l'effet des substances lipophiles protectrices mais qui ne parviennent pas à exprimer leur plein effet dans un environnement hydrophile caractérisant les milieux de conservation des spermatozoïdes et des cellules en général.

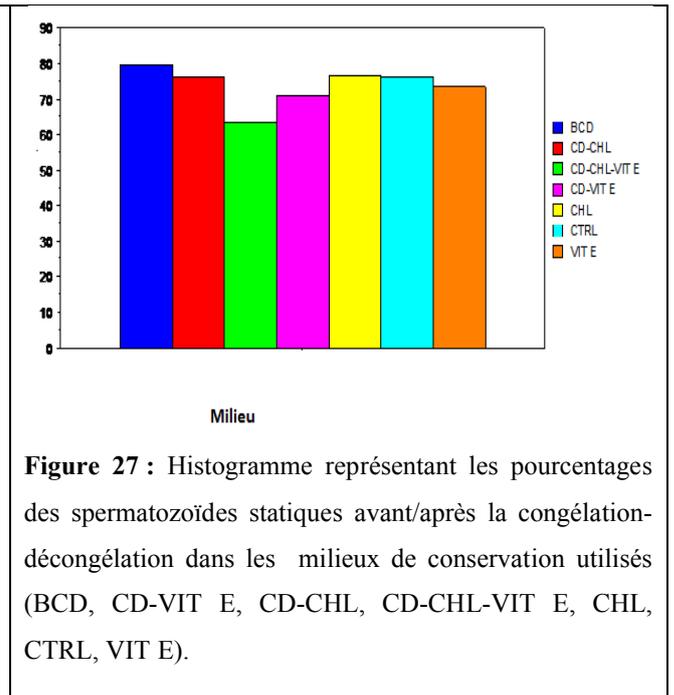


**Figure25 :** Histogramme représentant les vitesses (VSL) des spermatozoïdes avant/après la congélation-décongélation dans les milieux de conservation utilisés (BCD, CD-VIT E, CD-CHL, CD-CHL-VIT E, CHL, CTRL, VIT E).

L'analyse informatique du sperme congelé nous a permis aussi de générer deux paramètres indicateurs de la qualité du sperme. Il s'agit du pourcentage de spermatozoïdes progressif rapides (figure 26), considérés comme étant les meilleurs spermatozoïdes, et le pourcentage des statiques (figure 27), considérés comme étant les plus mauvais, car n'assurant pas de fertilisation par absence de mobilité. Pour ces deux paramètres de la même manière que pour la VSL, le milieu CD-CHL-Vit E est celui qui permet d'obtenir le plus de spermatozoïdes progressifs et le moins de spermatozoïdes statiques.



**Figure 26 :** Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes progressifs rapides avant/après la congélation-décongélation dans les milieux de conservation utilisés (BCD, CD-VIT E, CD-CHL, CD-CHL-VIT E, CHL, CTRL, VIT E).



**Figure 27 :** Histogramme représentant les pourcentages des spermatozoïdes statiques avant/après la congélation-décongélation dans les milieux de conservation utilisés (BCD, CD-VIT E, CD-CHL, CD-CHL-VIT E, CHL, CTRL, VIT E).

## Conclusion générale

---

La technique de congélation de la semence restera la méthode majeure de conservation des ressources génétiques. Cependant, la variabilité de réponse à la congélation en fonction de l'espèce restera une problématique qui intéressera toujours les scientifiques. .

Dans nos conditions expérimentales, les lapins utilisés présentent une production (volume) spermatique plus faible que celle rapportée dans la bibliographie, avec cependant une mobilité et une concentration plus intéressantes.

On a pu constater que la qualité de la conservation du sperme, aussi bien à température ambiante, à 4°C ou par congélation, est améliorée par la lutte contre le stress oxydatif. Cette amélioration est quantifiée notamment dans le cas de la congélation par un outil informatique automatique qui génère des résultats objectifs, pouvant donner de la crédibilité aux résultats obtenus. Ainsi, des vitesses de progression et des pourcentages de spermatozoïdes de différentes qualités sont obtenus.

Notre approche qui a consisté à lutter contre le stress oxydatif sur deux niveaux complémentaires semble prometteuse. Nous avons pu réduire l'impact des espèces oxydantes en renforçant la membrane cytoplasmique par l'ajout du cholestérol tout en luttant contre ces espèces par la vitamine E. La complexation de ces deux dernières molécules, de nature lipophile, avec des cyclodextrines a permis leur meilleure solubilité dans les milieux de conservation et une potentialisation de leur action.

Les présents résultats ouvrent des perspectives intéressantes, notamment dans l'exploration du potentiel fertilisant du sperme par des inséminations artificielles mais aussi par l'application des techniques de reproduction *in vitro*. De même, il serait intéressant d'explorer la qualité des embryons après insémination en utilisant le cholestérol, la vitamine E et les cyclodextrines.

## Références bibliographiques

---

- **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 ; poult. Science (3)1 II : p 467 -480.  
**AMORIUM E A M., 2009** . The hypoosmotic swelling test in fresh rabbit spermatozoa. Departement of animal science .111:p 338-343.
- **AWATIF N ., 2009** .Effet de l'extrait méthanolique de Zygophyllum cor nutum coss contre le stress oxydant associé au diabète sucré et les organes en relation. These de doctorat. Université Mentouri-Constantine.
- **BABOOTA S, KHANNA R, AGARWAL P, ALI J , AHUJA A., 2003** . Cyclodextrins in Drug Delivery Systems : An update. Departement of pharmaceutics.Hnmdard university,New Delhi-110062.
- **BADADE Z G and SAMANT P M., 2011** .Role of oxydative stress in male infertility, 3(2) ,p385- 391.
- **BAMBA K, THE LATE C, ADAMS E., 1990**. Freezing rabbit semen by the use of BFS diluents. Laboratory Animals 24, p 172- 175.
- **BARILLARO V., 2006** . Etude de l'inclusion du miconazole dans les cyclodextrines à l'aide du dioxyde de Carbone supercritique : aspects galénique et modélisation moléculaire. These de doctorat en Science Pharmaceutique, université de liège.
- **BETLERIDIGE D J., 2000** . Whats is oxydative stress ? Metabolisme , 49(2 sup .1),p3-8.
- **BOITI C., 2005**. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen .World Rabbit Sci,WFSA,UPV, 2003.p 72-80.
- **BOULBINA I, AIN-BAZIZ H, Ilès I, ZENIA S,BELABAS R, TIMEME S.,2012**. Effect of birth season on onset of puberty and semen characteristics in male rabbit of Algerian population (*Oryctolagus cuniculus*). World Rabbit Science Association Proceedings, 10 th World Rabbit Congress - September 3 - 6, 2012- Sharm El- Sheikh - Egypt,p 335- 339.

## Références bibliographiques

---

- **BOUGUIRNE B., 2012.** Conception et synthèse des dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires : thèse de doctorat. Université Toulouse III.
- **BOULBINA I., 2011.** Caractéristique de la semence du lapin de population locale (*Oryctolagus cuniculus*). Thèse de magister. Ecole nationale supérieure d'Alger.
- **BOUSSIT D., 1989.** Reproduction et insémination artificielle en cuniculture chez le lapin. Edité par l'association française de cuniculture : diffusion Lavoisier TEC et DOC.
- **BREWSTER M E, LOFTSSON T., 2007.** Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv drug Del Rev.*59 ,p645-666.
  
- **CABANNES C R A., 2008.** Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovines, canines, et humaine. Thèse :03-TOU 3-4108 à l'université Paul –Sabatier de Toulouse .p37-44.
- **CASTANE D, 2009-2010.** Etude des interactions entre les cyclodextrines et les membranes liposomales ou biologiques.
- **CRINI G, MORCEILET M, MORIN N., 2001.** Quelques applications des complexes d'inclusion cyclodextrine substrat, l'actualité chimique.
- **CANNORS K A., 1997.** The stability of CD complexes in solution. *Chem Rev* :97 :1325-57
- **CASTELLINI C., 2008.** Semen production and management of rabbit bucks. Dept. of Applied Biology, University of Perugia, Italy, 9th World Rabbit –June 10-13.
- **CASTILLINI C, MOURVAKI E, CARDINALI R, COLLEDEL G, LASAGNA CASTRO V, MOCE E, VICENT JS, MARCO-JIMENEZ F, LAVARA R., 2005.** In vitro evaluation of in vivo Fertilizing Ability of Frozen Rabbit Semen. *Reprod Dom Anim* 40, 2005 Blackwell Verlag, Berlin. p136-140.
- **CESAR C, CARDINALI R, DAL BOSCO A, MINELLI A, OLIVACAMICI., 2006.** Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology* 65 , p703–712.
- **CHALLA R, AHUJA A, AII J, KHAR R., 2005.** Cyclodextrin in drug delivery: An updated review. *APPS Pharm Sci Tech* .6, p329- 357.
- **CHEIM Y, KHRAKI K, RAYNAUD S, BILLON L, FRANCOIS J., 2006 :** Peracylation de cyclodextrine (B-CD et  $\alpha$ -CD) Par différents halogénures d'alkanoyles. *Lebanese Science Journal*, vol .7, NO.2.

## Références bibliographiques

---

- **CHEN Y, LI J, SIMKIM E, YONG X, FOOT H R., 1989:** Fertility of fresh and frozen rabbit semen inseminated at different time is indicative of male differences in capacitation time. *Biology of reproduction* vol( 41), p 848-853.
- **CILLARD J , CILLARD P., 1980 :** Prooxidant effect of alpha-tocopherol on essential fatty acids in aqueous media, *Ann .nutr. Aliment* -34, p579- 591.
- **GLANT S .,** Nouveaux complexes polyelectrolytes impliquant un polymère de B-cyclodextrines :un tensioactif cationique et un polyanion. Thèse de doctorat. Université de PARIS III.
- **CORTELL C, VIUDES DE CASTRO M P., 2008.** Effect of gelatin addition to freezing extender on rabbit semen parameters and reproductive performance. 9th World Rabbit Congress – June 10-13 – Verona – Italy. P 327-329.
- **CURTY J P, ROBIN J M., 2000.** Intérêt des complexes antioxydants .Centre d'étude et de développement de la nutrithérapie.
- **CRESPILHO DVM, ANDRE M , BETH E. SPIZZIRI , MINDY MEYERS, JAMES K. GRAHAM.,2012.** The effect of cholesterol addition, buffer, and pH on equine sperm stored at 5°C. *Journal of Equine Veterinary Science* ,p 1-4.
- **DAAR A H, ZEIDAN A S B., 2008.** Motility and acrosomal integrity of frozen rabbit sperm spermatozoa as affected by different extenders, cryoprotectants and packaging methods. 9th World Rabbit Congress – June 10-13 – Verona – Italy. 9th World Rabbit Congress – June 10-13, 2008 – Verona – Italy.
- **DILLARD , COLL ., 1978.** Effets of exercise , vitamine E , and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation , *J Appl physiol* 45 ,p927- 932 .
- **DOMINIQUE, BOUSSIT., 1989.** Reproduction et insémination artificielle en cuniculture .p17-41..
- **DEL VECCHIO M T, DAL BOSCO A., 2012.** Secretion patterns and effect of prostate-derived granules on the sperm acrosome reaction of rabbit buck. *Theriogenology* 78 ,p 715–723.
- **ELISABETHE BLESBOIS, FRONCOI DUBOS, ISABELLE GRASSEAU, MARIE-MADELEINE RICHAIR, YANNICK ROMAN.,2006.** Recherche d'indicateurs

## Références bibliographiques

---

d'aptitude à la congélation de la semence chez les oiseaux et mise au point de la cryopréservation du sperme de jars landais (6), p415-431.

- **F**LANDRIERE., 2007. Le système reproducteur male. consulté (le [http //www.cuniculture.info](http://www.cuniculture.info)).
- **FLEURY G., 2005.** Des polyrotaxanes de haute masse moléculaire au réseau topologique : les gels à points de réticulation glissants. These de doctorat. Université pasteur-Strasbourg I.
- **FROMAN D P, KIRBY., 2005.** Sperm mobility: phenotype in rooster (*Gallus Domestique*) determined by mitochondrial functions. *Biology of reproduction* 72, p 562567.
  
- **G**OGOL P, SZKA A, HILCZIR W., 2009. Membrane integrity, energy status and motility of rabbit spermatozoa stored for 2 days at 15°C. *Ann. Anim. Sci.*, (9), No. 1 , p 43 – 49.
- **GRESPIELHO M, ANDRE M, BETH E. 2012.** The effect of cholesterol addition , Buffer and pH on equine sperm stored at 5°C. *Journal of Equine Veterinary*, p1-4.
- **GRAHAM JK, MOCE E., 2005.** Fertility evaluation of frozen/thawed semen *Theriogenology* 64 , p 492–504.
- **GRIEND LING K , SORESCU S, LASSEGUE B , USHIO-FUKAI M 2000 .** Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their rôle in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler. Throb Vasc .Biol* 20, p 2175 -2185.
  
- **H**ALLIWER B., 1999 : Antioxydant defence mechanism : from the beginning to the end (of the beginning). *Free radic – rec* 31, p 261 -272.
- **HANG , COLLE ., 2004 .** Effet of vitamine E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin – induced diabetic rats-clin *Acta* 340 ,p 248 -258 .
- **HEDGES AR., 1998.** Industrial application of cyclodextrine. *chem review*, (5) , 54-AUG, p2035-2044.
- **HOLT, LOOK V., 2004.** Concepts in sperm heterogeneity, semi selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction* .27(5), p 527-535.

## Références bibliographiques

---

- **HSEICH YY, SUN YL, CHANG CC, LEE YS. TSAI HD, LIN CS., 2002.** Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. *J clin Lab Anal* 16: 31-127.
- **JIRAQI M M,RADWAN A A,GADOM S, EL-SAYAD A I ,ELOKIL A A,2012.**Evaluation of semen characteristics in a project of synthesizing new line of rabbits in Egypt. Benha University ,Moshtohor and Hurghada Egypt,p18-22.
- **JACQUET R ., 2006 :** Cyclodextrine hydrophiles : caractérisation et étude de leurs propriétés énantiométriques et complexant. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse. These de doctorat .l'université d'orleans.( 14),p 23-27.
- **JOLY T et THEAU CM., 2000 :** Reproduction et physiologie de la reproduction au 7ème Congrès Mondial de cyniculture, ISRA-FESIA ,31 place Bellecour -69288 Lyon.
- **JUAN M, BLANCO, JULIE A, LONG, GEORGE GEE, DAVID E, WILDT, ANN DONOGHUE M., 2012:** Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Effects of freezing and thawing rates on turkey and sand hill crane sperm cryosurvival. *Review*, (131), P 1-8.
- **KANNAKA DURGA DEVI N, PRAMEELA RANI A, MUNEER JAVED M, SAI KUMAR K,KAUSHIK J,SOWJAYA V., 2010 .** Cyclodextrins in pharmacy -an overview. *Pharmacophore* .1(3),p155-165 .
- **KIRSHVINK V, MOFFANTS B, LEKEUX P ., 2008 .**The oxidant /antioxydant equilibrium in horse.The veterinary journal. (177) ,p78-191.
- **KHAM A, FORGO P, STINE K, D'SOUZA V ., 1998 .** Méthodes for selective modification of cyclodextrines, *Chem Rev*,(5), p1977-1996 .
- **LAFFALDANO N, DILORIO M, Pina Rosato M., 2012.** The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: Dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide. *Theriogenology* (78) , p 1381-1389 .

## Références bibliographiques

---

- **LEBAS F, 2010** .Intérêt de l'insémination artificielle pour les artificielles pour l'élevage en Algérie .Atelier de travail sur la réaction d'une souche synthétique, Baba Ali (Algérie) 14-15.
- **LEBAS F, COUDERT P, ROCHAMBEAU H et THEBAULT RG., 1996** . Le lapin : Elevage et pathologie .Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculteur Rome. P54-55.
- **MAEDA T, LIE E, NISHIDJIM K , TANAKA M, YAMAGOCHI S, MORIMOTO M WATANABE T, FANJ, KITAJIMA S., 2012**. Effect of the primary cooling rate on the motility and fertility of frozen-thawed rabbit spermatozoa. World Rabbit Sci., 20: 65 - 70doi:10.4995/wrs.2012.1080.WRSA,UPV, 2003.p65-67.
- **MALLEM L, KECK G, FRANCK. M, BOULAKOUD MS., 2007**. Effets du Manèbe sur la thyroïde et la fertilité du lapin. Revue Méd. Vêt, **158**, 8-9, P 452-45.
- **MARCOPOULUS C., 2011**. Insertion de cyclodextrine amphiphiles dans des membranes lipidique .These de doctorat .Université Brasbourg . p 62-64..
- **MANETTE ., 1999** : Chemistry and biology of DNA damage by malondial dehyde. I ARC sci PUBI : 17- 27.
- **MARTIN DEL VAL E M., 2003** . Cyclodextrins and their uses : A review. Departement of chemicak engineering. University of Salamanca. Process Biochemistry , 39,p1033-1046.
- **MINISTERE DE L'ECONOMIE RURALE, BULLETIN TECHNIQUE 2009**(Polynésie française) .L'élevage du lapin en Polynésie française.
- **MOCE E, GRASSEAU I, BLESBOIS E., 2010**.Cryoprotectant and freezing process alther the ability of chicken sperm to acrosome reaction, p359-366.
- **MOCE E, JOSES, VICENT ., 2009**. Rabbit sperm cryopreservation: A review. Animal Reproduction Science.( 110) .P 1-24.
- **MOCE E .VICENT J S, LAVARA R., 2003**.Effect of freezing –thawing protocol on the perfomence of semen from three rabbits lines after artificial insemination .( 60) ,p115-123.
- **MOMAIR A A ., 2008** . Cyclodextrine in pharmaceuticals : An overview,13-175.
- **MOUTARD S., 2003**. Relation entre la structure et les propriétés d'organisation de nouvelles cyclodextrine amphiphiles. Thèse de doctorat. Université de Picardie jules verne.

## Références bibliographiques

---

- **NABI IBRAHIM, 2011-2012.** Etude des performances de reproduction chez les lapins locales de population blanche : contribution à l'essai de l'insémination artificielle dans un élevage rationnel (région de TIZI –OUZOU). Thèse de magistère.
- **NEUZIL J, GEBICKI JM, STACKER R .,1993 .** Radical-induced Chain oxydation of proteins and its inhibition by chain –breaking antioxydants, *biochem j*, 293, p601- 606.
- **NIZZA A, DIMEO C, TARANTO S., 2000: Effect** of lysine and methionine on libido and semen characteristics of backs. *World Rabbit Science*, 8(4), p181-184.
- **NYUS D, AND, M KELLY., 1991 :** Vitamine C and E donnâtes single hydrogen atoms in vivo. » *FEBS letters* 284 , (2) ,p 147- 151.
- **PARRISHE JJ et FOOT RH. 1986:** Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. Department of animal science Cornell University Itbaca, New York 14853,( 35),p253-257.
- **PAULE VASSEUR,JEAN-LUC MONTILLET ,2008.** Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. thèse du doctorat a L'université de TOULOUSE
- **PONS H, SION B,SAEY F, BRUGNON F,TONNY L . 2009 :** Rôles des dérivés actifs de l'oxygène(DAO) sur les spermatozoides humains et infertilité masculine . Quarantième journée thématique de la SFEF .(37) ,p 529- 535.
- **PRIGSHEIM H ., 1932 :** Chemistry of the saccharides, new york .p.280. Mc graw-hill  
Rhesus macaque (*Macaca mulatta*) sperm. *Theriogenology* 74 (2010), p 1431–1438.
- **ROSATO M P, DILORIO M, MANCHISI M, GAMBACORT. PETROSINO, CENTODUCATI G, SANTACROSEM P, IAFALDANO N., 2012:** In vitro survival and lipid peroxidation status of rabbit spermatozoa after both chilled and frozen storage in lycopene-enriched extenders. *Livestock Science* (146), p 199–202.
- **ROSATO M P, IAFALDANO N., 2012:** Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and Verification *Theriogenology* , p 1–9.
- **SABBAGH M., 1983.** «Etude de la sexualité et de la reproduction du lapin domestique *Oryctolagus cuniculus* à des températures, le comportement alimentaire et fonctionnement

## Références bibliographiques

---

- 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.
- **SAEANGER W., 1980.** Cyclodextrine inclusion compounds research and industry, *ANGEW .Chem-int. ED.Eng. (19)*,p344-362.
  - **SALAMATION L ., 2003 .** Les radicaux libres : une question d'équilibre. Université de varsaillles soint. Questionen Y velines. DESS IST.
  - **SALVETTI A, BAUDOT A, JOLY T., 2005:** Congélation de la semence de lapin: approche calorimétrique. 11èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris. p 91-92.
  - **SANOCHA D, MIESEL R, JEDRZEJCZAK P, CHELMONSKA-SOYTA AC, KURPISZ M., 1997.** Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxydant systems on human semen; association with male infertility. *Int J A ndrol ;vol (20)* ,p55-64.
  - **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.
  - **SJETLI J ., 1988 .**La technologie de cyclodextrine, vol 1. Springer, New York, « 978-90-277-2314 ».
  - **STADTMAN ., 1992 .** Oxydation of frée amino acids and amino acides residues un proteins by radiolysis and métal – catalyzed reaction: *annu rev biochem – vol (62)* ,p797 -821 .
  - **STADTMAN, LOVIS ., 2000.** Proteib oxidaton .*Ann NY Acad sci 899* :p 191 -208.
  - **STOCKER R , KEANEY T F ., 2004 .** Rôle of oxydative modification in atherosclerotic diseases *Circulation ,vol (114)*,p 2178-2189.
  - **SZENTE L, SZEJTLI J., 1999 .** Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties and, trends in development :*Advenced Dryg delivery reviews ,vol(36)*,p17-28.
  - ***T*HEAU-CLEMENT M., 2001 .** Etude de quelques facteurs de contrôle de l'interaction entre la lactation et la reproduction chez la lapine conduite en inséminationartificielle. Thèse doctorale en « Sciencesagronomiques ». Institut National Polytechnique de Toulouse.
  - **THEAU C M, SANCHEZ A, DUZERT R , BRUN M J.,2009 .**Etude de facteur de variation de la production spermatique chez le lapin ,13<sup>ème</sup> journé de larecherche cunicule ,17-18 ,le Mans ,France .

## Références bibliographiques

---

- **TOUSSAINT B, 2007, 2008.** Biochimie :Chapitre 6 « Oxygène et stress oxydant ». Faculté de médecine de grenoble .
- **TREMELLEN K ., 2008** Oxydative stress and male infertilité-a clinical perspective.Hum Reprod Update (14), p243- 58.
- **UEKAMA K, HIRAYAMA F, IRIE T.,1998** .Cyclodextrine drug carrier systems.Chem Rev ;98 :2045- 2076. Doi : 10 .1021/cr970025.
- **UEKAMA K, IRIE T, SUNADA M, OTAGIRI M, ARIMATSU Y ., 1982** . Alleviation of porchlorperazine-induced primary pharm irritation of skin by cyclodextrine complexation.Chem pharm .bull (30),p 3860-3862.
- **VAN ETHEER., (2003-2012):** www.Appareil Uro-génitale du lapin . Com.Appareil reproducteur male et orchidectomie.Midi rabbit.
- **WATSON P F., 2000** .The causes of reduced fertility with cryopreserved. Animal Reproduction Science 60–61.P 481–492.
- **WEI SI, THOMAS B. HILDEBRANDT, CATHER REID, RONALDKRIEG, WEIZHI JI, MIRJA FASSBENDER, ROBERT HERMES., 2006.** The successful double cryopreservation of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen in large volume using the direction freezing technique withreduced concentration of cryoprotectant. Theriogenology( 65) .p 788–798.
- **WEI SI, YONGQING LU ,XIECHAO HEA, SHAOHUI JIA, YUYU NIU, TAO TAN,WAIZHI JI .,2010.** Directional freezing as an alternative method for cryopreserving. Rhesus macaque (*Macaca mulatta*) sperm. Theriogenology( 74), p 1431–1438.

# Annexes

---

## Annexes

**Annexe n°1** : Echelle utilisé pour déterminer la MM d'après PETITJEAN H, 1965.

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

**Annexe n°2** : Echelle utilisé pour déterminer la MI d'après ADRIEU., 1974.

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

---

## Annexes

---

---

**Annexe n°3** : Table des marges d'erreur de entre les comptages des deux grilles d'hémocytomètre « Who semen manual » « 1999 ».

SUM	VALUE	SUM	VALUE	SUM	VALUE
969-1000	61	376-395			15
938-968	60	357-375	38	59-66	14
907-937	59	338-356	37	5258	13
876-906	58	319-337	36	4451	12
846-875	57	301-318	35	3843	11
817-845	56	284-300	34	3237	10
788-816	55	267-283	33	2731	9
760-787	54	251-266	32	2226	8
732-759	53	235-250	31	1721	7
704-731	52	219-234	30	1316	6
678-703	51	206-218	29	1012	5
651-677	50	190-205	28	79	4
625-650	49	176-189	27	56	3
600-624	48	163-175	26	34	2
576-599	47	150-162	25	2	1
551-575	46	138-149	24	1	0
528-550	45	126-137	23	0	
504-527	44	115-125	22		
482-503	43	105-114	21		
460-481	42	94-104	20		
438-459	41	85-93	19		
417-437	40	76-84	18		
396-416	39	67-75	17		
			16		

## **Résumé**

L'objectif de notre travail a été d'améliorer la conservation du sperme du lapin, à température ambiante, à 4°C et par la congélation, en luttant contre une des causes majeures de l'altération cellulaire, à savoir le stress oxydatif. Nous avons opté pour une approche qui consiste à utiliser deux molécules complémentaires, le cholestérol pour renforcer la solidité de la membrane cytoplasmique, et la vitamine E connue comme puissant antioxydant. Comme ces molécules sont lipophiles, avec donc une solubilité limitée dans les milieux de conservation, qui eux sont de nature hydrophiles, nous avons complexé ces deux molécules avec des cyclodextrines. Ces dernières présentent une cavité lipophile pour piéger le cholestérol et la vitamine E, et une périphérie hydrosoluble. Les résultats montrent indépendamment de la méthode de conservation, une meilleure préservation des paramètres de mobilité quand les trois facteurs, cholestérol, Vitamine E et cyclodextrines sont associés.

**Mots clés : Sperme du lapin, Congélation, Mobilité, CD, VIT E, Cholestérol, Stress oxydative.**

# **Introduction**

# **Partie bibliographique**

**Chapitre I**  
**Cyclodextrine**

## **Chapitre II**

# **Sperme du lapin**

## **Chapitre III**

# **Le Stress oxydative**

# **Chapitre IV**

## **Congélation du sperme**

# **Partie Expérimentale**

# **Matériels et méthodes**

## **Résultats et Discussion**

## **Conclusion générale**

## **Référence bibliographique**