

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université A. MIRA - Bejaia**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Biologiques de l'Environnement Spécialité  
: Biologie Animale



Réf : .....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

**Thème**

**Etude de la qualité du sperme  
épididymaire chez le lapin**

Présenté par :

MAOUCHI Aya      &      KHELLADI Sara

Soutenu le : 02/07/2025

Devant le jury composé de :

<b>Mr :</b> IGUER OUADA Mokrane	Professeur	président
<b>Mme :</b> TALBI Asmaa	MCB	encadrante
<b>Mme :</b> KEBBI Malaaz	MCB	examinatrice

**Année Universitaire : 2024/2025**

## ***Remerciements***

Tout d'abord, **Al Hamdoulillah**, nous adressons notre profonde reconnaissance à Dieu, qui nous a accordé la sante, la force, la patience et la volonté pour L'accomplissement de ce travail.

Nous exprimons ensuite nos sincères remerciements à notre chère promotrice, **Mme AMOKRANE / TALBI A.**, pour sa disponibilité, sa bienveillance, sa douceur, ainsi que pour ses conseils avisés et son accompagnement tout au long de ce travail. Sa présence constante, son écoute et ses encouragements ont grandement contribué à la bonne réalisation de ce mémoire.

Nous tenons également à remercier les membres du jury :

**Mr IGUEROUADA A.**, pour avoir accepté de présider ce jury, et **Mme KEBBI M.**, pour avoir pris le temps d'examiner ce travail avec attention et bienveillance.

Nos remerciements vont également à toute l'équipe du **Laboratoire Associé en Écosystèmes Marins et Aquacoles de la Faculté SNV**, pour leur accueil, leur soutien et leur précieuse assistance durant les travaux pratiques.

Enfin, nous remercions chaleureusement toutes les personnes, proches ou moins

Proches, qui nous ont soutenus de près ou de loin dans la réalisation de ce mémoire.

**Merci à tous.**



## Dédicaces

Je dédie ce travail a :

**Ma maman**, pour son amour inconditionnel, sa patience infinie et ses prières silencieuses. Tu as été ma force, mon refuge, mon repère. Merci d'avoir toujours été là, la merveilleuse des mamans. Je t'aime.

**Mes grands-parents**, Pour leur tendresse, leur force tranquille et tout ce qu'ils m'ont transmis avec le cœur.

Mes frères, **Sidali** et **Malik**, mes sœurs **Racia** , **Mihed** pour leur soutien silencieux, et tous ces moments simples mais précieux qui ont compté plus qu'ils ne l'imaginent.

Mon oncle **Imad**, pour sa présence discrète mais précieuse, et pour tous ces petits gestes qui m'ont fait du bien.

Une personne précieuse, Pour sa bienveillance, son écoute, et cette manière de rassurer sans jamais en faire trop. Merci du fond du cœur, **Dr Lechkhem**.

**Sara**, ma binôme, Merci d'avoir été là, dans les moments de stress comme dans les petits fous rires. Ta gentillesse et ton soutien ont rendu ce travail plus léger ma chérie.

Mes chers amis **Ryma**, **Abderrahmane**, Pour les sourires, l'entraide et les petits moments partagés qui ont rendu cette année plus douce.

Et à toutes celles et ceux qui, de près ou de loin, ont été là par un mot, un geste,

Une pensée ou un regard... Merci du fond du cœur.

**AYA**

## *Dédicaces*

A ma merveilleuse **Maman**, La prunelle de mes yeux, ma source de bonheur. Ton amour, ton courage et tes prières sont guidée mon chemin.

A mon très cher **Père**, mon héros, exemple de force et de sagesse. Merci pour ton amour inconditionnel, ton soutien et tes précieux conseils.

A mon cher grand frère **NOUREDDINE**, mon pilier, qui a su jouer le rôle d'un père quand il le fallait, merci pour ton sens de responsabilité et ton soutien tout au long de mes études. Ce travail porte ton empreinte.

A mon cher petit frère **NADJIM**, Mon complice de toujours, mon épaule. Merci pour ton amour et ta façon unique d'être avec moi sans jamais poser de questions.

A ma chère sœur **WARDA**, pour ton soutien et tes conseils durant tout mon parcours scolaire.

A tous mes chers cousins et cousines, Ainsi mes chères nièces et neveux chaqu'un pour son intérêt. En particulièrement **SIHAM** et sa maman **KAHINA**.

A toutes mes très chères tantes.

A ma binôme adorable **AYA**, entre les défis et les fous rires on a tout traverser ensemble, merci pour ton soutien et ta patience et ces moments agréables rester gravés dans ma mémoire.

A ma chère **NOURA**, une autre sœur que la vie m'a offerte. Merci pour ta présence rassurante, ton amour vrai et tous les moments partagés.

A ma chère **SALOUA**, une source d'encouragement tout au long de ce mémoire merci d'être cru en moi.

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

**SARA**

## Liste des abréviations

**%** : pourcentage

**°C** : Celsius

**μl** : microlitre

**μm** : micromètre

**ABTS** : Acide 2,2'-bis (3 - éthylbenzothiazoline - 6-sulfonique)

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AGPI** : Acides gras polyinsaturés

**ARN** : Acide Ribonucléique

**AG** : Acides gras

**CASA** : Computer Assisted Sperm Analyzer

**CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

**Cm** : Centimètre.

**DMSO** : diméthylsulfoxyde

**ERO** : espèces réactives de l'oxygène

**FSH** : Follicle Stimulating Hormone

**GnRh** : Gonadotropin-Releasing Hormone

**g** : gramme

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxide d'hydrogène

**HOST** : Test hypo-osmotique.

**h** : heure

**Kg** : Kilogrammes

**KDa** : kilodalton

**LH** : Luteinizing hormone

**LPO** : Peroxides Lipidiques

**mm** : millimètres

**min** : minutes.

**mg** : milligramme

**MVB** : Multivesicular Body

**NAD** : nicotinamide Adénine Dinucléotide

**NaCl** : chlorure de sodium

**OH** : hydroxyde.

**OMS** : organisation mondiale de la santé

**PEG** : polyéthylène glycol

**PH** : potentiel hydrogène

**ROS** : reactive oxygen species

**SOD** : superoxyde dismutase

**SPZ** : Spermatozoïde

**Tris** : trisaminométhane ( 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol)

**Tr** : tours

**UV** : ultra-violet

**VA** : vagin artificielle

**VitE** : Vitamine E .

## Liste des figures

Numéro	Titre	page
01	appareil reproducteur du lapin male	3
02	schéma du testicule et des voies spermatiques	4
03	la spermatogénèse	5
04	structure de spermatozoïde	7
05	Représentation schématique du testicule et des voies spermatiques	8
06	testicule et épидидyme du lapin	9
07	Représentation schématique de l'épithélium épидидymaire	9
08	Modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique.	19
09	spermatozoïde complet de lapin	20
10	Classification des différentes anomalies spermatiques	20
11	Évaluation des paramètres cinétiques des spermatozoïdes basés sur CASA montrant différentes trajectoires de mouvement (VSL, ligne droite de vitesse ; VCL, vitesse curvilinéaire ; BCF, fréquence croisée des battements ; VAP, trajectoire moyenne de vitesse ; ALH, amplitude du déplacement latéral de la tête)	22
12	Les différentes cibles des Espèces Réactives	30
13	lapins utilisés dans l'étude	32
14	Matériel nécessaire pour la préparation du tampon tris	33
15	agitation de la solution du tampon tris	34
16	mesure de la vitamineE	35
17	préparation de solution du PEG	36
18	le rotavapeur	37
19	résidu du complexe PEG/vitE	37
20	solution PEG/VitE-Tris	38
21	gonades réfrigérées à 4°C	40
22	les étapes de la récolte du sperme épидидymaire	41

23	le système CASA	42
24	cellule de Makler	42
25	Observation d'une goutte de sperme dilué sur une cellule de Makler	43
26	la solution hypo-osmotique	44
27	observation microscopique des spermatozoïdes contournés et non contournés après test hypo-osmotique au Gr. x20.	45
28	broyat de la queue épидидymaire	46
29	La centrifugation	46
30	mesure de l'activité antioxydante par spectrophotométrie	47
31	Diagramme en bâtons représentant la VSL des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C sans milieux de conservation	48
32	Diagramme en bâtons représentant la mobilité totale des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C sans milieux de conservation	49
33	Diagramme en bâtons représentant la mobilité progressive des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées sans milieux de conservation à 4°C.	49
34	Diagramme en bâtons représentant la VSL des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C, avec milieux de conservation.	51
35	Diagramme en bâtons représentant la mobilité totale des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C, avec milieux de conservation	52
36	Diagramme en bâtons représentant la mobilité progressive des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C avec milieux de conservation	53
37	Diagramme en bâtons représentant le pourcentage des spermatozoïdes vivants et morts prélevés des gonades réfrigérées sans milieux de conservation à 4°C	55
38	Diagramme en bâtons représentant le pourcentage des spermatozoïdes vivants et morts prélevés des gonades réfrigérées avec milieux de conservation à 4°C.	56

39	Diagramme en bâtons représentant le pourcentage d'inhibition de l'ABTS dans les spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées avec milieux de conservation à 4°C.	58
----	---	----

### Liste des tableaux

<b>Numéro</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Détermination de la note de motilité massale de la semence	17
<b>II</b>	détermination de la note de motilité individuelle des spermatozoïdes	17
<b>III</b>	Composants et propriétés adéquates du tampon Tris pour le lapin	24

## Sommaire

Remerciements.....	
Liste des abréviations.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Introduction.....	1

### Partie bibliographique

#### Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil génitale mâle du lapin

I.1. Les Testicules .....	3
I.1.1. Anatomie... ..	3
I.1.2. Physiologie .....	4
I.1.2.1. Fonction endocrine .....	4
I.1.2.2. Fonction exocrine (spermatogénèse)... ..	4
I.2. Le sperme du lapin... ..	6
I.2.1. Composition... ..	6
I.2.2. Caractéristiques... ..	7
I.3. L'épididyme .....	8
I.3.1. Anatomie... ..	8
I.3.2. Physiologie .....	11
I.4. Les facteurs influençant la qualité du sperme .....	12
I.4.1. L'âge et la race .....	12
I.4.2. Etat de santé .....	13
I.4.3. L'alimentation .....	13
I.4.4. La lumière .....	13

## Chapitre II : La conservation du sperme du lapin

II.1. Techniques de récolte du sperme .....	14
II.1.1. Sperme éjaculé.....	14
II.1.1.1. Récolte par Vagin artificiel... ..	14
II.1.1.2. Récolte par électroéjaculation .....	14
II.1.2. Prélèvement du Sperme épидидymaire.....	14
II.1.2.1. La Méthode de flottation... ..	15
II.1.2.2. La méthode retrograde-flushing .....	15
II.2. Analyse du sperme .....	15
II.2.1. Examen macroscopique .....	15
II.2.1.1. Couleur.....	15
II.2.1.2. Volume.....	15
II.2.1.3. Viscosité.....	16
II.2.1.4. Ph... ..	16
II.2.2. Examen microscopique .....	16
II.2.2.1. Motilité.....	16
II.2.2.2. Concentration .....	18
II.2.2.3. Test de viabilité.....	18
II.2.2.4. Morphologie... ..	19
II.2.2.5. Système CASA... ..	20
II.3. Techniques de conservation... ..	22
II.3.1. Types de conservation... ..	22
II.3.1.1. La conservation à long terme .....	22
II.3.1.2. La conservation à court terme.....	23

II.3.1.2.1. La réfrigération du sperme .....	23
II.3.1.2.2. La réfrigération de la gonade .....	23
II.4. Milieux de conservation... ..	23
II.4.1. La dilution... ..	23
II.4.2. Composition... ..	24
II.4.2.1. Milieux nutritifs .....	24
II.4.2.2. Substances solubilisantes... ..	25
II.4.2.3. Antioxydants... ..	26
II.4.2.4. Cryoprotecteurs .....	27
II.4.2.5. Antibiotiques... ..	27
II.4.2.6. Stabilisateurs membranaires.....	27

### **Chapitre III : Stress oxydatif**

III.1. Définition .....	28
III.2. Origine de stress... ..	28
III.3. Système de défense Antioxydants... ..	28
III.3.1. Définition... ..	28
III.3.2. Types... ..	28
III.3.2.1. Antioxydants enzymatiques... ..	28
III.3.2.2. Antioxydants non enzymatiques... ..	29
III.4. Les différentes cibles des espèces réactives .....	30
III.5. Stress oxydatif et sperme .....	30
III.6. Mesure du stress oxydatif... ..	31

### **Partie Pratique**

#### **I. Matériels et méthodes**

I.1. L'animal...	32
I.2. Milieux de conservations...	32
I.2.1. Préparation du tampon tris...	32
I.2.2. Préparation du complexe(PEG/VitE)...	34
I.2.3. Préparation de la solution PEG/VitE– tris	37
I.3. La réfrigération de la gonade.....	39
1.5. Récolte de sperme épидидymaire	40
1.6. Analyse du sperme épидидymaire.....	41
I.6.1. Examen macroscopique.....	41
I.6.2. Examen microscopique (CASA).....	42
I.6.2.1. Évaluation des paramètres de Mobilité (CASA).....	42
I.6.2.2. Test de l'intégrité membranaire (HOST)	43
I.7. Mesure de Statut oxydatif.....	45

## **II. Résultats et discussion**

II.1. Paramètres de mobilité...	48
II.1.1. Paramètres de mobilité du sperme prélevé des gonades réfrigérées à 4°C, sans milieux de conservation...	48
II.1.1.1. VSL.....	48
II.1.1.2. Mobilité totale.....	48
II.1.1.3. Mobilité progressive	49
II.1.2. Paramètres de mobilité du sperme prélevé des gonades réfrigérées à 4°C avec milieux de conservation...	51
II.1.2.1. VSL.....	51
II.1.2.2. Mobilité totale.....	52
II.1.2.3. Mobilité progressive	53

II.2. Le test d'intégrité membranaire .....	54
II.2.1. Le test d'intégrité membranaire des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C sans milieux.....	54
II.2.2. Le test d'intégrité membranaire des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C dans des milieux différent... ..	55
II.3. Mesure de statut oxydatif... ..	57
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>59</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>60</b>
<b>Résumé</b>	

# **Partie Bibliographique**

# Introduction

En Algérie, l'élevage joue un rôle fondamental dans l'économie et la sécurité alimentaire, notamment dans les zones montagneuses où les systèmes extensifs d'ovins et de caprins sont majoritaires, mais sont confrontés à des contraintes de production, de disponibilité du fourrage et de santé animale (**Saidani et al., 2019**).

Le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) constitue une alternative intéressante, grâce à sa prolificité, sa petite taille, sa facilité d'élevage, et la qualité de sa viande. Sur le plan nutritionnel, la viande du lapin est particulièrement riche en protéines, pauvre en lipides et en cholestérol (<50 mg/100 g). Elle contient aussi des acides aminés essentiels, des acides gras insaturés, du fer assimilable et des vitamines, notamment la B12 (**Combes & Dalle Zotte, 2005**). Cette valeur nutritionnelle en fait une viande adaptée aux régimes santé et à la prévention des maladies cardiovasculaires.

Dans certaines situations, un mâle à intérêt génétique important peut mourir avant d'avoir été utilisé, que ce soit par maladie, accident ou vieillesse. Afin de ne pas perdre son patrimoine génétique, il serait utile de récupérer les spermatozoïdes présents dans les épидидymes, même après la mort de l'animal. La réfrigération des gonades entières à 4 °C constitue une méthode simple et intéressante afin de ralentir la dégradation cellulaire et de préserver la viabilité des spermatozoïdes. En effet, des études menées chez le bélier (**Lone et al., 2011**), le taureau et le cerf rouge (**Malcotti et al., 2012**) ont montré que la réfrigération post-mortem permettait de récupérer des spermatozoïdes encore viables après plusieurs heures (**Lone et al., 2011**) voire plusieurs jours (**Malcotti et al., 2012**). À notre connaissance, aucune étude n'a rapporté des informations concernant une telle étude chez le lapin, ce qui encourage l'application de cette technique chez cette espèce.

Cependant, le refroidissement à basse température, bien qu'il soit utile, entraîne un stress oxydatif dû à la production de radicaux libres (ROS), qui détériorent les membranes cellulaires, réduisent la motilité, et affectent la viabilité des spermatozoïdes (**Chatterjee & Gagnon, 2001**). Pour éviter ces effets, des antioxydants comme la vitamine E sont souvent utilisés. Grâce à ses propriétés protectrices contre la peroxydation lipidique, elle aide à maintenir l'intégrité membranaire (**Laghouati et al., 2023**). Néanmoins, sa faible solubilité dans l'eau limite son efficacité, raison pour laquelle son association à une molécule solubilisante est indispensable. Le polyéthylène glycol (PEG) est un solubilisant qui en l'associant à la vitamine E améliore sa diffusion et son action. Cette association réduit le stress oxydatif et améliore la motilité et la viabilité des spermatozoïdes après réfrigération (**Amokrane et al., 2020**).

Ainsi, nous avons choisi dans notre présent travail de réfrigérer à 4 °C, pendant 10 jours, des gonades entières de lapins sacrifiés, dans l'objectif d'évaluer les caractéristiques des spermatozoïdes prélevés dans la queue de l'épididyme et leurs évolutions ; ainsi que le rôle de l'association PEG/VitE dans la préservation des paramètres de leur motilité et intégrité membranaire et dans leur protection contre le stress oxydatif. Ce qui nous a amené à poser les questions suivantes : Comment la réfrigération à 4 °C des gonades entières influence-t-elle la qualité des spermatozoïdes épидидymaires du lapin ? et dans quelle mesure l'ajout de milieux enrichis, comme le Tris ou l'association PEG/VitE, permet-il de limiter les effets délétères du froid ?

Notre mémoire est structuré en deux grandes parties :

La première est dédiée à l'étude bibliographique, avec un premier chapitre consacré à l'anatomie et la physiologie de l'appareil génitale mâle du lapin, un deuxième, à la conservation du sperme, et un troisième au stress oxydatif. La deuxième partie est réservée à l'étude expérimentale, divisée en deux sections : matériel et méthodes utilisés dans notre expérimentation, puis résultats obtenus et leur discussion, et on termine à la fin par une conclusion.

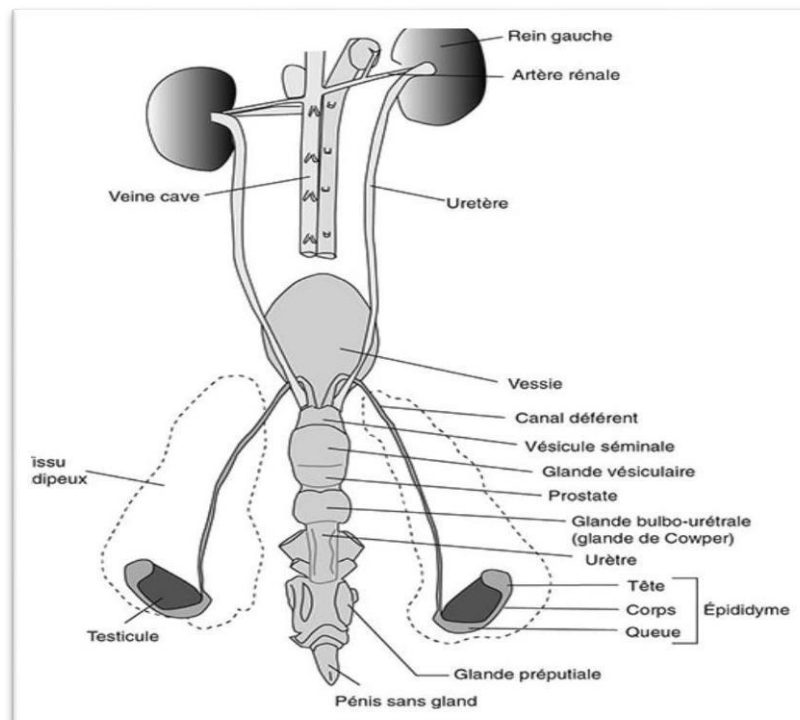
# **Chapitre I**

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

## I. Anatomie et physiologie de l'appareil génitale mâle du lapin :

Comme chez tous les mammifères, l'appareil génital mâle du lapin est composé de deux testicules (gonades), des voies spermatiques intra-testiculaires (tubes droits, rete testis) et extra-testiculaires (canaux efférents, canal épидidymaire, canal déférent et canal urogénital) et du pénis (**Poujardieu et al., 1995**) (**figure 1**). Mais avec des différences associées à la taille, au poids et à la structure des organes.

Les testicules du lapin sont capables de monter dans la cavité abdominale et redescendre dans les bourses grâce au crémaster (**Garreau et al., 2015**).

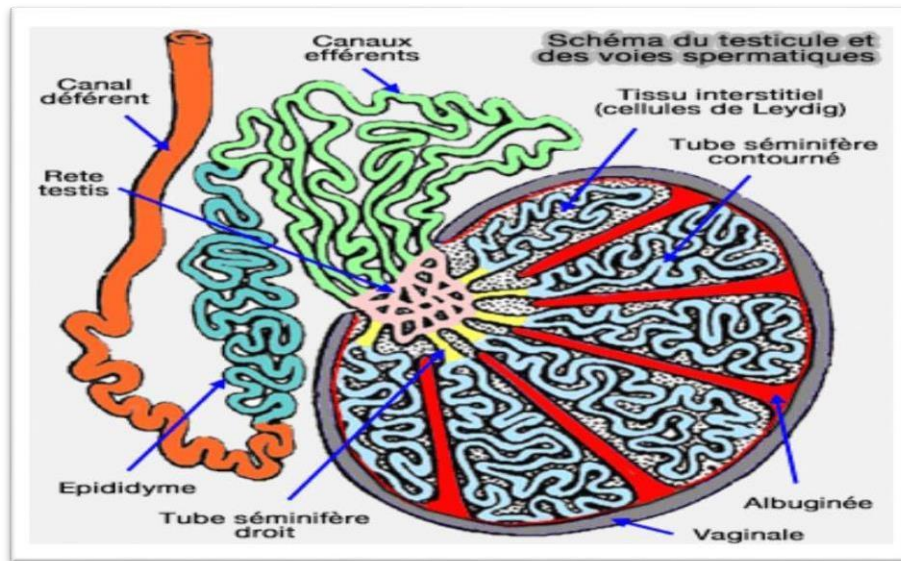


**Figure 1** : appareil reproducteur du lapin male (**Garreau et al., 2015**).

### I.1. Les Testicules

#### I.1.1. Anatomie :

Les testicules sont des organes paires d'une forme ovoïde non symétrique contenu dans le scrotum qu'ils rejoignent à l'âge de deux mois, Chaque testicule est entouré par l'albuginée, recouvert à l'extérieur par la tunique vaginale (**figure 2**) (**Thierry et al., 2015**).



**Figure 2** : schéma du testicule et des voies spermatiques ([www.vetopsy.fr](http://www.vetopsy.fr))

### I.1.2. Physiologie :

Les testicules assurent deux fonctions :

#### I.1.2.1. Fonction endocrine :

La sécrétion de l'hormone hypothalamique de libération des gonadotrophines (GnRH) stimule la production des hormones (LH) et (FSH) par l'hypophyse. La LH est transportée dans la circulation sanguine vers les testicules, où elle stimule les cellules de Leydig pour produire de la testostérone celle-ci peut agir comme un androgène ou aromatisée pour produire des œstrogènes. Les testicules, rétroagissent sur l'hypothalamus et l'hypophyse, une rétroaction négative par la sécrétion de testostérone et d'inhibine, pour limiter la production de GnRH et de gonadotrophine. Les androgènes et la FSH agissent les deux sur les récepteurs des cellules de Sertoli, pour stimuler diverses fonctions nécessaires à la spermatogénèse (O'donnell et al., 2017).

#### I.1.2.2. Fonction exocrine (La spermatogénèse) :

C'est le processus par lequel les spermatozoïdes sont formés à partir des cellules souches germinales (spermatogonies) (**figure 3**), elle commence à la puberté (vers 04 à 05 mois peu après la descente des testicules dans le scrotum) et se continue toute la vie. La spermatogénèse se déroule dans l'épithélium des tubes séminifères, en passant par trois phases (Bedossa, 1998).

**a- Phase mitotique :**

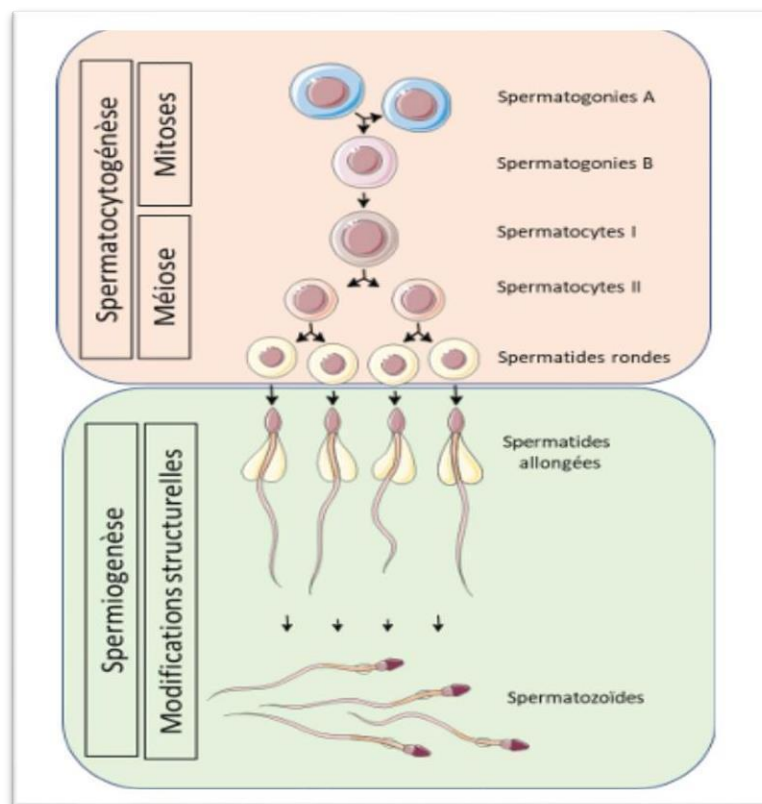
Les spermatogonies se divisent par mitose pour donner des spermatocytes primaires.

**b- Phase méiotique**

La méiose implique la duplication et l'échange de matériel génétique ainsi que deux divisions cellulaires qui réduisent le nombre de chromosomes et produisent quatre spermatides.

**c- La spermiogénèse :**

Les spermatides issues de la méiose subissent une série de différenciations morphologiques et fonctionnelles, telle que la formation de l'acrosome et du flagelle, qui leurs permet de se différencier en spermatozoïdes libérées dans la lumière des tubules séminifères après être détachés des cellules de sertoli (**Johnson, 1995**).



**Figure 3 : la spermatogénèse (Sellem, 2021).**

## I.2. Le sperme du lapin :

Le sperme est un mélange de spermatozoïdes en suspension dans un milieu liquide (**Boiti et al., 2005**).

### I.2.1. Composition :

Le sperme du lapin se compose de deux parties principales : une partie gélatineuse et une partie fluide. Après l'éjaculation, la partie gélatineuse remplit la lumière du vagin et forme un bouchon copulatoire (**Mukherjee et al., 1951**).

La partie fluide est composée de spermatozoïdes, produits dans le testicule, et du plasma séminal composé des sécrétions de l'épididyme et des glandes annexes, le mélange se produisant pendant l'éjaculation. Le plasma séminal fournit notamment des substrats énergétiques aux spermatozoïdes (**Fortun-Lamothe et al., 2015**).

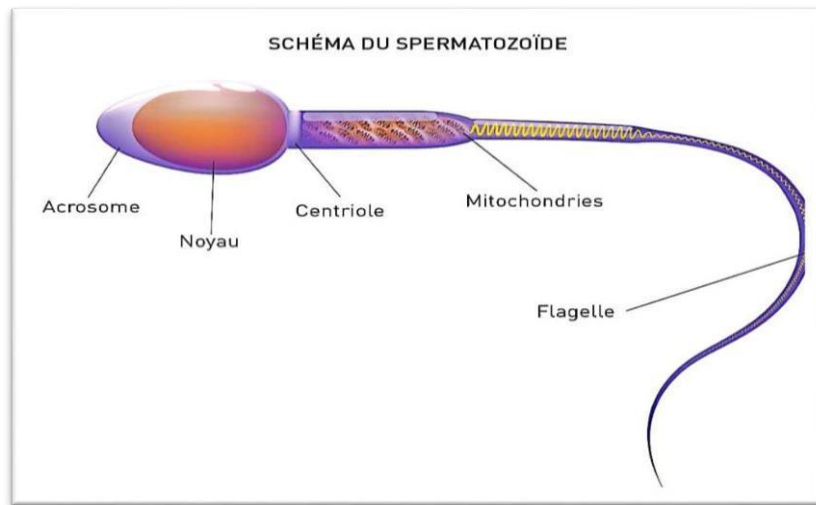
Le sperme du lapin contient des granules pas homogènes constituées de différentes populations de vésicules. Elles présentent des tailles variées (diamètre de 0,5 à 6 µm) et sont généralement entourés d'une membrane bilaminaire contenant une matière dense peu organisée au microscope électronique. Il a été supposé que ces particules moduleraient le processus de capacitation et la réaction acrosomique des spermatozoïdes par la libération de cholestérol (**Castellini, 2008**).

#### I.2.1.1. Spermatozoïdes :

Les spermatozoïdes (**Figure4**) sont des cellules uniques, produites par la spermatogenèse (**Bertolla, 2020**). Ils sont hautement différenciés pour s'adapter à la fusion avec l'ovocyte (**Auger et Eustache, 2000**).

Le spermatozoïde du lapin mesure entre 55 et 57 microns avec une tête de 6,5 à 9 microns une pièce intermédiaire de 9 microns et une queue de 39 microns (**Espinosa et al., 2009**).

- a- **La tête** : Elle est ovoïde, comprend le noyau contenant les chromosomes et l'acrosome.
- b- **La pièce intermédiaire** : Elle est le siège de la production énergétique nécessaire au mouvement. Elle contient la gaine mitochondriale, l'essentiel des mitochondries de la cellule.
- c- **Le flagelle** : Il représente l'organe moteur responsable du déplacement (**Baril et al., 1993**).



**Figure 4 :** structure de spermatozoïde (Sousa, 2025)

#### **I.2.1.2. Plasma séminale :**

C'est un milieu fluide composé de sécrétions des épидидymes et des glandes sexuelles accessoires. Le plasma séminal contient un groupe varié de protéines qui participent à la protection, à la maturation et capacitation des spermatozoïdes, à la réaction acrosomique, et à la fécondation (**Bazerra et al., 2019**).

Le plasma séminal du lapin présente une glycoprotéine d'origine épидidymaire qui inhibe de manière réversible le processus de capacitation des spermatozoïdes. Ainsi que des gouttelettes et des vésicules de taille similaire à celle des spermatozoïdes (**Mocé et Vicente, 2009**).

#### **I.2.1.3. Gel :**

Le gel provient des glandes vésiculaires, sa sécrétion dépend des androgènes. Il est composé d'une quantité importante de substances ostrogéniques, en plus de certains constituants séminaux tels que l'acide citrique et une petite quantité de fructose (**Campos et al., 2012**).

### **I.2.2. Caractéristiques du sperme du lapin :**

#### **I.2.2.1. Couleur :**

La couleur de sperme de lapin est blanche, varie du blanc crémeux au blanc aqueux (**Meyer, 2009**).

#### **I.2.2.2. Volume et concentration :**

Contrairement à d'autres espèces domestiques, le sperme du lapin se caractérise par un faible volume et une faible concentration en spermatozoïdes (entre 0,4 et 0,5 ml et entre 150 et

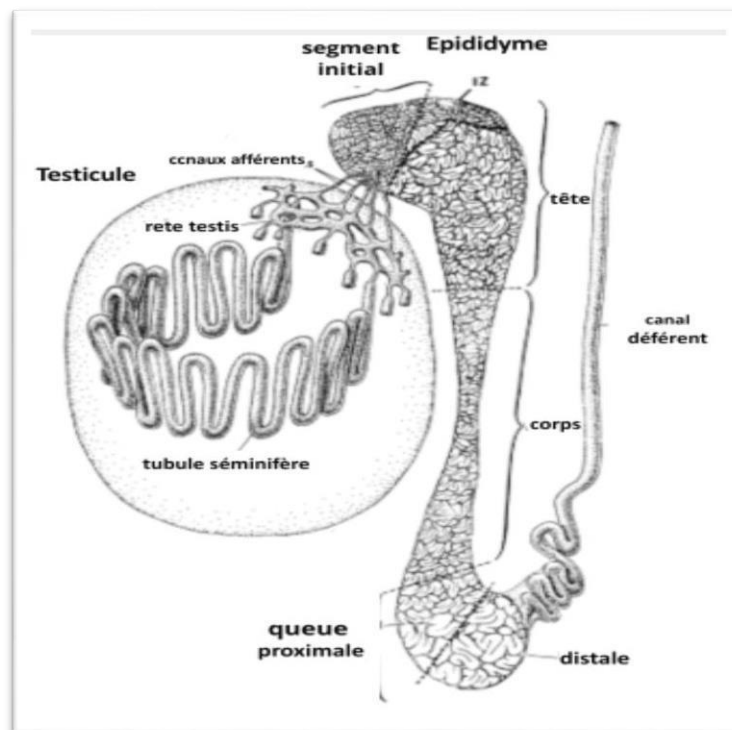
500×10<sup>6</sup> spermatozoïdes/ml), Ces caractéristiques dépendent également de la race ou de la lignée génétique (Mocé et Vicente, 2009).

### I.3. Épididyme :

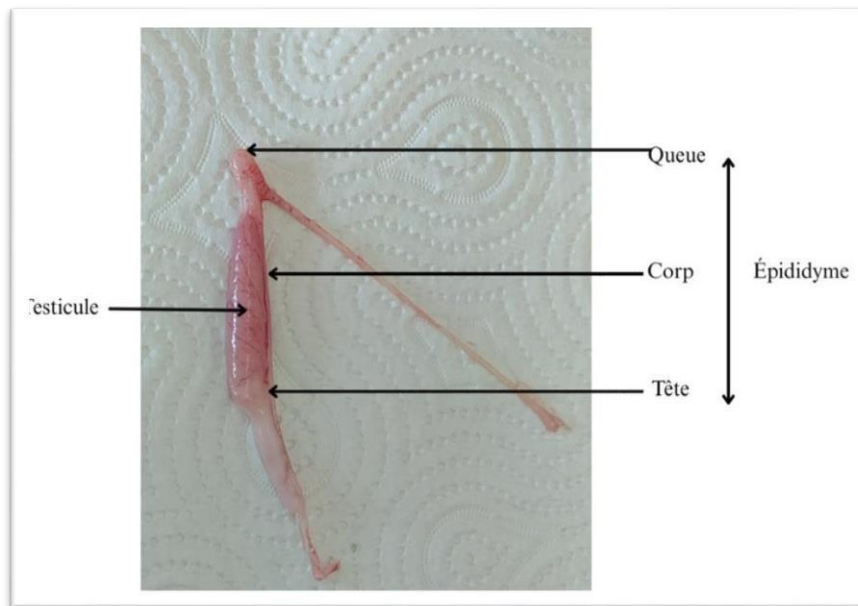
#### I.3.1. Anatomie :

C'est un organe allongé, collé au testicule, il reçoit de l'extrémité capitée de cette glande les canalicules efférents et se continue à son extrémité opposée par le conduit déférent, l'épididyme tend à contourner le testicule qu'il déborde par ses deux extrémités lesquelles sont plus volumineuses que la partie intermédiaire (Barone, 1976).

L'épididyme est nettement divisé en une tête, un corps et une queue (figure 5). La tête, enveloppée dans une grosse pelote adipeuse qui atteint presque la taille du testicule, est appliquée contre le pôle crânial de celui-ci. Le corps très mince forme un cordon qui se porte vers l'extrémité postérieure du testicule que vient coiffer la queue de l'épididyme. De cette région, se détache le canal déférent (Hegelen et Thiriet, 2012).



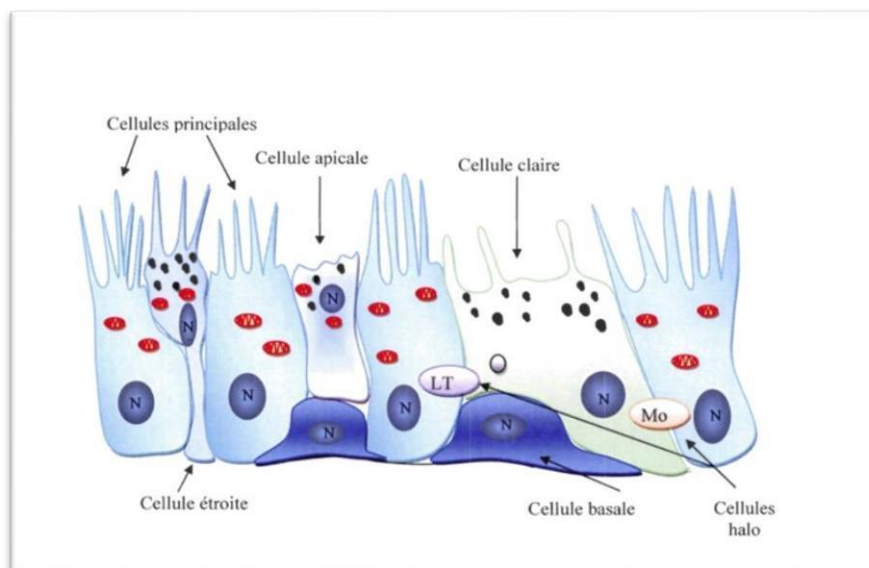
**Figure 5 :** Représentation schématique du testicule et des voies spermatiques (Robaire et al., 2006).



**Figure 6 : testicule et épididyme du lapin (photo personnelle)**

### I.3.1.1. L'épithélium :

L'épithélium de l'épididyme est pseudostratifié de type cylindrique, entouré de cellules musculaires lisses appelées cellules myoïdes (**figure 7**), il est composé de plusieurs types cellulaires : dont la distribution dépend de la région épидидymaire (**Mandon, 2015**).



**Figure 7 : Représentation schématique de l'épithélium épидидymaire (Girouard, 2009).**

**a- Les cellules principales :**

C'est le principal type de cellules épидидymaires de tous les mammifères, représentent environ 65 à 80 % de la population cellulaire épithéliale totale de l'épididyme et apparaissent tout au long du conduit mais présentent des différences structurelles entre les différents segments. Elles sont caractérisées par un appareil sécrétoire et endocytaire fortement développée ainsi qu'un noyau basal. Les cellules principales synthétisent un grand nombre de protéines qui jouent un rôle actif dans l'endocytose (**Robaire et Hinton., 2015**).

**b- Cellules claires :**

Ce sont des cellules prismatiques localisées principalement au niveau du segment intermédiaire et de la queue de l'épididyme (**Sorazo et al., 1982**).

Elles possèdent, dans leur région apicale, de nombreuses vésicules pâle, de tailles variées ; des lysosomes dans leur région médiane et des quantités variables de gouttelettes lipidiques près de leur base. Cette distribution des organites aurait une relation avec le rôle des cellules claires dans l'élimination des substances provenant de la lumière (**Robaire et Viger, 1995**).

**c- Cellules basales :**

Ce sont de petites cellules en forme de dôme, n'atteignant pas la lumière et sont présentes dans l'ensemble de l'épididyme et du canal déférent. Ces cellules possèdent un appareil endocytaire avec des puits recouverts, visibles sur leur membrane plasmique basale, ainsi que quelques endosomes, corps multivésiculaires (MVB) et lysosomes secondaires (**Hermo et al., 1994**).

Selon (**Veri et al., 1993**) ces cellules pourraient être impliquées dans la protection de l'épithélium épидидymaire contre l'attaque électrophile.

**d- Cellules apicales :**

Ces cellules sont similaires chez tous les mammifères étudiées. Ce sont des cellules rares (1 à 5 cellules/100 cellules principales) se trouvant principalement dans les segments initiaux de l'épididyme. Elles se caractérisent par leur richesse en mitochondries et leur cytoplasme adluminal présente quelques microvillosités courtes et contient de nombreuses vésicules positives à la phosphatase acide.

Leur fonction est encore inconnue, mais on suppose qu'elles sont impliquées dans : la sécrétion holocrine , la réabsorption épидидymaire du liquide testiculaire , et l'acidification du liquide épидидymaire (**Martinez-Garcia et al., 1995**).

**e- Cellules en halos :**

Elles ressemblent à des leucocytes, caractérisés par un petit noyau dense, entouré d'un cytoplasme très pâle pauvre en organites (**Hoffer et al., 1973**).

Ce type cellulaire se trouve dans tous les niveaux de l'épithélium de l'épididyme (**Flickinger et al., 1997**).

**f- Cellules étroites :**

Elles sont présentes uniquement dans le segment initial et la zone intermédiaire. Elles se caractérisent par une forme allongée et fine, avec un noyau apical, allongé. Elles présentent un fin prolongement cytoplasmique s'étendant jusqu'à la membrane basale (**Hermo et al., 2000**).

Ces cellules pourraient jouer un rôle dans le transport de fluides et/ou d'électrolytes dans la région proximale de l'épididyme (**Adamali et Hermo, 2000**).

**g- Cellules dendritiques :**

Les cellules dendritiques sont Localisés à la base de l'épithélium épидидymaire avec lequel elles établissent des interactions étroites et projettent de longues dendrites entre les cellules épithéliales vers la lumière (**Da Silva et al., 2011**).

Elles sont capables, sous leur forme immature, de capturer et d'apprêter les antigènes puis d'exprimer à leur surface un taux élevé de complexes CMH/peptides. Ensuite, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, sous une forme mature, elles initient la réponse immunitaire adaptative contre l'antigène qu'elles ont capturés (**Fernandez et al., 1999**).

**I.3.2. Physiologie :**

La première fonction de l'épididyme est de transporter les spermatozoïdes du testicule (après avoir traversé le rête testis et les canaux efférents) vers le canal déférent. Il assure aussi le développement de leur pouvoir fécondant, l'acquisition de la motilité et la création d'un milieu luminal spécialisé favorisant le processus de maturation par les activités absorbants et sécrétoires de l'épithélium épидидymaire (**Robaire et Hinton, 2015**).

**I.3.2.1. La maturation des spermatozoïdes :**

Un processus essentiel à la fertilité masculine normale, qui se produit pendant le transit épидидymaire. Les spermatozoïdes subissent de nombreux changements de maturation au cours de cette période, mais surtout, ils acquièrent la motilité et les facteurs nécessaires à la fécondation. Le processus de maturation se produit par contact direct des spermatozoïdes avec le contenu de la lumière épидидymaire. L'environnement luminal est spécifique à chaque région de l'épididyme et les différences entre les régions sont dues à la composition cellulaire variable de l'épithélium et à la régulation hormonale. Au fur et à mesure que les spermatozoïdes progressent dans l'épididyme, ils subissent des modifications de la compaction nucléaire, de la composition de la membrane plasmique, de la structure du cytosquelette, du contenu protéique et du contenu en ARN non codants (James et al., 2020).

**I.3.2.2. Caractéristiques de sperme épидидymaire :**

- **Maturation et mobilité** : Lorsqu'ils quittent le testicule, les spermatozoïdes sont fonctionnellement immatures et disposent de moyens de défense intrinsèques limités. Ils deviendront mobiles et fécondants après leur descente et leur maturation progressive dans le tubule épидидymaire. Le sperme épидидymaire présente une motilité et un mouvement plus rapide (Noblanc et al., 2012).

(Gloria et al., 2011) ont montrés les caractéristiques suivantes :

- **Morphologie** : la présence de gouttelettes cytoplasmiques distales dans les spermatozoïdes de la queue épидидymaire montre que les spermatozoïdes n'ont pas encore terminé leurs maturations.

- **La viabilité et l'activité mitochondriale** : Elles sont plus élevées dans le sperme épидидymaire.

- **Concentration** : la concentration des spermatozoïdes est plus élevée dans la queue de l'épididyme

**I.4. Les facteurs influençant la qualité du sperme****I.4.1. L'âge et la race :**

La maturité sexuelle survient vers 05mois environs selon la race. La qualité du sperme diminue généralement chez les lapins males âgés de plus de 2ans (Castellini et al., 2005).

**I.4.2. Etat de santé :**

L'inflammation de l'appareil reproducteur male altère diverses fonctions testiculaires ainsi que les caractéristiques du sperme (**Castellini et al., 2005**).

**I.4.3. L'alimentation :**

(**Luzi et al., 1996**) ont montré qu'un régime alimentaire restreint réduit la libido, ainsi que certaines caractéristiques du sperme. Toutefois, le facteur le plus important n'est pas la quantité de nourriture mais ses caractéristiques chimiques.

Par-ailleurs, le bon équilibre entre les bon AG, surtout oméga 3, aide à rendre les spermatozoïdes plus souples et plus mobiles, ce qui améliore la fertilité (**Castellini et al., 2005**).

**I.4.4. La lumière :**

La durée d'exposition à la lumière à un effet sur l'axe hypothalamo-Hypophysaire, ce qui influence la libération d'hormones et la production de spermatozoïdes. Un programme lumineux constant de 16h de lumière et 8h d'obscurité par jour est indispensable pour améliorer la production du sperme, à la fois en qualité et en quantité, par rapport à une durée de lumière plus courte (**Theau – clement et al., 1994**).

# **Chapitre II**

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

**Techniques de récolte du sperme :****II.1.1. Sperme éjaculé :****II.1.1.1. Récolte par vagin artificiel :**

Les vagins artificiels (VA) sont largement utilisés pour la collecte de sperme chez les ruminants. Il s'agit d'une méthode pratique, qui n'altère pas la qualité du sperme par rapport à l'accouplement naturel.

Le vagin artificiel est un appareil simple et pratique, comporte deux parties. Un cylindre extérieur en matériel rigide le plus souvent en caoutchouc dur et épais ou en plastique muni d'une ouverture fermée par un bouchon. Sa longueur est d'environ 13 cm et son épaisseur est de 0,5 mm. La chemise intérieure en latex ou en caoutchouc artificiel est introduite dans le cylindre externe et ses extrémités rabattues et maintenues par un élastique. La cavité ainsi formée par le cylindre externe et la chemise interne est remplie d'eau à 41-42°C en quantité suffisante pour obtenir une pression équivalente à celle du vagin de la femelle. Une extrémité du vagin artificiel est lubrifiée : elle servira à introduire le pénis ; sur l'autre est fixée un cône en caoutchouc au bout duquel est adapté un tube gradué pour recueillir le sperme. Certains vagins artificiels sont équipés d'un thermomètre (Hanzen, 2016).

**II.1.1.2. Récolte par électroéjaculation :**

L'électroéjaculation consiste à administrer des impulsions électriques de faible voltage et de faible courant via une sonde transrectale équipée d'électrodes. Cela induit l'érection du pénis, l'émission du sperme et, finalement, l'éjaculation. Les impulsions électriques stimulent les branches du plexus hypogastrique entourant la vésicule séminale, la prostate et le canal déférent, induisant l'émission du sperme depuis la queue de l'épididyme vers le pénis.

Cette technique est stressante et douloureuse, mais l'utilisation d'une sédation ou d'une anesthésie générale peut atténuer ces problèmes et améliorer la qualité du sperme. L'utilisation d'hormones, comme l'ocytocine associée au PFF 2 $\alpha$ , peut également, réduire les effets négatifs associés à l'électroéjaculation (Abril-Sanchez et al., 2019).

**II.1.2. Prélèvement du Sperme épидидymaire :**

De nombreuses méthodes de récupération du sperme épидидymaire sont décrites. Elles varient selon les auteurs et les espèces. Chez les petits animaux, en raison de la taille de l'épididyme, la méthode privilégiée est la méthode de flottation (Guérin et al., 2003).

**II.1.2.1. Méthode de flottation :**

Elle consiste à couper la queue de l'épididyme et à le mettre dans un milieu tamponné pendant quelques minutes. De cette manière, les spermatozoïdes nagent dans le milieu et sont récupérés par filtration du milieu soigneusement collecté. Cette technique est également utilisée pour les échantillons de grands animaux (**Martinez –Pastor et al., 2006**).

**II.1.2.1. La méthode « retrograde-flushing » :**

Cette technique consiste à pratiquer de nombreuses incisions sur la queue avec une lame et à presser doucement pour recueillir le liquide spermatique sortant des tubules coupés. Par ailleurs, une aiguille peut être utilisée pour perforer les tubules.

Une autre méthode largement utilisée consiste à rincer rétrogradement la queue de l'épididyme en exerçant une pression depuis le canal déférent jusqu'à ce que le contenu de la queue émerge, puis une incision est pratiquée près de la jonction avec le corps de l'épididyme. La pression est générée par une seringue, qui injecte généralement un milieu de culture ; l'échantillon est donc déjà légèrement dilué lors de sa récupération. D'autres auteurs n'utilisent aucun milieu de culture, uniquement de l'air (**Martinez –Pastor et al., 2006**).

**II.2. Analyse du sperme :**

Immédiatement après collecte, le sperme est placé dans un bain marie à 37°C avant de procéder à l'évaluation d'abord de sa couleur déterminée par observation directe dans le tube de collecte transparent ; son pH par un pH-mètre et son volume par lecture directe sur le tube gradué servant à la collecte (**Boussit, 1989**).

**II.2.1. Examen macroscopique :****II.2.1.1. Couleur :**

Un échantillon de sperme normal présente une apparence homogène, blanche et opalescente. La présence de globules rouges (aspect rougeâtre) ou d'urine (jaunâtre) est facilement détectable. Les échantillons de sperme foncés, jaunes ou présentant une apparence anormale sont généralement écartés (**Boiti et al., 2005**).

**II.2.1.2. Volume :**

La mesure du volume de l'éjaculat s'effectue par lecture directe à l'aide des graduations du tube de collecte. La lecture se fait sans tenir compte de la partie mousseuse de l'éjaculat. (**Baril et al., 1993**).

La quantité de sperme varie selon les espèces et pour une espèce donnée, selon l'état physiologique de l'individu, l'âge, la saison, les méthodes de récolte, la race ou encore les conditions sanitaires et alimentaires (**Hanzen, 2016**).

#### **II.2.1.3. Viscosité :**

La viscosité est corrélée à la concentration en spermatozoïdes, en effet l'éjaculat est d'autant plus visqueux que le nombre de spermatozoïdes est élevé. Le sperme a généralement une consistance « laiteuse » à « crémeuse » (**Cabannes, 2008**). La présence de grumeaux dans l'échantillon ou la formation d'un filament glaireux à l'extrémité de la pipette signe une pathologie (**Parez et Duplan, 1987**).

#### **II.2.1.4. Ph :**

Une valeur normale du pH se situe entre 6,8 et 7,3. Toute valeur en dehors de cette plage indique une mauvaise qualité séminale, à déterminer à l'aide d'un pH-mètre ou de papier tournesol (**Francisco et Luis, 2003**). Le pH doit être mesuré Immédiatement après le prélèvement, avant qu'il soit modifié par le métabolisme (**Boiti et al., 2005**).

#### **II.2.2. Examen microscopique :**

Cet examen fait principalement appel au microscope réalisé dans les minutes suivant le prélèvement, en respectant les conditions thermiques optimales (**Hanzen, 2016**).

##### **II.2.2.1. Motilité :**

La motilité des spermatozoïdes est un facteur important des caractéristiques du sperme. L'évaluation visuelle du pourcentage de spermatozoïdes en mouvement par l'opérateur est subjective. Pour une évaluation objective, il est préférable d'utiliser le système CASA (**Chrenek et al., 2007**).

##### **II.2.2.1.1. Motilité massale :**

Évaluée par observation microscopique d'une goutte de sperme brute sur lame pour noter le mouvement de la masse des spermatozoïdes de 0 à 9 (**Bencheikh, 1994**) ou de 0 à 5 (**Baril et al., 1993**) (**Tableau 1**).

Cet examen est réalisé le plus rapidement possible après la récolte du sperme (**kabera, 2008**).

**Tableau I** : Détermination de la note de motilité massale de la semence (Baril et al., 1993).

Note	Aspects du mouvement
0	Immobilité totale
1	Mouvements individualisés
2	Mouvements très lents
3	Motilité massale générale de faible amplitude
4	Motilité massale rapide, sans tourbillons
5	Motilité massale rapide, avec tourbillons

**II.2.2.1.2. Motilité individuelle :**

L'examen de la motilité individuelle est préférentiellement réalisé après dilution du sperme dans un dilueur ou dans du sérum physiologique préalablement chauffé. Le sperme doit être relativement peu concentré, afin que chaque spermatozoïde soit individualisable (Cabannes, 2008).

La motilité est déterminée au moyen d'un microscope à contraste de phase en plaçant une goutte de sperme entre lame et lamelle et en l'examinant au grossissement 200 à 500 pour le noter de 0 à 4 selon l'échelle d'Adrieu (1974) (**Tableau II**). La motilité d'un spermatozoïde peut être considérée comme bonne quand il traverse le champ du microscope relativement rapidement avec des mouvements de rotation de la tête (spermatozoïdes fléchant ou traceurs). Les analyseurs d'image de type CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) permettent de quantifier de manière plus précise la nature et la vitesse des déplacements des spermatozoïdes. (Hanzen, 2016)

**Tableau II** : détermination de la note de motilité individuelle des spermatozoïdes d'après ADRIEU, 1974

Note	Mouvements des spermatozoïdes
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 diamètre sensiblement égale à leur longueur
4	Les spermatozoïdes se déplacent rapidement de long d'une hélice de faible diamètre

Selon **Hanzen (2016)**:

- Un sperme de très bonne qualité (4) doit posséder au moins 80 à 100 % de spermatozoïdes mobiles.
- Un sperme de bonne qualité (3) aura 60 à 79 % de spermatozoïdes mobiles.
- Un sperme de qualité correcte (2) aura 40 à 59 % de spermatozoïdes mobiles.
- Un sperme de faible qualité (1) aura moins de 40 % de spermatozoïdes mobiles.

#### II.2.2.2. Concentration :

La concentration spermatique correspond au nombre des spermatozoïdes dans un ml de sperme (spermatozoïdes/ml) (**Alvarino, 2000**), elle est déterminée en diluant le sperme avec une solution de chlorure de sodium à 0,9 % contenant 1,0 % de formaldéhyde (**Arriola et al., 2001**) et mesurée par numération à l'hématimètre ou cellule de Thomas. Ces mesures permettent de calculer, pour chaque éjaculat, le nombre de spermatozoïdes totaux (= concentration x volume) et vivants (= concentration x volume x pourcentage de spermatozoïdes vivants/100) (**Bencheikh, 1994**).

#### II.2.2.3. Test de viabilité :

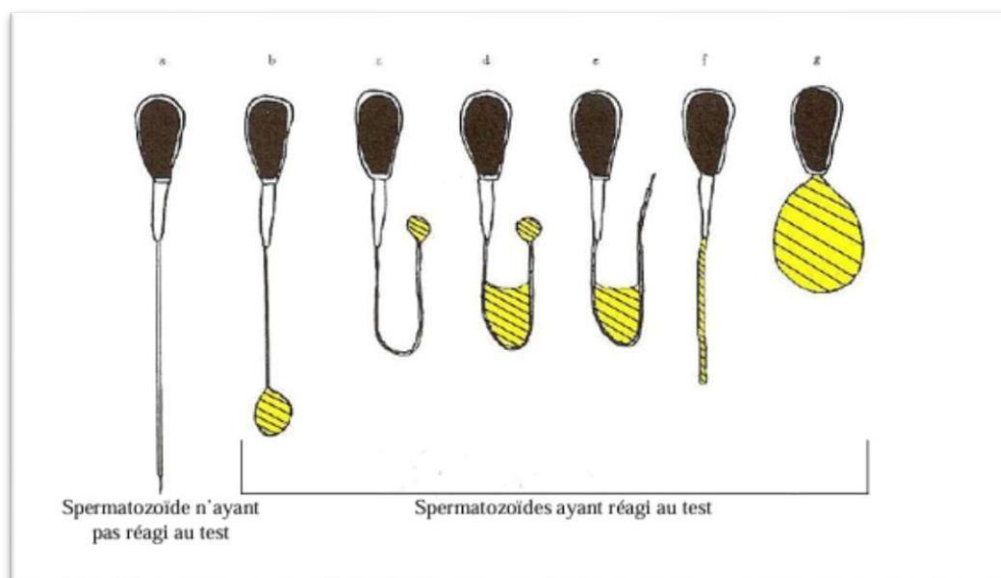
##### II.2.2.3.1. Coloration :

Elle se fait à l'aide de colorants spéciaux (Eosine nigrosine, bleu de méthylène ou bleu de bromophénol) qui traversent la membrane fragilisée des spermatozoïdes morts et les colorent différemment aux vivants qui restent incolores (**Kabera, 2008**). La coloration Éosine-nigrosine est l'une des colorations « vivant-mort » les plus utilisées chez les espèces domestiques, car elle est simple, rapide et ne nécessite aucune manipulation cellulaire pour déterminer les proportions de spermatozoïdes normaux et anormaux, vivants et morts (**Pena Martinez, 2004**).

### II.2.2.3.2. Test d'intégrité membranaire (Test hypo-osmotique) :

Ce test évalue l'intégrité fonctionnelle des membranes des spermatozoïdes. Lorsque les spermatozoïdes sont exposés à des conditions hypo-osmotiques, l'eau entre dans la cellule, à travers la membrane plasmique intacte, pour atteindre un équilibre osmotique. Cet afflux d'eau augmente le volume du spermatozoïde et provoque une dilatation (gonflement) de la membrane plasmique, la queue de spermatozoïde semble être sensible à de telles conditions hypo-osmotique (Jeyendran et al., 1984).

Ce test est réalisé en mélangeant le sperme avec une solution hypo-osmotiques préalablement préparée, puis en incubant le mélange à 37°C pendant 30 minutes. Les spermatozoïdes vivants présenteront des queues enroulées (**figure 8**). Un total de 200 spermatozoïdes, dans au moins 5 champs différents, sont évalués et comptés sous un microscope à contraste de phase avec un grossissement de 400x (Zou et al., 2000).



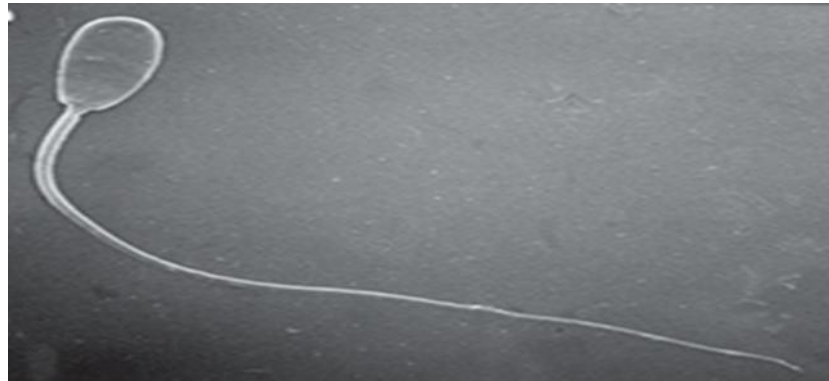
**Figure 8 :** Modifications morphologiques des spermatozoïdes soumis au test hypo-osmotique.

(D'après Jeyendran, 1984) (Cabannes, 2008).

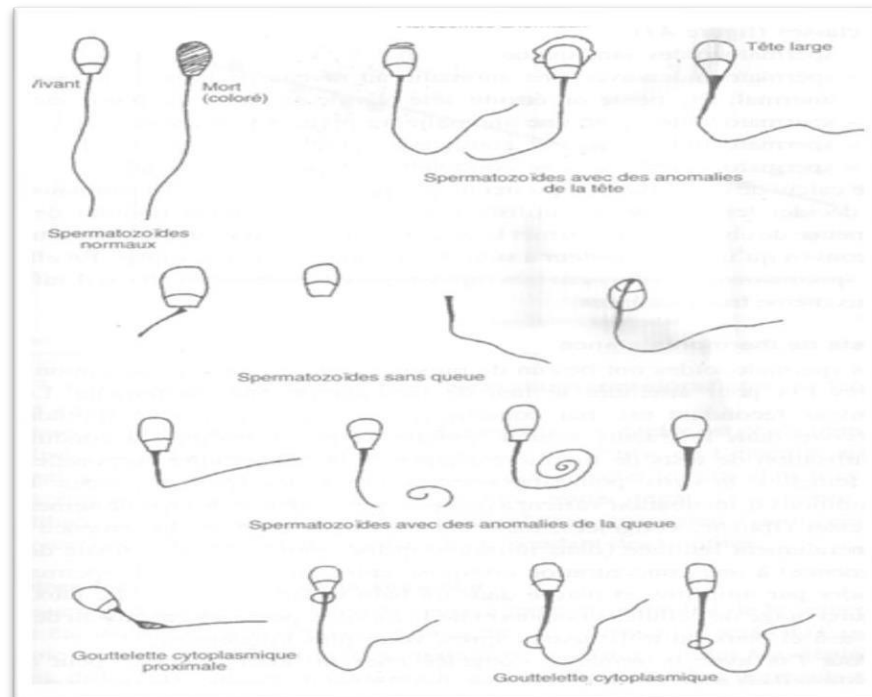
### II.2.2.4. Morphologie

L'examen morphologique permet de différencier les spermatozoïdes normaux (**figure 9**) de ceux qui sont anormaux (**figure 10**). La morphologie est appréciée sur des frottis de sperme colorés (encre de Chine, Giemsa, Eosine aniline ou bleu de bromophénol). Pour être

admissible, le sperme doit contenir moins de 25% de spermatozoïdes anormaux et plus de 60 % de spermatozoïdes vivants (**Kabera, 2008**).



**Figure 09** : spermatozoïde complet de lapin (**Boiti et al., 2005**).



**Figure 10** : Classification des différentes anomalies spermatiques (**Kabera, 2008**).

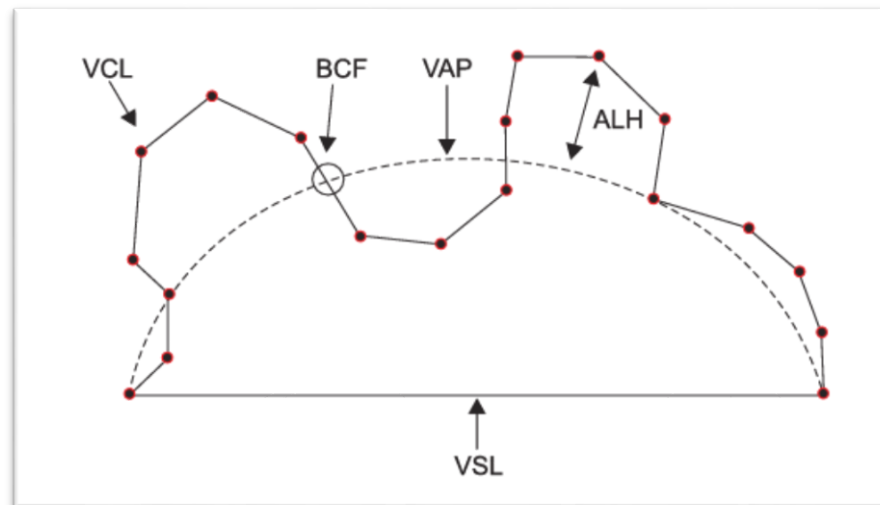
#### II.2.2.4. Système CASA :

Les systèmes d'analyse de sperme assistée par ordinateur (C.A.S.A. – *Computer Assisted Semen Analysis*) sont développés pour permettre une évaluation objective du schéma de motilité.

Ces systèmes comprennent un microscope à contraste de phase, équipé d'une platine chauffante, relié à une caméra vidéo à haute résolution et à un ordinateur (Boiti et al., 2005). La méthode CASA est développée au début des années 1980 (Amann et Waberski, 2014), elle visait à fournir une analyse plus objective et détaillée de la motilité et de la cinétique des spermatozoïdes (figure 11) pour l'évaluation de la qualité et l'estimation de la fertilité, ainsi que de leurs caractéristiques morphologiques (concentration, morphologie et viabilité). CASA analyse un plus grand nombre de spermatozoïdes en un temps plus court (Singh et al., 2021).

Les paramètres cinétiques suivants sont généralement évalués au CASA (Viudes de castro et al., 1999) :

- **% de spermatozoïdes mobiles** =  $(\text{Nombre de spermatozoïdes mobiles} / \text{total}) \times 100$  ;
- **VCL** (*Curvilinear Velocity*) = Vitesse de la tête du spermatozoïde le long de sa trajectoire courbe réelle ( $\mu\text{m/s}$ ) ;
- **VSL** (*Straight Line Velocity*) = Vitesse de la tête du spermatozoïde le long d'une ligne droite ( $\mu\text{m/s}$ ) ;
- **VAP** (*Average Path Velocity*) = Vitesse de la tête du spermatozoïde le long de sa trajectoire moyenne ( $\mu\text{m/s}$ ) ;
- **LIN** (*Linéarité*) = Linéarité de la trajectoire courbe ( $\text{VSL/VCL}$ ) ;
- **STR** (*Rectitude*) = Rectitude de la trajectoire ( $\text{VSL/VAP}$ ) ;
- **% de spermatozoïdes progressifs** = pourcentage de spermatozoïdes ayant une VAP >  $40 \mu\text{m/s}$  et une rectitude > 80 % ;
- **ALH** (*Amplitude of Lateral Head displacement*) = Amplitude du déplacement latéral de la tête autour de sa trajectoire moyenne ( $\mu\text{m}$ ) ;
- **BCF** (*Beat Cross Frequency*) = Fréquence moyenne à laquelle la vitesse de trajectoire croise sa trajectoire moyenne (battements/s).



**Figure 11 :** Évaluation des paramètres cinétiques des spermatozoïdes basés sur CASA montrant différentes trajectoires de mouvement (VSL, ligne droite de vitesse ; VCL, vitesse curvilinéaire ; BCF, fréquence croisée des battements ; VAP, trajectoire moyenne de vitesse ; ALH, amplitude du déplacement latéral de la tête) (Singh et al., 2021).

## II.3. Techniques de conservation

### II.3.1. Types de conservation

#### II.3.1.1 La conservation à long terme

La cryoconservation du sperme est un excellent moyen pour conserver des gamètes précieux pendant une longue période et grâce à cette technique, les opérations dans les centres d'insémination sont facilitées en réduisant le besoin de collecte de sperme à des moments précis (Viudes de Castro, 2021).

Durant le processus de cryoconservation, les spermatozoïdes subissent de nombreux stress liés à la baisse de température, à l'ajout de cryoprotecteurs, à la formation de glace et à l'exposition à une osmolarité accrue du milieu pendant la congélation. Cependant, il existe des différences entre les espèces quant à leur capacité à supporter le processus de cryoconservation. Il est donc nécessaire d'ajuster la composition des diluants, les cryoprotecteurs et leurs concentrations, ainsi que le protocole de cryoconservation des spermatozoïdes pour chaque espèce.

La cryoconservation endommage le sperme du lapin. Elle diminue le pourcentage de spermatozoïdes à acrosomes intacts, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et le pourcentage de spermatozoïdes vivants. De plus, des problèmes de transport des

spermatozoïdes, une capacitation prématurée et une diminution de la longévité in vitro sont souvent observés. Ces caractéristiques déterminent une diminution du pouvoir fécondant des spermatozoïdes après cryoconservation.

En général, les diluants à base de Tris (Tris, acide citrique et fructose ou glucose) (**tableau III**) constituent la base des diluants fréquemment utilisés pour la cryoconservation du sperme de lapin néanmoins, de nombreux protocoles et diluants ont été développés pour la cryoconservation du sperme du lapin. La plupart de ces diluants contiennent du jaune d'œuf et du DMSO ou de l'acétamide comme agent cryoprotecteur. La plupart des protocoles incluent un refroidissement lent à 5 °C. La congélation dans des vapeurs d'azote liquide avec une vitesse de congélation qui varie selon les protocoles, et la décongélation dans des bains-marie à 37 °C ou à des températures plus élevées (**Mocé, 2009**).

### **II.3.1.2. La conservation à court terme**

#### **II.3.1.2.1. La réfrigération du sperme:**

Le stockage à court terme du sperme par réfrigération, est une procédure simple et peu coûteuse, relativement facile à mettre en œuvre, Les protocoles de réfrigération du sperme ont été testés sur plusieurs espèces et peuvent être un outil utile pour aider aux programmes de reproduction assistée à la synchronisation de la disponibilité des gamètes et au transport des gamètes entre différentes exploitations.

Le stockage à court terme est particulièrement utile lorsque le volume de sperme obtenu est limité (**González-López, 2021**).

#### **II.3.1.2.2. La réfrigération de la gonade :**

Le principe de la conservation des organes est de maintenir leur viabilité ex vivo pour une longue période. Tout en les protégeant contre les effets délétères post mortem tel que l'ischémie et de la reperfusion, grâce à la composition qualitative et quantitative de la solution de conservation (**Pradeau et al., 2008**).

## **II.4. Milieux de conservation**

### **II.4.1. La dilution**

La dilution du sperme est une procédure couramment utilisée chez de nombreuses espèces pour permettre une évaluation plus précise de la qualité du sperme et améliorer la longévité des spermatozoïdes. Néanmoins, l'ajout d'un volume élevé de diluant au sperme brut, entraîne une faible concentration de spermatozoïdes ( $< 20 \times 10^6$  spermatozoïdes/ml), ce qui

peut avoir un effet néfaste sur la qualité du sperme (généralement la motilité des spermatozoïdes **(Hayden et al., 2015)**).

La qualité du sperme réfrigéré dépend des propriétés et de la composition du milieu de dilution **(Andrabi, 2007)**. Le sperme doit être en contact avec un milieu de dilution approprié, capable de créer un environnement métaboliquement et physiologiquement favorable à la survie des spermatozoïdes, les protégeant du choc thermique et de la prolifération bactérienne **(Fadl et al., 2003)**.

#### II.4.2. Composition :

##### II.4.2.1. Milieux nutritifs :

Les milieux de dilution sont complétés en substance nutritives pour couvrir les besoins énergétiques des spermatozoïdes **(Sautejeau, 2024)**.

##### ➤ Tris :

Le tris(hydroxyméthyl) aminométhane ( $C_4H_{11}NO_3$ ) est un composé tampon couramment utilisé, il peut induire de manière réversible la phase ondulée in situ dans des bicouches de lécithine à température ambiante, ce qui indique que l'interaction entre ces petites molécules et les lipides peut avoir une influence significative sur la morphologie et les propriétés de la membrane **(Mou et al., 1994)**.

Le Tris possède un PK favorable et une plage de tamponnement en pH adaptée aux réactions physiologiques, avec une capacité tampon approximativement équivalente à celle du sang normal. Contrairement à d'autres tampons comme le bicarbonate, le Tris pénètre dans les cellules et agit comme un tampon intracellulaire efficace **(Sirieix et al., 1997)**.

**Tableau III** : Composants et propriétés adéquates du tampon Tris pour le lapin **(Boiti et al., 2005)**.

Tris	3,029 g
Acide citrique H <sub>2</sub> O	1,676 g
D-Glucose déshydraté	1,250 g
Streptomycine	75.000 IU
G-pénicilline	166.200 IU
L'eau distillée	A 100 mL

PH	7,14
Osmolarité	299sm / kg

#### II.4.2.2. Substances solubilisantes :

##### ➤ PEG :

##### a- Définition :

Les PEGs (polyéthylène glycol) sont des molécules à haut poids moléculaire issues de l'industrie de la pétrochimie. Ils sont constitués d'une longue chaîne carbonée aliphatique, plus ou moins hydrosoluble grâce à ses fonctions éthers et alcools (Caillat et al., 2015).

Le PEG présente une grande solubilité dans les solvants organiques, ce qui facilite les modifications des groupes terminaux. Le PEG est adapté aux applications biologiques grâce à sa solubilité dans l'eau et sa faible toxicité intrinsèque, Il est principalement utilisé pour le stockage du sang et des organes (Betajeri, 2011).

##### b- Propriétés :

Pour que les polymères soient utilisés dans les domaines médical et pharmaceutique, des nombreuses caractéristiques structurels et physico-chimiques doivent être prises en compte :

##### - Faible toxicité :

La toxicité du PEG est liée à son absorption physiologique, laquelle dépend du poids moléculaire du PEG. Par conséquent, la toxicité diminue avec l'augmentation du poids moléculaire, ce qui entraîne une absorption systémique limitée

##### - Meilleure solubilité dans l'eau et dans de nombreux solvants organiques :

Les PEGs sont des polymères hydrophiles, et leur solubilité élevée dans l'eau les rend idéaux pour des applications biologiques. Ainsi, les PEGs sont conjugués à des nanotransporteurs pour augmenter leur solubilité dans l'eau. De plus, les PEGs sont très solubles dans de nombreux solvants organiques tels que le méthanol, l'éthanol et le dichlorométhane.

##### - Poids moléculaire du PEG :

Les PEGs sont synthétisés avec différentes longueurs de chaînes et une large gamme de poids moléculaires. Cependant, les molécules de PEG couramment utilisées dans diverses

applications médicales et pharmaceutiques ont un poids moléculaire entre 0,4 kDa à 50 kDa (Gaballa et al., 2024).

➤ **Les cyclodextrines :**

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques appartiennent à la famille des molécules de type cage. Elles présentent une surface hydrophile, des groupes hydroxyles à deux extrémités et une cavité interne hydrophobe. Grâce à leur forme, les cyclodextrines peuvent encapsuler d'autres molécules en solution aqueuse, permettant ainsi à un large éventail de molécules invitées hydrophobes d'interagir avec la cavité interne du macrocycle pour former des complexes d'inclusion. La capacité d'encapsulation et la flexibilité des cyclodextrines permettent aux interactions hôte-invité de modifier les propriétés physiques, chimiques et biologiques des molécules invitées (Esteso et Romero, 2024).

**II.4.2.3. Antioxydants :**

La vitamine C et la vitamine E (tocophérol) sont des antioxydants non enzymatiques. L'ajout d'antioxydants est une méthode bien connue pour améliorer la viabilité et la motilité des spermatozoïdes Cryoconservés (Azawi et al., 2013).

➤ **Vitamine E :**

C'est l'antioxydant majeur des milieux lipidiques (huiles, membranes biologiques, lipoprotéines) (Léger, 2000). Elle intervient aussi dans la fonction de reproduction. On connaît au moins 7 formes moléculaires de tocophérols se différenciant par le nombre et la position des groupement méthyl (-CH<sub>3</sub>) sur la molécule. Ils sont distingués par une lettre grecque (alpha, bêta, gamma, etc.) en fonction de l'ordre décroissant de leur activité vitaminique E (Lebas, 2000).

La vitamine E joue un rôle physico-chimique dans la stabilisation des membranes biologiques contenant des taux élevés d'AGPI (Lucy, 1972).

➤ **Vitamine C :**

La vitamine C est une vitamine hydrosoluble présente dans l'organisme principalement sous sa forme réduite, l'acide ascorbique (Jacob et Sotoudeh., 2002). Elle est largement reconnue comme un antioxydant principalement d'origine naturelle dans les systèmes biologiques (Cossins et al., 1998).

**II.4.2.4. Cryoprotecteurs :**

Les agents cryoprotecteurs sont nécessaires pour minimiser les dommages causés par la cryoconservation. Les agents cryoprotecteurs perméables les plus couramment utilisés sont le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le glycérol (**Harald et al., 2016**). Par ailleurs, le jaune d'œuf est également utilisé pour la congélation du sperme de mammifères et a donné de bons résultats chez les poissons (**Legendre et Billard, 1980**).

**II.4.2.5. Antibiotiques :**

Les milieux de congélations contiennent pour la plupart des antibiotiques. En effet l'éjaculat est forcément contaminé par des bactéries issues du prépuce ou de la partie distale de l'urètre. La manipulation du sperme lors de la congélation du sperme constitue aussi un facteur de risque supplémentaire de contamination bactérienne les antibiotiques les plus utilisés sont la pénicilline et la gentamicine (**Sautejeau Rizzoni, 2024**).

**II.4.2.6. Stabilisateurs membranaires :**

Pendant le processus de congélation, le cholestérol exerce un effet protecteur sur les spermatozoïdes en empêchant la séparation latérale des phospholipides pour maintenir l'intégrité et la perméabilité de la membrane (**Zhang et al., 2024**).

# **Chapitre III**

## **Le stress oxydatif.**

**III.1. Définition :**

Le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre entre la production de radicaux libres et de métabolites réactifs, appelés oxydants, et leur élimination par des mécanismes protecteurs appelés systèmes antioxydants. Ce déséquilibre entraîne des lésions de biomolécules et d'organes importantes, avec un impact potentiel sur l'organisme tout entier (**Ďuračková, 2009**).

**III.2. Origine de stress :**

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre les systèmes générateurs d'ERO et les piègeurs enzymatiques ou non enzymatiques responsables de leur élimination. Cet équilibre est soigneusement régulé au sein des cellules, mais aussi dans le compartiment extracellulaire par de nombreuses voies. Si les spermatozoïdes sont exposés à des niveaux excessifs d'ERO, leur capacité fécondante et leur intégrité génétique pourraient être compromises (**Vernet et al., 2004**).

**III.3. Système de défense Antioxydants :**

Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants composés d'enzymes (la glutathion peroxydase), de vitamines (A, C, E), d'oligoéléments (le sélénium), de protéines (la ferritine) (**Pincemail et al., 2002**).

**III.3.1. Définition :**

L'antioxydant c'est une espèce chimique plus ou moins complexe diminuant le stress oxydant au sein de l'organisme. Un antioxydant peut donc prévenir la synthèse de radicaux libres en inhibant l'initiation des chaînes réactionnelles ou désactiver directement les ROS. Les antioxydants peuvent être classés selon leurs modes d'actions : systèmes enzymatiques, inhibiteurs d'enzymes oxydantes, chélateurs de métaux et piègeurs de radicaux libres (**Desmier, 2016**).

**III.3.2. Types :****III.3.2.1. Antioxydants enzymatiques :****- Les superoxydesdismutases (SOD) :**

Les SOD éliminent les radicaux superoxydes par dismutation du radical en  $H_2O_2$  et en  $OH^+$  et  $OH^-$  (Mn SOD dans la mitochondrie, CuZn SOD dans le cytosol et les érythrocytes).

**- Les catalases :**

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en libérant de l'oxygène et de l'eau.

**- Les glutathion peroxydases (GSHPX) :**

Les GSHPX réduisent le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les hydroperoxydes lipidiques (Goudable et Favier, 1997).

**III.3.2.2. Antioxydants non enzymatiques :****III.3.2.2.1. Vitamine E :**

Elle agit in vivo et in vitro en neutralisant les radicaux libres, devenant elle-même un radical non toxique. La réduction de la vitamine E oxydée est assurée par la vitamine C. Les concentrations de ces deux vitamines sont donc nécessairement liées pour la protection contre la peroxydation lipidique. La vitamine E est l'antioxydant liposoluble qui a la plus grande concentration molaire cellulaire. Elle permet de diminuer la peroxydation lipidique dans la membrane cellulaire (Goudable et Favier, 1997).

Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer dans les membranes biologiques riches en acides gras polyinsaturés ou elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les espèces réactives de l'oxygène. Elle agit de même à la surface des lipoprotéines (Landrier, 2011).

L'ajout de la vitamine E à un milieu de congélation entraîne des taux plus élevés d'intégrité de la membrane plasmique, de l'acrosome et du potentiel de la membrane mitochondriale, ainsi qu'une motilité plus élevée chez les spermatozoïdes de lapin congelés et décongelés. La vitamine E protège les spermatozoïdes grâce à sa capacité à diminuer l'accumulation de ROS et de LPO pendant le processus de conservation (Zeng et al., 2016).

**III.3.2.2.2. Vitamine C :**

La vitamine C ou acide ascorbique est hydrosoluble et considérée comme étant l'antioxydant naturel le plus puissant. Présente sous sa forme ascorbate, elle piège les radicaux peroxydes en phase aqueuse avant qu'ils initient la réaction de peroxydation lipidique protégeant ainsi les membranes et les lipoprotéines. La vitamine C peut avoir un effet pro-oxydant et ainsi se lier avec des ions métalliques (Poisson, 2013).

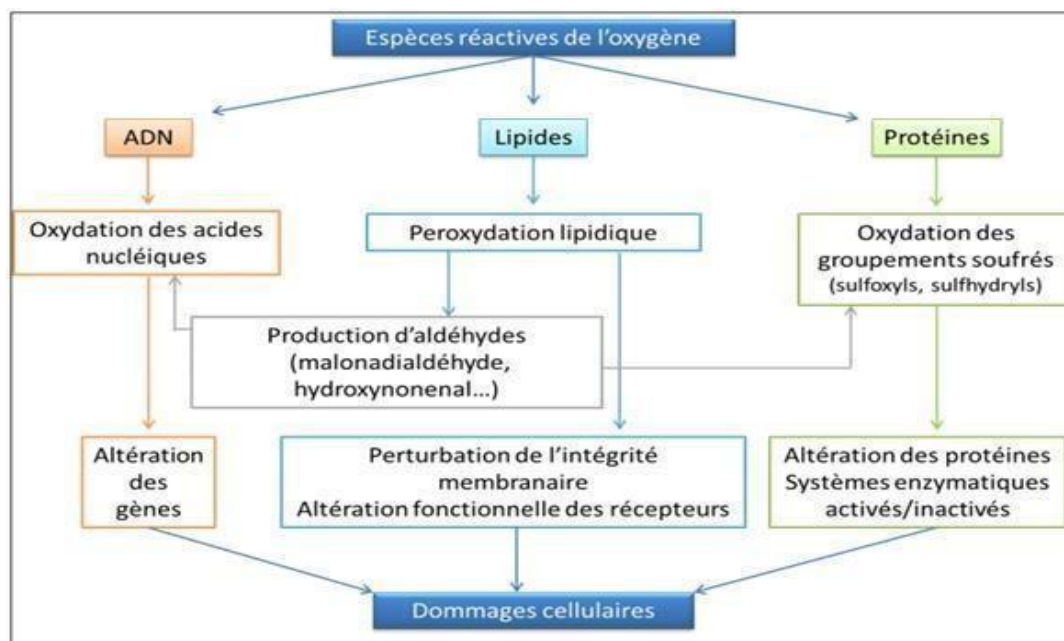
L'un des rôles essentiels de l'acide ascorbique (vitamine C) est d'agir en tant qu'antioxydant pour protéger les composants cellulaires contre les dommages causés par les

radicaux libres. Il a été démontré que l'acide ascorbique élimine directement les radicaux libres dans les phases aqueuses des cellules et du système circulatoire (**Beyer, 1994**).

Selon plusieurs études, la vitamine C améliore la qualité du sperme. Elle augmente la proportion de spermatozoïdes à morphologie normale, protège contre les dommages oxydatifs et aide à traiter l'agglutination des spermatozoïdes (**Akmal et al., 2006**).

### III.4. Les différentes cibles des espèces réactives

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides) (**Figure 12**), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (**Favier, 2003**).



**Figure 12 : Les différentes cibles des Espèces Réactives (Poisson, 2013).**

### III.5. Stress oxydatif et sperme :

Les spermatozoïdes sont particulièrement sensibles au stress oxydatif, principalement en raison de leurs caractéristiques uniques. Leur membrane contient des acides gras hautement insaturés, ce qui les rend très vulnérables aux attaques des ROS. De plus, les spermatozoïdes possèdent des systèmes enzymatiques antioxydants limités, ce qui aggrave encore leur sensibilité aux dommages oxydatifs (**Walke et al., 2023**).

Le stress oxydant peut-être délétère pour les spermatozoïdes si les capacités antioxydantes de l'organisme sont dépassées et que les niveaux de radicaux libres oxygénés (ROS) s'élèvent dans le plasma séminal et/ou dans le cytoplasme du spermatozoïde. Le principal mécanisme à l'origine des ROS dans le spermatozoïde est la réaction Redox NAD dépendante au niveau Mitochondrial. En effet, les spermatozoïdes sont riches en mitochondries de par leur besoin important d'énergie nécessaire à leur mobilité (**Methorst et al., 2014**).

Lors de la cryoconservation, les spermatozoïdes sont soumis à un stress oxydatif dû à la consommation d'antioxydants due à l'absorption du cytosol spermatique et à la perturbation du milieu extracellulaire, ce qui déstabilise le métabolisme spermatique et augmente les concentrations de ROS (**Fleming et Thomson, 2020**).

Le stress oxydatif peut provoquer des anomalies structurelles des spermatozoïdes, entraînant une morphologie anormale des spermatozoïdes et affectant négativement leur potentiel de fécondation. De plus, un stress oxydatif accru peut entraîner une baisse de la viabilité des spermatozoïdes, car il induit la mort des spermatozoïdes par apoptose, réduisant ainsi le nombre total de spermatozoïdes et la fertilité (**Walke et al., 2023**).

### **III.6. Mesure du stress oxydatif :**

Il est possible de mesurer la production de radicaux libres, la capacité antioxydante et les effets biologiques du stress oxydatif. Toutefois, en pratique clinique, l'évaluation du stress oxydatif est faite par la mesure des produits de dégradation des lipides et par la mesure des capacités de protection (**Goudable et Favier, 1997**).

# **Matériel et méthodes**

## **I. Matériel et méthodes**

### **I.1. L'animale :**

Notre étude est réalisée sur des lapins mâles adultes, âgées de 07 à 12mois (**figure13**), élevés à l'extérieur dans un endroit ouvert et protégé, dans un environnement bien aéré et exposé à la lumière du jour. Leur alimentation se composait de fourrage vert (herbe), de paille, pain sec et d'un aliment granulés spécial pour lapins.



**Figure 13** : lapins utilisés dans l'étude.

### **I.2. Les milieux de conservation :**

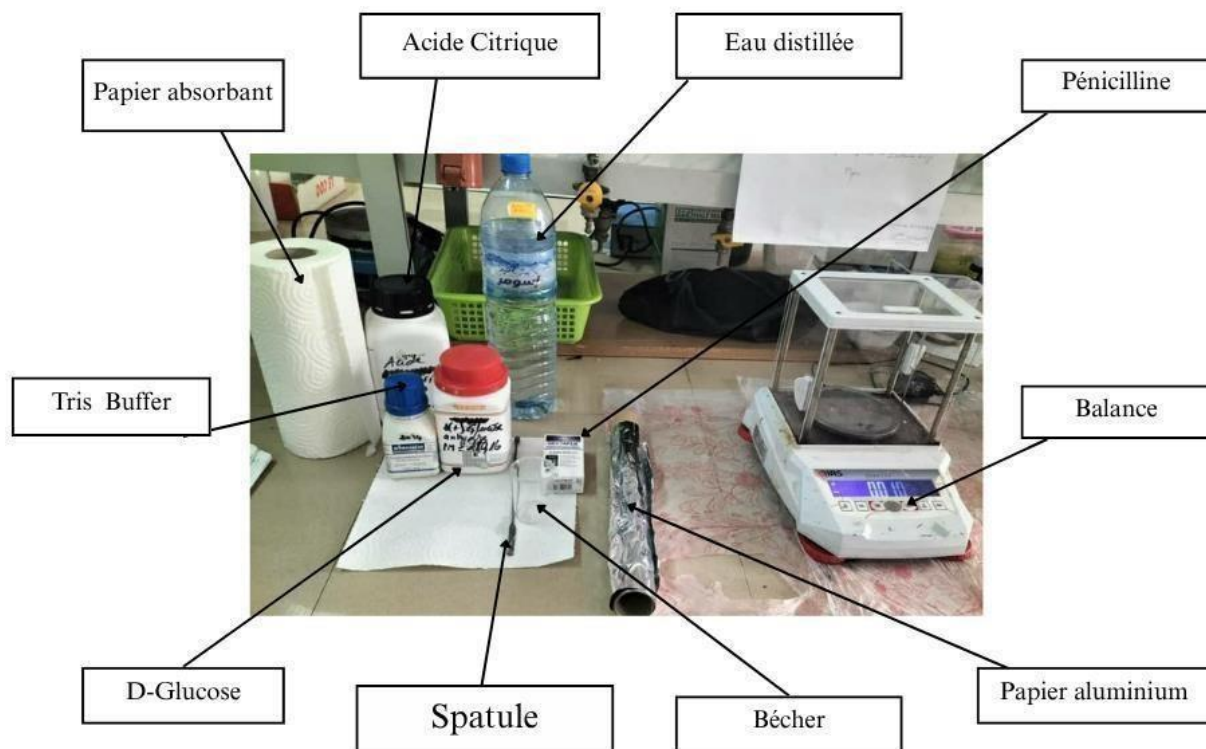
#### **I.2.1. Préparation du tampon tris :**

**Matériel** : le matériel utilisé dans la préparation de la solution du tampon tris est représenté dans la **figure 14**.

#### **- Produits chimiques :**

- Tris
- Acide citrique

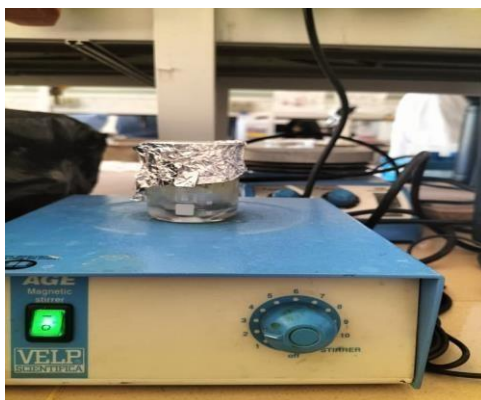
- Glucose
- Pénicilline
- Eau distillée
- **Matériel technique :**
  - Bêchers
  - Spatule
  - Papier aluminium
  - Papier absorbant
  - Agitateur magnétique
  - Balance de précision
  - Papier absorbant



**Figure 14 :** Matériel nécessaire pour la préparation du tampon Tris.

**Méthode :**

Pour préparer le tampon Tris, nous avons d'abord pesé 1,513 g de Tris, 0,85 g d'acide citrique, 0,625 g de glucose et 0,05 g de pénicilline. Ces poudres sont ensuite ajoutées progressivement dans 50mL d'eau distillée versée dans un bécher propre (**Strazinger, 1971**). Une fois tous les composants incorporés, nous avons placé un barreau magnétique dans le bécher, nous l'avons recouvert avec du papier aluminium, puis on laisse agiter (**figure 15**) pendant 30 minutes à température ambiante, jusqu'à dissolution complète.



**Figure 15** : agitation de la solution du tampon Tris.

**I.2.2. Préparation du complexe(PEG/VitE) :****a. La pesée de la vitamine E :****Matériel :**

- Vitamine E (huileuse)
- Micropipette
- Bécher (50 mL)
- Balance de précision

**Méthode :**

Nous avons prélevé, à l'aide d'une micropipette, une goutte de vitamine E que nous avons mis dans un bécher (**figure 16**), préalablement déposé sur une balance de précision. La balance a indiqué une masse de 80 mg. Cette quantité nous a servi, par la suite, à calculer la masse de PEG nécessaire, en respectant le rapport de 90 % pour le PEG et 10 % pour la vitamineE.



**Figure 16 :** Mesure de la vitamine E.

### **b. Préparation de la solution de PEG :**

#### **Matériel :**

- PEG-6000 (cristaux)
- Mortier et pilon
- Passoire
- Balance de précision
- Bécher
- Éthanol
- Barreau magnétique
- Papier aluminium

#### **Méthode :**

- **Préparation de la poudre de PEG** : Nous avons commencé par prendre des cristaux de PEG-6000 et les écraser doucement avec un Mortier et un pilon, pour obtenir une poudre fine (1). Ensuite, nous l'avons fait passer dans une passoire pour qu'elle soit bien homogène (2).

- **Calcul de la quantité de PEG à utiliser** : Nous avons calculé le poids du PEG nécessaire pour 80 mg de vitamine E en se basant sur le rapport de 10 % de vitamine E et 90 % de PEG (Amokrane et al., 2020), en utilisant la règle de trois à partir des valeurs de référence (100 mg de vitamine E correspondent à 900 mg de PEG). Nous avons, donc, calculé le poids du PEG comme suit :

100 mg de vitamine E  $\longrightarrow$  900 mg de PEG

80 mg de vitamine E  $\longrightarrow$  X

$X = (80 \times 900) / 100 = 720$  mg de PEG

- nous avons, ensuite, pesé exactement 720 mg de la poudre PEG (3), et nous l'avons mélangé à 100 mL d'éthanol (4). Le tout est mis sur un agitateur avec un barreau magnétique pendant 30 minutes pour bien dissoudre le PEG (5) (figure 17).



**Figure 17 :** préparation de solution du PEG

- **Préparation du complexe (PEG/VitE) :**

**Matériel :**

- La vitamine E
- La solution de PEG
- Agitateur
- Papier aluminium

- Ballon en verre
- Rotavapeur (évaporateur rotatif)
- Spatule
- Boîte en verre noire
- Bécher

**Méthode :**

Le PEG est d'abord dissous, puis mélangé à 80 mg de vitamine E et agité pendant 2 heures à température ambiante. Le mélange est ensuite versé dans un ballon en verre et placé au rotavapeur pendant 30 minutes (**figure 18**) pour faire évaporer l'éthanol, ce qui permet d'obtenir un résidu sec du complexe PEG/VitE (**figure 19**).

Ce résidu est gratté délicatement avec une spatule et transféré dans une boîte en verre noire, puis placé dans l'étuve à 37 °C pendant 8 heures pour le séchage. Enfin, la boîte est entièrement enveloppée de papier aluminium et conservée au réfrigérateur à 4 °C.



**Figure 18 :** le rotavapeur



**Figure 19 :** résidu du complexe PEG/vitE

**I.2.3. Préparation de la solution PEG/VitE– Tris :****Matériel :**

- Complexe (PEG/VitE)
- Tampon tris
- Balance

- Cuillère à mesure
- Bécher
- Micropipette
- Agitateur avec barreau magnétique

**Méthode :**

Pour la préparation de la solution de PEG/VitE dans le tampon Tris, nous avons suivi la règle suivante : 1,2 mg de (PEG/VitE) dans 1 mL du tampon Tris (**Amokrane et al., 2020**).

Après avoir pesé une quantité du complexe (PEG/VitE), nous avons obtenu 7mg. Pour déterminer le volume du tampon tris à ajouter, nous avons fait une règle de trois comme suit :

1,2 mg du complexe (PEG/VitE) → 1 ml du tampon tris

7 mg du complexe (PEG/VitE) → X

$X = (7 \times 1) / 1,2 = 5,83$  ml du tampon tris

Nous avons, donc, ajouté 5,83 ml de Tris pour dissoudre les 7 mg de PEG/VitE, en laissant le mélange agiter pendant une heure et demi avec un barreau magnétique (**figure20**).



**Figure 20** : solution PEG/VitE-Tris

**I.3. La réfrigération de la gonade :****Matériel :**

- Des gonades de lapins sacrifiés
- Milieux de conservation (le tampon tris, PEG/VitE)
- Lame bistouri
- Papier absorbant
- Flacons stériles (à bouchons rouges)
- Réfrigérateur réglé à 4°C
- Etiquettes

**Méthode :**

Après l'abattage du lapin, les gonades sont prélevées avec soin, puis transportées jusqu'au laboratoire dans une glacière contenant de la glace pour maintenir une température basse. Une fois au laboratoire, les gonades sont réparties dans des flacons stériles, selon les Conditions de conservation suivantes :

**1. Première expérience :**

La gonade est placée seule, sans aucun milieu de conservation, dans un flacon stérile, puis conservée à 4 °C au réfrigérateur.

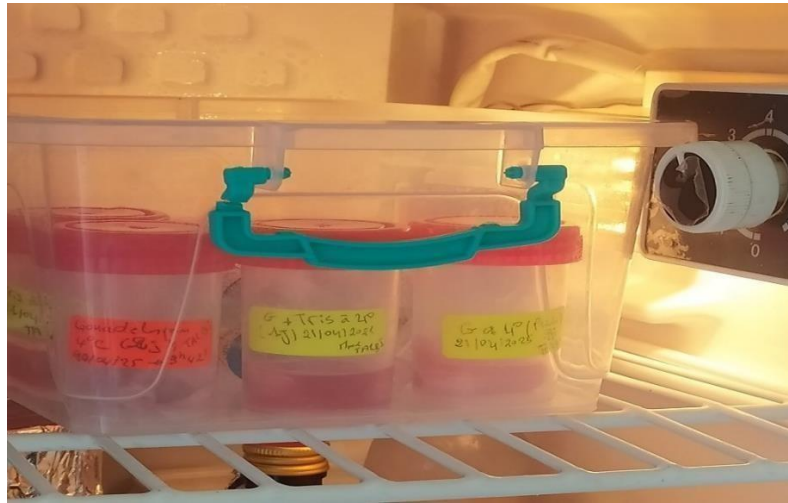
**2. Deuxième expérience :**

La gonade est placée dans un flacon stérile contenant du tampon Tris, en s'assurant qu'elle est bien recouverte par le tampon Tris. Le flacon est ensuite conservé à 4 °C.

**3. Troisième expérience :**

La gonade est placée dans un flacon stérile contenant une quantité suffisante de la solution (PEG/VitE) pour recouvrir la gonade. Le flacon est ensuite mis au réfrigérateur à 4 °C (**figure 21**).

Pour chaque condition, la conservation est testée sur plusieurs temps d'incubation : 1 jour, 2 Jours, 3 jours, 4 jours et 10 jours.



**Figure 21 :** gonades réfrigérées à 4°C

#### **I.4. Récolte de sperme épидидymaire :**

##### **Matériel :**

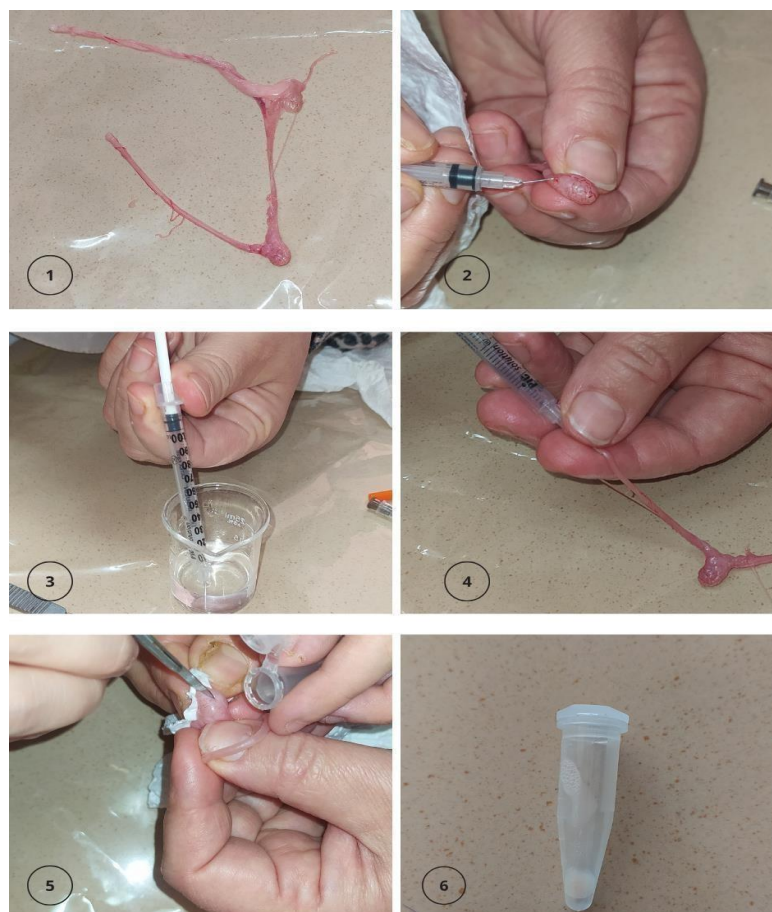
- Epididyme
- Lame bistouri
- Eau physiologique
- Seringue
- Aiguille
- Eppendorf

##### **Méthode :**

Après la réfrigération, la gonade est retirée du réfrigérateur et laissée à se réchauffer progressivement.

Nous avons d'abord retiré le testicule et l'épididyme de la séreuse qui les entoure. Ensuite A l'aide d'une lame bistouri nous avons isolé l'épididyme et le canal déférent du testicule (1). Afin d'éviter que le sang ne se mélange au sperme lors de sa récolte, nous avons fait éclater les vaisseaux sanguins au niveau de la queue de l'épididyme à l'aide d'une aiguille (2). Les échantillons sont, ensuite, lavés avec une solution physiologique (NaCl 0,9 %) pour éviter toute contamination, puis essuyés à l'aide du papier absorbant.

Pour la récolte du sperme, la méthode utilisée est celle de "Retrograde Flushing" décrite par (Martinez-Pastor et al.,2006). Nous avons commencé par insérer délicatement une seringue remplie de solution physiologique (NaCl 0,9 %) dans la lumière du canal déférent, afin de faire gonfler la queue de l'épididyme (3). Avec la même seringue vide nous avons injecté de l'air pour créer une pression à l'intérieur de l'épididyme (4). Enfin, à l'aide d'une lame bistouri, une incision est réalisée au niveau de l'endroit gonflé de la queue de l'épididyme (5), provoquant l'écoulement du sperme, dans un tube Eppendorf préalablement préparé (6) (figure22).



**Figure 22** : les étapes de la récolte du sperme épididymaire.

## **I.5. Analyse du sperme épididymaire :**

### **I.5.1. Examen macroscopique :**

Juste après la récolte, une évaluation macroscopique du sperme est réalisée à l'œil nu, afin de déterminer sa couleur et son volume par lecture directe sur le tube eppendorf gradué.

**I.5.2. Examen microscopique (CASA) :**

Pour l'analyse microscopique du sperme récolté nous avons utilisés le système CASA (computer-assisted sperm analysis).

Le CASA (computer-assisted sperm analysis) est un système qui consiste à analyser les paramètres du sperme notamment la motilité. Il est composé d'un microscope optique (Nikon ECLIPSE E200) équipé d'une caméra vidéo (BASLER) pour capturer les images des spermatozoïdes qui sont ensuite affichés et analysés automatiquement par un logiciel sur un ordinateur (ALFATRON) (**figure23**).



**Figure23** : le système CASA



**Figure24** : cellule de Makler

**I.5.2.1. Évaluation des paramètres de Mobilité (CASA) :****Matériel :**

- Sperme récolté
- Tampon tris
- Eppendorf
- Micropipette
- Embouts
- Cellule de Makler
- CASA

**Méthode :**

Le sperme récolté est dilué à 1-20 avec le tampon tris. Une goutte de sperme dilué est prélevée à l'aide d'une micropipette puis déposée délicatement sur une cellule de mackler préalablement chauffée (**figure 25**), l'échantillon est ensuite observé au grossissement 20x.

Trois champs microscopiques sont capturés et analysés pour évaluer le mouvement des spermatozoïdes qui sont classés en quatre catégories selon leurs types de mobilités (rapides, moyens, lents et statiques).



**Figure25** : Observation d'une goutte de sperme dilué sur une cellule de Mackler.

**I.5.2.2. Test de l'intégrité membranaire (HOST) :****Matériels :**

- Sperme dilué
- Eau distillée
- Solution physiologique (NaCl 0,9%)
- Tube à essai
- Eppendorf
- Micropipette
- Embouts
- Etuve
- Lames

- CASA

**Méthode :****a- Préparation de la solution hypo-osmotique**

Nous avons mélangé dans un tube à essai un volume de 400 $\mu$ L d'eau distillé et un volume de 100 $\mu$ L de la solution physiologique (NaCl 0.9 %), cette solution hypo-osmotique (**figure 26**) est utilisée pour évaluer l'intégrité membranaire des spermatozoïdes.

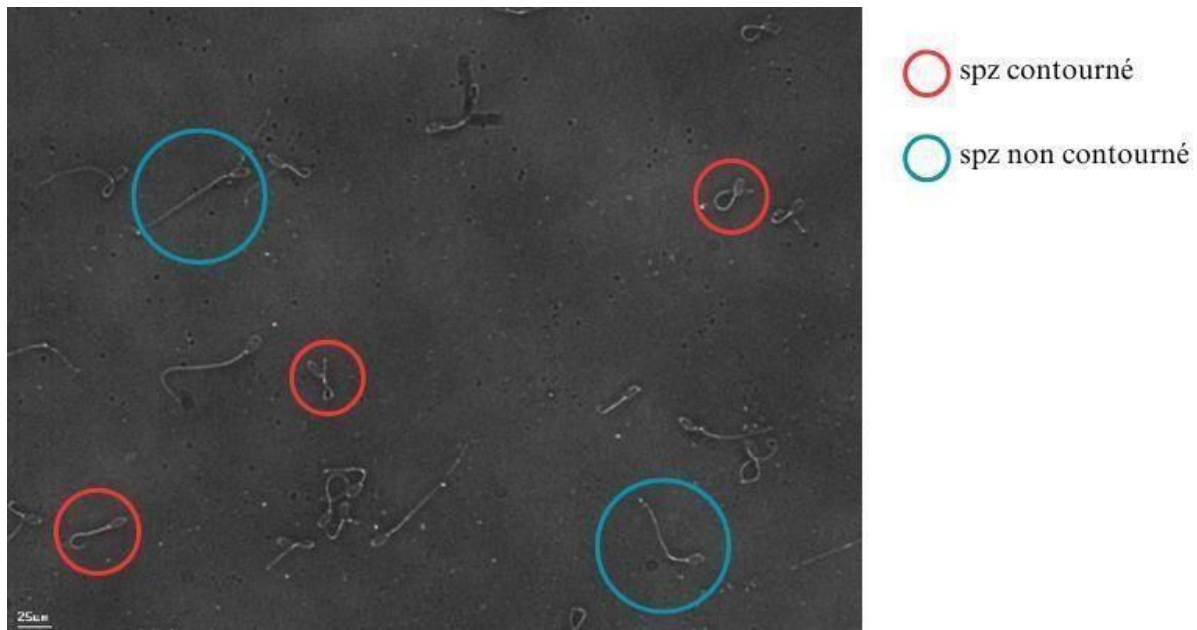


**Figure 26** : la solution hypo-osmotique.

**b- La Réalisation du test hypo-osmotique :**

Dans un tube Eppendorf nous avons mélangé 100  $\mu$ L de solution hypo-osmotique avec 10  $\mu$ L de sperme dilué. Le tube est ensuite placé dans une étuve réglée à 37 °C pendant 30 minutes. Après ce temps, une goutte du mélange est prélevée et déposée sur le bord d'une lame, puis étalée à l'aide d'une autre lame pour réaliser un frottis. La lame est laissée à l'air libre pour sécher.

L'observation microscopique est effectuée au grossissement 20x, Les spermatozoïdes à queue gonflée ou contournée sont considérés comme cellules spermatiques viables et les autres qui n'ont pas cette aspect sont considérées comme mortes (**figure27**), Au total, nous avons compté 100 spermatozoïdes dans différents champs pour l'analyse.



**Figure 27 :** observation microscopique des spermatozoïdes contournés et non contournés après test hypo-osmotique au Gr. x20.

#### I.6. Mesure Statut oxydatif :

##### Matériel :

- Gonades de lapins
- Eau distillée
- Solution d'ABTS (7 mM)
- Persulfate de potassium (2,45 mM)
- Broyeur électrique
- Centrifugeuse (1210 tr/min, 10 min)
- Tubes Eppendorf (2 mL)
- Spectrophotomètre UV-Visible (734 nm)
- Cuves pour spectrophotomètre
- Micropipettes et embouts stériles
- Chronomètre

**Méthode :****a- Préparation des échantillons :**

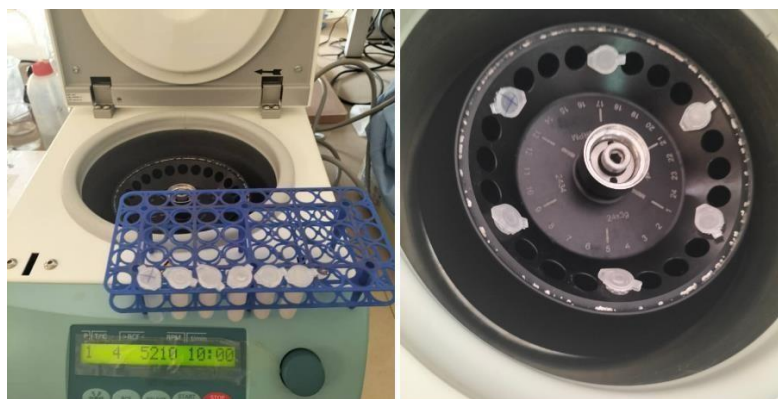
Les échantillons sont répartis selon trois conditions de réfrigération (3 jours à 4 °C) :

- **Gonade seule**
- **Gonade + Tampon tris**
- **Gonade + PEG/VitE**

Nous avons d'abords préparé un broyat en homogénéisant 1 g de tissu de la queue épидидymaire dans 10 ml d'eau distillée, à l'aide d'un broyeur électrique (**figure28**). La solution obtenue est, ensuite, centrifugée pendant 10 minutes à 1210 tr/min (**figure29**). Le surnageant récupéré a servi pour le test ABTS.



**Figure 28 :** Broyat de la queue épидидymaire.



**Figure 29 :** La centrifugation.

### **b- Préparation du radical ABTS<sup>•+</sup> :**

Le radical ABTS<sup>•+</sup> est obtenu en mélangeant 7 mM d'ABTS à 2,45 mM de persulfate de potassium, incubé à l'obscurité pendant 12 à 16 heures. Avant utilisation, la solution est diluée avec de l'eau distillée jusqu'à une absorbance de  $0,70 \pm 0,02$  à 734 nm.

La solution d'ABTS<sup>•+</sup> est préparée conformément à la méthode de (Re et al.,1999). Le réactif est utilisé après incubation et stabilisation préalable.

### **c- Analyse de l'activité antioxydante par spectrophotométrie :**

Nous avons évalué l'activité antioxydante par le test ABTS, en mélangeant 10  $\mu$ L de chaque échantillon avec 1 ml de solution d'ABTS<sup>•+</sup> dans des cuves. Quatre conditions ont été testées après 3 jours de réfrigération à 4 °C : témoin, gonade seule, gonade + Tris, et gonade + Peg-vitE. Les cuves sont remplies à l'aide d'une micropipette (1), placées dans la boîte à ABTS (2), puis insérées une à une dans le spectrophotomètre pour une lecture à 734 nm après 6 minutes d'incubation (3) (figure30).



**Figure 30 :** Mesure de l'activité antioxydante par spectrophotométrie.

# **Résultats et discussion**

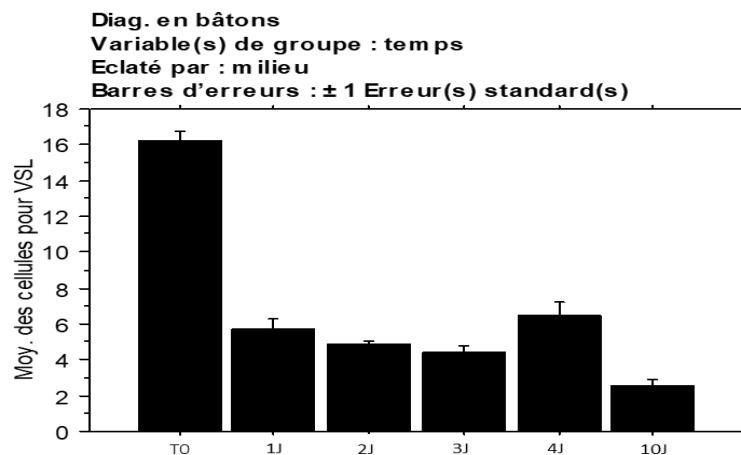
## II. Résultats et discussion

### II.1. Paramètres de mobilité :

#### II.1.1. Paramètres de mobilité du sperme prélevé des gonades réfrigérées à 4°C, sans milieux de conservation :

##### II.1.1.1. VSL :

La figure représente la VSL des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C, sans milieux de conservation.

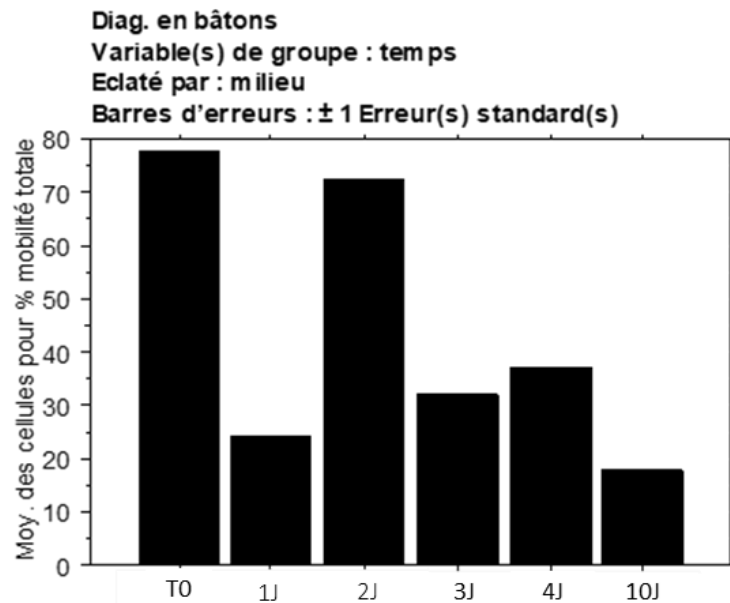


**Figure 31 :** Diagramme en bâtons représentant la VSL des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C sans milieux de conservation.

La VSL des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées sans milieu diminue progressivement avec le temps (**figure 31**) Nous avons noté une VSL maximale à T0 (16μm/s) puis une diminution remarquable après un 1jour (5,7 μm/s) de réfrigération. La VSL continue à diminuer avec des valeurs relativement proches jusqu'au dixième jour (2,5μm/s).

##### II.1.1.2. Mobilité totale :

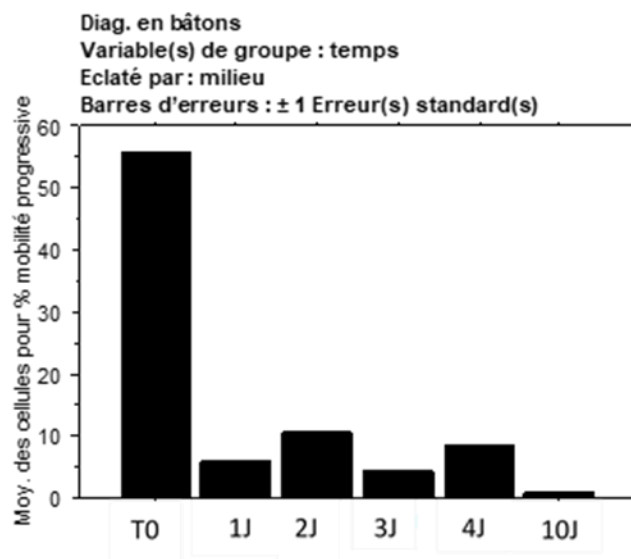
La figure représente la mobilité totale des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C sans milieux de conservation.



**Figure32 :** Diagramme en bâtons représentant la mobilité totale des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C sans milieux de conservation.

La (**figure 32**) montre que le pourcentage des spermatozoïdes mobiles diminue remarquablement après un jour de réfrigération (24,01% vs 77,34% à T0). Mais reste fluctuante jusqu'au dixième jour (10J) où le plus faible pourcentage est noté (18,05%).

### II.1.1.3. Mobilité progressive :



**Figure 33 :** Diagramme en bâtons représentant la mobilité progressive des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées sans milieux de conservation à 4°C.

À T0, le pourcentage des spermatozoïdes progressifs est élevé (65,47%). Après un jour (1J) de réfrigération ce pourcentage diminue fortement (5,87%), pour arriver à une valeur minimale à 10J (0,86%) (**figure 33**). Par ailleurs, nous remarquons une légère remontée du pourcentage de mobilité progressive le deuxième jour (2J) (10,63% vs 5,87% 1J) et le quatrième jour (4J) (8,42% vs 4,31% à 3J).

### Discussion :

D'après les résultats (**figures 31,32,33**) obtenus après l'évaluation des paramètres de mobilité des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C sans milieux ; Nous observons que le sperme avant réfrigération présente une très bonne qualité avec des valeurs élevées pour les trois paramètres de mobilité.

Après réfrigération, les spermatozoïdes analysés ont toujours montré la présence de spermatozoïdes mobiles jusqu'au dixième jour (10J), ce qui correspond au résultat noté par **Iranpour et Valojerdi (2013)** chez la souris où il a trouvé que les spermatozoïdes restent mobiles jusqu'à 12 jours. Cependant après un 1jour de réfrigération, les paramètres de mobilité ont, remarquablement baissé. Cela est probablement dû à la forte sensibilité des spermatozoïdes du lapin au choc thermique (**Nishijima et al.,2021**), qui provoque la diminution de motilité et l'activité métabolique (**white,1993**).

La remontée importante de la mobilité totale au 2em jour (72,34%), ainsi que la fluctuation des pourcentages de mobilité totale et progressive de 1J à 10J, pourrait avoir une relation avec les variations du taux initial de mobilité dans les différents échantillons. Au 3em et au 4em jour, la mobilité totale diminue et la mobilité progressive reste basse. Contrairement aux résultats observés chez le porc où la mobilité progressive reste élevée même après quelques jours de réfrigération (78,80% au 3em jour et 74,30% au 4em jour) (**Ydiaquez-miranda et al., 2021**). Cette déférence peut être due à la structure plus fragile de la membrane spermatique du lapin (**Nishijima et al.,2021**), Par contre chez les félins, **Toyonga et al. (2010)** ont observé une chute de mobilité après 48 à 72h de réfrigération. La chute marquée de la mobilité progressive après réfrigération pourrait s'expliquer par l'exposition des spermatozoïdes à un stress oxydatif prolongé et à une dégradation cellulaire (**Nishijima et al.,2021**).

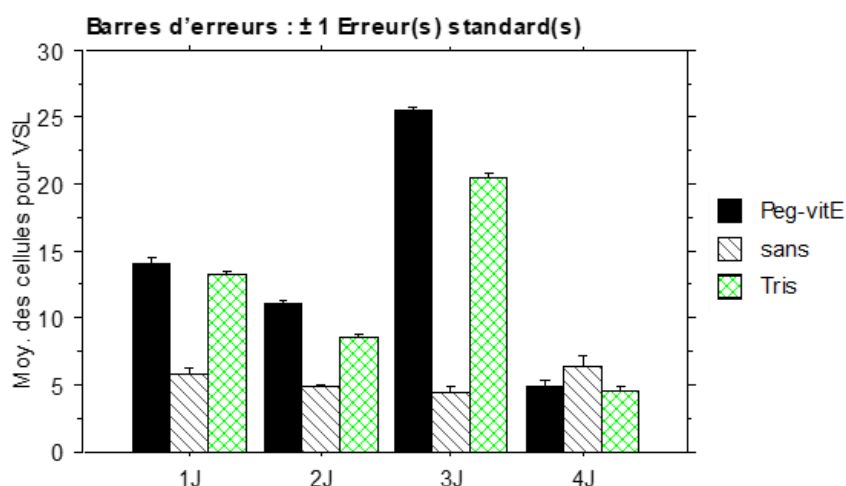
A 10jour, tous les paramètres de mobilité ont atteint leur niveau minimal (mobilité totale = 18,05%, mobilité progressif = 0,86%, VSL fortement réduite), ces résultats de mobilité totale sont similaires à celles observées chez la souris après 10jour de réfrigération (18%) (**Iranpouret Valojerdi, 2013**).

Le pourcentage des spermatozoïdes progressifs est important dans l'évaluation du potentiel fécondant d'un sperme donné, sa diminution indique que les spermatozoïdes ont perdus leur capacité d'atteindre l'ovule et de la féconder, ce qui diminue leur potentiel fécondant. D'après les critères de L'OMS (1999), une mobilité progressive des spermatozoïdes ( $\geq 50\%$ ) est associée à une augmentation significative de la probabilité de fécondation.

### II.1.2. Paramètres de mobilité du sperme prélevé des gonades réfrigérées à 4°C avec milieux de conservation :

#### II.1.2.1. VSL :

La figure représente la VSL des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C, avec milieux de conservation.



**Figure 34 :** Diagramme en bâtons représentant la VSL des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C, avec milieux de conservation.

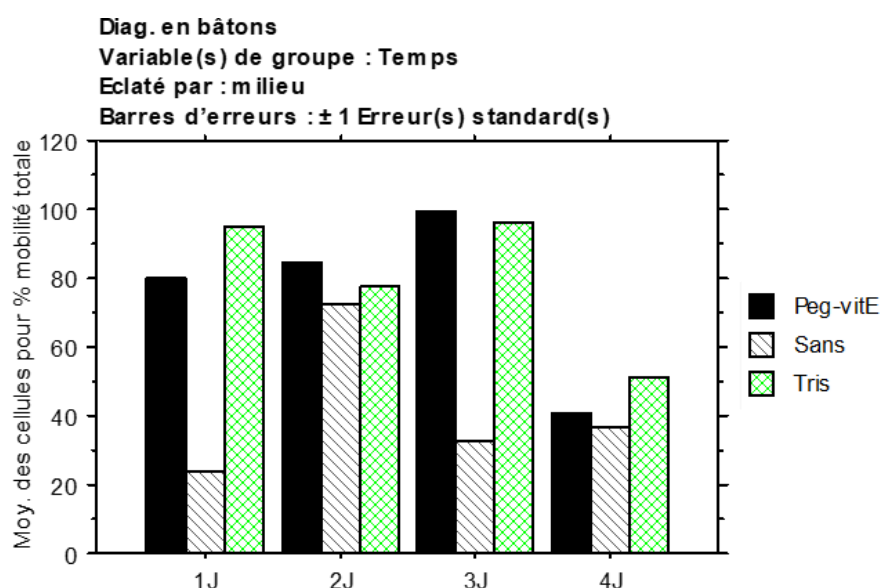
D'après la (**figure 34**), la vitesse progressive linéaire (VSL) des spermatozoïdes conservés pendant 4 jours à 4°C, présente des différences nettes selon les conditions de leurs réfrigération (sans milieu, dans le Tris, dans le complexe PEG/VitE). Les deux milieux ont donné des résultats de VSL meilleurs que ceux de l'échantillon conservé sans milieu.

Au troisième jour (3J), la valeur de la VSL des spermatozoïdes issus des gonades conservées sans milieu, est très faible (3 $\mu\text{m/s}$ ) par rapport à ceux conservés dans le Tris ou dans

le PEG/VitE (20, 25  $\mu\text{m/s}$ , respectivement). Ce qui prouve l'impact négatif du froid sur les spermatozoïdes et l'effet bénéfique des milieux utilisés.

### II.1.2.2. Mobilité totale :

La figure 35 représente la mobilité totale des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C, avec milieux de conservation.



**Figure35 :** Diagramme en bâtons représentant la mobilité totale des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C, avec milieux de conservation.

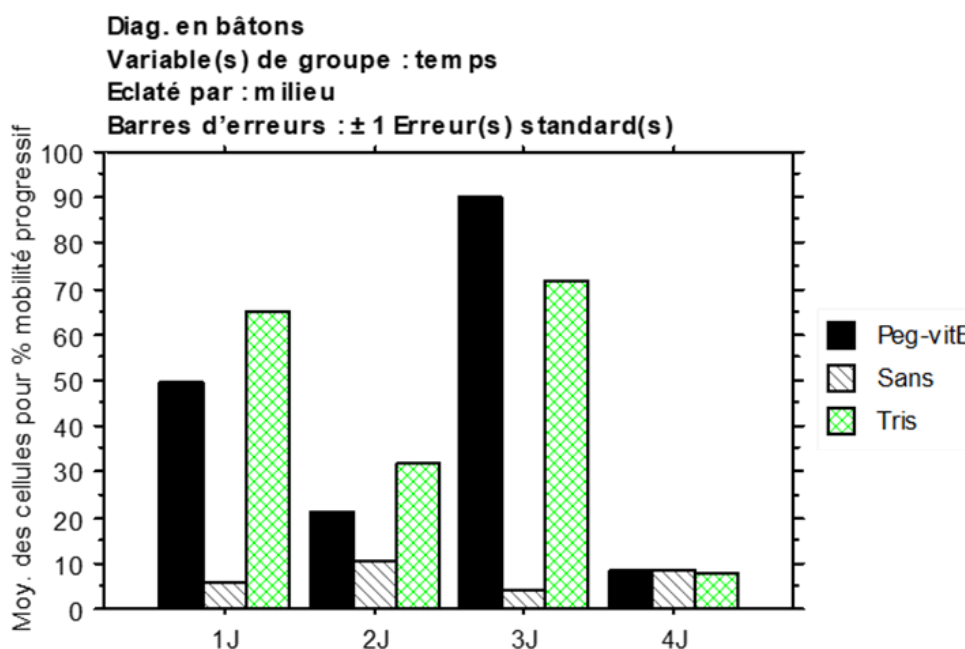
La mobilité totale des spermatozoïdes a nettement varié selon le type de milieu utilisé et la durée de conservation à 4 °C. Dès le premier jour, les résultats ont montré que les spermatozoïdes issus de gonades conservées dans le milieu Tris ont gardé une très bonne mobilité (94.8%), ces derniers sont, donc, bien protégé par le tampon. La mobilité est aussi bonne dans le milieu PEG/VitE (79,7 %) par contre elle a fortement diminué en absence du milieu (25 %), Cela montre que le froid abîme rapidement les spermatozoïdes et affecte leur capacité à se déplacer (**Watson, 2000**) et que l'association PEG/VitE à, donc, pu protéger les spermatozoïdes contre les effets du froid.

A partir du deuxième jour, le pourcentage des spermatozoïdes mobiles issus des gonades Conservées dans les deux milieux sont supérieurs à celui des spermatozoïdes issus des gonades conservées sans milieu (**Figure 35**). La meilleure mobilité est notée dans le milieu PEG/VitE à 2J (84 % vs 77% dans le Tris et 72% sans milieu) et à 3J (99,5% vs 96% dans le Tris et 32 % sans milieu). Ces résultats montrent l'effet protecteur exercé par le complexe PEG/VitE.

Cependant, au quatrième jour, la mobilité diminue et le meilleur pourcentage est noté dans le milieu Tris. (51 % vs 40 % dans PEG/VitE et 36 % sans milieu).

### II.1.2.3. Mobilité progressive :

La figure 36 représente la mobilité totale des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C, avec milieux de conservation.



**Figure 36 :** Diagramme en bâtons représentant la mobilité progressive des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C avec milieux de conservation.

Mobilité progressive, qui correspond au mouvement en ligne droite des spermatozoïdes, est un critère essentiel pour évaluer leur capacité à féconder. Sur la (**figure 36**), nous observons clairement, que les deux milieux de conservation ont pu protéger les spermatozoïdes et maintenir un taux de mobilité progressive élevé jusqu'à 3J ; avec une dominance dans le Tris au début (64.98 % à 1J et 31.94% à 2J), puis une dominance dans le complexe PEG/VitE à 3J (90 % vs 71% dans le Tris). Cela montre que ce milieu antioxydant a offert à ce stade, une excellente protection aux spermatozoïdes. Nous observons aussi qu'au quatrième jour, la mobilité progressive est très faible dans tous les échantillons, avec des pourcentages inférieurs à 10 %.

**Discussions :**

Les résultats des trois graphes (**figures 34, 35, 36**) montrent que les milieux (Tris et PEG/VitE) ont bien conservé les paramètres de mobilité des spermatozoïdes pendant trois jours de réfrigération.

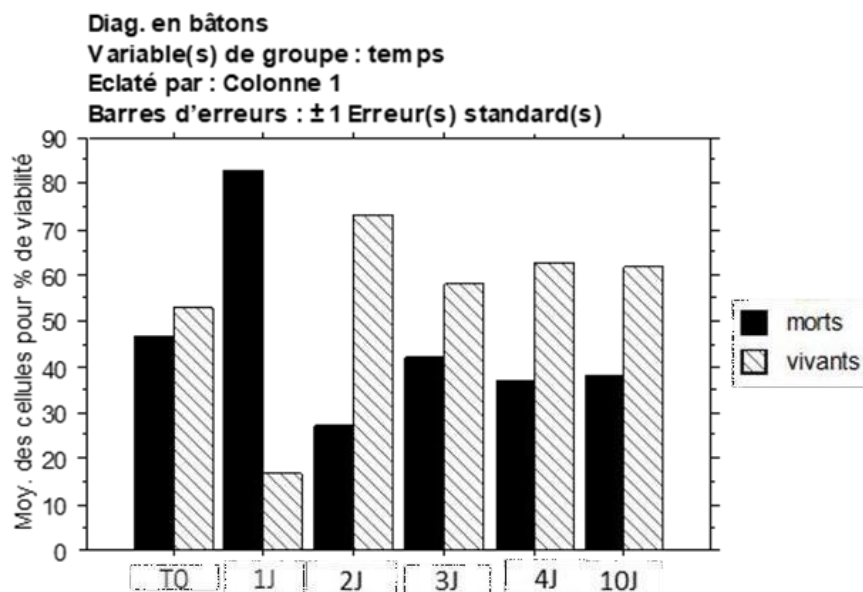
Ils ont donné de meilleurs résultats de mobilité totale (96%–99 % respectivement). En effet, le tampon Tris (Tris, acide citrique et fructose ou glucose) constitue la base des dilueurs fréquemment utilisés pour la conservation du sperme du lapin (**Mocé et Vicente, 2009**) ; il maintient bien la motilité et la viabilité des spermatozoïdes pendant plusieurs jours de refroidissement (**Purdy, 2006**).

Par ailleurs, le meilleur pourcentage de mobilité progressive des spermatozoïdes issus des gonades conservées dans les deux milieux est noté après trois jour de réfrigération (71%) pour le Tris, 90% pour PEG/VitE). Cela s'explique par l'effet bénéfique de la vitamine E sur les spermatozoïdes pendant leur réfrigération ; cet effet est probablement prolongé par l'amélioration de la solubilité de la vitamine E exercée par le PEG, ce qui a maximisé son effet antioxydant (**Amokrane et al.,2020**). En effet, la vitamine E est un antioxydant liposoluble, capable de neutraliser directement l'anion superoxyde, le peroxyde hydrogène et le radical hydroxyle (**Laghouati et al., 2023**).

Nos résultats ont donc, montré que les deux milieux utilisés ont permis, non seulement de préserver les spermatozoïdes, mais aussi de leur fournir l'énergie nécessaire pour un mouvement dynamique, essentiel à la fécondation (**Zhu et al.,2015**).

**II.2. Le test d'intégrité membranaire****II.2.1. Le test d'intégrité membranaire des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C sans milieux**

La figure 37 représente le pourcentage des spermatozoïdes vivants et morts prélevés des gonades réfrigérées sans milieu de conservation à 4°C.



**Figure 37 :** Diagramme en bâtons représentant le pourcentage des spermatozoïdes vivants et morts prélevées des gonades réfrigérées sans milieux de conservation à 4°C.

La (**figure 37**), montre que généralement, de T0 jusqu'au dixième jour de réfrigération sans milieu de conservation, le pourcentage des spermatozoïdes vivants, ayant une bonne intégrité membranaire est supérieur à celui des spermatozoïdes morts.

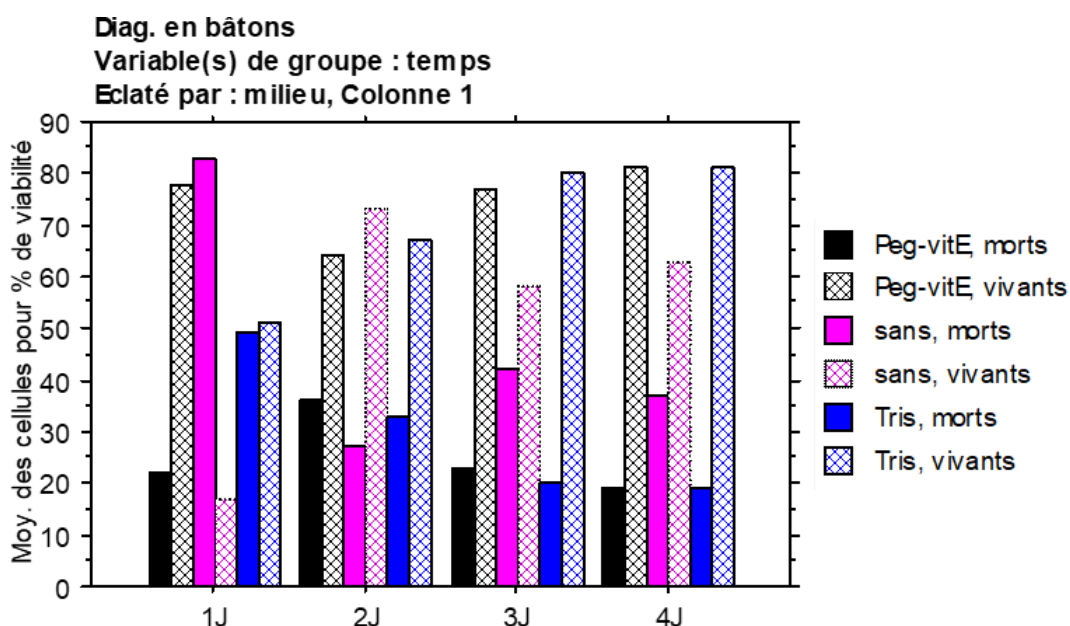
#### Discussion :

Les résultats obtenus indiquent que même sans milieu de conservation, un pourcentage élevé de spermatozoïdes maintenus dans les gonades réfrigérées à 4°C, ont conservé l'intégrité de leur membranaire et sont restés viables jusqu'à 10J de réfrigération (62%). Le même résultat est noté chez d'autres espèces comme le porc où les spermatozoïdes sont restés vivants jusqu'à cinq jours avec un pourcentage de viabilité égale à 65,30% (**Ydiaquez-miranda et al., 2021**). Chez la souris la viabilité des spermatozoïdes au bout de 10jour de réfrigération est égale à 27,7% (**Iranpouret Valojerdi 2013**).

Nos résultats ont, donc, montré que même si la mobilité diminue avec le temps de réfrigération, les résultats du test host ont montré que plusieurs spermatozoïdes gardent une bonne intégrité membranaire, ce qui veut dire qu'ils sont encore vivants et fonctionnels malgré leur faible capacité à se déplacer (**purdy, 2006**).

### II.2.2. Le test d'intégrité membranaire des spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées à 4°C dans des milieux différents :

La figure 38 représente le pourcentage des spermatozoïdes vivants et morts prélevés des gonades réfrigérées avec milieux de conservation à 4°C.



**Figure 38 :** Diagramme en bâtons représentant le pourcentage des spermatozoïdes vivants et morts prélevés des gonades réfrigérées avec milieux de conservation à 4°C.

Le test d'intégrité membranaire (HOST) réalisé sur les spermatozoïdes conservés à 4 °C dans les gonades, montre que la réfrigération sans milieu de conservation entraîne une forte mortalité dès le premier jour, (**figure 38**) avec une viabilité très faible (16,42 %). Dans les trois jours de conservation qui suivent, le pourcentage de viabilité reste élevé mais moins que ceux notés dans les milieux au troisième (77% dans le PEG/VitE vs 80% dans le Tris) et au quatrième jour (81% dans les deux milieux). En effet, l'ajout des milieux de conservation a protégé la membrane spermatique. Dès le premier jour (1J), ces milieux ont permis de maintenir une bonne viabilité avec un meilleur pourcentage dans le PEG/VitE (78% vs 51% dans le Tris, 16,42% sans milieu).

Au cours des trois jours de conservation qui suivent, l'effet bénéfique du Tris sur la protection de l'intégrité membranaire est exprimé par les pourcentages de viabilité importants dans ce milieu (67,5 à 2J, 80% à 3J) et égale à celui du PEG/VitE (81%) au quatrième jour.

**Discussions :**

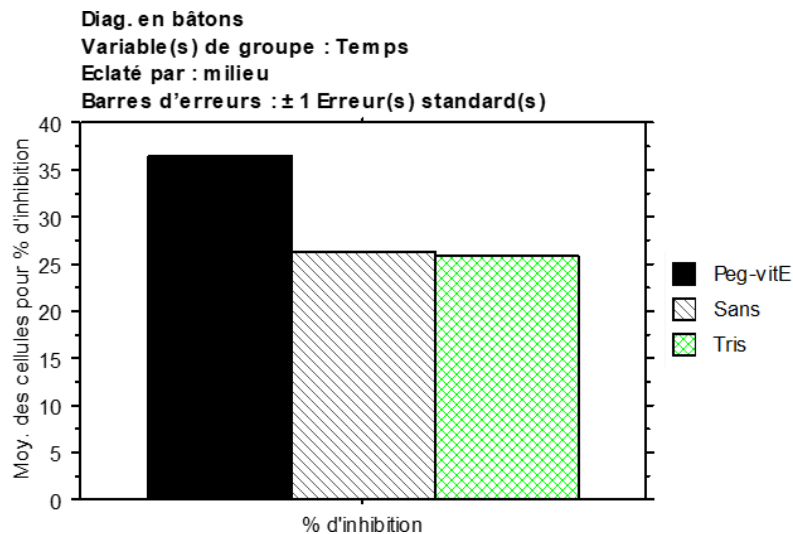
Les résultats du test HOST ont montré que, globalement, le pourcentage des spermatozoïdes ayant une membrane intacte est restée élevé (50%) du deuxième au quatrième jour de conservation à 4 °C, que ce soit issus des gonades réfrigérées sans milieu ou dans un milieu de conservation. Les spermatozoïdes sont donc, protégés dans l'épididyme même si nous ne leur n'avons pas procuré les conditions appropriées de conservation. En effet, les sécrétions des cellules épидидymaires, riches en nutriments, oligoéléments, protéines et en enzymes antioxydantes, contribuent à la conservation des spermatozoïdes pendant plusieurs mois et les protègent contre les infections et le stress oxydatif (**Pons-Rejon et al., 2020**). Elles sécrètent aussi, des molécules lipidiques qui renforcent la membrane spermatique (**Yanagimachi R, 1998**).

Par ailleurs, l'ajout des milieux de conservation a mieux conservé l'intégrité de la membrane spermatique, surtout le troisième et le quatrième jour, lorsque la viabilité a diminué dans l'échantillon sans milieux. Ce qui pourrait être expliqué par des effets complémentaires exercés par les différents milieux (le milieu intra épидидymaire, le Tris et le PEG/VitE).

Ces résultats confirment que l'utilisation de milieux enrichis en antioxydants constitue une stratégie efficace pour préserver la qualité des spermatozoïdes lors de la réfrigération dans les gonades.

**II.3. Mesure de statut oxydatif :**

La figure 39 représente le pourcentage d'inhibition de l'ABTS dans les spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées avec milieux de conservation à 4°C.



**Figure 39 :** Diagramme en bâtons représentant le pourcentage d'inhibition de l'ABTS dans les spermatozoïdes prélevés des gonades réfrigérées avec milieux de conservation à 4°C.

Les résultats représentés dans la **figure 39**, montrent que dans l'échantillon conservé dans le milieu PEG/VitE le pourcentage d'inhibition de l'ABTS est nettement plus élevé (36,41%) comparé à ceux conservés dans le Tris (25,89%) et dans le témoin (sans milieu) (26,26%). Ces résultats indiquent que le milieu PEG/VitE présente une meilleure protection contre le stress oxydatif grâce à la capacité anti-oxydante de la vitamine E à neutraliser les radicaux libres (**Goudable et Favier, 1997**) et à la présence du PEG, qui améliore la solubilité de la vitamine E (**Amokrane et al., 2020**).

Par contre, le milieu Tris n'a pas montré de différence significative par rapport au témoin, ce qui suggère qu'il n'a pas exercé un effet antioxydant.

# **Conclusion Et Perspectives**

### **Conclusion et perspectives**

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de la réfrigération à 4 °C des gonades du lapin, suivie du prélèvement du sperme épидидymaire, pour évaluer la qualité des spermatozoïdes au fil du temps. L'objectif était de voir si cette méthode permettait de conserver les capacités des spermatozoïdes, et si certains milieux de conservation pouvaient aider à mieux les protéger. À travers des analyses portant sur la mobilité (CASA), l'intégrité membranaire (test HOST) et le stress oxydatif (test ABTS), cette étude a permis de mettre en évidence l'impact de la conservation au froid sur les spermatozoïdes. Ainsi que l'effet bénéfique du tampon Tris, et de l'association de la PEG/VitE dans la protection des spermatozoïdes.

Les résultats ont montré qu'une simple réfrigération des gonades sans protection entraîne une altération progressive des paramètres spermatiques. Cependant, l'utilisation de milieux comme le Tris et surtout l'association PEG/VitE a permis de limiter ces effets délétères, en maintenant une meilleure mobilité, une intégrité membranaire plus élevée et un stress oxydatif réduit.

Cette approche présente un intérêt particulier dans des contextes où la récupération immédiate du sperme est impossible, notamment en conservation post-mortem, en transfert de matériel génétique ou dans certains programmes de reproduction assistée. Elle ouvre la voie à des stratégies simples, efficaces et peu coûteuses pour la préservation de la fertilité animale.

Cette étude constitue, donc, une base utile pour de futures recherches visant à optimiser les protocoles de réfrigération des gonades entières du lapin, et à mieux comprendre les mécanismes de protection offerts par les molécules utilisées dans les milieux de conservation.

En perspectives, Il serait intéressant de réaliser une étude prolongée, plus de dix jours, pour savoir exactement au quel jour les spermatozoïdes du lapin conservés à 4°C, seront complètement immobiles et morts. Il est aussi nécessaire d'estimer la fertilité du sperme récupéré des gonades conservées dans différentes conditions, en réalisant une insémination artificielle.

# **Références Bibliographiques**

-A-

**Abril-Sánchez S., Freitas-de-Melo A., Giriboni, J., Santiago-Moreno, J., et Ungerfeld, R. (2019).** *Sperm collection by electroejaculation in small ruminants : A review on welfare problems and alternative techniques.* Animal Reproduction Science, 205, 1–9.

**Akmal M., Qadri JQ., Al-Waili NS., et al. (2006).** *Improvement in human semen quality after oral supplementation of vitamin C.* 9 : 440-2.

**Alvarino J.M.R. (2000).** *Reproduction performance of male rabbits.* In proc.7th world rabbit congress , july 2000, valencia , spain , vol. A, 13-35.

**Amokrane A., Kaidi R. et Iguer-Ouada M. (2020).** *The effect of vitamin E and poly ethylene glycol (PEG) association on chilled rabbit sperm: Impact on sperm motility and oxidative stress status.* CryoLetters, 41(1), 19-25.

**Andrabi S. M. H. (2007).** *Fundamental Principles of Cryopreservation of Bos taurus and Bos indicus Bull Spermatozoa.* Mini Review, International Journal of Agriculture & Biology, 9 (2), 367-369.

**Andrieu R. (1974).** *Conservation du sperme de lapin sous forme liquide.* E.N.S.A., Montpellier, pp. 10.

**Arriola J. et Foote R.H.(2001).** *Accessory sperm as an indication of fertilizing ability of rabbit spermatozoa frozen in egg yolk – acetamide with detergent.* . J. of Andrology, 22(3):458-463.

**Auger J., Eustache F. (2000).** *Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée.* Andrologie, 10 : 358-373.

**Azawi O. I. et Hussein E.K. (2013).** *Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 C.* Veterinary Research Forum, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

-B-

**Baril G., Chemineau P., Cognie Y., Guérin Y., Leboeuf B., Orgeur P. et Vallet J. C.(1993).** *Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins.* Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome. pp. 129-13

**Barone R.** *Anatomie comparée des mammifères domestiques : tome 4 : splachnologie : laboratoire d'anatomie.* Lyon. ENV.-879P

**Bezerra M.J.B., Arruda-Alencar J.M., Martins J.A.M., Viana A.G.A ., Viana-Neto A.M., Rêgo J.P.A., Oliveira R.V., Lobo M., Moreira A.C.O., Moreira R.A., Moura A.A .(2019).** *Major seminal plasma proteome of rabbits and associations with sperm quality.* Theriogenology.,128,156-166

**Bedossa. (1998).** *Exploration de la fonction de reproduction.* Versant masculin. Cahier de formation, biologie médicale. N0 42, 12-15.

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

**Bertolla R. P. (2020).** *Sperm biology and male reproductive health.* Scientific Reports, 10, 21879.

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

**Beyer R. E.(1994).** *The Role of Ascorbate in Antioxidant Protection of Biomembranes: Interaction with Vitamin E and Coenzyme Q.* Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 26 (4).

**Boiti C., Castellini C., Besenfelder U., Theau-Clément M., Liguori L., Renieri T., Pizzi F. (2005).** *Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen.* World Rabbit Science, 13, 71 91.

**Boucelha L., Djabbar R. (2014).** *Les espèces réactives d'oxygène (ROS) : Dr Jekkyl and mister Hyde ou comment l'oxygène peut 'il devenir toxique.* [Conférence], université Houari Boumdienne, Algérie, 17p.

**Boussit D. (1989).** *Reproduction et insemination artificielle en cuniculture* assoc Frcuniculture, Lempdes france, 234p.

-C-

**Cabannes, C. (2008).** *Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans les espèces bovine, canine et humaine* (Doctoral dissertation, Université Toulouse 3).

**Caillat L., Meunier-Salinas L. et Coignard M.A .(2015).** *Régénération continue des bains de PEG utilisés pour la consolidation des bois archéologiques gorgés d'eau. Science et Conservation*, n° 42:115-120.

**Campos A.C.N., Guerreiro M. E. F., Gadelha, C. R. F., Catunda, A. G. V., Estevam F. N. L., Meneses, H.M. (2012).** *Principais características do sêmen de coelho da raça Nova Zelândia Branco criados em clima tropical.* *Ciência Animal*, 22(1), 284-295. Universidade Federal do Ceará (UFC).

**Castellini C. 2008.** *Semen production and management of rabbit bucks.* *Dept. of Applied Biology*, University of Perugia, Italy, 9thWorld Rabbit Congress-June 10-13.

**Chatterjee S. et Gagnon C. (2001).** *Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing.* *Molecular Reproduction and Development*, 59(4), 451–458

**Chiha F., Benkara Y., Sellami A., Karouche S. (2016).** *Stress oxydant : Influence d'une complémentation nutritionnelle en antioxydant set adaptation a l'exercice physique.*12p

**Chocu S.(2014).** *Découverte de nouvelles protéines impliquées dans la spermatogenèse chez le rat.* *Biologie de la reproduction.* Université de Rennes.

**Chrenek P., Trandzik J., Massanyi P., Makarevich A., Lukac N., Peskovicova D., Paleyanda R. (2007).** *Effect of transgenesis on reproductive traits of rabbit males.* *Animal Reproduction Science.* 99: 127–134.

**Combes S., et Dalle Zotte A. (2005).** *La viande de lapin : valeur nutritionnelle et particularités technologiques.* A review [Communication présentée à une conférence].

**-D-**

**Da Silva N., Cortez-Retamozo V., Reinecker H.C., Wildgruber M., Hill E., Brown D., Swirsk F. K., Pittet M. J., et Breton S. (2011).** *A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis.* *Reproduction*, 141(5), 653–663.

**De Castro M. P. V., Vicente J. S., et Lavara R. (1999).** *Effet du nombre de spermatozoïdes sur la fertilité de la semence conservée 24 heures chez le lapin.* In *Annales de zootechnie* (Vol. 48, No. 5, pp. 407-412.

**Desmeir Th. (2016).** *Les antioxydants de nos jours : définition et applications.* [Thèse de doctorat], Université de Limoges, France, 88p.

**Řuračková Z. (2009).** *Quelques connaissances actuelles sur le stress oxydatif.* Physiological Research, 58(4), 455–460.

**-E-**

**Espinosa E., Josa A., Vilorio A.(2009).** Fisiologia de la reproducción en el conejo. 135/139.

**Esteso M. A., & Romero C. M.(2024).** *Cyclodextrins: Properties and Applications.* International Journal of Molecular Sciences, 25(8), 4547.

**Esteves P. J., Lopes A. M., et Abrantes J. (2022).** *The rabbit as an animal model in immunology and reproduction research.* Journal of Comparative Immunology, 76(2),

**-F-**

**Fadel A.M., Ghallab A.M., et Abou-ahmed M.M.(2003).** *Comparison between TRIS buffer and INRA-82 extenders on the quality of chilled rabbit spermatozoa.* World Rabbit Sci., 28: 13-18

**Favier A. (2003).** *Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.* L'actualité chimique. p : 108-115.

**Fernandez N.C., Lozier A., Flament C. et Zitvogel L. (1999).** *Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité naturelle.* Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 39 (4), 237-239.

**Fortun-Lamothe L., Theau-Clément M., Combes S., Allain D., Lebas F., Le Normand B. et Gidenne T.(2015).** Chapitre 2 : Physiologie. in Gidenne T., *Le Lapin : de la biologie à l'élevage*, Editions Quae Versailles, France, 39-83.

**Fleming S. D., & Thomson L. K. (2020).** *The oxidative stress of human sperm cryopreservation: A review.* International Journal of Molecular Sciences, 21(14), 5146.

**Francisco D.A.A. et Luis A. R.F. (2003).** *Analysis of seminal quality, a tool in fertility experimental toxicology study.* p44-46.

-G-

**Gaballa S.A., Naguib Y.W., Mady F. M. et Khaled K. A. (2024).** *Polyethylene glycol : properties, applications, and challenges.* Journal of Advanced Biomedical and Pharmaceutiical Sciences, 7,26-36.

**Garreau H., Theau-Clement M., gidenne T.** Anatomie, taxonomie, origine, évolution et domestication. gidenne t (2015) in: *Le lapin , de la biologie à l'élevage* ., Quae pp 13-31.

**Gloria A., Carluccio A., De Amicis I., Robben D. et Contri A. (2011).** *Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey.* Animal Reproduction science, 128(1-4), 118-122.

**González-López W. A., Patel D. M., Duncan N. et Beirão J. (2021).** *Is it possible to store spotted wolffish (Anarhichas minor) sperm by refrigeration?* Fish Physiology and Biochemistry, 47(3), 725–735.

**Goudable J., Favier A. (1997).** *Radicaux libres oxygénés et antioxydants.* Nutrition Clinique et Métabolisme, 11:115-120.

-H-

**Hanzen Ch. (2016).** *La propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme des ruminants* ( supports de cours pour les 1<sup>er</sup> doctorat, faculté de médecine vétérinaire, université de liège).

**Harald Sieme Harriëtte Oldenhof Willem F. Wolkers. (2016).** *Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation.* Animal Reproduction Science ,169 :2-5.

**Hayden S. S., Blanchard T. L., Brinsko S. P., Varner D. D., Hinrichs K. et Love C. C. (2015).** *The “dilution effect” in stallion sperm.* Theriogenology, 83(4), 772-777.

**Hegelen M. et Thiriet A.(2012).** Atlas photographique de l'anatomie clinique. *Petits mammifères à l'exception du furet.* Doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil.

**Hermo L., Oka R. et Morales C. R. (1994).** *Secretion and endocytosis in the male reproductive tract : a role in sperm maturation.* International review of cytology, 177, 105-189.

**Hermo L., Adamali H.I., Andonian S. (2000).** *Immunolocalization of CAII and H<sup>+</sup> V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymise.* J Androl 21(3) :376-391.

**Hoffer A.P., Hamilton D.W. et Fawcett D.W. (1973).** *The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis.* Anat Rec 175,169-201.

**-I-**

**Iranpour F. G., et Valojerdi M. R. (2013).** *The epididymal sperm viability, motility and DNA integrity in dead mice maintained at 4–6°C.* Iranian Journal of Reproductive Medicine, 11(3), 195–200.

**-J-**

**Jacob R. A. et Sotoudeh G. (2002).** *Vitamin C function and status in chronic disease.* Nutrition in Clinical Care, 5(1), 66–74.

**James E.R., Carrell D.T., Aston K.I., Jenkins T.G., Yeste M., Salas-Huetos A. (2020).** *The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction.* Int J Mol Sci.21(15), 53777.

**Jeyendran R.S., Van Der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G., Zaneveld L.J.D. (1984).** *Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.* J. Repro Fert., 70, 219-225.

**Johnson I. (1995).** *efficiency of spermatogenesis* , In book : microscopy research & technique ( pp 385 – 455) .

**-K-**

**Kabera F. (2008).** *Appréciation de la qualité de la semence bovine produite au centre national d'amélioration génétique (cnag) de dahra au senegal*, (mémoire de diplôme d'études approfondies de productions animales).

**-L-**

**Laghouati A., Belabbas R., Mattioli S., Dal Bosco A., Benberkane A., Bravi E., Sileoni V., Marconi O. et Castellini C. (2023).** *Effect of an extender enriched with Algerian date palm pollen on chilled semen characteristics of rabbit bucks at different ages.* World Rabbit Science, 31(2).

**Landrier J.F. (2011).** *Vitamine E et physiologie du tissu adipeux*. 18(2) : 83-87. Doi : 10.1684/ocl.2011.0370.

**Lebas F. (2000).** *Les besoins vitaminiques du lapin*. Cuniculture 27, P2- 199 – 209.

**Legendre M., Billard R. (1980).** *Cryoconservation du sperme de truite arc-en-ciel (salmo gairdneri R.)*. Bulletin Français de la pêche et de la pisciculture, 272,117-125.

**Léger C.L. (2000).** *La vitamine E : état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardiovasculaire, biodisponibilité*. OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids, 7(2), 83-88.

**Lone F. A., Islam R., Khan M. Z. et Sofi, K. A. (2011).** *Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram*. Animal Reproduction Science, 123(1–2), 54–59

**-M-**

**Malcotti V., Pelufo V., Bergamo N. et Aisen E. G. (2012).** *Recovery of epididymal spermatozoa from bull and red deer, stored at different times and temperatures before freezing– thawing*. Animal Production Science, 52.(8),741-745.

**Mandon M. (2015).** *Isolement des cellules basales épидидymaire et caractérisation de nouvelles fonctions*. Québec : Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique.

**Martinez-Garcia F., Regadera J., Cobo P., Palacios J., Paniagua R. et Nistal M. (1995).** *The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis*. Andrologia 27,199-206.

**Martinez-Pastor F., Garcia-Macias V., Alvarez M., Chamorro C., Herraes P., Paz P. D. et Anel L. (2006).** *Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer*. Theriogenology, 65(3), 471-485.

**Ydiaquez-Miranda M.A., Herrera-Barragán J.A., González-Lozano M. et Ávalos-Rodríguez A. (2021).** *Potential fertilizer of spermatozoa in porcine epididymal tail post-orchietomy*. Veterinary Research Forum, 12(3), 267–272.

**Methorst C., Huyghe E. & les membres du Comité d'Andrologie et de Médecine Sexuelle de l'Association Française d'Urologie, Sous-Comité Fertilité masculine du CAMS. (2014).** *Stress oxydant et infertilité masculine : physiopathologie et intérêt thérapeutique des antioxydants*. Progrès en Urologie, 24(HS3), 4–10.

**Meyer C. (2009).** *L'insémination artificielle de la lapine* : Note bibliographique. Document interne, UR18 Systèmes d'élevage et produits animaux, Département Environnement et Société, CIRAD, TA C18/A, BP 5035, 34398 Montpellier Cedex 5, Fran.

**Mocé E., Vicente J.S. (2009).** *Rabbit sperm cryopreservation: A review.* Animal Reproduction Science, 110 : 1-24.

**Mou J., Yong J. et Shao Z. (1994).** *Tris(hydroxymethyl)aminomethane (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) Induced a Ripple Phase in Supported Unilamellar Phospholipid Bilayers.* Animal Reproduction Science, 118: 236-247.

**Mukherjee D.P., Johari M.P., Bhattacharya P. (1951).** *The gelatinous mass in rabbit semen.* Nature. 168: 422 – 423.

**-N-**

**Noblanc A., Kocer A. et Drevet J. R. (2012).** Protection post-testiculaire des gamètes mâles contre les dommages radicalaires : *Le rôle de l'épididyme.* Médecine/Sciences, 28(5), 519–525.

**Nishijima K., Kitajima S., Matsuhisa F. et Niimi M. (2021).** *Strategies for highly efficient rabbit sperm cryopreservation.* Animals, 11(5), 1220.

**-O-**

**O'Donnelle L., stanton P. et de Krester D . M. (2017).** *Endocrinology of the male reproductive system and spermatogenesis* In Endotext. MDText.com,Inc .

**-P-**

**Pena Martinez A.I. (2004).** *Canine fresh and cryopreserved semen evaluation.* Anim. Reprod. Sci., 82-83, 209-224.

**Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O. (2002).** *Nutrition et stress oxydant : Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante.* Nutrition Clinique et Métabolisme, 16(4), 233–239.

**Poisson-moreau C. (2013).** *Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique.* (Thèse de doctorat, université paris-sud 11, école doctorale innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué).

**Pons-Rejon O., Gusman-Pérez D. et Morgado-Valle F. (2020).** *The role of epididymal proteins in sperme maturation and capacitation.* Andrology, 8(3), 643-657.

**Poujardieu B., Théau-Clément M.** *Productivité de la lapine et état physiologique.* Annales de zootechnie INRA/EDP Sciences, 1995, 44 (1), pp.29-39.

**Purdy P. H. (2006).** A review on *goat sperm cryopreservation.* Small Ruminant Research, 63(3), 215–225.

**-R-**

**Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice- Evans C. (1999)** *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.* Free Radical Biol Med 26(9-10):1231-1237.

**Robaire,B., et Viger R.S. (1995).** *Regulation of epididymal epithelial cell functions.*Biology of reproduction 52, 226-236.

**Robaire B., Hinton B.T., et Orgebin-Crist, M. C. (2006).** *The epididymis.* physiology of reproduction,1, 1071-1148.

**-S-**

**Sautejeau Rizzoni P. (2024).** *Contribution à l'étude de la congélation du sperme équin : influence de la durée d'équilibration.* Thèse de doctorat vétérinaire, Oniris – École nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation. Sciences du Vivant [q-bio]. HAL Id

**Saidani K., Ziam H., Hamiroune M., Righi S., et Benakhla A. (2019).** *Élevage des petits ruminants en Kabylie, Algérie, et perspectives de développement.* Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux, 72(2), 49–54.

**Singh A. K., Kumar A., et Bisla A. (2021).** *Computer-assisted sperm analysis (CASA) in veterinary science : A review.* Indian Journal of Animal Sciences, 91(6), 419–429.

**Sirieix D., Delayance S., Paris M., Massonnet-Castel S., Carpentier A. et Baron J. F. (1997).** *Tris-hydroxymethyl aminomethane and sodium bicarbonate to buffer metabolic acidosis in an isolated heart model.* Am. J. Respir. Crit. Care. Med., Vol. 155, pp. 957-963.

**Sun E.L. et C.J. Flickinger.** *Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis.* Am J Anat 1997 ; 154 :27-55.

**Soares J., Pinheiro A. et Esteves P. J. (2022).** *Le lapin comme modèle animal pour étudier les gènes de l'immunité innée : est-il meilleur que la souris ?* Médecine/Sciences, 38(9), 745–751.

**Sousa A. (2025).** *Spermatozoïdes : concentration, fabrication, taille, durée de vie, vitesse et schéma.* Journaliste scientifique.

**-T-**

**Thierry Gidenne., Hervé Garreau., Michèle Theau-clément. (2015).** Anatomie, taxonomie, origine, évolution et domestication, in book : le lapin : de la biologie à l'élevage, (pp14-37).

**Toyonaga M., Kaihara A. et Tsutsu T. (2011).** *The quality of cryopreserved sperm collected from feline caudal epididymides stored at room temperature.* Journal of Veterinary Medical Science, 73(10), 1395–1398.

**-V-**

**Veri J. P., Hermo L. et Robaire B. (1993).** *Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat.* Journal of andrology, 14(1),23-44.

**Vidament M. (2005).** French field results (1985-2005) on *factors affecting fertility of frozen stallion semen.* Animal Reproduction Science, 89 : 115-136.

**Vernet P., Aitken R. J. et Drevet J. R. (2004).** *Stratégies antioxydantes dans l'épididyme.* Endocrinologie moléculaire et cellulaire, 216(1-2), 31–39.

**Viudes-de-Castro M. P., Talaván A. G. et Vicente J. S. (2021).** *Evaluation of dextran for rabbit sperm cryopreservation:* Effect on frozen–thawed rabbit sperm quality variables and reproductive performance. Animal Reproduction Science, 226, 106714.

**-W-**

**Walke G., Gaurkar S. S., Prasad R., Lohakare T. et Wanjari M. (2023).** *The impact of oxidative stress on male reproductive function:* Exploring the role of antioxidant supplementation. Cureus, 15(7), e42583.

**White I. G. (1993).** *Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review.* Reproduction, Fertility and Development, 5(6), 639–658.

**Watson P. F. (2000).** *Les causes de la baisse de fertilité avec le sperme cryoconservé.* Reproduction, Nutrition, Development, 60–61, 481–492.

**World Health Organization. (1999).** *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction* (4th ed.). Cambridge University Press.

**-Y-**

**Yanagimachi R. (1998).** *Sperm-egg fusion.* Current Topics in Developmental Biology, 39, 1- 52.

**-Z-**

**Zeng W., Wang G., Zhang Q., Zhang Y., Chen Y. et Dong Q. (2016).** "Vitamin E Analogue Improves Rabbit Sperm Quality during the Process of Cryopreservation through Its Antioxidative Action." Frontiers in Veterinary Science, 3, 47.

**Zhu Z., Xiaotong F., Niv Y., Zhang N., Chuning F., Zhang P., et Zeng W. (2015).** *L'analogue de la vitamine E améliore la qualité du sperme de lapin pendant le processus d cryoconservation grâce à son action antioxydante,* PloS ONE, 10(12), e145383.

# Résumé

## **Résumé :**

Dans certaines situations, il n'est pas toujours possible de récupérer le sperme d'un animal immédiatement et par les méthodes habituelles. En effet, lorsqu'un animal de valeur génétique meurt subitement, la seule façon de préserver son patrimoine génétique est de conserver ses gonades.

Notre objectif été d'évaluer les caractéristiques des spermatozoïdes prélevés dans la queue de l'épididyme et leurs évolutions dans le temps ; ainsi que le rôle de l'association PEG/Vit E dans la préservation des paramètres de leur motilité et intégrité membranaire et dans leur protection contre le stress oxydatif durant la période de la conservation des gonades à 4°C.

Notre étude s'est, donc, intéressée à conserver les gonades du lapin entières (avec épидидymes) à 4 °C pendant 10 jours, sans milieu de conservation ou maintenus dans une solution du tampon tris ou de PEG/VitE, puis extraire le sperme par prélèvement de l'épididyme après différents jours de réfrigération. Nous avons évalué la qualité des spermatozoïdes récupérés à travers plusieurs tests : mobilité (CASA), intégrité membranaire (HOST) et statut oxydatif (ABTS).

Les résultats ont montré que plus le temps passe, plus la qualité du sperme diminue, surtout sans protection. En revanche, l'utilisation des milieux de conservation, comme le Tris ou l'association PEG/VitE, a permis de limiter les dégâts. Le milieu PEG/VitE a donné de bons résultats, en aidant les spermatozoïdes à rester mobiles, intègres et moins affectés par le stress oxydatif. Ce travail montre qu'il est possible, même après 10 jours de réfrigération de gonades du lapin, On peut récupérer des spermatozoïdes encore mobiles mais surtout à membrane plasmique intacte. Cela ouvre des perspectives utiles pour la reproduction assistée, la préservation de la fertilité ou encore la conservation post-mortem.

### **Mots-clés :**

Réfrigération, Gonades, Épидидyme de lapin, Spermatozoïdes, Intégrité membranaire, Stress oxydatif, Reproduction assistée, VitE, PEG, Tris.

### **Abstract :**

In certain situations, it is not always possible to collect sperm from an animal immediately using conventional methods. When a genetically valuable animal dies suddenly, the only way to preserve its genetic material is to conserve its gonads.

The aim of this study was to evaluate the characteristics of spermatozoa retrieved from the cauda epididymis and their evolution over time, as well as the role of the PEG/Vitamin E combination in maintaining motility, membrane integrity, and protecting against oxidative stress during gonadal preservation at 4 °C.

Our study focused on preserving whole rabbit gonads (with epididymides) at 4 °C for 10 days, either without any preservation medium or in a solution of Tris buffer or PEG/VitE.

Sperm was then collected from the epididymis after different durations of refrigeration. Sperm quality was assessed using several tests : motility (CASA), membrane integrity (HOST), and oxidative status (ABTS).

The results showed a gradual decline in sperm quality over time, particularly in the absence of any protective medium. However, the use of preservation media such as Tris or PEG/VitE helped limit this degradation. The PEG/VitE medium yielded promising results by maintaining sperm motility, preserving membrane integrity, and reducing oxidative stress.

This work demonstrates that even after 10 days of refrigeration, it is still possible to recover mobile spermatozoa with intact plasma membranes from rabbit gonads. These findings offer valuable prospects for assisted reproduction, fertility preservation, and post-mortem genetic conservation.

### **Keywords :**

Refrigeration, Gonads, Rabbit epididymis, Spermatozoa, Membrane integrity, Oxidative stress, Assisted reproduction, VitE, PEG, Tris.

