

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

**La Réfrigération du sperme du
Lapin**

Présenté par :

Belhocine Cylia & Bendiab Sara

Soutenu le :08/06/2023

Devant le jury composé de :

Mr : IGUER- OUADA Mokrane professeur

Mme : Mme AMOKRANE/ TALBI A. MAA

Mme : DJOUAD S. MAA

président

Encadreur

Examinatrice

Année Universitaire : 2022/2023

Dédicaces.

Je dédie ce travail :

A ma maman qui ma soutenue durant toute ma scolarité et ma appris toutes les bases, à mon père, en premier lieu et aux autres Membres de ma famille, particulièrement à Mon petit frère YOUNES, à ma petite sœur NAWAL, à mes chères amies LYDIA et CYLIA ainsi que tous ceux qui m'ont soutenue de près comme de loin, et surtout à ma binôme CYLIA Avec qui on a tout partager et pus surmonter cette année difficile et pus réalisé ce travail, dieu merci.



Dédicaces

*Je dédie ce mémoire à mes parents
Mère tu m'as soutenue, épaulée et toujours aidée à
aller de
L'avant et donner le meilleur de Moi-même, sans toi
je ne
Serais pas parvenu à réaliser ce travail. Merci à la
plus
Merveilleuse des mamans,
Père, merci pour ta présence, ton soutien et ton
assistance,
Que dieu vous protège
A mes frères, et mes deux neveux ISLAM, GHILASS,
et ma belle-sœur FOUZIA
A ma sœur jumelle FAIZA, Et Ma copine WISSAM,
Ma meilleur binôme SARA
Avec qui on a tout partager et pus surmonter cette
année difficile et pus réalisé ce travail, dieu merci.*

*A tous ceux qui m'ont prêté aide, soutien et
encouragement de
Prêt ou de loin.*

Remerciements

Tout d'abord nous remercions avant tout, dieu le tout puissant pour le courage, la force, la volonté et la santé

Qu'il nous a donné afin de réaliser ce mémoire.

Mes sincères remerciement vont à notre chère promotrice **Mme AMOKRANE/TALBI.A**, qui a toujours été présente dans la réalisation de ce mémoire, en plus son encouragement,

Sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils précieux.

Nous tenons à remercier également les membres de

Jury :

Mr IGUEROUADA.A.M D'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de ce mémoire.

Mme DJOUAD.S pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions toute l'équipe du laboratoire associé en Ecosystème Marins et Aquacoles de la faculté SNV,

Pour la disponibilité et l'aide apportée.

En dernier lieu, nous remercions chaleureusement toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la

Réalisation de ce modeste travail.

Merci à tous.

Sommaire

Liste d'abréviation

Liste des figures

Listes des Tableau

Introduction01

Partie 1 : Partie bibliographique

Chapitre I : Physiologie de la reproduction chez les lapins

I. Anatomie de l'appareil génital du lapin.....	02
1. Les testicules.....	03
a) Anatomie.....	03
2. L'épididyme.....	03
a) Anatomie.....	03
b) Lumière du canal épидидymaire.....	04
c) Epithélium épидидymaire.....	04
d) Cellules épидидymaire	04
II. La spermatogenèse.....	08

Chapitre II : Conservation du sperme de lapin

I. Les facteurs influençant sur la production et la qualité du sperme...10	
a) L'âge et la race.....	10
b) La santé.....	10
c) L'environnement.....	10
II. Récolte du sperme.....10	
a) Vagin artificiel.....	11
b) Prélèvement épидémique.....	11

III- Analyse du sperme.....12

1- Examen macroscopique.....12

- a) Couleur.....12
- b) Volume.....12
- c) Le ph.....12

1- Examen microscopique.....13

- a) Motilité massale13
- b) Motilité individuelle13
- c) Concentration.....13
- d) Morphologie et viabilité13
- e) Le système CASA.....14

IV – Conservation.....17

1. Les Types de conservation de la semence.....18

- a) La Congélation avec l’Azote liquide.....18
- b) La Décongélation.....18
- c) La réfrigération “ A l’état frais.....18

2. Milieux de conservation de la semence.....19

- a) Le polyéthylène glycol (PEG).....19
- b) La vitamine C.....19
- c) La vitamine E.....20
 - 1- Définition et structure.....20
 - 2- Propriétés physico-chimiques.....20
 - 3- L’intérêt de la vitamine E dans la conservation de la semence.....21

Partie Pratique

Matériel et méthodes

Objectif du travail.....	23
I- Collecte de la semence.....	23
II- Matériels de collecte.....	23
a) Matériels biologiques.....	23
b) Matériels techniques.....	23
III- Préparation des milieux de conservation de la semence.....	24
a) Préparation du contrôle du (TB).....	24
b) Préparation du milieu peg.....	26
c) Préparation du milieu vitE.....	27
d) Préparation du milieu vitC.....	28
e) Préparation de l'association peg/vitE.....	29
f) Préparation de l'association peg/vitC.....	30
g) Préparation du complexe peg/vitE/vitC.....	30
h) Préparation de l'association vitE/vitC.....	30
IV- Méthode de la collecte de la semence.....	31
a) Séparation de l'épididyme des gonades.....	32
b) Les étapes de la collecte de la semence.....	32
V- Analyse de la semence.....	33
a) Matériels d'analyses.....	33
1- Examen macroscopique.....	34
a) Couleur.....	34
b) Volume.....	34
2- Examen microscopique.....	34

a) Système CASA.....	34
VI-Réfrigération à 4° C.....	35
1- Matériels de conservation.....	35
a) Produits utilisés.....	35
b) Matériels technique.....	35
2- Préparation des traitements (milieu de conservation+ sperme)	36
3- Analyse des milieux de conservation + spz à T0/T1/T2.....	37
Résultats et discussion	
I- Caractéristique macroscopique u sperme étudiés.....	38
II- Comparaison des paramètres de mobilité des milieux par rapport aux contrôle	39
1- Interprétation des résultats de la VCL.....	39
2- Interprétation des résultats de la VSL.....	40
3- Interprétation des résultats de la Motilité totale.....	42
4- Interprétation des résultats de la Motilité progressive.....	43
Conclusion.....	45
Les Références.....	46
Résumé.....	53

Liste d'abréviation

% : pourcentage.

µl : microlitre.

µm: micromètre.

C: Celsius.

CASA: Computer Assisted sperm analyser.

Cm: Centimètre.

G: gramme.

Kg : kilogramme.

L : litre.

Large : largeur.

Long : Longueur.

Nbre : Nombre.

peg : polyéthylène glycol.

spz : Spermatozoïdes.

TB : Tris Buffer.

V/V : Volume /volume.

VA : Vagin artificiel.

VAP : vilocity average pathxay.

VCL : curviliner velocity.

vitC : Vitamin C.

vitE : Vitamine E.

VSL : straight-line velocity

ALH : amplitude of latéral head displacement

LIN: linearity

STR: straightness

DMSO: diméthylsulfoxyde

PUFAS: acide gras polyinsaturés

ROS : reactive oxygen spicies

tris : trisaminométhane 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol

IA : insémination artificielle

SGP-2 : sulfated glycoprotein

GST : glutathion S-transferase

C : Celsius

PH : potentiel hdrogéne

OMS : organisation mondiale de la santé

H : heure

Exp : expériences

T0 : temps avant la réfrigération

T1 : à 1heure de réfrigération

T2 : à 2heures de réfrigération

Liste des Figures

Numérotation des figures	Titre	Page
Figure 01	Appareil reproducteur du lapin mâle (Garreau et al., 2015).	02
Figure 02	Anatomie de l'épididyme (Hermo et Robaire, 2002)	03
Figure 03	l'épididyme du lapin (photo personnel)	04
Figure 04	cellules de l'épithélium épидидymaire (Breton, 2012).	05
Figure 05	Description du cycle spermatogénétique (Boussit, 1989)	09
Figure 06	Un vagin artificiel	11
Figure 07	les principales anomalies morphologiques des SPZ (Ott et al., 1987)	14
Figure 08	Identification d'un spermatozoïde et sa zone de probabilité (A), position probable sur la prochaine image (B), complications possibles lorsque plusieurs spermatozoïdes se trouvent dans une même zone de probabilité (Mortimer et al.2000)	15
Figure 09	- Reconstruction d'une trajectoire. Le centre de la tête spermatique (point de référence) est suivi sur une série d'images d'un spermatozoïde. Les points sont alors reliés pour obtenir la reconstruction de la trajectoire. (Mortimer et al.2000)	16
Figure 10	Terminologies standards des variables cinétiques mesurées par les systèmes CASA (manuel de l'OMS 2010)	17
Figure 11	Structure chimique du Tocophérol (LANDRIER, 2011)	20
Figure 12	Des gondes de lapins de différentes races (Photo personnelle)	23
Figure 13	Matériel technique utilisé (photo personnelle)	24
Figure 14	Tris+ acide citrique+ d-glucose	25
Figure 15	L'agitation de la solution tris	25
Figure 16	La solution du tris préparé	25
Figure 17	Peg en poudre	26
Figure 18	L'agitation de la solution peg	26

Figure 19	La texture de la vit E	27
Figure 20	La vitE (- α -tocophérol)	27
Figure 21	Balance à précision	28
Figure 22	L'agitation de la solution vitE/tris	28
Figure 23	La vit C pure	28
Figure 24	L'agitation de la vitC/tris avec le vortex agitateur	28
Figure 25	Le Rot à vapeur	29
Figure 26	L'association peg/vitE (en poudre)	29
Figure 27	L'agitation de l'association peg/vitE/tris	30
Figure 28	L'association peg/vitE/tris	30
Figure 29	La séparation de l'épididyme du testicule	32
Figure 30	L'injection du tris	33
Figure 31	L'injection de l'air	33
Figure 32	La récolte du sperme	33
Figure 33	Le sperme récolté	33
Figure 34	La système CASA (photo personnelle)	34
Figure 35	La cellule de Makler	35
Figure 36	Le matériel technique	36
Figure 37	Différents traitements	36
Figure 38	Les micropipettes	36
Figure 39	Histogramme représentant le VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$) des spermatozoïdes mobiles conservés à 4C°, analysés à différents temps.	40
Figure 40	Histogramme représentant le VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$) des spermatozoïdes mobiles conservés à 4C°, analysés à différents temps.	41
Figure 41	Histogramme représentant la Mobilité Totale (%) des spermatozoïdes mobiles conservés à 4C°, analysés à différents temps.	43
Figure 42	Histogramme représentant la Mobilité Progressive (%) des spermatozoïdes mobiles conservés à 4C°, analysés à différents temps.	44

Listes des Tableau

Tableaux N°1 : Les composants des traitements de conservation.....31

Tableaux N°2 : caractéristiques de la semonce des lapins étudiés.....38

Introduction

Le lapin est un animal qui est utilisé à la fois comme animal domestique, animal de compagnie et animal modèle de recherche en raison de ses nombreux avantages dans le domaine de la reproduction, tels que son cycle court, sa prolificité élevée et sa facilité de manipulation facile.

Afin d'améliorer la productivité de l'élevage et de contribuer au développement de la cyniculture, il est essentiel de recourir aux biotechnologies et à l'IA, en particulier pour la conduite des reproducteurs. Pour garantir le succès de l'insémination artificielle, il est crucial d'évaluer la qualité de la semence à l'aide de techniques analytiques fiables telles que le système CASA.

La méthode de biotechnologie de l'insémination artificielle a permis la mise en place d'un nouveau système de production appelé "la conduite en bande", qui valorise les travaux de sélection et de diffusion génétique tout en réduisant les risques sanitaires. La production de semence commence par la collecte du sperme, suivi de l'évaluation des paramètres spermatiques. Une fois la qualité du sperme contrôlée, il peut être utilisé directement pour l'insémination artificielle sous forme fraîche ou réfrigérée, ou bien dilué puis cryoconservé pour une utilisation ultérieure.

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer le meilleur milieu de conservation de la semence du lapin à 4C° en utilisant des milieux de conservation à base de tris buffer auxquels nous avons ajouté du polyéthylène glycol (PEG) seul ou associé à d'autres substances, telles que la vitE et vitC, en tant qu'antioxydant pour améliorer la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes. Le but de notre étude est de déterminer le ou les meilleurs milieux de conservation de la semence en termes de paramètres de mobilité.

Partie bibliographie

Chapitre I

I- Physiologie de la reproduction chez les lapins

L'appareil génital du lapin mâle présente une organisation générale similaire à celle des autres mammifères, bien que quelques différences existent en ce qui concerne la taille, le poids et la forme des organes. Toutefois, l'une des particularités du lapin est sa capacité à rétracter ses testicules dans l'abdomen. (Hamon *et al.*,1999).

1) Anatomie de l'appareil reproducteur mâle

Le système reproducteur du lapin mâle se situe à l'arrière et se caractérise par des bourses peu prononcées par rapport à d'autres mammifères (Boussit, 1989). Il est composé de deux testicules, d'un ensemble de canaux génitaux internes et externes (tubes droits et tête testis, canaux efférents, épидидyme, canal déférent, canal éjaculateur), de glandes annexes (vésicules séminales, prostate et glandes de Cowper), et d'un tractus uro-génital représenté par l'urètre (Garreau *et al.*, 2015) (Figure 1).

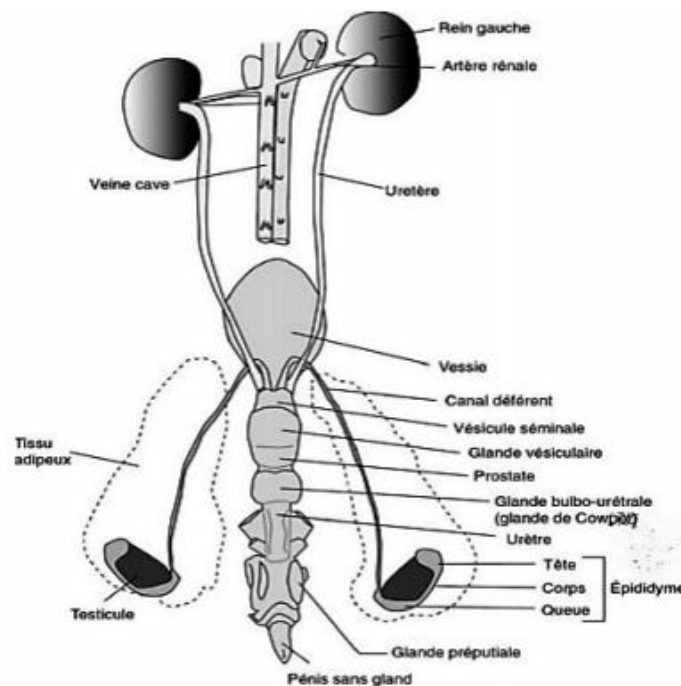


Figure 1 : Appareil reproducteur du lapin mâle (Garreau *et al.*, 2015).

a) Anatomie du testicule

Les testicules sont des organes présentant une structure complexe, comprenant deux compartiments distincts : les tubes séminifères et le compartiment interstitiel. Le premier assure la production des spermatozoïdes, tandis que le second est responsable de la synthèse et de la sécrétion d'hormones stéroïdes, principalement la testostérone. Ces deux fonctions sont cruciales pour la reproduction masculine et sont classées respectivement comme exocrine et endocrine (Muller et Clos, 1997).

2) Anatomie de l'épididyme

Après avoir quitté les canalicules efférents, les spermatozoïdes entrent dans l'épididyme où ils subissent leur maturation (Figure 2) (Hamilton, 1975 ; Robaire et Hermo, 1988). Chez le lapin, l'épididyme est situé sur le bord médian du testicule, et est un canal très plié et recouvert d'une tunique conjonctive qui lui donne une forme allongée en croissant reliant les deux pôles dorsaux du testicule. Sa longueur varie selon les espèces, mais chez le lapin, elle est d'environ 1,5 à 3 cm (Barone, 1978). L'épididyme a une tête volumineuse qui recouvre largement l'extrémité capitée du testicule, un corps épais et une queue bien détachée qui forme un appendice globuleux et mobile. Les ligaments propres du testicule et de la base de la queue de l'épididyme (Figure 3), qui sont relativement longs et épais, sont fixés à sa base et contiennent des fibres musculaires lisses, ressemblant à un gubernaculum testis incomplètement rétracté.

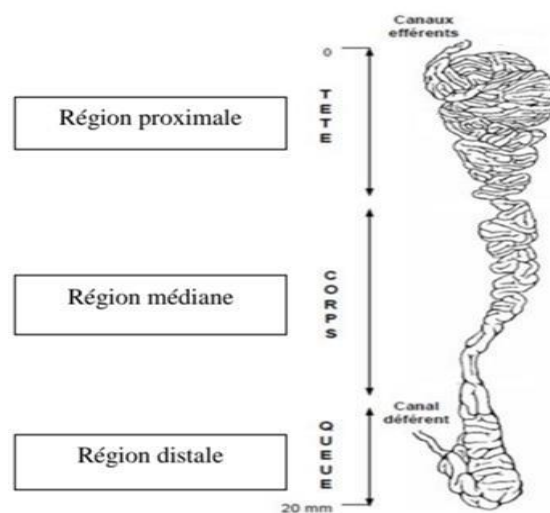


Figure 2 : Anatomie de l'épididyme (Herme et Robaire, 2002)



Figure 3 : l'épididyme du lapin (photo personnelle)

a) La lumière du canal épидидymaire :

Le canal épидидymaire est entouré d'un épithélium pseudo stratifié stéréocilié qui borde la lumière où se trouvent les spermatozoïdes. En outre, des cellules musculaires lisses entourent le canal.

b) Épithélium de l'épididyme :

L'épithélium pseudo stratifié se compose de cellules de tailles variables avec des noyaux situés à différents niveaux du tissu. Les noyaux des cellules les plus hautes sont plus grands que ceux des cellules basales.

c) Les cellules de l'épithélium épидидymaire :

Le tissu épithélial de l'épididyme est le principal responsable des modifications que subit le fluide épидидymaire, ainsi que de la mise en forme de la membrane plasmique des spermatozoïdes, grâce à ses activités de sécrétion et d'absorption. Le type cellulaire le plus répandu dans cet épithélium est constitué de :

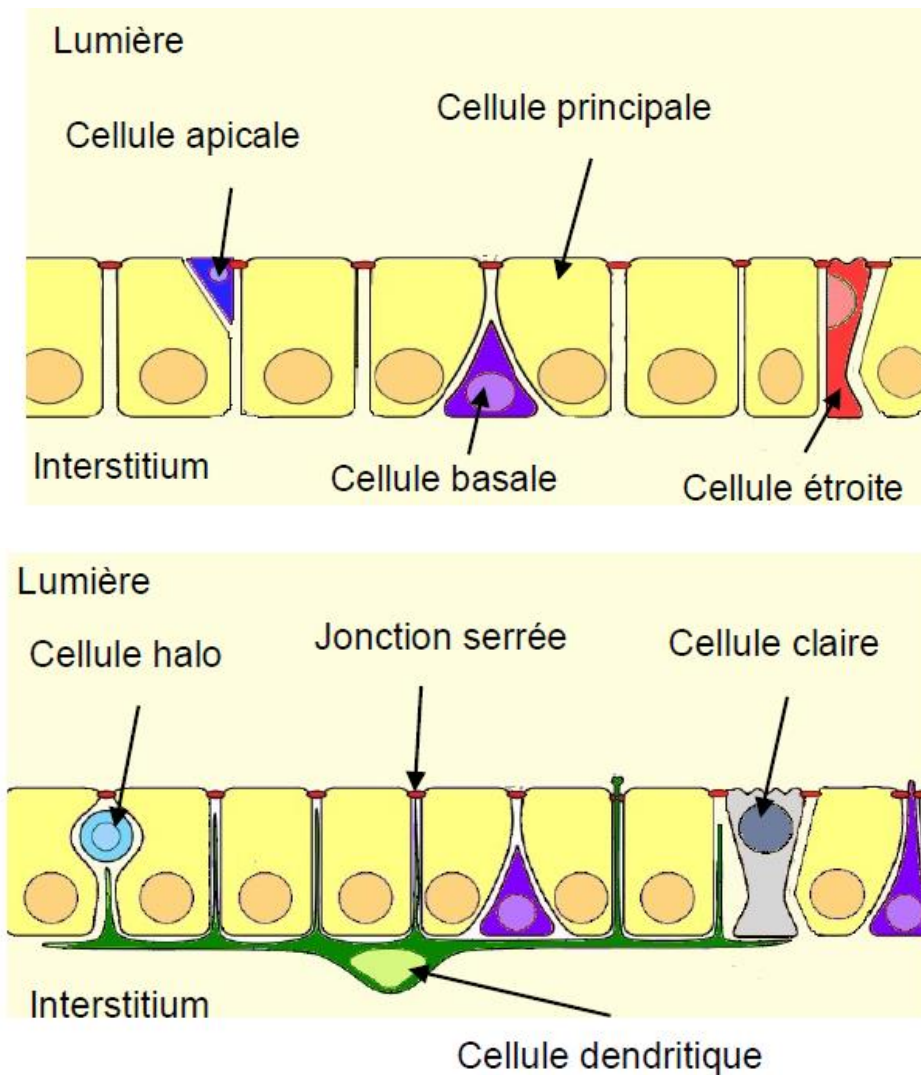


Figure 4 : cellules de l'épithélium épididymaire (Breton, 2012).

➤ Cellules principales :

Les cellules principales, décrites par **Cooper (1986)**, sont de grandes cellules allongées munies de stéréocils, qui jouent un rôle important dans le transport et la sécrétion de petites molécules telles que la carnitine, la synthèse et la sécrétion de protéines, ainsi que l'adsorption de fluides et de molécules (**Robaire et Hermo, 1988**). Les exemples de leurs fonctions incluent la sécrétion de la SGP-2 et de l'immobiline. La SGP-2 est sécrétée par les cellules principales de la tête et se lie à la membrane plasmique des spermatozoïdes pendant leur transit (**Hermo et al., 1991**), tandis que l'immobiline est sécrétée par les cellules principales de la tête et s'accumule dans la queue de l'épididyme (**Usselman Cone, 1985**). Bien que les cellules

principales soient présentes dans toutes les régions de l'épididyme, leur morphologie et leurs fonctions varient selon les différentes régions, tout comme les cellules claires (**Hermo et al., 1994**).

➤ **Les cellules claires :**

Ce sont des cellules de grande taille sont organisées de manière à suggérer leur participation active dans la récupération de molécules présentes dans la lumière de l'épididyme (**Moore et al., 1979**). Elles ont une capacité d'endocytose supérieure à celle des cellules principales et un exemple de leur fonction est observé chez les cellules claires de la queue de l'épididyme qui effectuent l'endocytose de l'immobiline pour maintenir un niveau constant de cette molécule dans la lumière de la queue (**Hermo et al., 1992**).

➤ **Les cellules halo :**

Elles sont présentes de manière diffuse dans l'épithélium de l'épididyme (**Flickinger et al., 1997**), ce qui suggère leur implication dans le système immunitaire. Toutefois, la nature de l'interaction entre l'épididyme et le système immunitaire n'est pas clairement définie (**Trasler et al., 1988**).

➤ **Les cellules basales :**

Les cellules basales sont des cellules étroites et allongées dont les fonctions précises ne sont pas encore bien définies. On a proposé qu'elles pourraient jouer un rôle dans la détoxification et la résistance aux radicaux libres, étant donné leur concentration élevée en glutathion S-transferase (GST) (**Veri et al., 1993**).

➤ **Cellules étroites :**

Les cellules étroites étaient auparavant regroupées avec les cellules apicales sous l'appellation cellules gobelet ; des études ont ensuite différencié les deux types cellulaires (**Abou-Haila and Fain-Maurel, 1984**). Les cellules étroites sont présentes uniquement dans le segment initial (**Adamali and Hermo, 1996**). Ces cellules possèdent de minces projections de cytoplasme qui atteignent la lame basale. Elles possèdent des vésicules impliquées dans l'endocytose, et auraient également un rôle d'acidification (**Hermo and Robaire, 2002**).

➤ **Cellules apicales :**

On trouve des cellules apicales dans tout l'épididyme, mais elles sont plus nombreuses dans le segment initial (Adamali et Hermo, 1996). Ces cellules sont impliquées dans l'acidification du fluide luminal, ainsi que dans des fonctions d'absorption et de sécrétion (**Martinez-Garcia et al., 1995**).

➤ **Cellules dendritiques :**

En 2011, Da Silva et al. ont découvert la présence de cellules dendritiques épидидymaires possédant des marqueurs leucocytaires et régulant potentiellement le système immunitaire dans l'épididyme. Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes qui régulent la réponse immunitaire dans d'autres tissus (**Helft et al., 2010 ; Steinman, 2007**), et sont également présentes dans le testicule mâle (**Guazzone et al., 2011**). Au niveau de l'épididyme, les cellules dendritiques forment un réseau localisé à la base de l'épithélium et projettent des dendrites entre les cellules épithéliales en direction de la lumière. Les dendrites sont plus nombreuses au niveau du segment initial, suggérant un rôle de cette région dans l'acquisition de la tolérance du système immunitaire envers les spermatozoïdes matures. Les analyses de plusieurs marqueurs de cellules immunitaires ont permis d'identifier au moins quatre sous-populations de cellules dendritiques dans l'épididyme (**Da Silva et al., 2011**).

Plus récemment, Smith et al. (2014) ont montré que les cellules dendritiques de l'épididyme jouent également un rôle dans la régulation des cellules apoptotiques.

II- La spermatogenèse

La spermatogenèse est l'ensemble des processus de multiplication et de différenciation des cellules de la lignée germinale. Elle est inactive et commence entre 40 et 50 jours. Toutefois la maturité sexuelle est atteinte vers 30 à 32 semaines mais un jeune mâle peut être utilisé vers l'âge de 20 semaines pour la reproduction. Au cours de la spermatogenèse, les cellules germinales (spermatogonies souches) passent par cinq stades différents pour se différencier en spermatozoïdes (**Lebas, 2000 et Legrand et al, 1993**).

Les tubes séminifères contiennent des spermatogonies souche qui se trouvent au niveau de la membrane basale. Ces cellules se multiplient activement par mitose pour donner des spermatocytes I qui subissent un important accroissement à la puberté. Chaque spermatocyte I donne par méiose deux spermatocytes II, puis quatre spermatides. La spermiogénèse est la dernière étape de la spermatogenèse qui transforme les spermatides en spermatozoïdes. Cette transformation se déroule dans les replis cytoplasmiques des cellules de Sertoli, à proximité de la lumière du tube séminifère. **Boussit (1989)** cette durée varie de 38 à 45 jours (**Figure5**). Les spermatozoïdes produits sont immatures et ne sont pas encore fécondants. Ils acquerront leur pouvoir fécondant au cours de la phase de maturation dans les voies génitales mâles. C'est la phase de maturation.

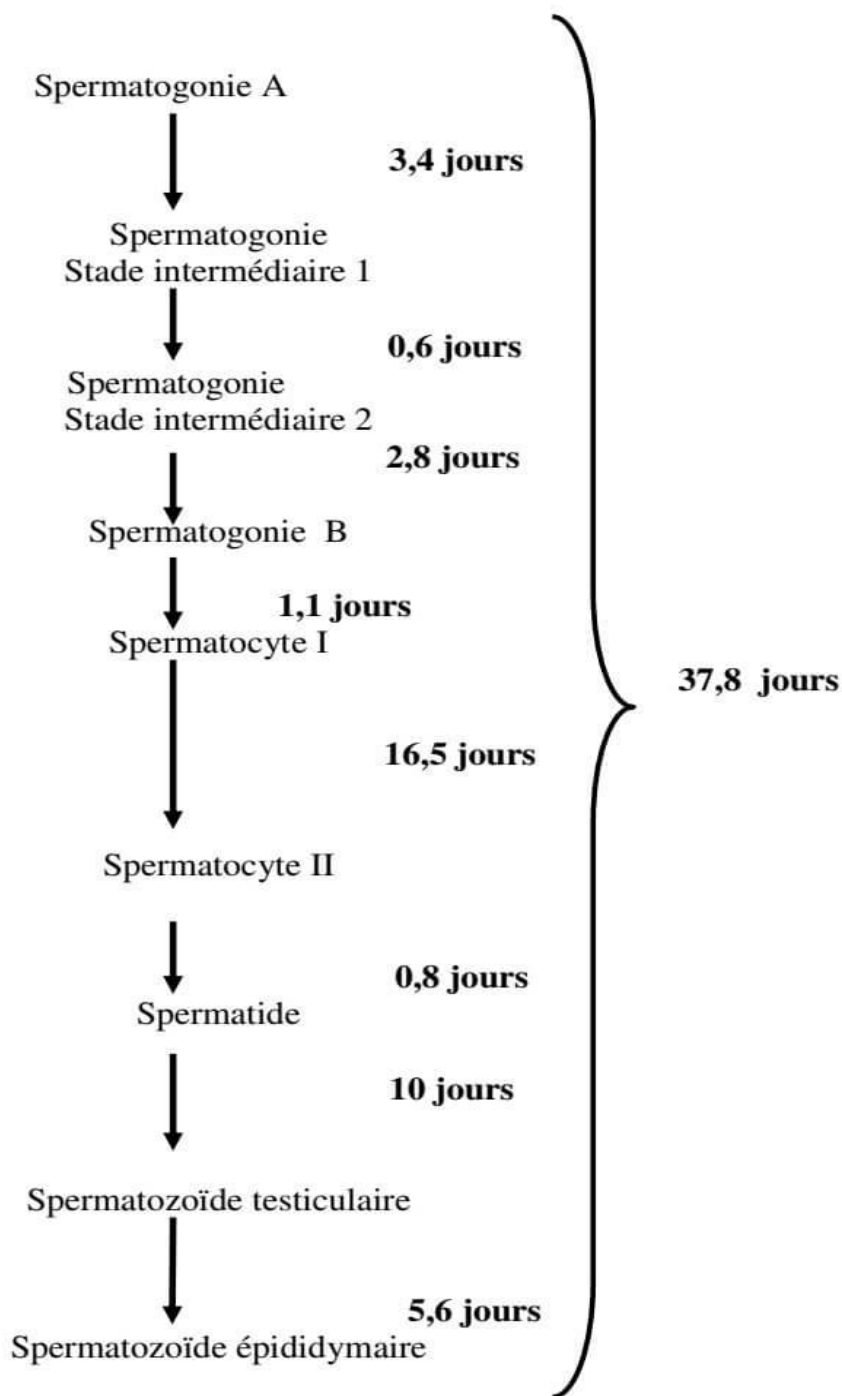


Figure 5 : Description du cycle spermatogénétique (Boussit, 1989)

Chapitre II

I- Conservation du sperme de lapin

1- Les facteurs influençant sur la production et la qualité du sperme :

La production de spermatozoïdes peut être affectée par divers facteurs tels que l'âge, la santé, l'environnement et les stratégies d'alimentation, ce qui peut avoir un impact sur les aspects qualitatifs et quantitatifs.

a) L'Âge et la race

La puberté se produit habituellement vers l'âge de 5 mois (en fonction de la race) et la qualité du sperme tend à diminuer chez les lapins âgés de plus de 2 ans.

b) État de santé

Il est communément admis que l'inflammation de l'appareil reproducteur masculin (qu'elle soit subclinique ou manifeste ; **O'BRYAN et coll., 2000**) peut altérer les fonctions testiculaires et séminales caractéristiques en perturbant la biosynthèse des eicosanoïdes pro-inflammatoires (prostaglandines et leucotriènes) et la libération de cytokines (**KNAPP, 1990**). Par conséquent, il est essentiel de surveiller étroitement la santé des mâles de lapin, en particulier ceux qui sont âgés.

c) L'environnement :

Il a été mentionné précédemment que l'environnement joue un rôle crucial pour l'animal. L'environnement peut être défini comme tout ce qui entoure l'animal, y compris son habitat, sa nourriture (solide et liquide), l'air, le bruit, etc. Cette notion peut également englober la ferme, le village, la région et même le pays tout entier. En conséquence, il est essentiel de renforcer les conditions d'hygiène et les réglementations sanitaires. (**Oloufa, M.M., Bogart, R., & McKenzie**).

II- Récolte du sperme :

Il y a plusieurs méthodes disponibles pour la collecte de sperme, à savoir l'électroéjaculation, l'utilisation d'un vagin artificiel et l'incision de l'épididyme. Cette dernière technique permet une collecte directe du sperme, sans la présence de sang ou de gel qui pourraient altérer les résultats lors de l'analyse.

a) Vagin artificiel :

Il s'agit d'un dispositif pratique et simple qui est constitué de deux parties : un cylindre externe en caoutchouc dur ou en plastique, mesurant environ 3 à 5 cm de longueur et 2 à 7 cm de diamètre extérieur, muni d'un bouchon qui ferme une ouverture. Ce cylindre est doté d'une isolation thermique épaisse pour maintenir une température constante. À l'intérieur, une chemise en caoutchouc ou en latex est placée et maintenue en place à l'aide d'un élastique (**Bredderman et al., 1994**). La cavité formée par le cylindre externe et la chemise est remplie d'eau à 40-45°C avant utilisation, de manière à atteindre une température de 39°C lors de l'utilisation employé (**Lebas et al., 1996**). L'extrémité la plus grande du dispositif est lubrifiée pour faciliter l'introduction du pénis, tandis que l'autre extrémité est équipée d'un tube gradué en verre ou en plastique de 1,5 à 2 cm de diamètre et de 11 cm de long pour recueillir le sperme (**Bredderman et al., 1994**) (**Figure 6**).

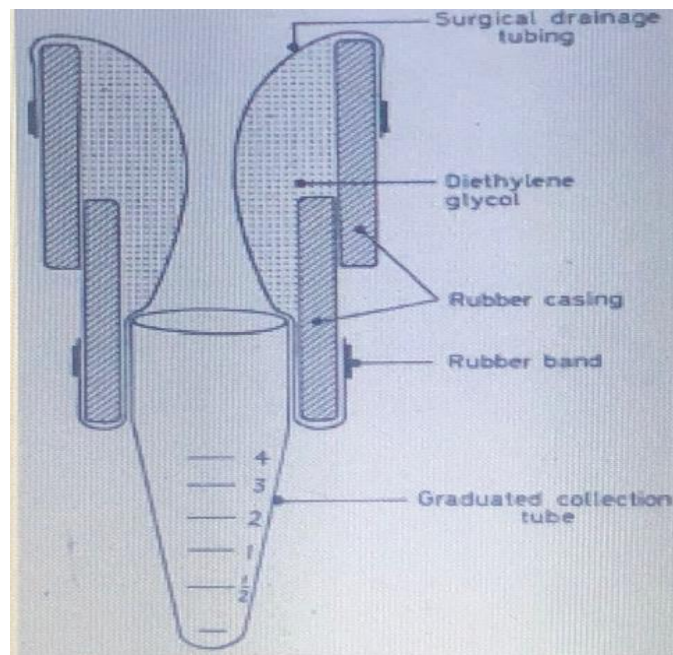


Figure 6 : un vagin artificiel

b) Technique de la récolte prélèvement épидéymaire :

Les spermatozoïdes provenant de l'épididyme sont prélevés sur la partie la plus accessible du tube en effectuant une incision transversale. Le liquide épидéymaire est ensuite recueilli. Cette technique, qui permet la conservation du sperme épидéymaire pendant plusieurs jours à 4°C, est utilisée dans le cadre de l'insémination artificielle ou de la fécondation in vitro. Elle

offre la possibilité de recueillir du sperme chez des animaux non collectables. Pour garantir l'absence de contamination sanguine et obtenir le maximum de spermatozoïdes, l'échantillonnage est réalisé en rétro rinçant la lumière épидидymaire du conduit déférent avec de l'air. Cette technique est utilisée dans différentes espèces, notamment chez la souris. (**An et al., 1999 ; C. Theriogenology 50, 1998 ; Kikuchi et al., 1998 ; Vieira et al., 2012**).

III- Analyse de la semence :

Après la récolte on entame la phase d'analyse de la semence, à l'œil nue, on regarde d'abord le volume récolté à partir des gonades pour avoir une idée sur le calcul de la première dilution, sa concentration, sa couleur, sa viscosité, son ph et enfin une première analyse à l'aide du casa afin d'observer sa motilité massale.

III-1- Examen macroscopique :

C'est l'examen visuel qui vas nous permettre de contrôler le volume et la couleur de la semence :

a) Couleur :

Le sperme récolté de l'épididyme est Blanc, blanc crémeux ou blanc aqueux (absence d'urine, de sang, etc.) (**Colomb, 1972**).

b) Volume :

Le tube gradué permet de mesurer le volume de sperme prélevé quotidiennement, qui est d'environ 0,3 à 0,8 ml, et de 0,2 à 1,5 ml en moyennes, (**Vaissaire en 1977 et de Montailé en 1992**). En ce qui concerne la quantité de sperme collectée par épидидymes, elle varie entre 0,05 et 0,1 ml selon les recherches de (**Baril et Chemineau 1993**).

c) Le PH :

La mesure du ph doit être immédiate après la récolte, il se fait à l'aide d'un ph mètre ou d'un papier indicateur. Dans un sperme de lapin normal la valeur du pH varie entre 6,8 à 7,3 (**Francisco et luis, 2003**).

III-2- Examen microscopique :

a) Motilité massale

La mobilité des spermatozoïdes est mesurée en observant leurs mouvements de masse à travers une observation microscopique d'une goutte de sperme brut placée sur une lame. Cette observation est effectuée avec un grossissement de x10 et est ensuite notée selon l'échelle de Petitjean sur une échelle de 0 à 9 (**Boussit D., 1989**).

b) Motilité individuelle

La motilité individuelle des spermatozoïdes correspond au mouvement de chaque spermatozoïde, qui est mesuré en diluant la semence fraîche avec une solution Tris-buffer dans un rapport de (1/20), (**Najjar et Benmrاد (2013)**). Pour évaluer la motilité individuelle, elle est notée sur une échelle de 0 (absence de mouvement des spermatozoïdes) à 4 (mouvement rectiligne des spermatozoïdes) (**N Bencheikh (1994)**).

c) Concentration

La concentration de sperme représente la quantité de spermatozoïdes contenue dans un millilitre de sperme. Le processus de dilution se réalise à l'aide d'une solution de fixation contenant 10 millilitres de formol à 35% v/v mélangés à 1 litre de NaCl à 0,9% (**Arriola et al, 2001**). Ensuite, la concentration de spermatozoïdes est mesurée à l'aide d'un hématimètre ou une cellule de Thoma (**N Bencheikh, 1994**).

d) Morphologie et viabilité :

Le but de L'étude de la morphologie sont but est de déterminer les anomalies morphologiques qui peuvent siéger au niveau de différentes parties du spermatozoïde. La technique la plus utilisée est la coloration à la nigrosine-éosine qui permet aussi de déterminer les pourcentages des spermatozoïdes vivants et/ou morts. Ne peuvent être conservé et ne sont retenus pour l'IA que les spermes ayant moins de 25% de spermatozoïdes anormaux (**Figure7**) et plus de 60% de spermatozoïdes vivants peuvent être conservé. La forme du spz du lapin est similaire à celle des autres mammifères (**Parez et Duplan, 1987**).

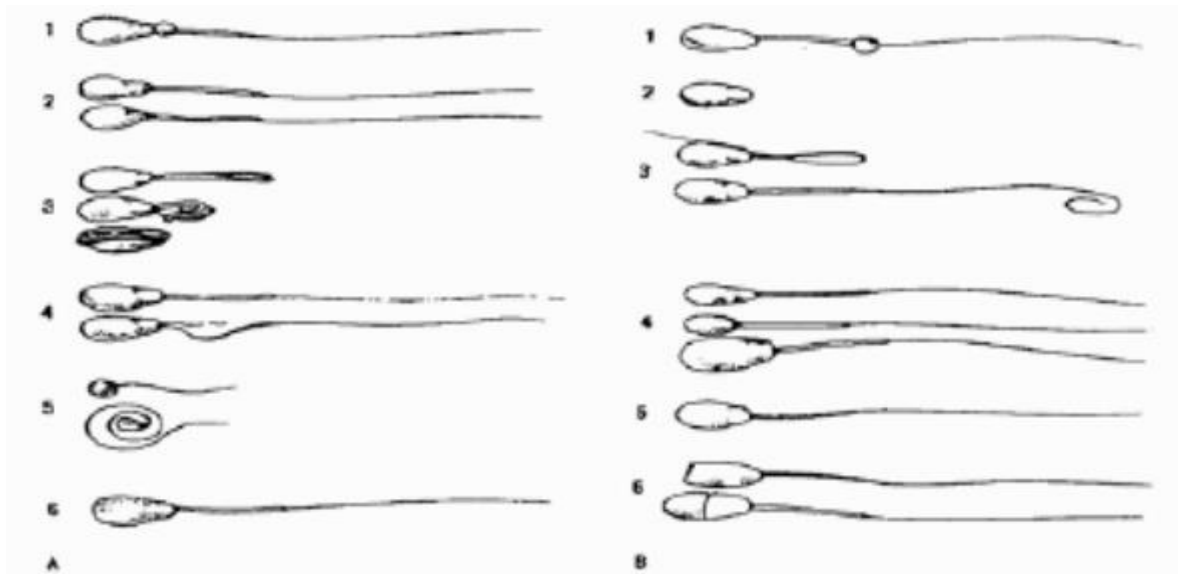


Figure 7 : les principales anomalies morphologiques des SPZ (Ott et al., 1987).

La viabilité des spermatozoïdes, est principalement déterminée par l'état de leur membrane. En plus de la coloration à la Nigrosine-éosine, la mesure de l'intégrité de cette membrane peut être effectuée à l'aide de différentes méthodes (Mocé et Graham, 2008).

e) Le système CASA :

- **Principe de fonctionnement**

CASA est un système semi-automatisé permettant l'analyse de paramètres spermatiques tels que la concentration, la mobilité, la vitalité et la morphologie des spermatozoïdes, ainsi que les paramètres cinétiques à travers une analyse fine du mouvement flagellaire. Il est composé d'un microscope optique et d'un logiciel informatique connecté à une caméra pour la digitalisation des images. L'opérateur doit se déplacer sur la chambre de comptage pour permettre l'acquisition des différents champs. Il est important que les champs analysés soient à différentes distances du site de dépôt de l'échantillon dans la chambre, principalement le long de l'axe central formé par les point d'entrée et point de sortie de la lame (Amann et Waberski 2014), car la distribution des spermatozoïdes dans la chambre n'est pas homogène (Douglas-Hamilton et al. 2005a). La validation de méthode doit notamment montrer que cette distribution non homogène n'a pas d'impact sur la qualité des résultats (si l'acquisition des champs est

correctement réalisée) grâce à une comparaison par rapport à une méthode de référence qu'est l'hémocytomètre (cellule de Malassez).

La position d'un spermatozoïde est définie par le centre de la tête spermatique et ses coordonnées (x,y) sont alors déterminées. Pour chaque position de la tête d'un spermatozoïde, le logiciel calcule la probabilité de la nouvelle position sur l'image suivante grâce à une zone de probabilité au rayon prédéterminé (**Figure 8**). Ce rayon est la distance maximum qu'un spermatozoïde est censé parcourir sur la période de temps séparant 2 images (distance définie par le fournisseur : 10 μ m).

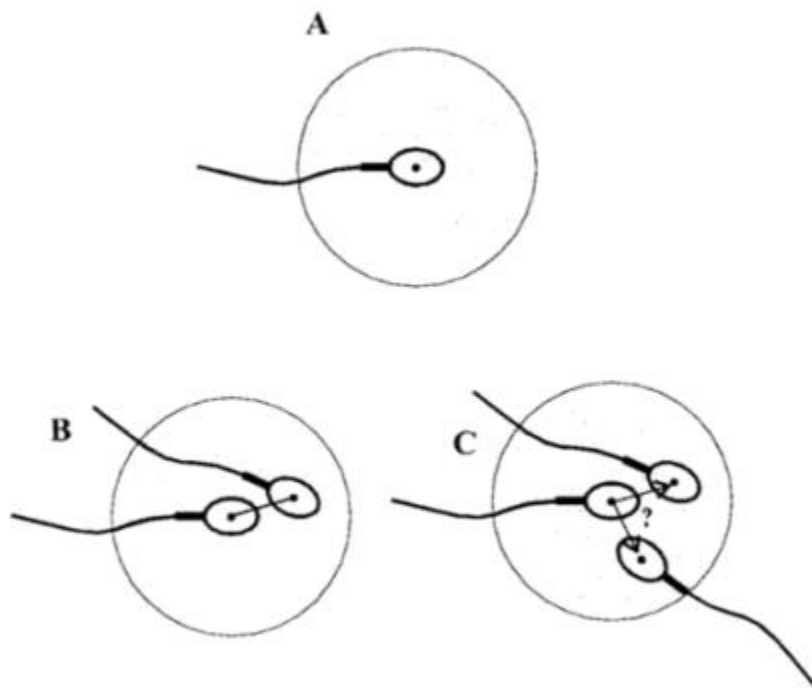


Figure 8 - Identification d'un spermatozoïde et sa zone de probabilité (A), position probable sur la prochaine image (B), complications possibles lorsque plusieurs spermatozoïdes se trouvent dans une même zone de probabilité (**Mortimer et al.2000**)

La trajectoire d'un spermatozoïde est alors reconstruite à partir de la succession des différentes positions de la tête sur les 30 différentes images constituant un champ (**Figure9**).

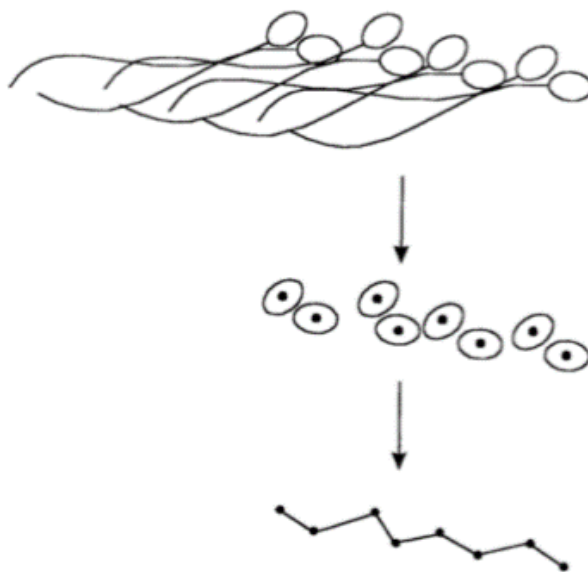


Figure 9 - Reconstruction d'une trajectoire. Le centre de la tête spermatique (point de référence) est suivi sur une série d'images d'un spermatozoïde. Les points sont alors reliés pour obtenir la reconstruction de la trajectoire. (**Mortimer et al.2000**).

Si plusieurs spermatozoïdes se trouvent dans une même zone ou entrent en collision, cela peut entraîner des erreurs de trajectoire. Ces erreurs sont minimales lorsque la concentration de spermatozoïdes est inférieure à 30 millions/ml selon le (**manuel du fournisseur Hamilton Thorne**), mais elles augmentent significativement avec la concentration. Pour minimiser ces erreurs, il est préférable d'analyser uniquement les 10 premières images pour déterminer la concentration de spermatozoïdes mobiles, la concentration de spermatozoïdes immobiles et la fraction de spermatozoïdes mobiles. Les paramètres cinétiques sont quant à eux calculés à partir de toutes les images selon le (**manuel du fournisseur Hamilton Thorne**). En plus de ces paramètres, le logiciel peut également fournir des paramètres "annexes" en reconstruisant la trajectoire des spermatozoïdes, tels que les paramètres cinétiques principaux définis dans le manuel de l'OMS 2010 qui sont (**Figure 10**) :

- **VSL (Straight line velocity)** : la vitesse en ligne droite ($\mu\text{m/s}$) obtenue en mesurant la distance entre la première et la dernière position de la tête.
- **VCL (Curvilinear velocity)** : la vitesse ($\mu\text{m/s}$) obtenue en calculant la somme des distances entre les différentes positions de la tête sur chaque image.

- **VAP (Average path velocity)** : la vitesse ($\mu\text{m/s}$) obtenue en suivant la trajectoire moyenne.
- **ALH (Amplitude of lateral Head displacement)** : l'amplitude de déplacement latéral de la tête (μm) obtenue en calculant la distance maximale de chaque point de la trajectoire par rapport à la position moyenne.
- **LIN (linearity)** : le ratio VSL/VCL exprimé en pourcentage pour illustrer la direction de la trajectoire.
- **STR (Straightness)** : le ratio VSL/VAP pour représenter la linéarité de la trajectoire moyenne.

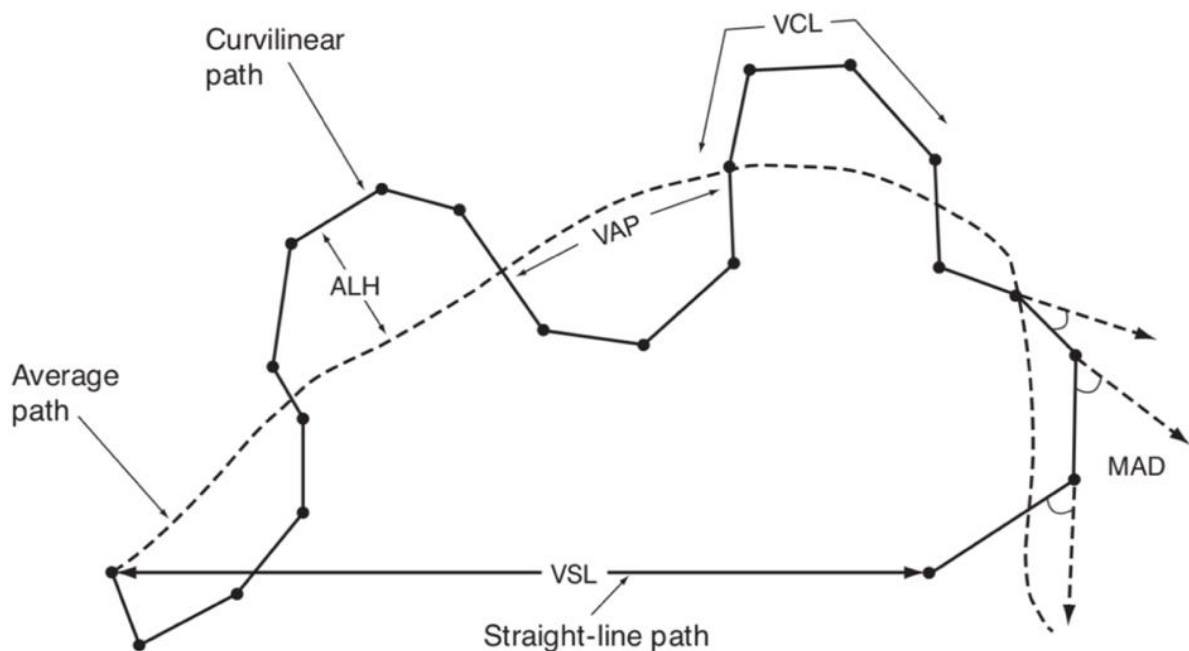


Figure 10 : Terminologies standards des variables cinétiques mesurées par les systèmes CASA (**manuel de l'OMS 2010**)

IV – Conservation :

Juste après la récolte, la semence est soit utilisée directement pour l'IA comme semence fraîche soit conservée pour une longue durée (congélation) ou bien une courte durée (réfrigération) pour un usage ultérieur :

1- Les Types de conservation de la semence

a) Congélation avec l'Azote liquide

Le processus de congélation du sperme comprend plusieurs étapes cruciales. D'abord, il y a l'équilibration, où le sperme est préalablement réfrigéré à 4°C afin de permettre l'action du cryoprotecteur et de réduire le choc thermique pour les spermatozoïdes (**Mocé et al.,2003 b**). Ensuite, vient le conditionnement, qui consiste à diviser la semence en paillettes pour faciliter son stockage, son utilisation et son identification (**Decuadro-Hansen, 2004**).

La congélation elle-même se déroule en deux étapes. Tout d'abord, les paillettes sont exposées à la vapeur d'azote liquide pendant 10 minutes, puis elles sont plongées dans l'azote liquide (**Mocé et al.,2003a**). La vitesse de refroidissement joue un rôle essentiel dans la qualité des spermatozoïdes après décongélation. Si elle est trop lente ou trop rapide, cela peut entraîner une diminution de la motilité ainsi que des changements irréversibles, seront notés sur les spermatozoïdes, suite à un choc thermique.

b) Décongélation :

La dernière étape de la congélation, qui est essentielle pour assurer la survie, la mobilité et la capacité de fécondation des spermatozoïdes Cryoconservés, est cruciale. La décongélation se réalise de manière similaire en utilisant un bain-marie. (**Ponthier et al. 2014**)

Il est préférable d'effectuer une décongélation rapide afin d'éviter toute recristallisation des molécules d'eau, car cela peut causer des dommages importants à la membrane (**Forthier, 2010**). Pour la décongélation, les paillettes contenant les spermatozoïdes sont placées dans un bain-marie à 45°C pendant 10 secondes (**Mocé et al., 200...**).

La décongélation se réalise de manière similaire en utilisant un bain-marie. Les paillettes sont transférées directement de l'azote liquide dans le bain-marie.

c) A l'état frais « réfrigération à 4°C » :

Pour préserver la qualité de la semence, on utilise la technique de réfrigération en abaissant la température jusqu'à +4°C, ce qui réduit le métabolisme des spermatozoïdes. Ce processus

peut être effectué avant ou après la dilution. Il est important d'avoir une vitesse de refroidissement rapide pour minimiser le temps passé dans la plage critique de température, mais également suffisamment lent pour éviter un choc thermique. On atteint la température de +4°C en environ une heure et demie en utilisant une vitrine réfrigérée. La réfrigération permet de maintenir la viabilité du sperme pendant plusieurs jours à cette température (**Dumon 2007**).

2- Milieux de conservations de la semence :

Avant d'utiliser les milieux de conservation de la semence, il est essentiel de se familiariser avec les recherches scientifiques qui soutiennent leur utilisation. Ces études ont montré que l'utilisation de milieux de conservation spécifiques peut maintenir la qualité du sperme et la viabilité des spermatozoïdes sur une période prolongée.

L'utilisation d'un milieu de conservation spécifique permettait de maintenir la mobilité et la vitalité des spermatozoïdes, favorisant ainsi leur utilisation réussie dans les techniques de reproduction assistée (**Smith et al. 2010**).

a) Polyéthylène glycol (PEG) :

Le PEG est couramment utilisé pour favoriser la dissolution de composés insolubles dans l'eau et de stéroïdes grâce à des dispersions solides. Cette substance est un polymère biocompatible et non allergène autorisé par la Food and Drug Administration pour une utilisation humaine par voie intraveineuse, orale ou cutanée. Les experts ont confirmé que le PEG 6000 est particulièrement efficace pour augmenter la solubilité et la biodisponibilité de différentes molécules actives. (**A Amokrane et al., 2020**).

b) Vitamine C :

L'acide ascorbique, également connu sous le nom de vitamine C, est un composé organique soluble dans l'eau qui se trouve largement dans les organismes vivants. Grâce à ses propriétés antioxydants résultant de son puissant pouvoir réducteur, l'acide ascorbique est impliqué dans de nombreuses fonctions corporelles importantes, notamment dans la fertilité masculine. Plusieurs études ont démontré l'effet bénéfique de l'acide ascorbique sur la qualité du sperme, incluant une amélioration de la quantité, de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes. (**Akmal M ; Qadri J.Q ; Al-Waili N.S ; et al., 2006**).

c) Vitamine E :

1- Définition et structure :

Le terme "vitamine E" englobe les tocophérols et les tocotriénols dérivés du 6-chromanol. L'alpha-tocophérol est la forme la plus active biologiquement et la plus abondante dans le plasma (environ 88%). Cette information a été confirmée par (SOUCCAR et al., 1996).

La vitamine E est un élément crucial dans la nutrition humaine et animale car elle est liposoluble et a été identifiée pour la première fois par EVANS en 1936. Si elle manque dans notre alimentation, cela peut causer des troubles neurologiques ou ophtalmologiques graves. Elle agit comme l'antioxydant principal dans notre corps pour protéger les structures membranaires des cellules contre les effets néfastes des radicaux libres, en particulier en ce qui concerne l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés (GUILLAND et al., 2009).

2- Structure chimique :

Il y a huit formes de vitamine E, qui se composent de quatre tocophérols et quatre tocotriénols. Les tocophérols ont un noyau hydroxychromane et une chaîne latérale saturée phytyle de 16 carbones. Les différentes formes de tocophérols et tocotriénols sont déterminées par le nombre et la position des groupements méthyle sur le noyau hydroxychromane (**figure11**). La forme la plus active de cette vitamine est l' α -tocophérol, que l'on trouve le plus souvent dans la nature (GIROUD, 2011).

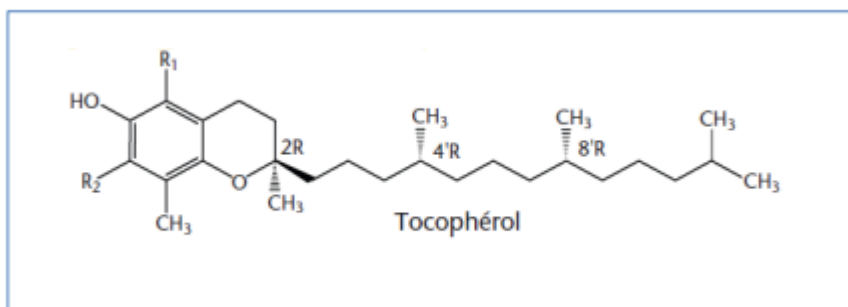


Figure 11 : Structure chimique du Tocophérol (LANDRIER, 2011).

3- Propriétés physico-chimiques :

Les tocophérols ont l'apparence d'une huile visqueuse de couleur jaune pâle à température ambiante. Ils sont insolubles dans l'eau mais se dissolvent facilement dans les graisses, les huiles

et les solvants organiques tels que les éthers, l'acétone, le chloroforme, le méthanol et les alcools méthyliques et éthyliques. Bien qu'ils soient peu sensibles à la chaleur, à la lumière et aux acides, ils sont très sensibles à l'oxydation et aux bases (**BOURGEOIS (2003)**).

4- L'intérêt de la vitamine E dans la conservation de la semence :

Chez diverses espèces animales, dont le lapin (**A Amokrane et al., 2020**), l'incorporation d'alpha-tocophérol dans le milieu de dilution de sperme lors de sa cryoconservation procure des avantages. Ce composé bioactif exerce un impact important sur la protection des acides gras polyinsaturés (**PUFAS**) et d'autres constituants membranaires contre l'oxydation occasionnée par les radicaux libres. En agissant comme un piège à radicaux, il réduit les lésions induites par ces derniers, qui découleraient de l'oxydation des **PUFAS**.

La présence de Vitamine E dans le sperme est bénéfique pour sa conservation et sa dilution à basse température, car elle protège les membranes des spermatozoïdes. Une augmentation de la quantité de Vitamine E dans le sperme améliore la stabilité de ses membranes spermatiques, (**Triebel 1981**). La vitamine E préserve la qualité des spermatozoïdes en protégeant leur motilité ainsi que l'intégrité de leur membrane, leur acrosome et leur potentiel de membrane mitochondriale, permettant ainsi une meilleure mobilité des spermatozoïdes qui ont été congelés et décongelés. Cette vitamine agit en éliminant l'accumulation de ROS et en évitant la peroxydation des lipides pendant la conservation.

Matériels et Méthodes

Objectif du travail :

Dans notre travail, nous avons testé de nouveaux milieux de conservation de la semence du Lapin par réfrigération à 4°C, dans le but de conserver sa viabilité et sa motilité et faciliter son utilisation dans l'élevage.

I- Collecte de la semence :

Nous avons réalisé notre étude avec du sperme prélevé de l'épididyme des testicules de lapins abattus, récupérés de différentes boucheries de la ville de Béjaia.

II- Matériel de collecte :**a) Matériel biologique :**

- Des gonades des lapins morts de race algérienne et espagnoles (**Figure 12**).



Figure 12 : des gonades de différentes races

Des lapins (photo personnelle)

a) Matériel technique :

- Seringue
- Aiguille
- Tubes Eppendorf
- Aluminium
- Papier absorption
- Portoir
- Lame bistouri
- L'eau distillé



Figure 13 : Matériels technique utilisé (photo personnelle)

III- Préparation des milieux de conservation de la semence :

Avant de commencer, nous avons préparé les différents milieux en commençant par le tris, puis les autres milieux :

a) Préparation du contrôle (TB) :

Nous avons utilisé les ingrédients ci-dessous pour préparer une solution de tampon tris dans 50 ml d'eau distillée (**Figure 14**) :

- Tris Buffer = 1,513
- Acide Citrique = 0,850g
- D-Glucose = 0,625g
- Pénicilline = 0,050g
- Eau Distillé = 50ml

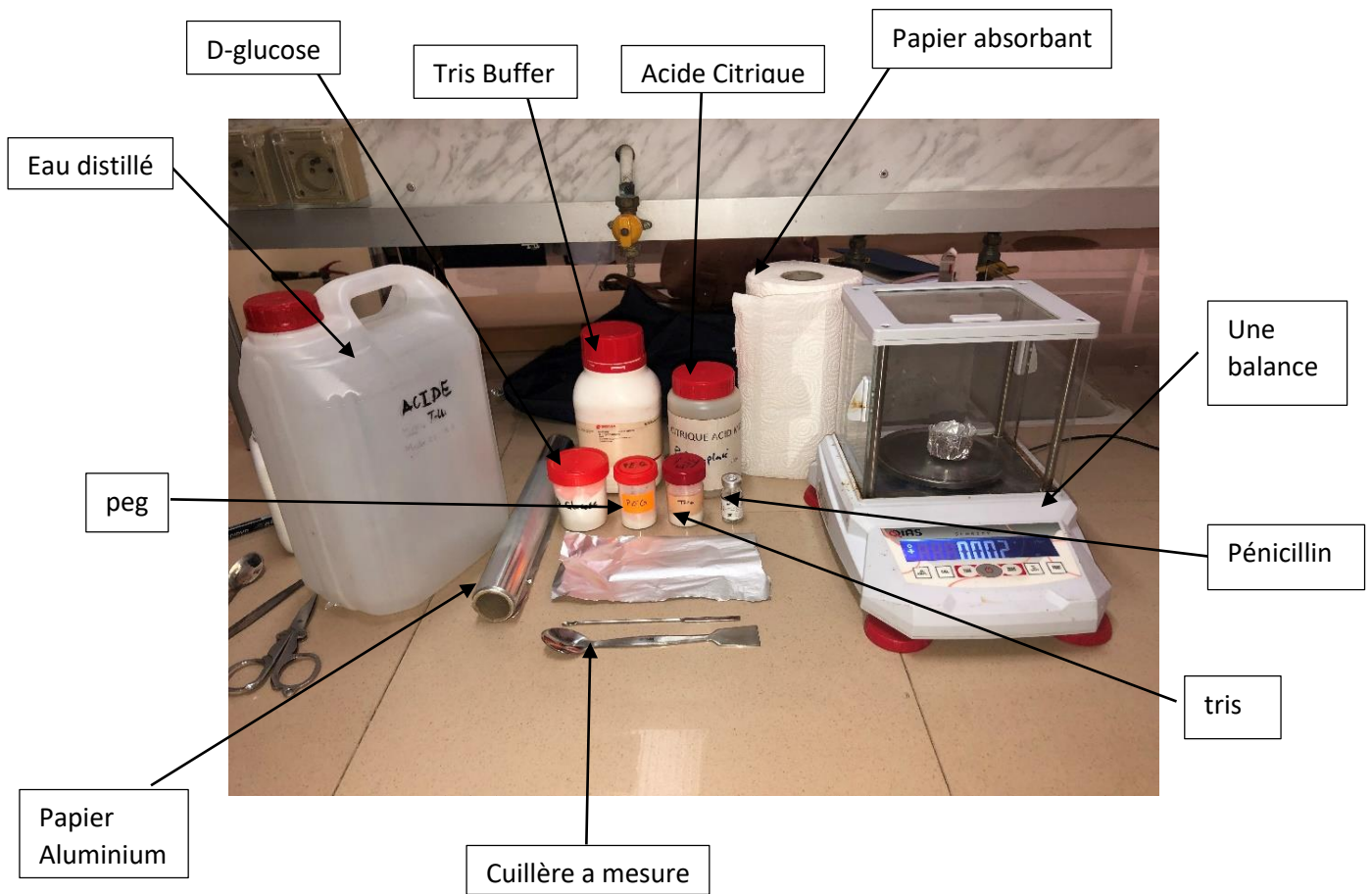


Figure 14 : préparation du contrôle tris buffer

Nous avons mis tous ses ingrédients dans un b cher avec un baromagn tique puis laissé agiter pendant 2h (**Figure 15**) (**figure 16**).



Figure 15 : agitation de la solution du tris

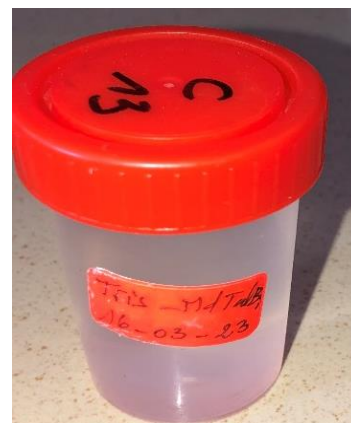


Figure 16 : la solution du tris préparée

b) Préparation du milieu peg :

Afin de préparer le milieu à base de peg nous l'avons mélangé au tris buffer, selon la règle de trois suivante :

$$\begin{array}{l} 0.180 \text{ g du peg} \longrightarrow 5 \text{ ml du tris} \\ \text{peg ?} \longrightarrow 10 \text{ ml du tris} \\ \hline \hline 0.36 \text{ g} \end{array}$$

Dans un bécher, nous avons mis 10 ml du tris à l'aide d'une seringue, nous lui avons rajouté 0.36 g du peg (**Figure 17**) que nous avons minutieusement pesé avec la balance de précision. Le mélange est laissé sur l'agitateur pendant 2h. (**Figure 18**).

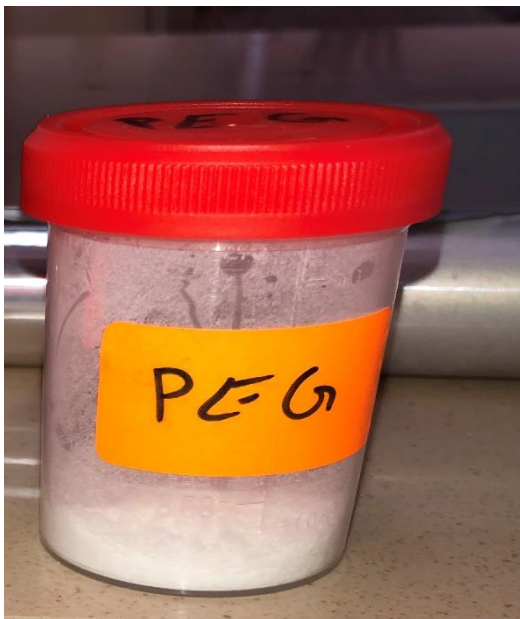


Figure 17 : le peg en poudre



Figure 18 : l'agitation de la solution peg

c) Préparation du milieu vitE :

Pour la préparation de l'association vitE/tris, nous avons pris une quantité de la vitE liquide que nous avons mélangé avec une quantité du tris convenue. Selon la règle de trois suivant :

1.2 mg de vitE \longrightarrow 10 ml du tris

1.8 mg \longrightarrow ? ml du tris

$\underline{\underline{\hspace{1cm}}}$
15 ml du tris

La pesée de la vitE a été un défi, car elle est sous forme liquide et visqueuse (**Figure19**) (**Figure 20**). Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé une balance de précision (**Figure21**) avec une précision de 4 chiffres, qui nous a permis de mesurer avec une précision en mg. Nous avons réussi à peser 1,8 mg de vitE, puis nous avons calculé le volume du tris nécessaire pour la quantité de la vitE pesée, soit 15 ml. Enfin, nous avons mélangé les deux ingrédients à l'aide d'un agitateur pendant 2 heures jusqu'à ce que le mélange soit bien homogène (**Figure 22**).



Figure 19 : la texture De la vitE

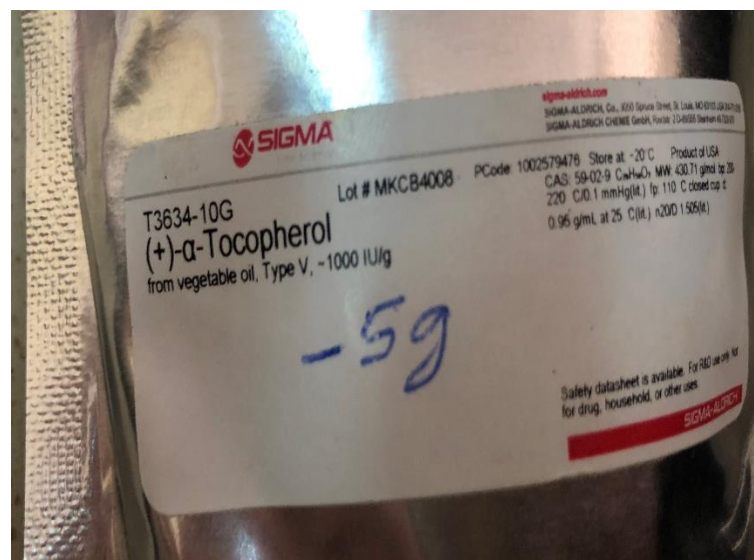


Figure 20 : la vitE (-α- tocophérol)



Figure 21 : balance a précision



Figure 22 : l'agitation de la
Solution vitE/tris

d) Préparation du milieu vitC :

Pour le milieu vitC vue qu'il n'a pas besoin d'un long temps d'agitation et qu'il a une durée de vie plus courte que les autres milieux (car il s'oxyde rapidement à la lumière) nous l'avons préparé directement le jour du prélèvement du sperme. Nous prenons donc :

0.001g de vitC (**Figure 23**) que nous avons mélangé avec 10ml du Tris dans un tube à essai, le mélange a été fait avec un vortex agitateur pendant environ 5 min (**Figure 24**).



Figure 23 : la vitC pure



Figure 24 : l'agitation de la vitC avec
Le vortex agitateur

e) Préparation de l'association peg/vitE :

Pour préparer l'association peg/vitE nous avons commencé par mélanger, dans une fiole, le peg et la vitE à 50ml d'éthanol, à raison d'une proportion de 90%/10% respectivement. Nous avons d'abord mélangé le peg à l'éthanol et l'avons laissé 4h sur l'agitateur jusqu'à solubilisation du peg, puis nous avons ajouté la vitE et laissé agiter pendant 20min. Dans un deuxième temps, nous avons placé la fiole contenant la solution, dans l'évaporateur rotatif (Rot-à-vapeur) réglé à 45°C (**Figure 25**) pendant 20 min jusqu'à l'obtention d'une poudre (**Figure 26**).



Figure 25 : le Rot-à- vapeur



Figure 26 : L'association
peg/vitE (poudre)

Pour préparer le milieu de conservation à base de l'association peg/vitE, nous l'avons ajouté au tris à raison de 0,012g / 1ml du tris, puis nous l'avons mis sur l'agitateur pendant 2h (**Figure 27**) et à la fin on obtient une solution (**Figure 28**).



Figure 27 : l'agitation de l'association
peg/vitE/tris



Figure 28 : l'association
peg/vitE/tris

f) Préparation de l'association peg/vitC :

Pour l'association vitC/peg nous avons pris un volume de vitC que nous avons mélangé avec un volume du milieu peg, la quantité dépend du volume du sperme récolter

g) Préparation de l'association vitC/vitE :

Pour ce l'association nous avons pris un volume de vitC avec un volume de la solution vitE.

h) Préparation du complexe peg/vitE/vitC :

Nous avons pris un volume de vitC que nous avons mélangé avec un volume de l'association déjà préparé vitE/peg.

Le tableau n° I regroupe le résumé des préparations des différents milieux.

Tableau N°I : Les composants des traitements de conservation

peg	0,36g + 10ml de tris (1)
VitE	1,8 mg de vitE + 15ml de tris (2)
vitC	0.001mg de vitC + 10ml de tris (3)
peg/vitC	Volume (1)/ Volume (3)
peg/vitE	Volume (1)/ Volume (2)
vitE/vitC	Volume (2)/ Volume (3)
peg/vitE/vitC	Volume (1) / Volume (2) / Volume (3)

IV- Méthodes de collecte de la semence :

Après la récupération des gonades des lapins récemment abattus, au niveaux des boucheries, nous nous sommes rendu directement au laboratoire pour réaliser la collecte de la semence épydidymaire.

a) Séparation de l'épididyme des gonades :

Le processus de préparation des testicules implique plusieurs étapes. Tout d'abord, nous avons enlevé la gaine des testicules de l'épididyme. Ensuite, nous avons isolé l'épididyme et le canal déférent du testicule et enfin, nettoyé soigneusement l'échantillon pour éviter toute contamination. Ces étapes sont cruciales pour s'assurer que les échantillons sont propres et prêts à être analysés (**Figure 29**).



Figure 29 : La Séparation de l'épididyme du testicule

b) Les étapes de la collecte de la semence :

Nous avons commencé par injecter du tris dans la lumière du canal déférent à l'aide d'une seringue (**a**), puis réalisé une incision au niveau de la queue de l'épididyme et placé dans un eppendorf au niveau du point de l'incision. Nous avons vidé l'air de la seringue dans la lumière du canal déférent pour créer à l'intérieur une pression (**b**) qui conduit à l'écoulement de la semence dans le tube de collecte (**c**), (**d**).



Figure 30 : a) l'injection du tris



Figure 31 : b) l'injection de l'air



Figure 32 : c) La récolte du sperme



Figure 33 : d) le sperme récolté

V- Analyse de la semence :

a) Matériels d'analyse :

Afin de réaliser une bonne analyse de notre sperme récolté dans l'éppendorf nous avons besoin de :

- Lames
- Lamelles
- Les Embouts
- Micropipettes
- CASA
- Cellule de Makler

1- Examen macroscopique :

a) Couleur :

A l'observation visuelle de la couleur de notre semence récoltée, nous avons noté immédiatement après la récolte sa couleur afin de déterminer si elle est pure et prête à l'emploi ou contaminée.

b) Volume :

La lecture du volume du sperme récolté est réalisée directement sur l'épandorff gradué

2- Examen microscopique :

a) Système CASA :

Pour analyser le sperme prélevé, nous avons utilisé le système CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) (Figure 34).



Figure 34 : Le système CASA (photo personnelle).



Figure 35 : la cellule de Makler

VI -Réfrigération à 4°C

1- Matériels de conservation :

a) Produits utilisés :

- Tris buffer (en poudre)
- Acide citrique
- Pénicilline
- D-glucose
- Éthanol
- vitE (liquide)
- vitC (en poudre)
- peg (en poudre)
- Eau Distillé

b) Matériels technique :

- Des micropipettes
- Bécher
- Tubes
- Fiole
- Seringue
- Marqueur
- Etiquettes
- Portoir
- Aluminium
- Biomagnétique
- Baromètre
- Réfrigérateur
- 2 Balance à précision (en g de 3 et 4 chiffre)
- Cuillère de mesureur
- Des micropipettes
- Bécher
- Tubes



Figure 36 : le matériel technique

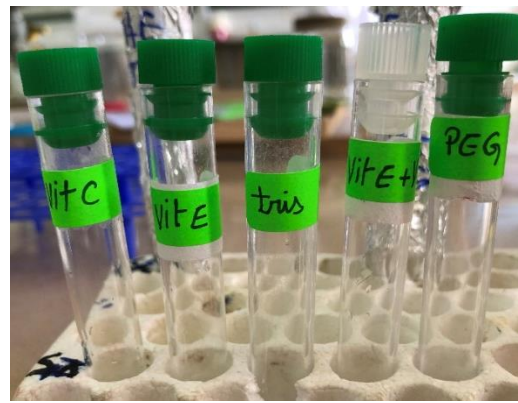


Figure 37 : différents traitement



Figure 38 : les Micropipettes

2- Préparation des traitements (milieu de conservation + sperme) :

Après la collecte du sperme nous avons mesuré le volume recueilli et procédé à la dilution 1/20 (: 1 volume de spermatozoïdes avec 19 volumes de tris). Nous avons soigneusement mélangé cette solution à l'aide d'une micropipette, dans un tube étiqueté "spz+tris".

Nous avons, ensuite, divisé le volume de ce sperme dilué (spz+tris), à l'aide d'une micropipette, sur huit tubes correspondant aux 7 milieux de conservation et un tube de contrôle (tris+spz). Tous les tubes sont étiquetés avec les noms des milieux correspondants. A ces 8 tubes nous avons ajouté à chacun le milieu de conservation correspondant à raison d'une proportion de V/V (: le même volume de milieu que de sperme dilué).

3- Analyse des milieux de conservation+ sperme à T0/T1/T2 :

Nous avons prélevé une goutte de chaque traitement à l'aide d'une micropipette. Ensuite, nous avons déposé la goutte sur la cellule de Makler. À T0, nous avons examiné les paramètres cinétiques de la mobilité du sperme à l'aide du système CASA. Nous avons réglé les paramètres du système en fonction des caractéristiques spécifiques du spermatozoïde du lapin.

Les 8 tubes contenant les échantillons ont été conservés au réfrigérateur réglé à 4°C. Nous avons répété cette analyse deux fois après chaque une heure de réfrigération, en remettant les milieux au réfrigérateur après chaque mesure et en les retirant une heure plus tard. Avant chaque analyse, nous avons légèrement réchauffé les milieux à la température du corps en les frottant avec les mains ou en les plaçant sur une plaque chauffante pendant quelques secondes.

Pour chaque analyse, nous avons enregistré 3 champs. Nous avons pris soin de noter les résultats à chaque fois, en indiquant le milieu et l'heure correspondante.

Résultats et Discussion

I- Caractéristiques macroscopiques du sperme épидидymaire prélevé :

Tableau II : caractéristiques macroscopique du sperme étudiés

Analyse macroscopique Expériences	Volume récupérer de plusieurs gonades	0 Couleur
Exp1	0,2ml	Blanchâtre
Exp2	0,2ml	Blanc nacré
Exp3	0,5ml	Blanchâtre

Le volume du sperme épидидymaire utilisé dans chacune de nos trois (3) répétitions est rapporté dans le tableau II. Le volume mentionné pour chaque répétition correspond à un pool de sperme prélevé de plusieurs épидидymes récupérés au même temps de la boucherie. Ce volume est suffisant pour la réalisation des différentes dilutions et analyse. Selon la bibliographie le volume varie entre 0,05 et 0,1 ml selon les recherches de **(Baril et Chemineau 1993)**.

II- Comparaison des paramètres de mobilité des Milieux par rapport aux contrôle :

1- Interprétation des résultats de la VCL :

À T0, nous constatons que la VCL (vitesse curviligne) de la vitE est la plus élevée, atteignant une valeur de 42 $\mu\text{m}/\text{sec}$, suivie de l'association peg/vitE et du complexes peg/vitE/vitC, qui ont les deux une valeur de 35 $\mu\text{m}/\text{sec}$. L'effet antioxydant de la vitE (Neyrat, 2008) et de la vitC (Munnich et al., 1987) est observé, ainsi que l'effet du polyéthylène glycol (peg) qui améliore la biodisponibilité de la vitE et la vitC dans le complexe peg/vitE/vitC, sur le sperme conservé pendant 15 minutes à température ambiante correspondant au temps qui sépare le moment de la préparation des traitements et l'analyse T0. Nous remarquons également que dans presque tous les milieux, la VCL est supérieure à celle du contrôle, à l'exception du complexe peg/vitC, qui a une VCL égale à celle du tris, soit environ 28 $\mu\text{m}/\text{sec}$.

Après une heure de réfrigération à 4°C (T1), nous observons une augmentation de la VCL de l'association peg/vitE jusqu'à 40 $\mu\text{m}/\text{sec}$ et une baisse de la VCL de la vitE à environ 38 $\mu\text{m}/\text{s}$. Pendant ce temps, la VCL de la VitC seule augmente également à 33 $\mu\text{m}/\text{sec}$, dépasse le contrôle tris avec environ 31 $\mu\text{m}/\text{sec}$.

Arrivés à T2, la vitE présente une fois de plus la VCL la plus élevée, atteignant 40 $\mu\text{m}/\text{s}$, dépassant ainsi celle du contrôle tris qui est de 33 $\mu\text{m}/\text{sec}$ et celle de l'association peg/vitE, dans laquelle, la disponibilité de la vitE permise grâce à l'effet solubilisant du peg a facilité son utilisation et donc son épuisement au fil du temps. En revanche, l'association vitE/vitC et le complexe peg/vitE/vitC affichent la VCL la plus faible, avec une valeur égale de 25 $\mu\text{m}/\text{sec}$ mais qui reste proche de celles notées à T1. (Figure 39).

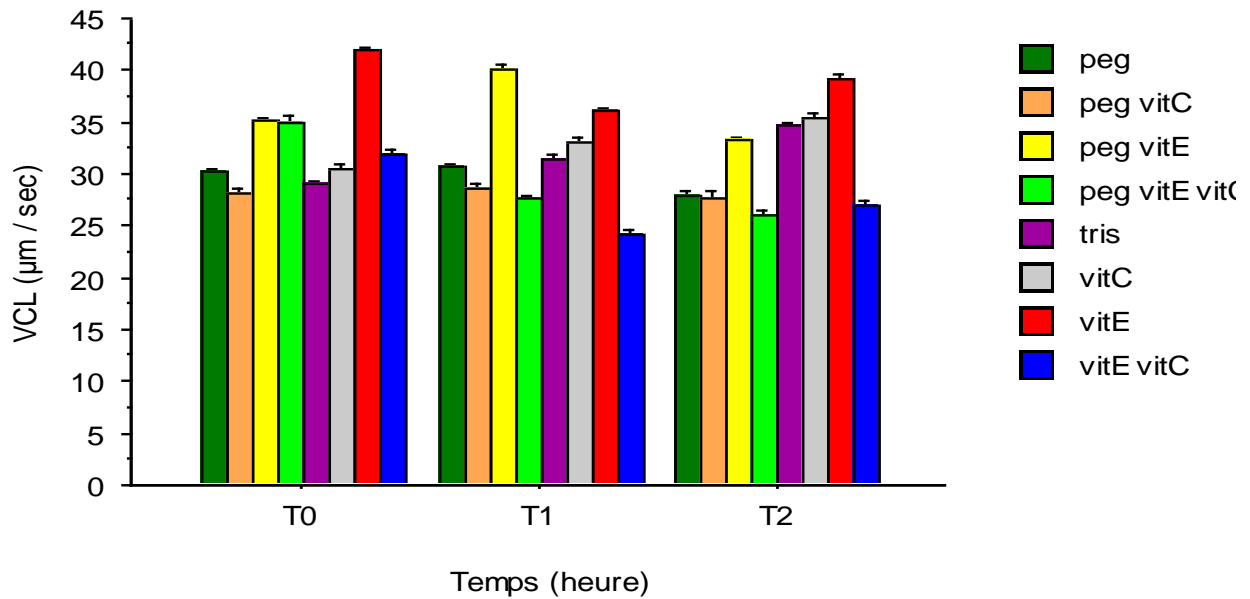


Figure 39 : Histogramme représentant le VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$) des spermatozoïdes mobiles conservés à 4°C , analysés à différents temps.

2- Interprétation des résultats de la VSL :

À T0, nous observons que les spermatozoïdes dans le milieu contenant de la vitamine E présentent la meilleure vitesse de déplacement (VSL) d'environ $9 \mu\text{m}/\text{s}$, suivis de ceux placés dans le complexe peg/vitE/vitC avec environ $8,7 \mu\text{m}/\text{s}$. Nous remarquons également que dans presque tous les milieux, la VSL est meilleure que celle du contrôle (tris), à l'exception de l'association peg/vitC qui présente une VSL de $5,8 \mu\text{m}/\text{s}$. Les différentes molécules utilisées dans nos différents traitements ont probablement exercées leurs effets bénéfiques sur le sperme avant même sa réfrigération, l'effet antioxydant de la vitE (Neyrat, 2008) et de la vitC (Munnich et al. 1987) ainsi que l'effet du peg qui améliore l'action de la vitE.

Après 1 heure de réfrigération à 4°C , les spermatozoïdes placés dans l'association peg/vitE ont la meilleure VSL avec $8 \mu\text{m}/\text{sec}$. Cela nous laisse conclure qu'il y a une synergie entre ces deux molécules et supposer qu'après 1 heure de conservation le peg a eu le temps de solubiliser la vitE ajoutée comme a été rapporté par (A Amokrane et al., 2020) ce qui l'a rendue disponible aux spermatozoïdes, elle qui est connue pour son effet antioxydant (Neyrat, 2008). À ce moment, les spermatozoïdes conservés dans la vitE seule et dans la vitC seule présentent également une VSL de $7,8 \mu\text{m}/\text{s}$ et $7 \mu\text{m}/\text{s}$ respectivement, ce qui est supérieur à celle du contrôle (tris) qui est seulement de $6,7 \mu\text{m}/\text{s}$.

À T2 heures, nous constatons que la VSL des spermatozoïdes conservés dans l'association vitE/vitC est la meilleure (9 $\mu\text{m/s}$), meilleure que celles notées déjà dans le même traitement, ainsi que celle du contrôle. Nous supposons qu'autant d'antioxydants, la vitE et la vitC exercent leurs effets en synergie. Parailleurs, la vitC est un générateur de vitE (Heller et al., 2006), ce qui a fait que la VSL dans l'association vitE/vitC est plus élevée que celle notée dans la vitE seule (8 $\mu\text{m/s}$) et la vitC seule (7,2 $\mu\text{m/s}$). Ces derniers ont presque maintenu le niveau de la VSL de T1 à T2. En revanche, dans le complexe peg/vitE/vitC, la VSL s'améliore après une baisse observée à T1 donc avec le temps le peg a su exercer son effet solubilisant sur la vitE ainsi que la vitC ce qui les a rendus plus résistantes (A Amokrane et al., 2020), tandis que la VSL de l'association peg/vitE a nettement diminué, atteignant 6,5 $\mu\text{m/s}$ (Figure 40).

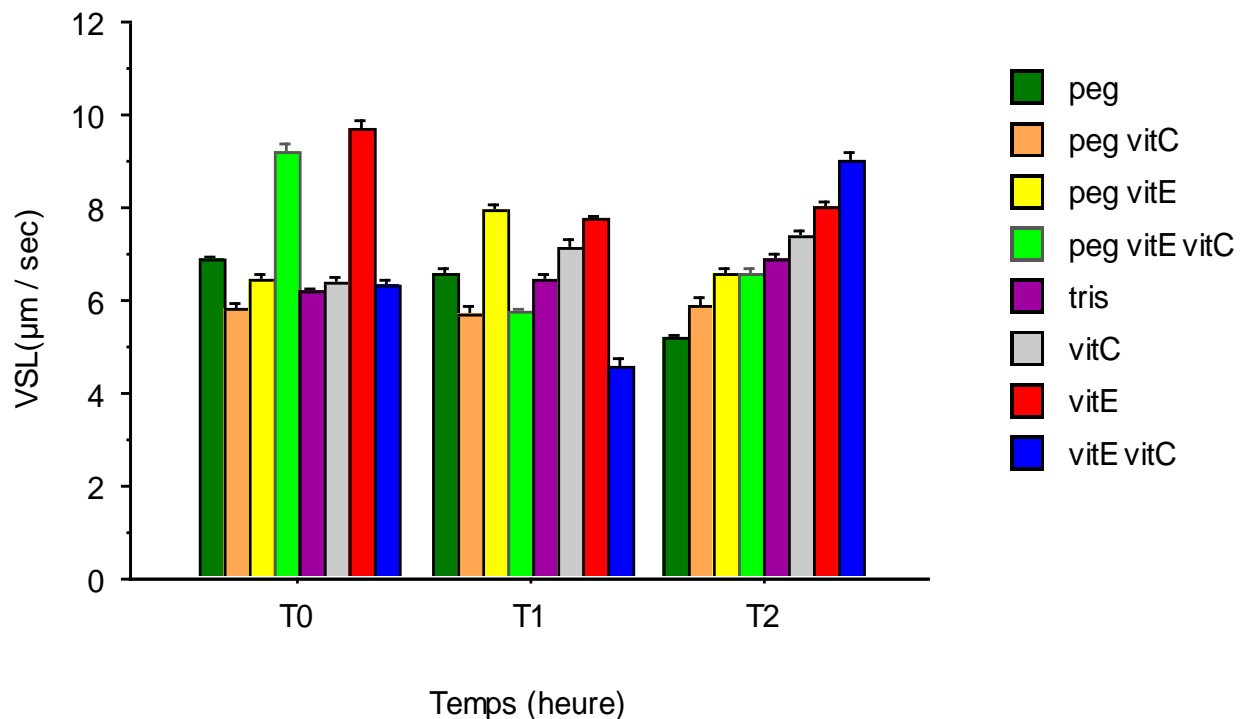


Figure 40 : Histogramme représentant le VSL ($\mu\text{m/sec}$) des spermatozoïdes mobiles conservés à 4°C, analysés à différents temps.

3- Interprétation des résultats de la motilité totale :

À T0, le complexe peg/vitE présente la meilleure mobilité totale avec une valeur de 85%, suivi de la vitC et du peg seuls, avec une mobilité totale de 80% et 70% respectivement, Dès la première heure de réfrigération, la vitC a probablement manifesté son pouvoir antioxydant, étant un réducteur très puissant, (Munnich et al. 1987). En effet la vitC inhibe rapidement la peroxydation lipidique et protégé, ainsi, les membranes contre les attaques peroxydatives en capturant les radicaux peroxydes avant qu'ils ne puissent initier les réactions de peroxydation (Poulab et al. 2015). De plus, la vitC joue un rôle essentiel dans le cycle de Krebs pour la production d'énergie, (Morena et al. 2009).

Nous remarquons que tous ces milieux précédents ont une mobilité totale supérieure à celle du contrôle, qui est de 55%. On suppose que le tris malgré ses composant bénéfiques et antibiotique, il n'est pas assez puissant pour protéger réellement les spz, ce qui prouve que le tris a un effet meilleur additionné d'autres molécules. En revanche, la mobilité totale la plus faible est celle du complexe peg/vitE/vitC, (28%).

À T1, la mobilité totale du complexe peg/vitE reste à 85%, tout comme celle de la vitC à 80%, ces milieux ont donc, conservé la mobilité des spermatozoïdes durant leur conservation à 4°C. Nous observons une augmentation de la mobilité totale du milieu de contrôle, atteignant une valeur de 75%, mais également une forte baisse de la mobilité totale du complexe vitE/vitC à 28%, qui est la valeur la plus faible à ce moment.

À T2, la vitC dépasse cette fois-ci le peg/vitE en termes de mobilité totale, avec une valeur de 83% pour la vitC et de 80% pour le complexe, qui est égal à celle du contrôle tris. Cette fois-ci, c'est le complexe peg/vitC qui présente la mobilité totale la plus faible, avec une valeur de 28% La diminution de la mobilité totale dans ce traitement est probablement due à l'épuisement des réserves ainsi que la vitC ajoutée et solubilisée par la peg (Figure 41).

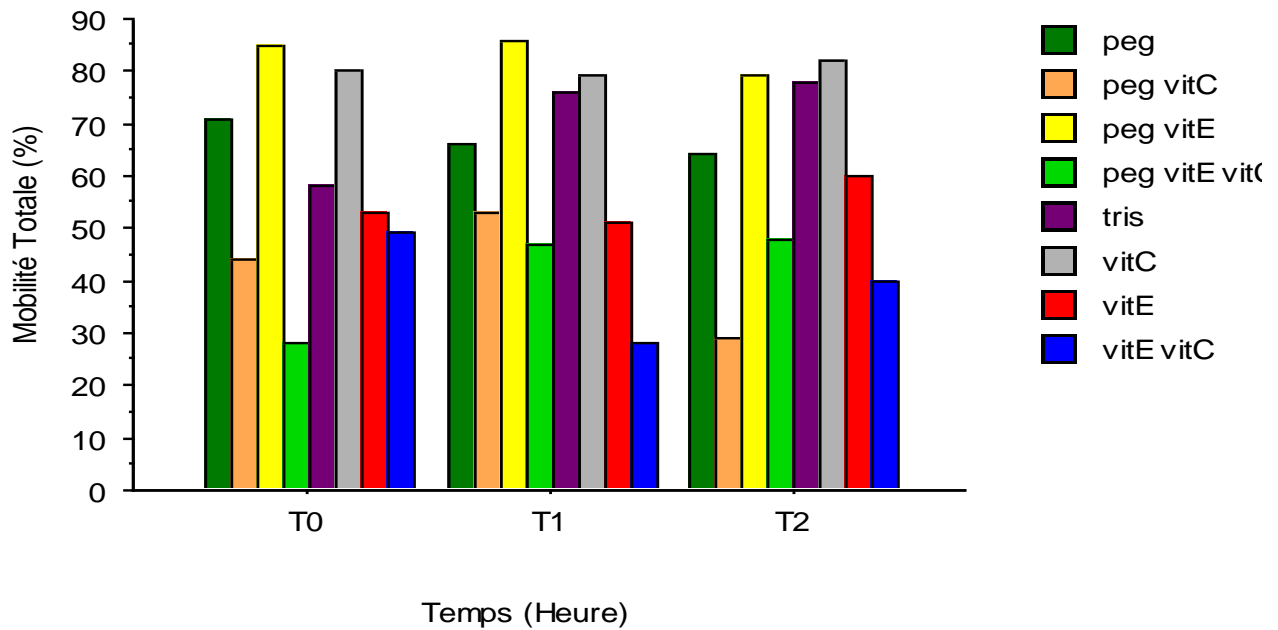


Figure 41 : : Histogramme représentant la Mobilité Totale (%) des spermatozoïdes mobiles conservés à 4°C, analysés à différents temps.

4- Interprétation des résultats de la Mobilité Progressive :

À T0, la vitC présente la plus forte mobilité progressive (28%), suivie du complexe peg/vitE (25%), et du peg (17%). Ces trois derniers affichent une mobilité progressive supérieure à celle du contrôle (tris), qui est d'environ 13%. Le complexe peg/vitE/vitC et l'association peg/vitC ont la plus faible mobilité progressive, (8%). Durant les 10 minutes de conservation à température ambiante, avant la réfrigération, l'effet bénéfiques de la vitE, vitC et peg sur les spermatozoïdes est constaté.

À T1, l'association peg/vitE devient le milieu avec la mobilité progressive la plus élevée, tandis que celle de la vitC diminue à 23% et celle du tris augmente à 25%. Cette fois-ci, le complexe vitE/vitC présente la plus faible mobilité progressive (5%).

À T2, la mobilité progressive de la vitC augmente cette fois-ci à 27%, tandis que celle de l'association peg/vitE redescend à 20%, devenant ainsi égale à celle du tris. Cette fois-ci, c'est l'association peg/vitC qui affiche la valeur la plus faible, qui est de 6%.

Durant les 2 heures de réfrigération à 4°C, les milieux qui ont conservé une bonne mobilité progressive des spermatozoïdes sont le peg/vitE et la vitC seule. Cela est probablement due à

l'effet antioxydant des deux molécules vitE et vitC (Neyrat, 2008) qui a protégé les spermatozoïdes contre le stress oxydatif, ainsi qu'à l'effet solubilisant du peg (A Amokrane et al., 2020) qui a rendu la vitE disponible dans le milieu peg/vitE. Par ailleurs, l'effet régénérateur de la vitE exercé par la vitC (Chapelle, J. P. (2007) a permis la disponibilité de la vitE dans le milieu vitC et son effet régénérateur d'énergie (Chapelle, J. P. (2007) a probablement rendu les spermatozoïdes plus actifs et conservé cette activité pendant leurs réfrigération (Figure 43).

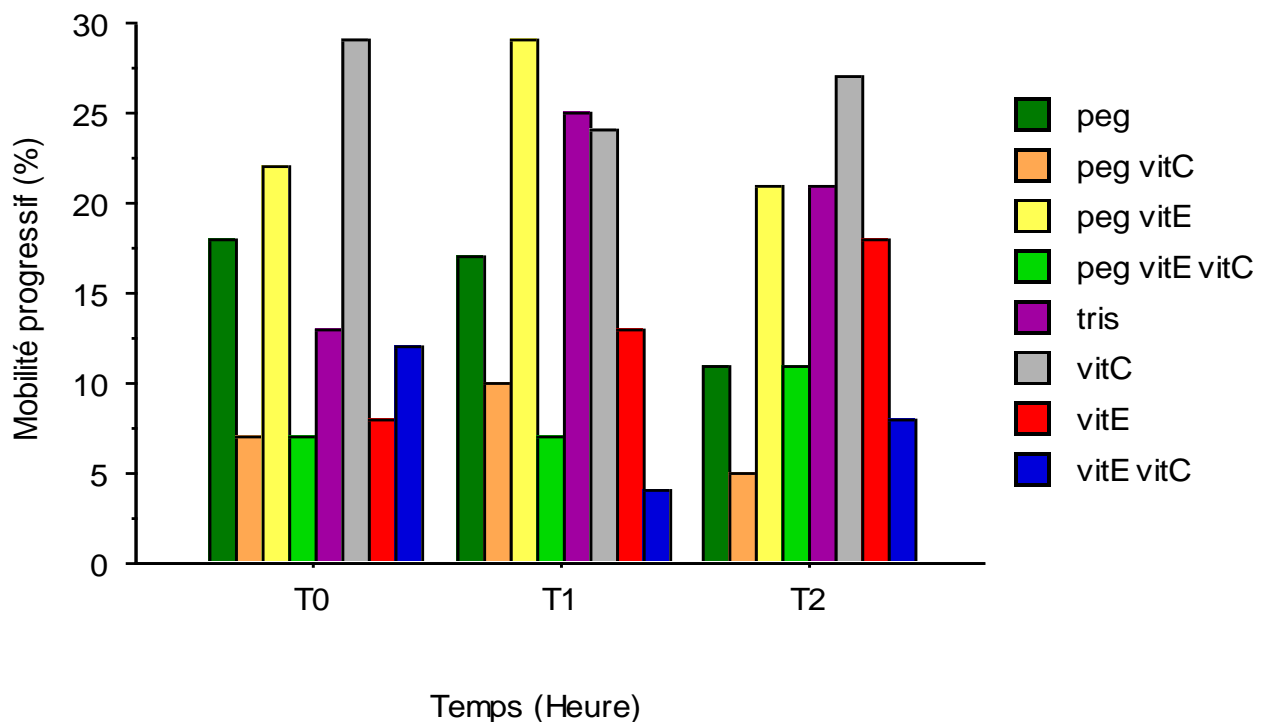


Figure 42 : Histogramme représentant la Mobilité progressive (%) des spermatozoïdes mobiles conservés à 4°C, analysés à différents temps.

Conclusion

Nous avons mené une étude pour évaluer la tolérance du sperme de lapin à la conservation au réfrigérateur (4 °C) à différents moments (T0, T1, T2), en utilisant un diluer à tampon Tris supplémenté de diverses concentrations de substances telles que la vitamine E, la vitC et le peg.

Les résultats obtenus démontrent que le diluer contenant des suppléments de vitE, de vitC et la combinaison peg/vitE présente presque toujours, un meilleur maintien des paramètres de mobilité spermatique, tels que la VSL, la VCL, la mobilité totale et la mobilité progressive pendant les 2h de réfrigération. En se basant sur ces résultats, il est recommandé d'utiliser ces milieux dans la conservation du sperme du lapin à 4 °C pendant 2 heures.

Cette approche permettrait d'optimiser la préservation de la qualité spermatique dans de telles conditions de conservation.

Les Références

A

A Amokrane., R Kaidi and M Iguer-Ouada. 2020. The effect of vitamine E and polyethylene glycol (PEG) association on chilled rabbit sperm: impact on sperm motility and oxidative stress status.

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

Abou-Haila, A., & Fain-Maurel, M. A. (1984). Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characterization. *The Anatomical Record*, 209(2), 197-208.

ADAMALI, H. I., & HERMO, L. (1996). Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *Journal of andrology*, 17(3), 208-222.

Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5-17

Arriola J. et Foote R. H., 2001, Accessory Sperm as an Indication of Fertilizing Ability of Rabbit Spermatozoa Frozen in Egg Yolk Acetamide With Detergent.

B

BATTAGLINI et al., 1992 ; HOLTZ and FOOTE, 1978 ; SETCHELL, 1989 ; Alvarino 2000).

Boussit D, 1989. reproduction et insémination artificielle en cuniculture, association française de cuniculture Ed. Lempdes France.234p

Baredderman P, J, Foot R.H., Yassen A.M., 1994, An improved artificial vagina for collecting rabbit semen. Department of animal Husbandry, Cornell University, Ithaca New York, U.S.A pp401-403.

Barone R, Chap 2 : appareil génital male In Barone R. anatomie des mammifères domestiques Tome 3 Fascicule II: appareil uro-génital. Lyon Ed.Laboratoire d'anatomie ENV.1978 : 90-268

Bencheick, 1995. Effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoides récoltés chez le lapin ; Ann.zootech.44,263-279p.

Boussit D., 1989. Reproduction et insemination artificielle en cuniculture chez le lapin Edite par l'association francais de cuniculture : diffusion toulouse III. P330.

Breton ,Shum, W.W., E. Hill, D. Brown, . Plasticity of basal cells during postnatal development in the rat epididymis. *Reproduction* 2012; 146:455-69.

Bourgeois C., (2003). Les vitamines dans les industries agroalimentaires. Edition TEC & DOC,Paris

C

Castellini C., 2008, Semen production and management of rabbit bucks, 9th World Rabbit Congress – June 10-13, Verona – Italy

Cooper TG ,Seiler P, Wenzel I, Wagenfeld A, Yeung CH, Nieschlag E., The appearance of basal cells in the developing murine epididymis and their temporal expression of macrophage antigens. *Int J Androl* 1986; 21:217-226.

Cheong, C., Matos, I., Choi, J. H., Dandamudi, D. B., Shrestha, E., Longhi, M. P., ... & Steinman, R. M. (2010). Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209+ dendritic cells for immune T c ell areas. *Cell*, 143(3), 416-429.

Colomb M., 1972. Etude des caractères biologiques simples du sperme de lapins soumis à 3 rythmes de récolte et calcul de leur répétabilité. Mémoire de fin d'études, Ecole Nat. sup. Féminine d'Agronomie, Rennes, 35 p.

D

Dumon 2007 Insémination artificielle dans l'espèce canine: Actualités. Bull. Acad. Vét. France. Tome 160 - N°2

Decuadro-Hansen G., 2004, La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal Chilled and frozen semen: the animal experience, *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 32 (2004) 887–893.

F

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

Forthier M., 2010, La cryométrie en flux comme outil pour caractériser et évaluer le potentiel de fertilité des spermatozoïdes bovins, Thèse pour l'obtention du grade de maître en science. Faculté de médecine. Université Laval.

G

GARREAU H, THEAU-CLEMENT M, GIDENNE T « Anatomie, taxonomie, origine, evolution et domestication ». GIDENNE T (2015) In *Le lapin, de la biologie à l'élevage*, Quae pp13-31.

García, M. F. M., & Ramírez, M. G. (1995). La perspectiva psicosocial en la conceptualización del apoyo social. *Revista de Psicología social*, 10(1), 61-74.

Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen, world rabbit sci.2005, 13: 71 –91

Guilland J.C., Lequeue B., (2009). Encyclopédie de vitamines. Du nutriment au médicament Lavoisier France.

Giroud J.P., (2011). Médicaments sans ordonnance : Les bons et les mauvais. La Martinière. France.

G. Baril, P. Chemineau, Y. Cognie, Y. Guérin, B. Lebœuf, P. Orgeur et J.-C. Vallet. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Etude FAO production et santé animales 83 (1993) : chapitre 4.

H

Hamon R, thepot N et salaun., 1999 structure, origine genetique des ignames cultivees du complexe diocorea cayenensis-rotundates et domestication des ignames en Afrique de l'ouest

Hamilton, D.W., 1975, Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis, and ductus deferens in the rat, in: *Handbook of Physiology: The Male Reproductive System*, D.W. Hamilton, and R.O. Greep, eds., American Physiology Society, Washington D.C

Hermo R., Robaire B. Epididymal cell types and their functions. In: B. Robaire, B. Hinton, eds. *The epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002: 81– 102

Hermo, L., Barin, K., and Robaire, B. (1988). Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats during postnatal development. *The Anatomical record* 233, 205-228.

Hermo, L., Wright, J., Oko, R., & Morales, C. R. (1991). Role of epithelial cells of the male excurrent duct system of the rat in the endocytosis or secretion of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). *Biology of Reproduction*, 44(6), 1113-1131.

Hermo, L., Oka, R., & Morales, C. R. (1994). Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *International review of cytology*, 154, 105-189.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10)

J

Jacobo, P., Guazzone, V. A., Theas, M. S., & Lustig, L. (2011). Testicular autoimmunity. *Autoimmunity reviews*, 10(4), 201-204.

K

Kakuk T., Darnas A. 1973. Biotin deficiency, Magyar Allatorvosok Lapja, 95: 9, 477-482.

KNAPP H.R. 1990. Prostaglandins in human semen during fish oil ingestion: evidence for in vivo cyclooxygenase inhibition and appearance of novel trienoic compounds. Prostaglandins, 39: 407-423

L

Lebas F, 1994 Physiologie de la reproduction chez le lapin, journée AERA-ASFC <>

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

M

Munnich A., Ogier H., Saudubray J-M et Amédée-Manesme O. 1987. Les Vitamines : aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques. Masson, Paris. 428 p. p.

Manuel fournisseur Hamilton Thorne du CASA Hamilton Thorne CEROS II

Mocé E., Purdy P.H., et Grahama J.K., 2008, Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. Published by Elsevier B.V.

Moore, H.D., and Bedford, J.M. (1979). Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. The Anatomical record 193, 293-311.

Mortimer D, Aitken R, Mortimer S, Pacey A. Workshop report: clinical CASA--the quest for consensus. Reprod Fertil Dev. 1995;7(4):951-9.

Mortimer D, Mortimer ST. Influence of system parameter settings on human sperm motility analysis using CellSoft. Hum Reprod. 1988 Jul;3(5):621-5.

Mortimer D, Serres C, Mortimer ST, Jouannet P. Influence of image sampling frequency on the perceived movement characteristics of progressively motile human spermatozoa. Gamete Res. 1988. Jul;20(3):313-27.

Mortimer ST. CASA – Practical Aspects. J Androl. 2000 Jul-Aug;21(4):515-24.

Muller Y., Et Clos J., (1997). La reproduction (Gonade, gamètes et fécondation). Edition Nathan, Paris : 9-31.

Morena M ; Dupuy A.M ; Jaussent I ; Vernhet H ; Gahide G et al. 2009. A cut-off value of plasma osteoprotegerin level may predict the presence of coronary artery calcifications in chronic kidney disease patients. Nephrol Dial Transplant 24 : 3389-3397.

N

Neyrat P. 2008. Vitamine E (tocophérols) et ses rôles. e .santé. fr.

N Bencheikh, 1994, effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoïdes récolté chez le lapin. *Ann Zootech* (1995) 44, 263-279

Najjar A, Rouatbi M et Ben Mrad M 2009 Le rythme de récolte affecte-t-il le spermogramme du lapin et la fertilité des lapines ? In Proc : 16èmes journées scientifiques sur les résultats de la recherche agricole, 2 et 3 décembre 2009, Nabeul, Tunisia. 16 : 336-343

Najjar, A., & Ben Mrad, M. (2013). Variations in the quality of sperm in rabbits. *Livestock Research for Rural Development*, 25(8)

O

Ott R.S ., Goffaux M., et Thibier M ., 1987, Examen morphologique des spermatozoïdes . EL. et INS ., 221, p15-20.

Oloufa, M.M., Bogart, R. & McKenzie, F. 1951. Effect of environmental temperature and the Thyroid Gland on Fertility in the Male Rabbit. P5, Statioi Technical Bulletin.

O'Bryan M.K., Schaltt S., Philips D.J., De Kretser D.M., HedgerM.P. 2000. Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology*, 141: 238-246.

P

poulab et al 2015, International Journal of Basic Sciences & Applied Research. Vol., (4) 3, 190-195, 2015

Ponthier J., VAN DEN BERGHE F., PARRILLA-HERNANDEZ S., HANZEN C. et DELEUZE S. 2014 Congélation du sperme dans l'espèce équine: état des lieux et perspectives.

S

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

spermatozoa from epididymides stored at 4 degrees C, *Theriogenology* 50 (1998) 615-623.

Souccar T., Curtay J.P., (1996). Le nouveau guide des vitamines. Seuil. France.

Smith, S., Turbill, C., & Suchentrunk, F. (2010). Introducing mother's curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. *Molecular ecology*, 19(1), 36-43.fèt

Steinman, R. M. (2010). Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209+ dendritic cells for immune T c ell areas. *Cell*, 143(3), 416-429

T

Trasler, J. M., Hermo, L., & Robaire, B. (1988). Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: a quantitative approach. *Biology of reproduction*, 38(2), 463-479.

Traber, M.G. (2006) Vitamin E. In: Shils, M.E., Shike, M., Ross, A.C., Caballero, B. and Cousins, R.J., Eds., *Modern Nutrition in Health and Disease*, Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore, 396-411.

van Thiel, D., Wächter, W., **Triebel, E.**, Habermann, J., Marschner, I., & Scriba, P. C. (1981). Assessment of the efficacy of iodine supplementation by TSH determination in Tanzania

U

USSELMAN, M. C., CONE, R. A., & ROSSIGNOL, D. P. (1985). Rat cauda epididymal fluid is a mucus. *Journal of andrology*, 6(5), 315-320.

V

Vaissaire J. P., 1977. Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire. Paris, Maloine SA Editeur. ed., 1 vol., 457 p

VERI, J. P., HERMQ, L., & 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.

Van Hecke, O. A. S. K. R., Austin, S. K., Khan, R. A., Smith, B. H., & Torrance, N. (2014). Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *PAIN®*, 155(4), 654-66

Résumé

L'objectif de notre étude est d'évaluer les effets de la vitE, de la vitC et du peg sur la conservation des spermatozoïdes du lapin provenant des boucheries locales, à une température de 4°C. L'objectif principal est d'optimiser la conservation sur une période aussi longue que possible.

Dans cette étude, nous avons privilégié l'utilisation du sperme épидидymaire par rapport à celui de l'éjaculat utilisé dans les recherches précédentes. Plusieurs paramètres sont évalués pour déterminer la qualité des semences du lapin, tels que la VSL (vitesse en ligne droite ou progressive), la VCL (vitesse curviligne), la mobilité totale et la mobilité progressive. Ces paramètres sont évalués pour chaque milieu de conservation et comparés au milieu de contrôle tris.

La vitE et la vitC sont toutes deux réputées pour leurs effets antioxydants et pour améliorer la mobilité des spermatozoïdes. Le peg, quant à lui, est connu pour son effet solubilisant. Lorsqu'il est associé à d'autres substances, telles que la vitE, il peut solubiliser cette dernière et la rendre plus biodisponible dans les milieux de conservation, ce qui lui permet d'exercer son effet antioxydant. Cette association est appelée un complexe, qui consiste à mélanger deux ou plusieurs milieux de conservation afin de bénéficier des bienfaits de toutes les substances. Les différents résultats obtenus avec ces complexes sont comparés afin de sélectionner les meilleurs milieux de conservation.

En effet nous avons constaté qu'en général, les milieux qui ont conservé le mieux la mobilité et ses paramètres pendant les deux heures de réfrigération sont ceux à base de vitE, vitC, l'association peg/vitE et le tris.

Les conclusions de cette étude pourraient être utiles pour les centres de recherche travaillant sur la conservation spermatique en utilisant les vitE et vitC ainsi que le peg.

Abstract

The aim of our study is to evaluate the effects of vitE, vitC, and peg on the preservation of rabbit sperm obtained from local butcher shops, at a temperature of 4°C. The main objective is to optimize the preservation for the longest possible period.

In this study, we favored epididymal sperm over ejaculate sperm used in previous research. Several parameters are evaluated to determine the quality of rabbit semen, such as VSL (straight-line or progressive velocity), VCL (curvilinear velocity), total motility, and progressive motility. These parameters are assessed for each preservation medium and compared to the control medium tris.

Both vitE and vitamin C are known for their antioxidant effects and improvement of sperm mobility. peg, on the other hand, is known for its solubilizing effect. When combined with other substances, such as vitE, it can solubilize it and make it more bioavailable in preservation media, allowing it to exert its antioxidant effect. This combination is called a complex, which involves mixing two or more preservation media to benefit from the advantages of all the substances. The different results obtained with these complexes are compared to select the best preservation media.

Indeed, we found that in general, the media that best preserved mobility and its parameters during the two hours of refrigeration are those based on vitE, vitC, the peg/vitE association and tris.

The findings of this study could be helpful for research centers involved in sperm preservation by utilizing vitE, vitC, and peg.

The findings of this study could be helpful for research centers involved in sperm preservation by utilizing vitE, vitC, and peg.