

*République Algérienne démocratique et Populaire*  
*Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**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 de Master en Biologie Animale

### *Thème*

*Optimisation de la conservation  
du sperme du lapin*

*Présenté par :*

***Bouزيد Taous & Atfadel Tassadit***

*Soutenu le : 08 juin 2023*

*Le jury :*

<b><i>Mr IGUER-OUADA Amokrane</i></b>	<b><i>Professeur</i></b>	<b><i>Président</i></b>
<b><i>Mme AMOKRANE/TALBI Asma</i></b>	<b><i>MAA</i></b>	<b><i>Encadreur</i></b>
<b><i>Mme Rahmani Amina</i></b>	<b><i>MCA</i></b>	<b><i>Examinatrice</i></b>

**Année universitaire : 2022/2023**

# *Remerciement*

*Le grand merci s'adresse au bon dieu le tout-puissant, de nous avoir donné la force et la patience, et de nous guidé et éclairé notre chemin pour la réalisation de ce mémoire.*

*Au terme de l'élaboration de ce modeste travail, nous tenons à exprimer tout notre gratitude et nos vifs remerciements à Mme la promotrice **Mme Amokrane/TALBI.A**, pour avoir voulu accepter d'encadrer ce travail, pour la confiance qu'elle a témoignée, sa disponibilité permanente et sa patience. Ainsi, nous la remercions pleinement pour ses conseils qu'elle n'a cessé de nous prodiguer.*

*Nous tenons à remercier également les membres de jury **Mr IGUEROUADA.A** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire et **Mme Rahmani.A** 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. Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail, en nous soutenant chacun à sa façon.*

*«Grand merci à tous »*

# **DEDICACE**

*Je dédie ce travail à mes chers et respectueux parents:*

## **A Ma mère:**

*A toi qui m'a donné la vie, aucune dédicace ne saurait exprimé mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que tu as consenti pour mon instruction et mon bien être.*

## **A MON PERE:**

*Ce travail est dédié à mon père, celui qui a été durant toute ma vie un exemple de dévouement, de militance, de préservation et de sacrifice. Grâce à son enseignement des principes et de valeurs, ma permit la force et le courage de faire face à ma vie.*

*A mes frères **Ali, Mehdi**, Ma Sœur **Imene** et mes grandes sœurs qui m'ont soutenu **Meriem** et **Faiza** ainsi que ma cousine **Sandra**, à mes cousins **Sofiane, Mouhamed, Mokrane** à toute Ma famille en particulier ma tante **Ghania**. A mes amis, **Sana, Ihssan**, mon p'tite frère **Sifou**, mes amis **Islem, Bilal.....**).  
*Et à tous ceux qui me sont chers.**

*A tous les membres de familles qui portant le nom «Bouزيد et Brahmi »*

*A Ma binôme **Sissa** qui a été une amie. Je te remercie pour ton soutien.*

# **DEDICACES**

*Je tiens d'abord à remercier le bon **D**ieu le tout puissant pour la volonté et le courage qu'il m'a donné pour mener à terme ce travail.*

*J'ai l'immense plaisir de dédier ce modeste travail de fin d'étude à ceux que J'aime le plus au monde, mes très chers parents qui m'ont apporté leur soutien, dans les moments difficiles avec beaucoup d'amour et d'affection et qui ont souffert sans se plaindre pour m'élever et m'éduquer afin que j'atteigne ce niveau.*

*A ma très chère mère « Farida », quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit, ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*A mon cher père « **Khelaf** », pour le goût à l'effort qu'il a suscité en moi, qui à tout sacrifier pour mon bien et qui a éclairé ma route par sa compréhension, son soutien et son amour, je lui confirme mon attachement et mon profond respect.*

*A mes très chères sœurs Dyhia et Tinhinane, qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans les moments les plus durs, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite et que le dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde pour moi.*

*Et à mon très cher frère **Mouloud**, que le bon **D**ieu te protège. Je te souhaite de la réussite dans ta vie.*

*A mon fiancé « Rabah » pour sa confiance, son encouragement et sa patience et à toute ma belle-famille merci beaucoup d'être toujours à mes côtés.*

*A tous les membres de ma famille et toutes personnes qui portent le nom « Atfadel et Ourabah ».*

*A ma chère amie et binôme « Manel » et à toute sa famille.*

*Sissa*

## Liste des abréviations

**%** : pourcentage

**µl** : microlitre

**µm** : micromètre

**C°**: Celsius

**CASA**: Computer Assisted Sperm Analyzer

**cm**: centimeter

**FSH**: Follicle Stimulating Hormone

**g**: gramme

**GnRh**: Gonadotropin-Releaising Hormone.

**IA** : Insémination Artificiel.

**IM** : Intramusculaire.

**Kg** : Kilogramme.

**L** : litre.

**Large** : largeur.

**LH** : Luteinizing hormone.

**L** : longueur.

**min** : minutes.

**Sec** : seconde

**ml** : millilitre.

**mm** : millimètre.

**Nbre** : nombre.

**PEG** : polyéthylène glycol.

**spz** : spermatozoïdes.

**TB** : tris buffer.

**v/v**: volume / volume.

**VA**: vagin artificiel.

**VAP**: vilocity average pathxay.

**VCL**: Curvilinear velocity.

**vitC**: vitamine C.

**VSL** : straight-line velocity.

**HE** : Huile Essentielle.

**EO** : Essentiel Oil

## Liste des figures

Numéro de Figure	Titre de figure	Page
Figure 01	Appareil reproducteur du lapin male	-4-
Figure 02	Testicule du lapin	-5-
Figure 03	Anatomie et régionalisation de l'épididyme	-7-
Figure 04	Représentation schématique de l'épithélium épидидymaire	-8-
Figure 05	Différent étapes de la spermatogenèse	-11-
Figure 06	Perfusion de la partie caudale de l'épididyme de bélier (technique de flush rétrograde)	-15-
Figure 07	Classification de différentes anomalies spermatiques	-14-
Figure 08	Structure de spermatozoïde du lapin	-14-
Figure 09	Graphe représente la mobilité du spermatozoïde	-20-
Figure 10	Isotype de Rosmarinus Officinalis	-23-
Figure 11	Rosmarinus Officinalis « Halhal »	-24-
Figure 12	Matériels Technique	-28-
Figure 13	Matériels Chimique	-28-
Figure 14	Les produits composants de Tris	-29-
Figure 15	Préparation du contrôle Tris	-29-
Figure 16	Agitation de solution	-30-
Figure 17	Complexe PEG/TRIS	-30-
Figure 18	Solution HE	-31-
Figure 19	Complexe PEG/HE	-32-
Figure 20	Milieux de conservation	-32-
Figure 21	Étapes de la récolte épидидymaire	-34-
Figure 22	Le CASA et ses instruments	-35-
Figure 23	Les traitements + sperme	-36-

<b>Figure 24</b>	Histogramme représente la VCL ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) des spz conservé à $4\text{C}^\circ$ dans différents milieux et analysés à différents temps.	-39-
<b>Figure 25</b>	Histogramme représente la VSL ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) des spz conservé à $4\text{C}^\circ$ dans différents milieux et analysés à différents temps.	-40-
<b>Figure 26</b>	Histogramme représente le pourcentage de mobilité totale des spz conservé à $4\text{C}^\circ$ dans différents milieux et analysés à différents temps.	-42-
<b>Figure 27</b>	Histogramme représente le pourcentage de mobilité progressif des spz conservé à $4\text{C}^\circ$ dans différents milieux et analysés à différents temps.	-43-

## Liste des tableaux

N° de tableau	Titre	Page
I. Tableau	Volume spermatique de l'éjaculat de quelques mammifères	-15-
II. Tableau	Valeur de PH du sperme chez quelques espèces	-16-

# Sommaire

Liste des abréviations .....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
<i>Introduction</i> .....	- 0 -
<i>Chapitre I : physiologie de la reproduction chez lapin</i> .....	
<b>I. Anatomie d'appareil génital du lapin male :</b> .....	- 4 -
<b>1- Les testicules :</b> .....	- 4 -
a) Anatomie : .....	- 5 -
<b>2- L'épididyme :</b> .....	- 6 -
a) Anatomie : .....	- 6 -
b) Lumière du canal épидидymaire :.....	- 7 -
c) Epithélium épидидymaire : .....	- 7 -
d) Les cellules épидидymaire :.....	- 8 -
<b>II. La spermatogénèse :</b> .....	- 10 -
<i>Chapitre II</i> .....	12
<b>I. Les facteurs influençant à la production et la qualité du sperme :</b> .....	- 13 -
<b>1- L'âge :</b> .....	- 13 -
<b>2- La santé :</b> .....	- 13 -
<b>3- L'environnement :</b> .....	- 13 -
<b>II. La récolte du sperme :</b> .....	- 13 -
a) Vagin artificiel :.....	- 14 -
b) Prélèvement épидémique :.....	- 14 -

<b>III. Analyse du sperme :</b>	- 15 -
<b>1) Evaluation macroscopique :</b>	- 15 -
a) Volume :	- 15 -
b) Couleur :	- 16 -
c) Le ph	- 16 -
<b>2) Evaluation microscopique :</b>	- 16 -
1) Mobilité	- 17 -
2) Concentration :	- 17 -
3) Morphologie :	- 17 -
4) Le système CASA :	- 19 -
<b>V. La Conservation :</b>	- 20 -
<b>1) Types de conservation de la semence :</b>	- 20 -
a) Congélation avec l'Azote Liquide :	- 20 -
b) La décongélation :	- 21 -
c) La réfrigération :	- 21 -
<b>2) Milieux de conservation de la semence :</b>	- 21 -
a) Vitamine « E » :	- 22 -
b) Vitamine « C » :	- 22 -
c) Polyéthylène glycol « PEG » :	- 22 -
<b>3) Huile Essentielle « Rosmarinus Officinalis » :</b>	- 23 -
a) Définition et répartition :	- 23 -
b) Description botanique :	- 23 -
c) L'extraction des huiles essentielles :	- 24 -

d) Intérêt du « <i>Rosmarinus Officinalis</i> » :.....	- 24 -
e) La toxicité de « <i>rosmarinus officinalis</i> » : .....	- 24 -
<i>Matériel et méthodes</i> .....	26
<b>Objectif du travail</b> .....	- 27 -
<b>I. Collecte de la semence</b> :.....	- 27 -
<b>I. Matériel de collecte</b> : .....	- 27 -
a) Matériel biologique : .....	- 27 -
b) Matériel technique (figure 12) :.....	- 27 -
<b>1) Préparation du contrôle Tris</b> :.....	- 29 -
<b>2) Préparation des autres milieux</b> : .....	- 30 -
a) Préparation du milieu PEG seul (PEG+TRIS) : .....	- 30 -
b) Préparation de l'HE :.....	- 31 -
c) Préparation de l'association PEG/HE :.....	- 31 -
d) Préparation du milieu vitC seule : .....	- 32 -
<b>3) Méthode de collecte de la semence</b> :.....	- 33 -
<b>II. Analyse de semence</b> :.....	- 34 -
<b>1) Examen macroscopique</b> :.....	- 35 -
a) Couleur : .....	- 35 -
b) Volume :.....	- 35 -
<b>2) Examen microscopique</b> :.....	- 35 -
a) Système CASA :.....	- 35 -
<b>3) Préparation des traitements {milieu + sperme}</b> :.....	- 36 -
<i>Résultats et Discussion</i> .....	- 37 -

<b>I. Interprétation des résultats .....</b>	<b>- 38 -</b>
<b>1) Résultats de la VCL dans les différents milieux: .....</b>	<b>- 38 -</b>
<b>2) Résultats de la VSL dans les différents milieux:.....</b>	<b>- 39 -</b>
<b>3) Comparaison de la motilité totale des spermatozoïdes dans les différents milieux .....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>4) Comparaison de la mobilité progressive des spermatozoïdes dans les différents milieux .....</b>	<b>- 42 -</b>
<b><i>Conclusion</i>.....</b>	
<b><i>Références</i> .....</b>	
<b>Résumé.....</b>	

# *Introduction*

L'élevage animal est une activité essentielle qui vise à améliorer les performances et la productivité des espèces d'élevage. Dans ce contexte, la conservation du sperme épидидymaire est une pratique prometteuse pour préserver la fertilité des animaux, faciliter la reproduction et favoriser le développement de nouvelles lignées génétiques. La conservation à basse température, telle que 4 °C est une méthode couramment utilisée pour prolonger la durée de viabilité du sperme. Cependant, cette technique nécessite l'utilisation de substances additives pour maintenir la qualité du sperme au fil du temps (**Joly et Theau Clément, 2000**).

Cependant, plusieurs paramètres peuvent influencer la performance de reproduction chez les lapins tels que l'environnement, les conditions d'élevages et l'alimentation. Récemment plusieurs études menées sur les huiles essentielles ont montré leurs effets sur le processus de reproduction (**El K alamouni 2010**).

L'huile essentielle « *Rosmarinus officinalis* » communément connu sous le nom du romarin, est un extrait de plantes, reconnu pour ces propriétés antimicrobiennes, antioxydants et anti-inflammatoires. Il a suscité un intérêt particulier en raison de ses diverses applications en médecine et en industrie alimentaire. L'utilisation de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* dans la conservation du sperme épидидymaire à 4 °C présente un potentiel intéressant en raison de ses propriétés bénéfiques.

Cependant, malgré l'intérêt croissant pour l'utilisation de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* dans la conservation du sperme épидидymaire du lapin à basse température, des questions subsistent quant à leur efficacité et à leurs avantages potentiels. Il est donc nécessaire de mener des recherches approfondies afin de mieux comprendre comment ces huiles essentielles peuvent être utilisées de manière optimale dans ce contexte spécifique. Cette étude vise à explorer les effets de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur la viabilité et la mobilité du sperme épидидymaire du lapin à 4 °C, ainsi que son potentiel pour améliorer l'élevage à l'avenir. Ainsi, cette recherche se concentrera sur l'évaluation de l'efficacité de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* dans la conservation du sperme épидидymaire du lapin à 4 °C.

La conservation du sperme épидидymaire du lapin à des températures basses est un domaine de recherche important pour les élevages. L'utilisation des huiles essentielles, notamment celles dérivées de la plante *Rosmarinus officinalis* (romarin), suscite un intérêt croissant en raison de leurs propriétés bénéfiques. Cependant, il est essentiel de comprendre

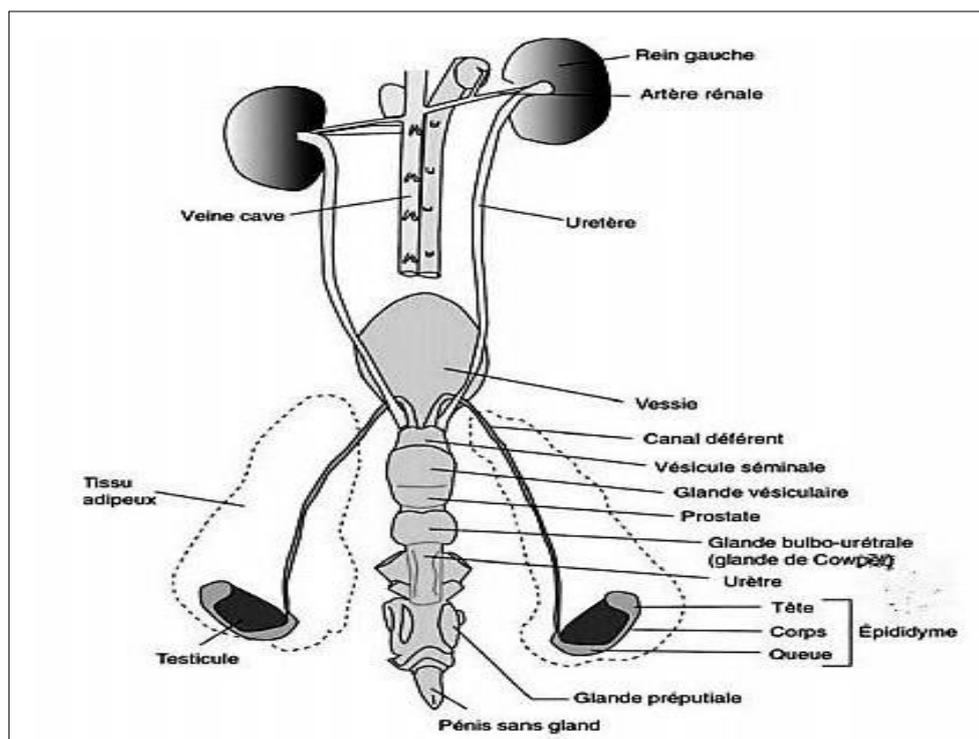
comment ces huiles essentielles peuvent être utilisées de manière efficace et sécurisée dans la conservation du sperme épидидymaire à 4 °C en particulier chez le lapin, chose qui n'a jamais été faite. Notre objectif est donc de déterminer l'efficacité et les avantages potentiels de l'utilisation des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* dans la conservation du sperme épидидymaire du lapin à basse température, en termes de paramètres de mobilité des spermatozoïdes.

# *Chapitre I*

## I. Anatomie d'appareil génital du lapin mâle :

L'organisation générale de l'appareil génital du lapin mâle est voisine à celle des autres mammifères, sauf pour la capacité supplémentaire de pouvoir rétracter les testicules dans l'abdomen ou de les extérioriser dans les bourses grâce à un tissu musculaire qui est le crémaster, ainsi que quelques différences concernant la taille, le poids et la forme des organes (**Hamon et al., 1999**).

Il comporte 3 grandes parties : la partie glandulaire constituée par les testicules, la partie tubulaire constituée par l'épididyme, le canal déférent, l'urètre et en fin la partie copulatrice constituée par le pénis (**Barone, 1976**), ainsi que les glandes annexes qui sont ; la prostate, les vésicules séminales, la glande de Cowper... (**Figure 1**).



**Figure01:** Appareil reproducteur du lapin mâle (*Garreau et al., 2015*).

### 1) Les testicules :

Les testicules sont des organes pairs dotés d'une double fonction :

- La fonction exocrine : (spermatogénèse).

- La fonction endocrine : (la synthèse et la sécrétion des hormones sexuelles principalement la testostérone) qui sont assurées par une double structure, un compartiment tubulaire et un compartiment interstitiel (**Muller et Clos, 1997**).

**a) Anatomie :**

Les testicules du lapin sont des organes pairs de forme ovoïde (**Bedosa, 1998**) amincis aux extrémités avec un pôle caudal plus pointu mesurant 3 à 3,5cm de longueur, 1 à 1,5 cm de largeur, 1 à 1,3 cm d'épaisseur et pesant 1,5 à 2g (**Figure 02**).

Ils sont situés de part et d'autres de la ligne médiane inguinale, protégés et soutenus par une enveloppe appelée scrotum ou sac scrotal, constitué d'une fine couche de peau recouvrant divers couches fibro-élastiques et musculaires dont la plus importante est le dartos (**Barone, 2001**).

Le lapin est alternativement exorchide lorsque les testicules montent dans la cavité abdominale sous l'effet de frayeur, ou énorchide lorsqu'ils redescendent dans les bourses grâce à un tissu musculaire appelé crémaster (**Boussit, 1989 ; Barone, 2001**).



**Figure02 : Testicule du lapin (photo personnelle)**

## 1- L'épididyme :

L'épididyme, organe du tractus génital mâle, est accolé à la face postérieure du testicule et relie les canaux efférents au canal déférent. Chez les mammifères, c'est un long tubule unique fortement contourné dont la taille varie selon les espèces, il mesure 1,5 à 3cm chez les lapins (**Barone, 1978 ; Grasse, 1995**) (**Figure 03**).

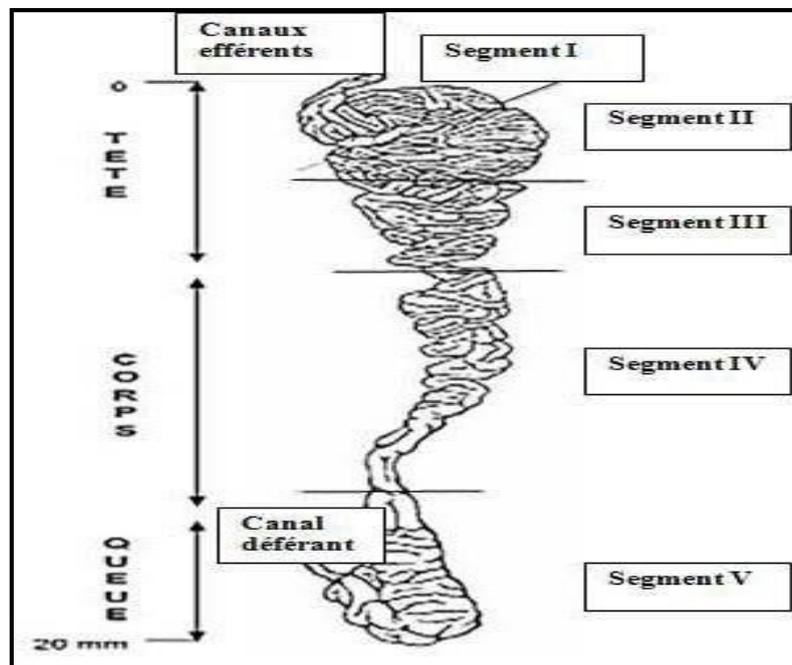
### a) Anatomie :

Sur la base de sa morphologie et de son histologie, cet organe peut être divisé en trois parties distinctes :

- La tête (région proximale) : qui est reliée au hile du testicule par les canaux efférents et le rete-testis.
- Le corps (région médiane) : accolé au testicule jusqu'à sa partie postérieure.
- la queue (région distale) : connectée au canal déférent (**Abe et al., 1983 ; Abou Haila et Fain-Maurel, 1984**).

Ces parties sont également subdivisées en plusieurs segments chacun d'entre eux étant délimité par des cloisons conjonctives (**Thibault et Levasseur, 2001**) (**Figure 03**).

Autour de ce canal, on note la présence d'une mince couche de fibres musculaires lisses, dont les contractions permettent le transit des spermatozoïdes (**Bonnes et al., 2005**).



**Figure03 : Anatomie et régionalisation de l'épididyme (Hermo et Robaire, 2002).**

#### **b) Lumière du canal épидидymaire :**

Le transit des spermatozoïdes pour rejoindre le système éjaculateur depuis les gonades mâles, à travers l'épididyme au niveau de sa lumière, où ils baignent dans un milieu de nature très complexe : le fluide épидидymaire.

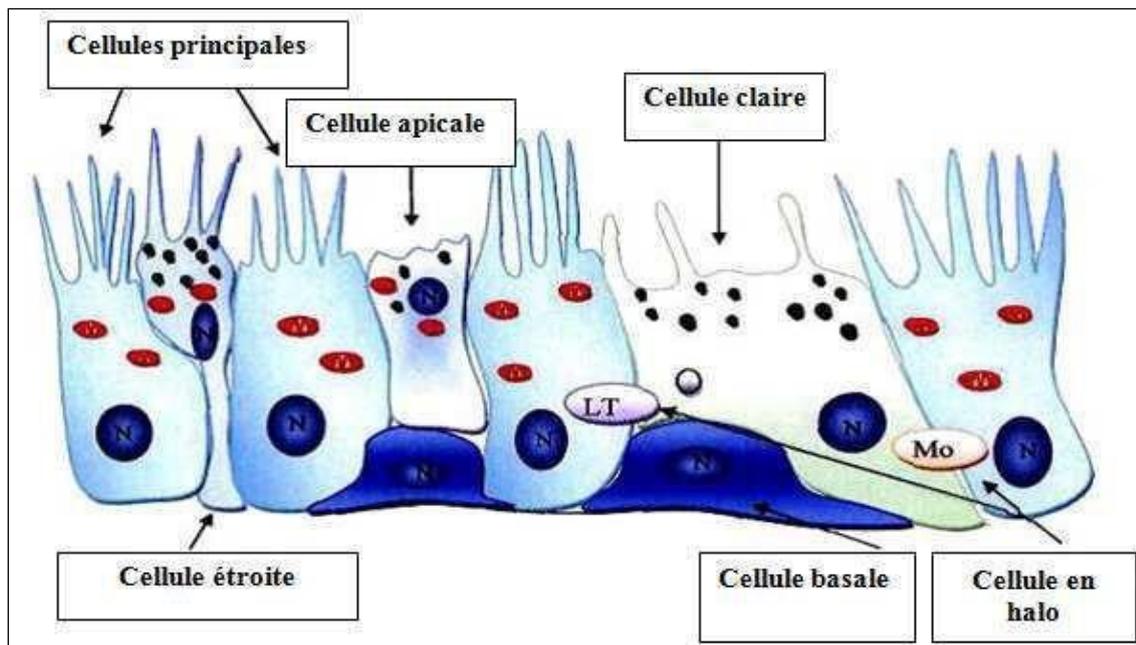
Ce dernier est composé principalement d'ions, de petites molécules organiques, de protéines et de macromolécules. Mais en raison d'une forte régionalisation tissulaire et cellulaire des activités de synthèse, de sécrétion et réabsorption des cellules épithéliales, la composition de ce fluide épидидymaire varie tout le long du canal (Adamali et al., 1999 ; Hermo et Robaire, 2002).

#### **c) Epithélium épидидymaire :**

L'épithélium de l'épididyme est un épithélium pseudo stratifié de type cylindrique ; entouré de cellules musculaires lisses appelées cellules myoïdes. Plusieurs types cellulaires se

retrouvent dans l'épithélium de l'épididyme. Chaque type cellulaire est retrouvé dans l'épithélium selon une distribution région-dépendante (**Mandon ; 2015**).

Six types de cellules composent l'épithélium de l'épididyme ; ce sont les cellules basales, étroites, apicales, claires, en halos et principales, qui présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles très variées de la région proximale à la région distale du tubule. et chaque type de cellules a un rôle qui est spécifique (**Figure04**) (**debellefeuille, 2002**).



**Figure04** : Représentation schématique de l'épithélium épididymaire (**Girouard, 2009**).

N: noyau; LT: lymphocyte T; Mo: monocyte.

#### d) Les cellules épididymaire :

##### - Cellules principales :

Les cellules principales (cellules stéréo ciliées) sont les cellules les plus abondantes de l'épithélium épididymaire, constituent environ 80% de la population cellulaire totale dans le segment initial et ne représentent que 65% de la population cellulaire totale dans la queue de l'épididyme (**Trasler et al., 1988**).

Ces cellules présentent des caractéristiques structurales variables d'un segment à l'autre de l'épididyme, elles sont reliées entre elles par des jonctions serrées et des desmosomes (**Hermo et Robaire, 2002**).

Leur hauteur est plus élevée au niveau de la tête que de la queue de l'épididyme,

cette variation concerne aussi la longueur des microvillosités qui tapissent leur pôle apical (**Ramos et Dym, 1979, Flickinger et al., 1978 ; Jones et al., 1979**).

Ces cellules jouent un rôle important dans le transport, la sécrétion et l'absorption de petites particules et de protéines induisant ainsi la maturation épидидymaire des spermatozoïdes (**Hermo et Robaire, 2002**) et participent également à la formation de la barrière hémato-épididymaire via l'établissement des jonctions serrées (**Suzuki et Nagano, 1979**).

- **Cellules basales :**

Les cellules basales représentent 10% à 20% de la population cellulaire épидидymaire totale. Sont de petites cellules allongées, avec un noyau irrégulier et un cytoplasme pauvre en organites, localisées tout le long du canal épидидymaire et reposent sur la membrane basale formant ainsi un réseau en dessous des cellules principales (fig04) (**Soranzo et al., 1982**).

D'après **Veri et al (1993) et Cooper (1998) et Seiler et al., (2000)**, elles jouent un rôle dans l'élimination des radicaux libres ainsi que dans la protection immunitaire des spermatozoïdes en participant à ce qu'on appelle, la barrière hémato-épididymaire.

- **Cellules en halo :**

Les cellules en halo sont présentes tout au long de l'épididyme et sont situées à la base de l'épithélium (**Robaire et Hinton, 2002**).

Elles sont identifiées comme étant des lymphocytes intra-épithéliales ou des monocytes qui migrent dans l'épithélium durant le développement post-natal et elles contribuent à former une barrière immunologique au niveau de l'épididyme (**Hofferet al., 1973 ; Hermo et Robaire, 2002**).

- **Cellules claires :**

Les cellules claires sont des grandes cellules prismatiques, présentes essentiellement dans le corps et la queue de l'épididyme (**Soranzo et al., 1982**), elles sont caractérisées par la présence de nombreuses vésicules claires en région apicale, de lysosomes en région médiane et de nombreuses inclusions lipidiques dans leur région basale (**Robaire et Hermo, 1988**).

D'après **Olson et Hinton (1985)**, elles joueraient un rôle dans l'absorption de certains composants du fluide épидидymaire.

**- Cellules apicales :**

Les cellules apicales retrouvées principalement dans le premier segment de l'épididyme (la partie proximale de la tête) présentent un cytoplasme dense, très riche en mitochondrie, contenant des lysosomes et de l'anhydrase carbonique impliquée dans la sécrétion des ions  $H^+$  et la réabsorption des bicarbonates ( $HCO_3^-$ ), responsables de l'acidification du fluide épидидymaire (**Martinez-Garcia et al., 1995**).

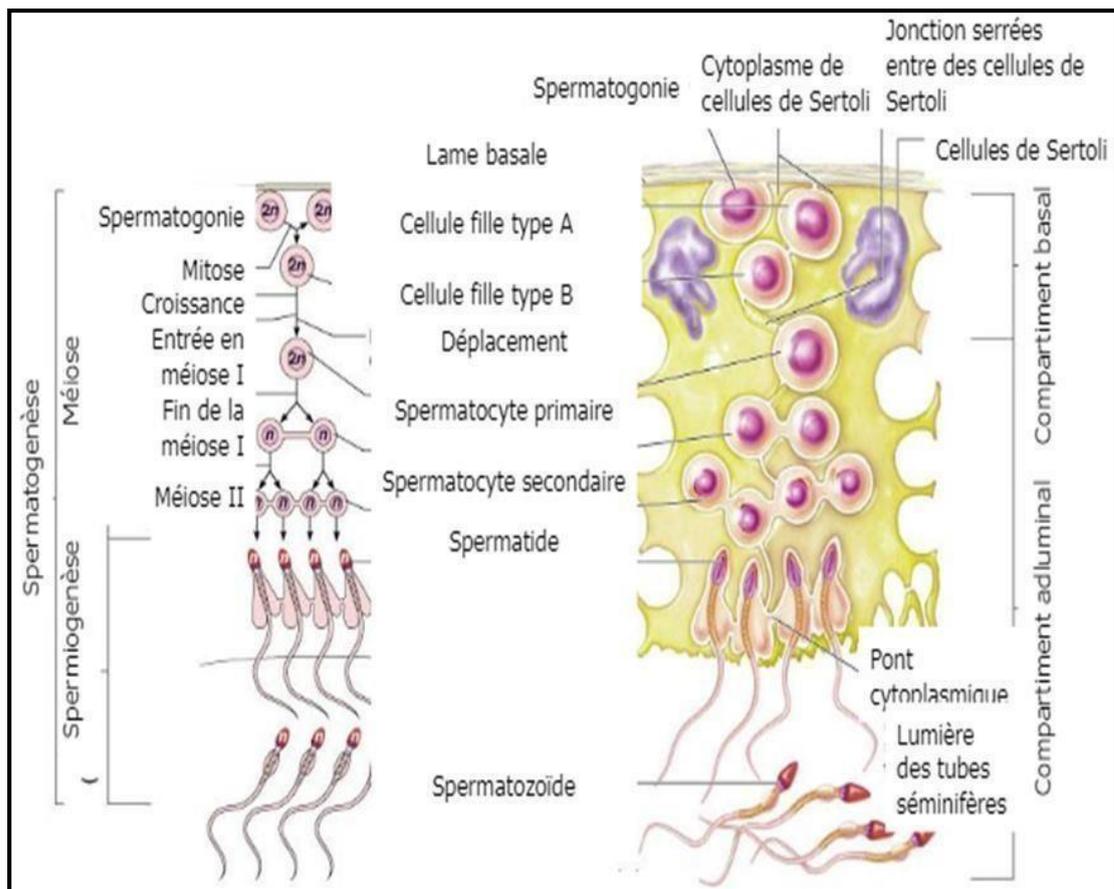
**- Cellules étroites :**

Les cellules étroites se retrouvent dans le segment initial et intermédiaire de l'épididyme, pourvue d'un noyau allongé en position apicale. Ces cellules se prolongent entre les cellules principales pour atteindre la région basale de l'épithélium épидидymaire, ce qu'ils leur confèrent un aspect en calice. Leur cytoplasme est riche en vacuole, vésicules endocystiques, lysosome et mitochondrie et leur membrane apicale émet des villosités courte, épaisse et irrégulière (**Hermo et al., 2000**). Elles semblent participer à l'acidification du fluide épидидymaire car elles possèdent une activité anhydrase carbonique et sont capables de sécréter des protons dans la lumière (**Cohen et al., 1976;Hermo et al., 2005**).

**II. La spermatogénèse :**

La spermatogénèse est le processus de différenciations cellulaire qui permet la production des gamètes mâles matures haploïdes (n): les spermatozoïdes, à partir de cellules souches diploïdes (2n) (**Figure05**) (**Dadoune et Demoulin, 2001**).

Selon **Amman (1993)**, la spermatogénèse se déroule au niveau des tubules séminifères des testicules en passant par spermiogénèse trois grandes étapes: la spermatocytogénèse, la méiose et la Spermiogénèse.



**Figure05** : Différentes étapes de la spermatogénèse (**Marie b, 2006**).

# *Chapitre II*

## **I. Les facteurs influençant à la production et la qualité du sperme :**

Effectivement, plusieurs critères peuvent influencer la productivité potentielle d'un lapin, tels que l'âge, la santé de l'animal et l'environnement dans lequel il vit. Voici quelques détails sur chacun de ces critères .

### **1- L'âge :**

L'âge du lapin influence sur la concentration des spz et même sur la viabilité du spermatozoïde, exemple la maturité sexuelle des males commence à partir de 110 jours ; mais dans son premier éjaculat la viabilité des spermatozoïdes est faible à nulle. Il faut attendre 135 à 140 pour l'accouplement. Il existe en effet des différences raciales dans l'âge de la puberté, mais les conditions d'élevage jouent aussi un rôle essentiel en particulier l'alimentation (plus encore que le climat) (**Colin, M. & Lebas, F. 1994**).

### **2- La santé :**

Le lapin est de nature très propre comme le chat, et qu'il fait très bien sa toilette. Il a été largement vérifié que l'inflammation de l'appareil reproducteur masculin (**O'Bryan et Coll., 2000**). Altère les fonctions testiculaires et séminal caractéristique en affectant la biosynthèse. La santé des lapins doit être étroitement contrôlée, en particulier chez les animaux qui vieillissent.

### **3- L'environnement :**

. L'environnement (milieux) est tout ce qui entoure l'animal : habitat, alimentation solide et liquide, air, bruit, etc. la notion d'environnement peut s'étendre à la ferme, au village à la région et même au pays parallèlement, les conditions d'hygiène ou règlements sanitaires doivent être renforcés. L'environnement propice et adapté à ce comportement naturel favorisera la reproduction réussie chez les lapins (**Oloufa, M.M., Bogart, R. & McKenzie**).

## **II. La récolte du sperme :**

Le recueil du sperme est une technique employée lors de l'insémination artificielle (IA) ou la fécondation in vitro (FIV) mais selon deux méthodes soit par vagin artificielle ou

par récolte de sperme de l'épididyme, Cette dernière est une nouvelle biotechnologie de la reproduction.

### 1- Technique de récupération du sperme :

Après plusieurs recherches, il a été découvert que la récolte de l'épididyme est la meilleure semence à conserver. La motilité et la viabilité de ses spermatozoïdes est meilleur par rapport au sperme récolté par le vagin artificiel ou l'électro éjaculation. Ils ont trouvé que la semence épидидymaire peut rester de 4 à plusieurs jours à 4C° sans dilution avec des résultats acceptable pour la conservation (**D. Fernández Abella1,22015**)

#### a) Vagin artificiel :

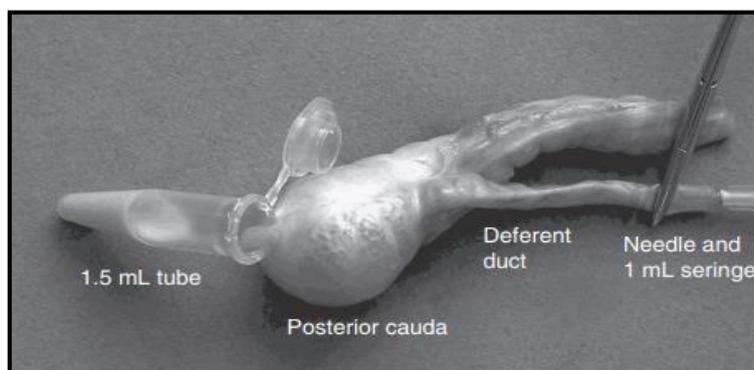
Le sperme est recueilli au moyen d'un vagin artificiel remplis d'un liquide chaud de température environ 45 C° une femelle est équipée de se dispositif est présentée au male. Quelques auteurs ont rapporté que la stimulation antérieure de male augment la concentration de la semence en spermatozoïdes. Et il peut être utile de laisser auparavant une femelle sur le dessus de la cage du male pendant plusieurs minutes. Le type de vagin artificiel influence l'adaptation du male à la collection. Un vagin avec un orifice large facilite l'adaptation. Généralement il y'a beaucoup de contamination bactérienne de l'environnement et il est important de prélever l'échantillon de sperme dans les conditions d'hygiène (**Mercier et Redeaud, 1990**).

#### b) Prélèvement épидémique :

Le nombre des spermatozoïdes fertile présent dans l'épididyme est de 5 à 15 fois le nombre des spermatozoïdes dans l'éjaculat (**Jones, 1998**). Le sperme de l'épididyme est aussi une source d'une gamme génétiques pour les animaux au court d'extinction ou qui meurent de façon inattendue. Le sperme épидидymaire récolté est utilisé dans plusieurs techniques de reproduction pour différentes espèces comme la souris (**An et al., 1999**), et l'homme (**McLachan, 1998**).

Le sperme épидидymaire est recueilli après incision du tubule épидидymite et (**Tamayo-Canul et al., 2011b**). Pour évités toute contamination par du sang et pour obtenir un nombre maximums de spermatozoïdes épидидymaire, l'échantillonnage doit être d'abord

effectuée en rétro rinçant la lumière épидидymaire du conduit déférent avec de l'air (Kikuchi et al., 1998), l'eau physiologique (Dacheux, 1980) ou l'huile de paraffine (Dacheux et al., 2006) (figure 06).



**Figure 06** : Perfusion de la partie caudale de l'épididyme de bœuf (technique de flush rétrograde). (Tamayo-Canul et al., 2011b)

### III. Analyse du sperme :

#### 1) Evaluation macroscopique :

Après la récolte du sperme on établit un examen visuel du Eppendorf (micro tubes) pour préciser le volume et la couleur de la semence.

##### a) Volume :

Le volume du sperme récolté dépend de l'âge, la race de lapins, aussi d'autres facteurs qui agissent sur la quantité et la qualité du sperme collectées. La mesure de volume s'effectue par lecture directe à l'aide de la graduation du tube de collecte. Le volume moyen de l'éjaculat est environ 0.4 à 1.5 ml, mais cela varie d'un éjaculat à l'autre. Concernant la semence récoltée de épидидymes varie entre 0.05 et 0.1 ml (G. Baril, P. chamineau).

**Tableau I** : Volume spermatique de l'éjaculat de quelques mammifères

	<i>Lapin</i>	<i>Taureau</i>	<i>Cobaye</i>
<b>Volume (ml)</b>	0.4 – 0.6	2 – 10	0.4 – 0.8

**b) Couleur :**

La couleur de la semence est blanc nacré ; une couleur différente est interprétée comme suite :

- Une couleur blanchâtre : signifie que ce sperme est moins concentré par rapport à l'origine.
- Une couleur rougeâtre : signifie à la présence du sang frais.
- Une couleur jaunâtre : signifie présence du pus ou des urines.
- Une couleur marron : signifie à la présence des éléments sanguins dégénérés ou matière fécales.

(Alvarino, 1998).

**c) Le pH :**

La mesure du pH se fait à l'aide d'un papier pH ou d'un pH-mètre. Le pH du sperme est proche de la neutralité. Un pH inférieur à 6.5 ou supérieur à 8 a comme conséquence la diminution de la plupart des paramètres (paramètre cinétique, viabilité, activité mitochondriale, et morphologie) (Contri et al., 2012)

**Tableau II.** Valeur de pH du sperme chez quelques espèces

	<i>Verrat</i>	<i>Taureau</i>	<i>Etalon</i>	<i>Bélier</i>
<b><u>pH</u></b>	7.3 – 7.9	6.5 – 6.9	6.2 – 7.8	5.9 – 7.3

**2) Evaluation microscopique :**

L'évaluation microscopique permet d'estimer la concentration, la motilité et la présence d'éléments autres que les spermatozoïdes (autres cellules, gouttelettes, ou particules). Un microscope à contraste de phase est recommandé pour l'examen des produits non colorés préparatifs. Le sperme de lapin présente une variété de quantités de particules.

Alors Dans cette étape on évalue par l'observation d'une goutte de semence brute et diluée puis donner une note de 0 à 9 pour la motilité massale et de 0 à 4 pour la motilité individuelle.

### 1) Mobilité :

#### a) Mobilité Massale :

C'est une mesure rapide et facile qui nécessite un examen microscopique de la semence, dès que celle-ci est collectée. La motilité massale est notée de 0 à 9 évalué par l'observation d'une goutte de semence pure ; elle se précise par le mouvement de la masse des spermatozoïdes. (N Bencheikh, 1994). L'observation doit être faite très rapidement car la motilité massale du sperme diminue rapidement au bout de 15 à 20 secondes.

#### b) Mobilité Individuel :

La motilité individuelle est notée de 0 (aucun mouvement des spermatozoïdes) à 4 (Spermatozoïdes « fléchant » avec un mouvement rectiligne), puis évaluée par une analyse microscopique d'une goutte de semence diluée entre lame et lamelle, cette dernière se caractérise par le mouvement propre des spermatozoïdes (N Bencheikh, 1994).

### 2) Concentration :

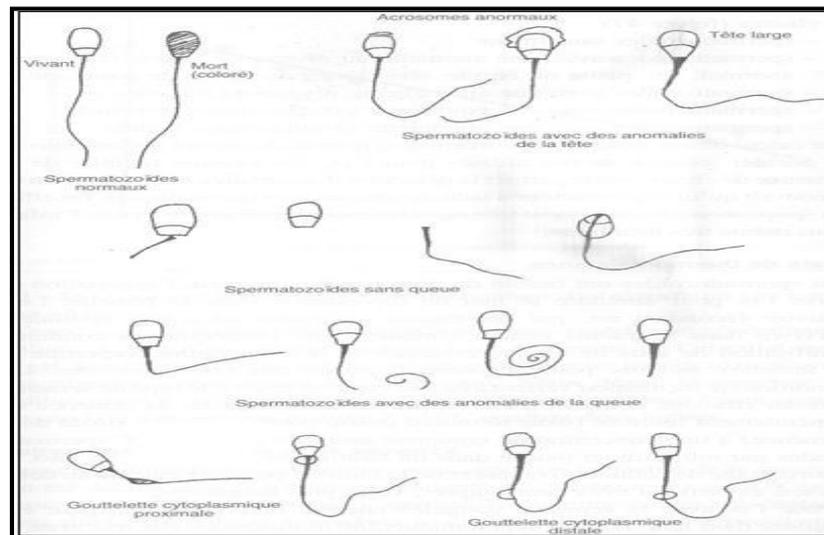
La concentration de la semence en spermatozoïdes est ensuite mesurée par la numération à l'hématimètre ou cellule de Thoma. Ces mesure permettent de calculer, pour chaque éjaculat, le nombre des spermatozoïdes totaux (concentration des spermatozoïdes x volume) et vivant (concentration x volume x pourcentage de spermatozoïdes vivant / 100). (N Bencheikh, 1994).

### 3) Morphologie :

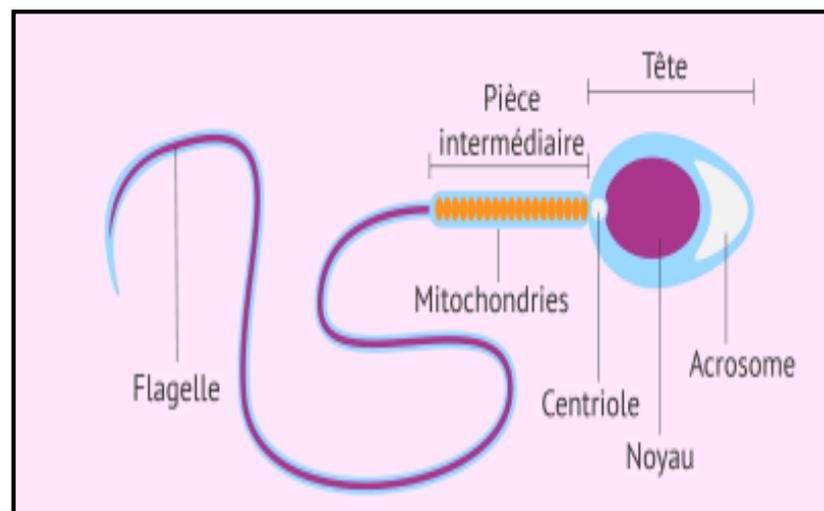
L'étude de La morphologie des spermatozoïdes du lapin est essentielle pour établir les paramètres physiologiques du sperme, Il peut être réalisée par microscopie optique d'un frottis de semence coloré en utilisant différentes techniques de coloration à la nigrosine-éosine, à l'encre de Chine et au Giemsa. Son but est de déterminer les anomalies morphologiques pouvant siéger au niveau de différentes parties des spermatozoïdes (**figure**

07). Sur ce même frottis on peut déterminer le pourcentage des spermatozoïdes vivants ou morts.

Les spermés ayant moins de 20% de spermatozoïdes anormaux et plus de 60% de spermatozoïdes vivants peuvent être conservés. La forme du spermatozoïde du lapin est similaire à celle des autres mammifères (**figure08**) (**Parez et Duplan, 198**).



**Figure 07** : Classification des différentes anomalies spermatisques (G. Baril, P. chamineau)



**Figure 08** : Structure du spermatozoïde du lapin  
(<https://www.invitra.fr/spermatozoïde/structure-du-spermatozoïde/>)

#### 4) Le système CASA :

Le CASA « *Computer Aided Sperm Analysis* » a évolué au cours des années pour fournir un moyen objectif et pratique de mesure et de caractérisée la vitesse et le modèle de mouvements des spermatozoïdes. Les instruments du CASA utilisent des cartes d'acquisition vidéo pour capturer de multiples images de dizaines de spermatozoïdes alors qu'ils traversent le champ du microscope Vue. L'ordinateur numérise les traces de spermatozoïdes pour une analyse en temps réel ou ultérieure de divers paramètres de mouvement (**Boyers et al., 1989; Mortimer, 1997**).

Le CASA se compose d'une série de points, chacun marquant la position de la tête du spermatozoïde du lapin sur chaque image – vidéo. L'emplacement du point ou « centroïde » peut être déterminé en fonction de la taille, la luminosité ou du bord de la tête du spermatozoïde (**Mortimer, 1997**). Le logiciel CASA relie les points pour construire des pistes individuelles visualisées sur l'écran de l'ordinateur. Une trace du spermatozoïde est une projection bidimensionnelle réelle de sa tête telle qu'elle est propulsée vers l'avant par le flagelle (**Mortimer, 1997**).

L'ordinateur du CASA utilise les coordonnées x, y du centroïde en chaque point pour calculer trois termes de vitesse et de dériver d'autres mesures qui caractérisent la piste. Une compréhension de ces mesures est importante pour interpréter les données du CASA et pour choisir les plus appropriés pour une situation (**figure 09**).

- **VSL (Straight Line Velocity)**: la vitesse en ligne droit ( $\mu\text{m/s}$ ) correspondant à la trajectoire rectiligne définie à partir de la distance entre la première et la dernière position de la tête.
- **VCL (Curvilinear velocity)** : la vitesse ( $\mu\text{m/s}$ ) calculée selon la trajectoire curvilinéaire (somme des distances entre les différentes positions de la tête sur chaque image).
- **VAP (Average path velocity)**: la vitesse ( $\mu\text{m/s}$ ) selon la trajectoire moyenne. **ALH, (Amplitude of lateral Head displacement)**: l'amplitude de déplacement latéral de la tête ( $\mu\text{m/m}$ ) correspondant à la distance maximale obtenue en calculant pour chaque point constituant la trajectoire sa distance par rapport à la position moyenne.

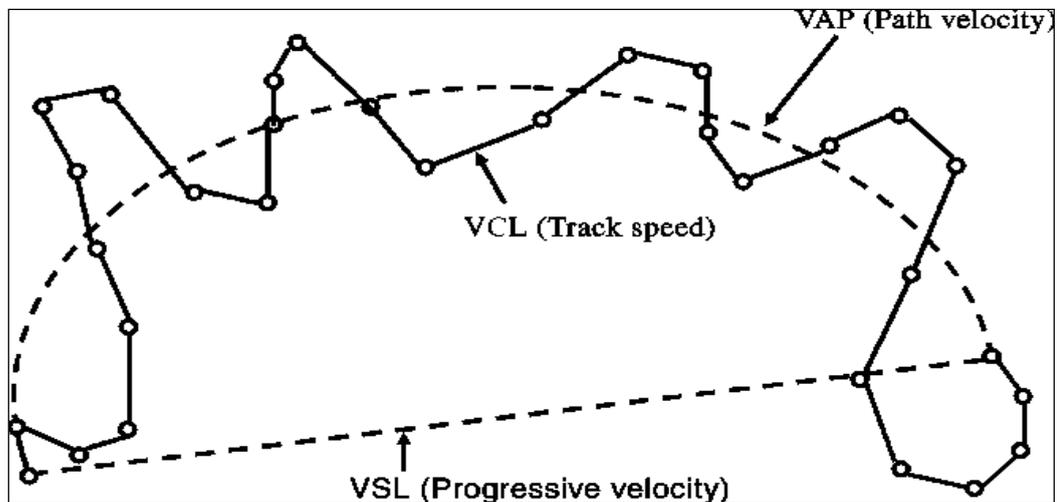


Figure 09 : Graphe représente la motilité du spermatozoïde (P. Kathiravan et al., 2011).

## V. La Conservation :

### 3) Types de conservation de la semence :

Après la récolte, la semence peut être soit utilisée en tant que semence fraîche soit réfrigérée ou congelée pour un usage ultérieur.

#### a) Congélation avec l'Azote Liquide :

Quelle que soit l'espèce, la semence est conditionnée juste avant d'être congelée. Le but du conditionnement est de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement identifiable, stockable et utilisable. Deux principaux conditionnements sont disponibles pour congeler la semence : les pastilles, les paillettes et les ampoules qui sont à l'origine prévues pour une congélation lente mais qui sont peu utilisés.

La congélation correspond à la mise des paillettes dans la vapeur d'azote pendant quelques minutes puis à les plonger dans l'Azote Liquide à  $-196\text{ C}^{\circ}$ . En effet, Les paillettes et les pastilles autorisent des vitesses de congélation plus rapide que les ampoules.

**b) La décongélation :**

La semence est décongelée juste avant l'utilisation, le plus souvent lors d'une IA (insémination artificielle). (Ponthier et al., 2014). Les paillettes sont directement transférées de l'azote liquide vers un bain-marie réglé à 45°C.

Une autre méthode de décongélation de la semence consiste à vider le contenu de chaque paillette décongelée dans un volume de solution isotonique à 37 – 38 °C et de laisser la suspension de la semence à cette température pendant 5 min avant d'évaluer la qualité de la semence et de l'utiliser pour une IA (Pena et Lind-Forseberg 2000 ; Luvoni et al., 2003).

**c) La réfrigération :**

Le sperme peut être réfrigéré progressivement de 12 – 14 °C dans les 24 aux 96 heures, à 7 °C ou plus souvent à 4 °C (0 – 5, jusqu'à 8 jours) (Decuadro-Hansen., 2004).

La réfrigération de la semence peut constituer soit un processus à part entière soit une des étapes du processus de cryoconservation qui correspond au refroidissement de la semence avant la congélation. La réfrigération permet de conserver le pouvoir fécondant du sperme pendant plusieurs jours à 4 °C (Dumon, 2007).

La réfrigération de la semence est utile dans le cas d'une insémination artificielle à distance lorsque les animaux sont éloignés géographiquement, lorsque la semence est de qualité médiocre ou encore lorsque qu'il faut différer une insémination initialement prévue avec de la semence fraîche.

**4) Milieux de conservation de la semence :**

Une semence épидидymaire, contient que du sperme pure sans gel, il contient plusieurs milliards de spermatozoïdes ; alors qu'il suffit un seul spermatozoïde pour féconder l'ovule.

**➤ Taux de dilution :**

Il y a plusieurs facteurs à respecter pour avoir une meilleur dilution, à savoir le volume, la concentration du sperme récolté et le taux des spz vivants qui jouent un rôle très

important dans la conservation. Par ailleurs, le taux de dilution à un rôle important dans la survie des spz (**Boiti et al., 2005**).

**a) Vitamine « E » :**

La vitamine E est un antioxydant et liposoluble, elle protège les membranes cellulaires, d'autant mieux qu'elle en stabilise les lipides. 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 groupements méthyle (-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 (**F. Lebas., 2000**).

**b) Vitamine « C » :**

La vitamine C est une vitamine hydrosoluble, également appelée acide ascorbique. L'acide ascorbique qui se présente sous l'aspect d'une poudre cristalline très soluble dans l'eau et sous forme oxydée- l'acide déhydroascorbique, il est plus fragile et facilement oxydé au contact de l'eau, de l'air et de la lumière. C'est un donneur hydrogène qui intervient dans diverses réactions métaboliques de l'organisme. La vitamine C assure une protection contre les agents oxydants toxiques pour la cellule (**Jacques Buxeraud et al., 2021**).

Des études montrant que la vitamine C joue un rôle important dans l'amélioration en qualité et en quantité des spermatozoïdes, c'est une amélioration qui touche leur mobilité et leur morphologie des Spz (**Akmal ; Qadri ; Al waili et al., 2006**).

**c) Polyéthylène glycol « PEG » :**

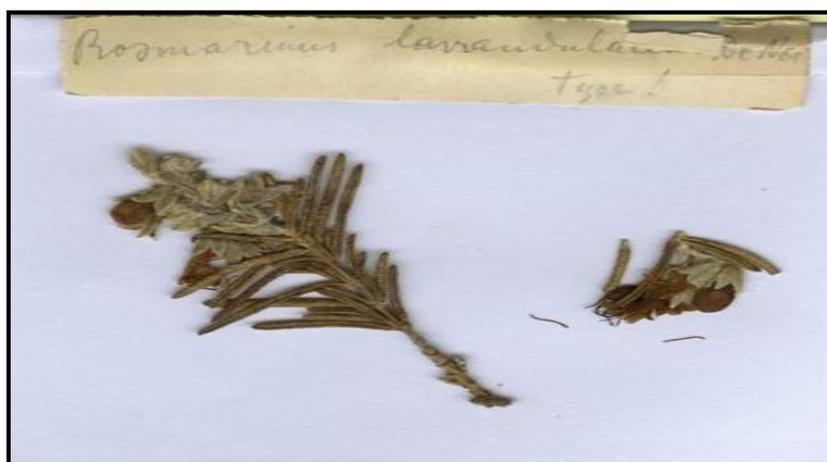
Le PEG est un polymère fabriqué à partir de monomères d'éthylène glycol (dérivé d'alcool). C'est un liquide visqueux incolore, il est soluble dans l'eau, l'alcool et l'acétone. Le PEG 6000 à un effet efficace pour augmenter la solubilité des différentes molécules actives (**Mokrane Iguer-ouada et., R Kaidi and Asma Amokrane. 2020**).

## 5) Huile Essentielle « *Rosmarinus Officinalis* » :

### a) Définition et répartition :

L'Algérie est un pays riche en plantes médicinales qui poussent généralement à l'état spontané (Baba Aïssa, 1991), (figure 10).

*Rosmarinus Officinalis* L. est sous le nom vernaculaire local « *Halhal el djebel* » ; nom français « *Romarin* » c'est une plante souvent utilisée efficacement par les tradipraticiens dans le traitement de diverses maladies infectieuses (Beloued, 1998).



**Figure 10** : Isotype de *Rosmarinus Officinalis*, plante d'Algérie 1852 N° 444, Oran.

### b) Description botanique :

Arbuste ou sous-arbrisseau ligneux très odorant avec des feuilles linéaires à marge révoluée, gaufrées, verdâtres en dessus, plus ou moins hispides blanchâtres en dessous. Inflorescences et calice à pilosité pruineuse très courte constituée par des poils étroitement appliqués. Inflorescences en épis très courts, à bractées squamifères de 1 – 2 mm, rapidement caduques Figure 11 (M.D. Mira et al., 2013).



**Figure 11 : *Rosmarinus Officinalis* « Halhal » (photo personnelle)**

**c) L'extraction des huiles essentielles :**

Elle s'effectue par hydro distillation durant une heure, à la température de 100°C, en mettant des parties aériennes séchées de la plante dans un appareil de type Clevenger. La vapeur d'eau enrichie de constituants volatils est condensée puis décantée à 20°C. Cette opération est suivie par le calcul des rendements effectué selon la norme (AFNOR (1986)).

**d) Intérêt du « *Rosmarinus Officinalis* » :**

L'huile du romarin a un effet essentiel dans tout les domaines comme la cosmétique, la santé et il est même concéderé comme un antioxydant car il protège le sperme contre le stress oxydative pendant la cryoconservation (Zhong R & Zhou D (2013)). L'huile essentielle de « *Rosmarinus Officinalis* » a prouvé qu'il a un effet efficace pour la conservation des spermatozoïdes de la coque dans une température de 4 C° (Touazi L et al., (2018)).

**e) La toxicité de « *rosmarinus officinalis* » :**

Le romarin comme les autres huiles essentielles à une dose de toxicité, ces derniers temps les scientifiques ont découvert à des concentrations élevées, certaines substances présentes dans l'huile de romarin peuvent être toxiques pour les spermatozoïdes. Il est donc recommandé de respecter les doses appropriées et de faire

preuve de précaution lors de l'utilisation de l'huile essentielle de romarin dans des applications liées à la préservation des spermatozoïdes (**A. Benberkane et al., 2019**) à découvrir que la meilleur dose pour conserver le sperme d'un coq est de 0.5  $\mu$ l.

# *Matériel et méthodes*

## Objectif du travail

Dans notre travail, nous avons testé de nouveaux traitements à base de l'huile essentielle « Rosmarinus Officinalis » dans la conservation du sperme épидидymaire du lapin, dans le but d'améliorer sa conservation à 4C°.

### I. Collecte de la semence :

Nous avons réalisé notre étude par l'analyse du sperme épидидymaire des lapins emmenés de deux boucheries de Bejaïa, collés aux gonades fraîches récupérés dans une glacière.

#### I. Matériel de collecte :

##### a) Matériel biologique :

Des gonades fraîches, de deux races de lapin différentes espagnoles et algériennes.

##### b) Matériel technique (figure 12) :

- Balance
- Seringue
- Aiguille
- Les bécher
- Des tubes secs
- Tubes Eppendorf
- CASA
- Micropipette 0.5µl, 10µl, 100µl et 1000µl
- Les embouts
- Aluminium
- Papier absorption
- Portoir
- Barreaux magnétiques



Figure 12 : Matériel technique

**Produits utilisés (figure 13) :**

- D-glucose
- Acide citrique
- Polyéthylène glycol
- Tris
- Vit E
- Eau distillé
- Pénicilline
- Vit C
- Huile essentielle



Figure 13 : Matériels chimique

## II. Conservation de la semence par réfrigération à 4 C°

Nous avons d'abord préparé les différents milieux en commençant par le Tris.

### 1) Préparation du contrôle Tris :

Pour préparer la solution du tris buffer dans 100ml d'eau distillée, nous avons eu besoin des produits suivant :

- Tris Buffer = 3.028g
- Acide Citrique = 1.25g
- D-Glucose = 1.65g
- Eau Distillé = 100ml

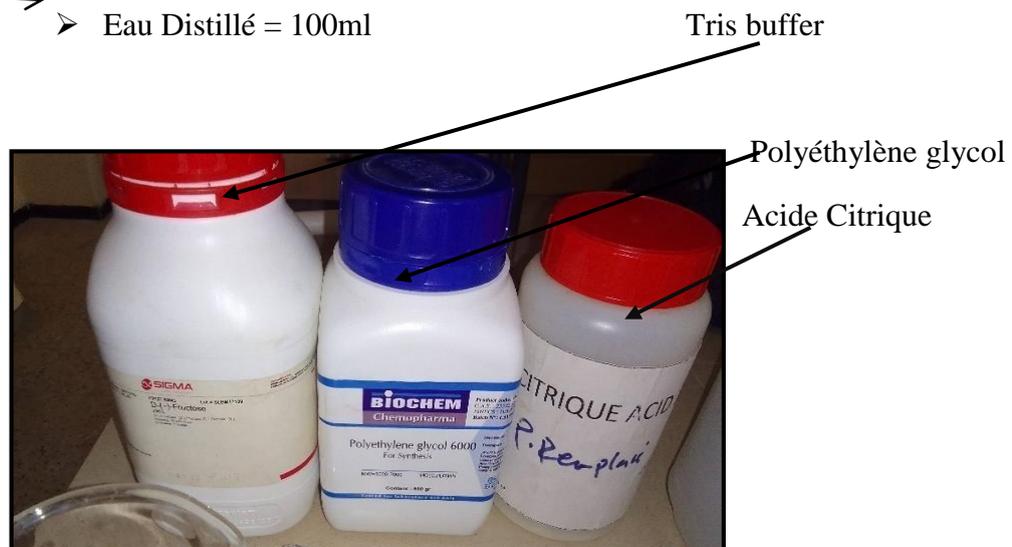


Figure 14 : Les produits composant de tris.



- Acide citrique
- Balance
- Cuillère à mesure
- D-Glucose
- Eau distillé
- Papier absorbant
- Papier aluminium
- PEG
- Pénicilline
- Tris

Figure 15 : Préparation du Contrôle Tris

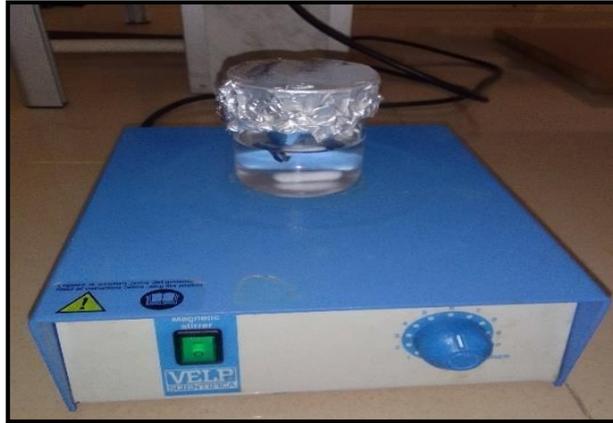


Figure 16 : Agitation de la solution.

## 2) Préparation des autres milieux :

### a) Préparation du milieu PEG seul (PEG+TRIS) :

Pour 10 ml du Tris :

0,180g  $\longrightarrow$  5ml tris

X g  $\longrightarrow$  10ml tris

$$X = 0,360\text{g de PEG}$$

Nous avons mit 0,360g de PEG dans 10ml de Tris, puis nous l'avons laissé sur un agitateur pendant 2 heures (**figure 17**).

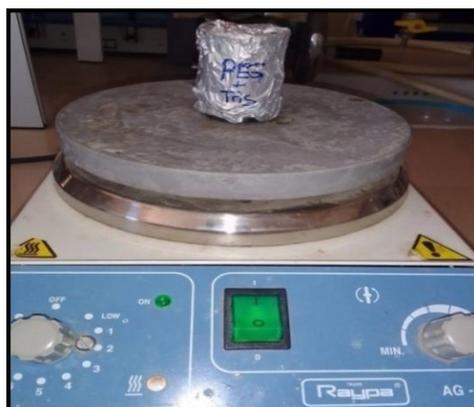


Figure 17 : Association PEG/TRIS

**b) Préparation de l'HE :**

Pour préparer ce milieu dans 1ml de tris, nous avons prélevé, avec la micropipette, 0.5 $\mu$ l de l'huile essentielle. Puis nous avons laissé sur un agitateur pendant 2 heures (**figure18**).



**Figure 18** : La solution de l'HE

**c) Préparation de l'association PEG/HE :**

Pour préparer cette association, nous avons utilisé le rapport {10% HE : 90% PEG} nous avons utilisé donc, 8mg d'HE et 72mg de PEG pour 2ml de Tris.

Dans un bécher nous avons mit le PEG+HE et le Tris puis nous l'avons couvert avec du papier aluminium pour éviter son exposition à la lumière. Ensuite nous avons laissé le mélange s'agiter pendant 2 heures jusqu'à ce que la solution soit homogène (**figure19**).



**Figure 19** : Association PEG/HE

**d) Préparation du milieu vitC seule :**

Ce milieu est préparé le jour de la collecte du sperme car la vitC s'oxyde rapidement. Nous avons mélangé 0.100g de vitC avec 1ml de Tris. Ensuite, l'avons laissé pendant 1h sur l'agitateur (**figure 20**).



**Figure 20** : Les milieux de conservation.

### 3) Méthode de collecte de la semence :

Au niveau de la boucherie et juste après l'abattage des lapins, nous avons récupéré les gonades reliées à leurs épидидymes et nous nous sommes dirigés vers le laboratoire pour le prélèvement et l'analyse du sperme.

#### ➤ Séparation de l'épididyme du testicule :

Après l'enlèvement de l'albuginé (**a**), la tête de l'épididyme et le canal déférent sont dépouillés du testicule à l'aide d'une lame bistouri (**b**), nous avons séparé l'épididyme du testicule, puis avec une seringue nous avons injecté du Tris pour bien gonflé l'épididyme (**c**). Avec la même seringue vide, nous avons injecté de l'air pour créer une pression à l'intérieur de l'épididyme (**d**) et avec une lame bistouri nous avons réalisé une petite incision au niveau de la tête d'épididyme, d'où va s'écouler le sperme pour le récupérer dans un eppendorf (**e**) et (**f**) (**figure 21**).



**Figure 21** : Étapes de la récolte épидидymaire.

## II. Analyse de semence :

Dès son prélèvement, le sperme épидидymaire est examiné macroscopiquement et microscopiquement.

## 1) Examen macroscopique :

### a) Couleur :

La semence prélevée a une couleur blanchâtre, observée à l'œil nu dans le tube Eppendorf,.

### b) Volume :

La lecture du volume est réalisée directement sur le tube gradué, après la récupération du sperme de plusieurs gonades.

## 2) Examen microscopique :

### a) Système CASA :

Le CASA "Computer Assisted Sperm Analyser" est un système qui consiste à analyser, entre autres, la motilité des spermatozoïdes. Cet ordinateur est composé d'un moniteur et d'un microscope avec une caméra qui permet d'afficher l'image sur l'écran de l'ordinateur en même temps que les spermatozoïdes beignent dans la solution déposée sur la lame de Makler (**figure 22**).



1. Moniteur

2. Microscope associer a une  
caméra

3. Ordinateur

4. Lame Makler

5. Huile à émersion

**Figure 22 :** Le CASA et ses instruments.

### 3) Préparation des traitements {milieu + sperme} :

- Juste après la collecte du sperme épидидymaire, nous avons distingué son volume affiché sur le tube à eppendorf pour le diluer avec le Tris, à raison de {1 : 20} respectivement.
- Huit (8) traitements sont préparés en mélangeant le sperme dilué avec un des milieux préparés précédemment pour la conservation du sperme (PEG, HE, vitC, HE/vitC, HE/PEG, PEG/HE/vitC, HE/vitC, Tris) à raison de v/v (volume de sperme dilué/volume de chaque milieu).
- une première analyse de mobilité au CASA est réalisé pour les 8 traitements à T0 avant leur réfrigération, ce qui correspond à 15min ou 10min de conservation à température ambiante. par la suit les 8 traitements sont conservés dans le réfrigérateur à 4C° pendant 2heurs. Deux analyses de mobilité sont réalisées, une après une heure de conservation à 4C°(T1) et l'Autre après deux heurs (T2).

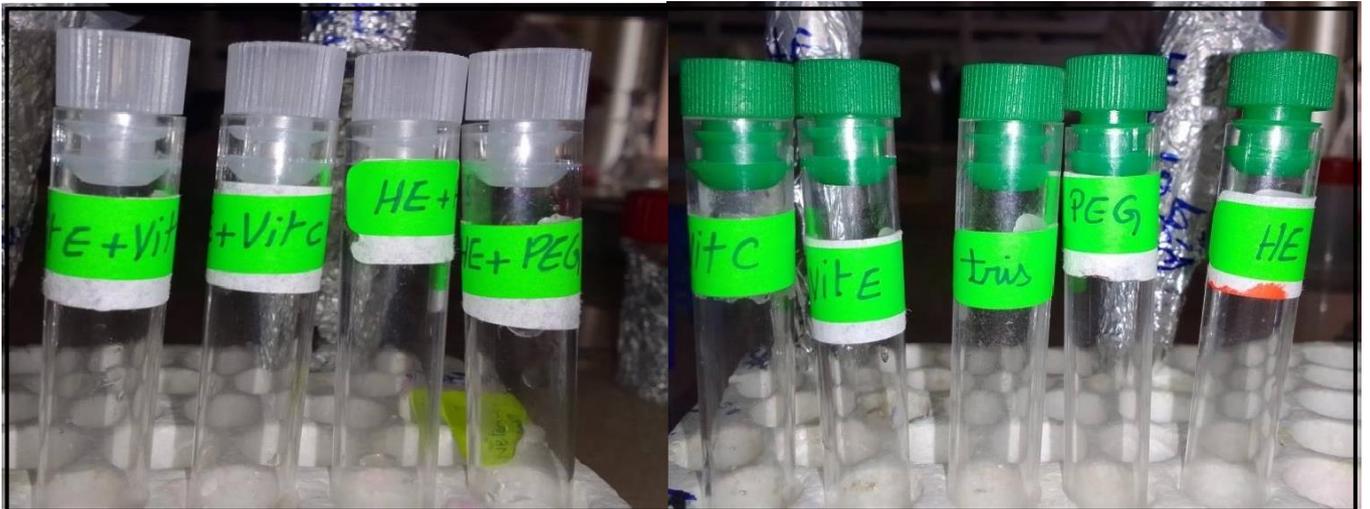


Figure 23 : Les milieux + sperme.

# *Résultats et Discussion*

## I. Interprétation des résultats

### 1) Résultats de la VCL dans les différents milieux :

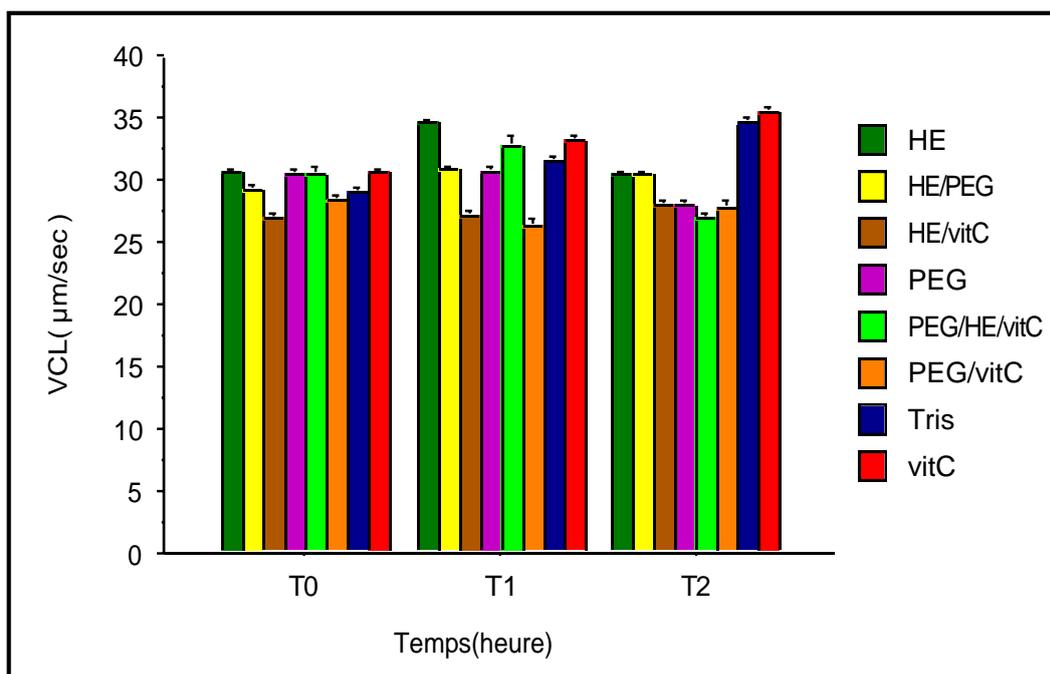
Nous remarquons sur la **figure 24** qu'à T0, la VCL dans les milieux he, peg, vitC, he/peg et le complexe peg/he/VitC est supérieure à celle du contrôle (tris). Sachant que T0 correspond à 15 minutes ou 10 min de conservation à température ambiante, le temps écoulé entre la préparation des différents traitements et l'analyse T0, les molécules utilisées dans ces différents milieux ont probablement exercé leurs effets bénéfiques sur les spermatozoïdes.

Après 1 heure de réfrigération à 4°C, nous remarquons une augmentation de la VCL dans les milieux he par une valeur de 30µm/sec, sachant que l'he est un antioxydant durant la conservation du sperme à 4°C, ce qui explique l'effet protecteur de la mobilité et de l'intégrité membranaire. Cet effet bénéfique est rapporté par **Touazi et al, (2018)**. Nous avons également remarqué une amélioration de la VCL dans les milieux vitC et PEG/HE/vitC (34µm/sec), ainsi que dans le Tris dont la VCL reste inférieure à celle des milieux précédents. A ce temps la meilleure VCL est celle des spermatozoïdes conservés dans l'he.

A T2 heures, une amélioration remarquable de la VCL est notée dans le milieu vitC (36µm/sec) qui exerce un effet précoce et important en tant qu'antioxydant (**Munnich et al., 1987**). En effet, la VitC protège les membranes cellulaires contre les attaques oxydatives et inhibe la peroxydation lipidique (**Poulab et al. (2015)**). Ces actions contribuent à maintenir la fonctionnalité des cellules et à favorisé une meilleure conservation, par contre les autres milieux ont présenté une régression de la VCL qui est resté au même niveau noté à T0.

Par ailleurs, la VCL dans l'he est meilleure que celle notée dans l'association peg/he surtout à T0 et à T1, alors que le complexe peg/he/vitC a montré une augmentation remarquable de la VCL à T1 mais qui reste inférieure à celle de l'he.

Concernant l'association he/vitC et peg/vitC, nous avons remarqué qu'ils ont maintenu la VCL stable pendant tout le temps de la réfrigération.



**Figure 24:** Histogramme représentant la VCL ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) des spz mobiles conservés à  $4^\circ\text{C}$  dans différents milieux et analysés à différents temps.

## 2) Résultats de la VSL dans les différents milieux :

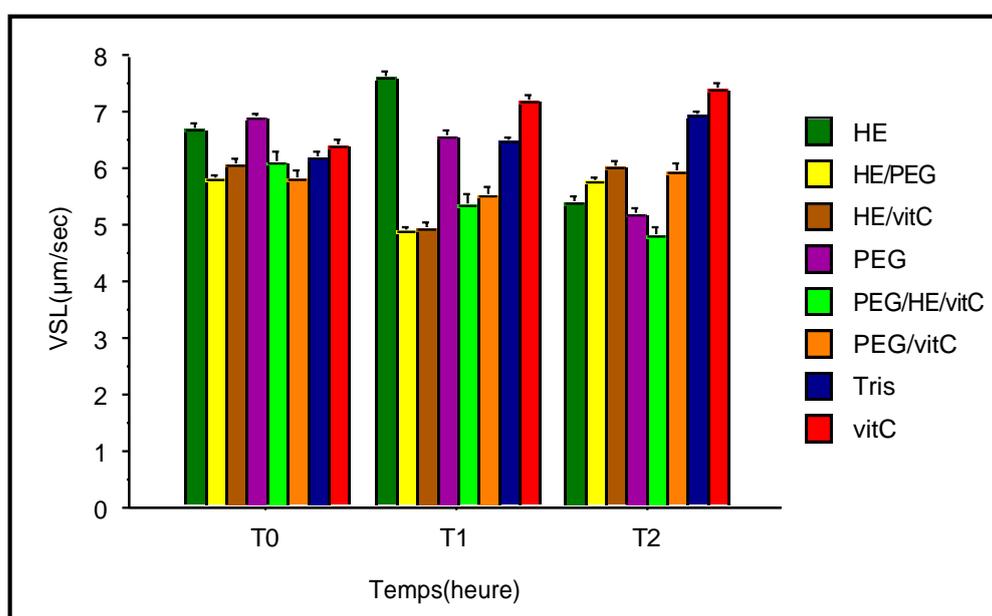
Nous avons remarqué sur la **figure 25**, qu'à T0 la VSL des milieux he, vitC et PEG est supérieure à celle du contrôle (Tris), avec une meilleur VSL dans le PEG ( $7\mu\text{m}/\text{sec}$ ) car ce dernier exerce un effet de protection de la membrane plasmique (**Mocé E et al., 2009**) et lutte contre les réactifs oxydants (**Watanab Y., 2009**) par contre la VSL du reste des milieux PEG /vitC ( $6\mu\text{m}/\text{sec}$ ), HE/vitC ( $6.1\mu\text{m}/\text{sec}$ ), HE/PEG ( $5.9\mu\text{m}/\text{sec}$ ) est inférieures à celle du contrôle Tris qui est à égalité avec celle du complexe PEG/HE/vitC ( $6.4\mu\text{m}/\text{sec}$ ).

A T1 heure de réfrigération à  $4^\circ\text{C}$  nous avons remarqué une augmentation de la VSL dans les milieux HE avec ( $7.7\mu\text{m}/\text{sec}$ ), vitC environ  $7.4\mu\text{m}/\text{sec}$ . En effet, l'HE (**Chikhoune et al, 2015**) (**Buch et al, 1988**) et la vitC (**Haleng et al ,2007**) sont des antioxydants permettant de protéger les spermatozoïdes et donc leurs paramètres de mobilité pendant leur réfrigération. Par contre, la VSL du PEG a baissée à une valeur de ( $6.6\mu\text{m}/\text{sec}$ ). Cette dernière a continué à baisser après 2 heures de réfrigération. Etant un solubilisant des matières organiques (**A Amokrane et al., 2020**), le PEG a certainement solubilisé les

molécules contenant dans le sperme tel que la vitC et le HE se trouvant dans la membrane plasmique des spermatozoïdes ce qui a rendu ces molécules disponibles pour utilisation dans la protection des spermatozoïdes contre le stress oxydatif (**Favier, 2003**). Ce qui a certainement conduit à l'épuisement de ces molécules dans le milieu au bout de 2 heures de conservation.

A T 2 heures, nous avons remarqué que la meilleurs VSL est celle de la vitC seule qui a continué à augmenter et qui a atteint la valeur de  $7.5\mu\text{m}/\text{sec}$ . Ce traitement est le seul qui a montré, à ce temps, une VSL supérieure à celle du contrôle. La VSL des autres milieux PEG/HE/vitC ( $5\mu\text{m}/\text{sec}$ ), HE/PEG ( $5.9\mu\text{m}/\text{sec}$ ), HE/vitC ( $6.1\mu\text{m}/\text{sec}$ ), PEG/vitC ( $6.1\mu\text{m}/\text{sec}$ ), PEG ( $5.4\mu\text{m}/\text{sec}$ ) est inférieure à celle du contrôle.

Ces observations suggèrent que les différents milieux et leurs combinaisons ont des effets variables sur la VSL, avec des résultats parfois supérieurs et parfois inférieurs à celui du contrôle Tris. L'he semble avoir une VSL plus élevée que celle de l'association PEG/HE, chose qui a changé à T2 où nous avons remarqué une amélioration de la VSL dans les associations PEG/HE, HE/vitC et qui est devenu même meilleure que celle de l'he seule qui a remarquablement diminué.



**Figure 25 :** Histogramme représente la VSL ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) des spz mobiles conservés à  $4\text{C}^\circ$  dans différents milieux et analysés à différents temps.

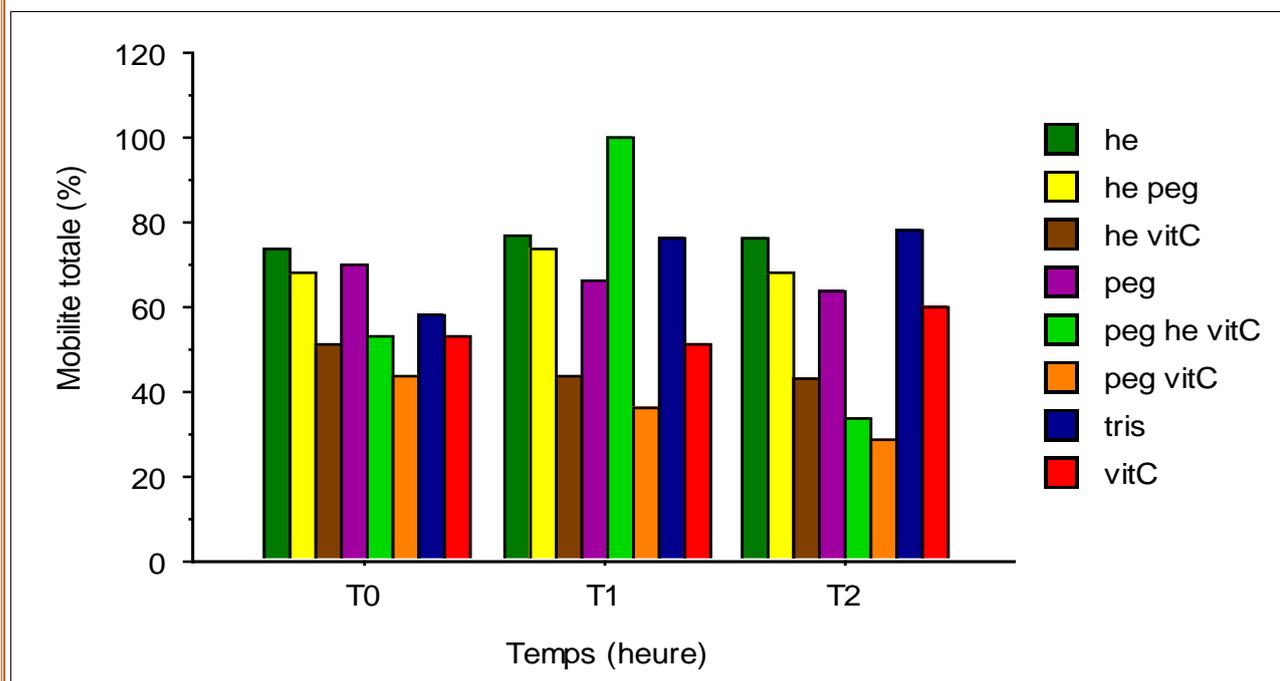
### **3) Comparaison de la motilité totale des spermatozoïdes dans les différents milieux:**

Nous avons remarqué, sur la figure 26, qu'à T0 la meilleure motilité est celle des spermatozoïdes se trouvant dans l'huile essentielle avec un pourcentage de 75%, suivi du PEG (70%) puis l'association HE/PEG (69%). La motilité totale dans ces 3 milieux est meilleure que celle notée dans le contrôle (Tris) (59%).

A T 1 heure, nous avons remarqué que la motilité des spermatozoïdes conservés dans le complexe PEG/HE/vitC s'est améliorée et elle a atteint le pourcentage de 100%. Malgré que le pourcentage de motilité dans l'HE et le contrôle soit inférieur (77% et 78% respectivement), une amélioration est notée dans ces deux milieux à T1, conservée même à T2.

A T2 heure, le pourcentage de motilité totale le plus élevé est noté dans le contrôle (80%) suivi de l'HE (79%). Dans ce dernier la motilité totale est meilleure que celle de l'association PEG/HE et que le complexe PEG/HE/vitC (35%).

Les observations indiquent que les différents milieux et leurs combinaisons ont des effets variables sur la motilité des spermatozoïdes. L'HE, en particulier dans le complexe HE/PEG, présente généralement une meilleure motilité que les autres combinaisons. Cependant, les milieux contenant vitC, ainsi que les complexes HE/vitC, PEG/HE/vitC et PEG/vitC, montrent une diminution de la motilité au fil du temps. Il est également constaté que le contrôle (Tris) maintient une motilité relativement stable, ainsi que l'HE seule. Il est donc intéressant de noter que les milieux HE, HE/PEG et vitC seule ont conservé la motilité totale des spermatozoïdes au même niveau de T0 jusqu'à 2 heures de réfrigération.



**Figure 26 :** Histogramme représente le pourcentage des spz mobiles conservé à 4°C dans différents milieux et analysés à différents temps.

#### 4) Comparaison de la mobilité progressive des spermatozoïdes dans les différents milieux :

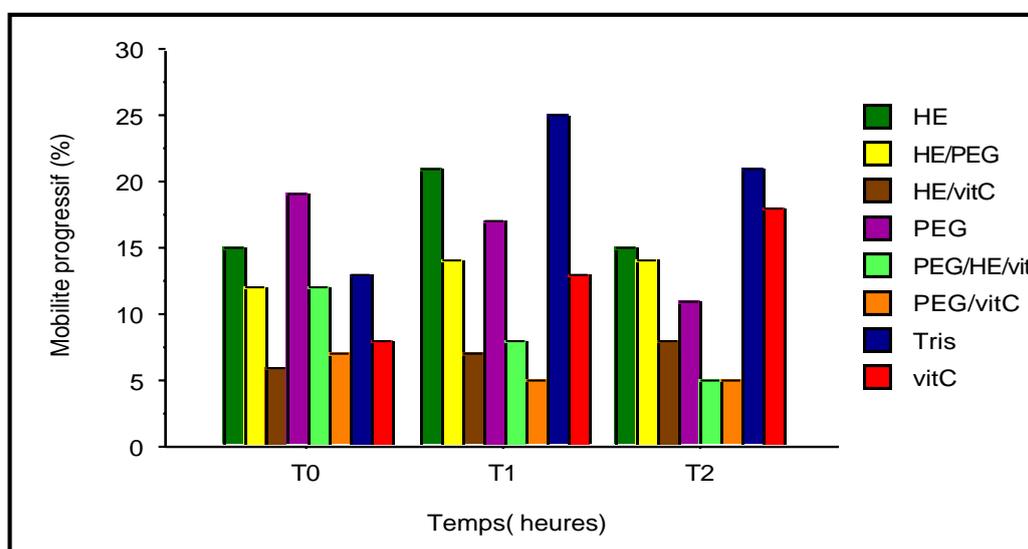
La **figure 27**, montre les différents pourcentages des spermatozoïdes progressifs dans les différents milieux, aux différents temps. A T0 la mobilité progressive est meilleure dans le milieu peg (18%) suivi de l'HE (15%) par rapport au Tris (13%). Le PEG qui est un solubilisant (**A Amokrane et al., 2020**), a certainement exercé son effet sur le sperme avant même sa conservation (T0). D'autre part, la mobilité progressive dans l'HE (15%) est meilleure que celle notée dans l'association HE/PEG, PEG/HE /vitC et PEG/vitC dont les pourcentages varient entre 7% et 13%.

A T1 heure de réfrigération à 4°C, le pourcentage des spermatozoïdes progressifs est remarquablement amélioré notamment dans les deux milieux Tris et HE (25%, 22% respectivement) ce n'est que récemment que (**Touazi et al, (2018)**) ont montré l'effet protecteur des huiles essentielles lors de l'étude des effets du romarin sur la mobilité du sperme du coq conservé à 4°C, une amélioration qui n'est pas maintenue à T2. Une légère

amélioration est également notée dans l'association PEG/HE ainsi que dans le milieu vitC seule.

A T2 heures de conservation à 4°C, le pourcentage des spermatozoïdes progressifs a diminué dans presque tous les milieux à l'exception du milieu vitC seule qui a continué à montrer une amélioration de ce pourcentage.

Ces observations indiquent que la mobilité progressive des spermatozoïdes varie dans les différents milieux et évolue au fil du temps (A. Benberkane, A. Khellouf, K. Benhenia, 2019).



**Figure 27 :** Histogramme représente le pourcentage de mobilité progressif des spz conservé à 4°C dans différents milieux et analysés à différents temps.

# *Conclusion*

Notre étude nous a permis de mettre l'accent sur l'impact de l'huile essentielle du romarin sur la qualité du sperme, en termes de mobilité, conservé à 4°C à différents temps.

Les résultats ont montré une amélioration des paramètres spermatiques (VSL, VCL) après une heure de conservation dans le milieu HE et de T0 jusqu'à T2 heures dans le milieu vitC. Ces molécules sont connues pour leur effet antioxydant exercé probablement pour protéger les spermatozoïdes pendant leur réfrigération.

Dans le traitement vitC seul, la mobilité totale et progressive sont inférieures à celles du contrôle (tris) mais les améliore remarquablement jusqu'à 2 heures de réfrigération à 4°C. par contre dans l'he seul, la mobilité progressive est améliorée à T1 mais la mobilité totale est conservée presque au même niveau pendant les deux heures de réfrigération. La même chose est observée dans l'association PEG/he dans lequel la mobilité totale et progressive sont presque conservés jusqu'à T2, mais restent toujours inférieurs au contrôle. D'autre part, dans le complexe PEG /HE/vitC, la mobilité totale est remarquablement améliorée après une heure de réfrigération. L'association entre ces trois molécules a probablement permis la solubilisation de l'HE par le PEG et une action antioxydant synergique entre l'HE et la vitC.

A la lumière de nos résultats des perspectives intéressantes s'ouvrent à la conservation du sperme épидидymaire pour faciliter le transport et l'échange de matériel génétique entre différents élevages de lapins et même après la mort de l'animale. En effet, le rôle des huiles essentielles dans la conservation de la semence à 4°C pourrait être utilisé dans le future.

# *Références*

## A

- **An TZ, Wada S, Edashige K, Sakurai Tand Kasai M 1999**, viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death. *Cryobiology* 38, 27-34.
- **Alvarino M.R.1993**.Control de la reproduction en el conejo. 1<sup>er</sup> éd., IRYDA. Mundi-Prensa, 137p.
- **AFNOR, 1986-** Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », **AFNOR**. Paris. 57 p. **Andrews J.M., 2001**-The Development of the BSAC standardized method of disc diffusion testing. *J. Antimic. Chemo.*, 48 (1) : 29-42.
- **Akmal M., Qadri J.Q., Al-Waili N.S., et al 2006**.Improvement in human semen quality after oral supplementation of vitamin C. 9 : 440 – 2.
- **A.Benberkane, A. Khellouf , K. Benhenia , S. Fatmi, and M. Iguer-ouada 2019**.Rosmarinus officinalis essential oil preloaded in cyclodextrin: effect on ram spermatozoa motility, membrane integrity and oxidative status during 4C° storage.40 (4), 219-225 (2019)
- **Abe K., Takano H. et Ito T. (1983)**. Ultra structure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells. *Archive. Hist. Jap.*, 46 (1): 51-68.
- **Abou-Haila A., Et Fain-Maurel M.A. (1984)**.Regional differences of the proximal part of mouse epididymes: morphological and histochemicalcharacterization. *The Anat. Rec.*, 209 (2): 197-208.
- **Adamali H.I., Somani I.H., Huang J.Q., Gravel R.A., Trasler J.M. ET Hermo L. (1999)**. II: characterization and development of the regional and cellular specificab normalities in the epididymys of the micewiyh bêta-hexosaminidase a deficiency. *J Androl.* 20 (6): 803-824.
- **Amann R.P. (1993)**. **Physiology and Endocrinology**. In : **MC KINNON AO,Yoss JL (eds)**, *Equine Reproduction*, 1ed., Lea et Febigereds, Philadelphia: 1137-11545.

## B

- **Boyers, S.P., David, R.O., and Katz, D.F., 1989**, Automated semen analysis. *Curr. Prob Obstat. Gynecol.Fertil.* XII : 167.

- **Baba Aïssa F., 1991** – les plantes médicinales en Algérie. Bouchène et Ad. Diwan éd., Alger. 181 p.
- **Beloued A., 1998-** Plantes médicinales d'Algérie. Ed. Office des publications universitaires. 277 p.
- **Barone R. (1976).** Anatomie comparée des Mammifères domestiques. Tome 3 : Splanchnologie 2 : Appareil uro-génital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Paris : 896 p.
- **Bedossa L. (1998).** Exploration de la fonction de reproduction. Versant masculin. Cahier de formation, bio. Méd., 42 : 12-15.
- **Barone R. (2001).** Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4 : splanchnologie II. Edition Vigot Frères, Paris : 896 p.
- **Boussit D. (1989).** Reproduction et insémination artificielle en cuniculture chez le lapin. Edité par l'association française de cuniculture ; Diffusion Lavoisier TEC et DOC : 240p.
- **Barone R. (2001).** Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4: splanchnologie II. Ed. Vigot Frères, 241-516.
- **Barone R. (1978).** Color atlas of veterinary anatomy. Anat. Rec., 1-2: 59-64.
- **Bonnes G., Des Claude J., Drogoul., Gadoud R., Jussian R., Le lo'h A., Montémas L. et Robin G. (2005).** Reproduction des animaux d'élevage. 2èmeEd. Edition du Cagri : 470 p. Cooper T. G. (1998). Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. J.Reprod. Fert. Suppl. 53: 119-136.
- **Buch JG, Dikshit RK and Mansuri SM. (1988).** Effect of certain volatile oils on ejaculated human spermatozoa. *Indian. J. Med. Res.*, 87: 361-363.

## C

- **Chikhoun A, Stouvenel L, Iguer-Ouada M, Hazzit M, Schmitt A, Lorès P, Wolf JP, Aissat K, Auger J, Vaiman D and Touré A. (2015).** *In-vitro* effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol on human sperm motility and function. *Reprod. Biomed. Online*, 31: 411-420.

- **Contri et al., 2012.** Kinematic study on Effect of pH on bull sperm function. *Animale reproduction Science*, 2013, p 252-259.
- **Colin, M. & Lebas, F. 1994.** La production du lapin dans le monde. Communication aux 6es Journées de la recherche cunicole en France, 6-7 déc. 1994.
- **Cooper T. G. (1998).** Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J.Reprod. Fert. Suppl.* 53: 119-136.
- **Cohen J.P., Hoffer A.P. ET Rosen S. (1976).**Carbonic anhydrase localization in the epididymes and testis of the rat: histochemical and biochemical analysis. *Biol. Reprod;* 14: 505-517.

## D

- **Dacheux JL 1980.** An 'in vitro' luminal perfusion technique to study epididymal secretion. *IRCS Medical Science* 8, 137.
- **Dacheux JL, Belghazi M, Lanson Y and Dacheux F 2006.** Human epididymal secretome and proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 250, 36-42.
- **Decuadro-Hansen., 2004.** La réfrigération et la conservation du sperme : expérience chez l'animale. *Gynecol. Obstet. Fertile.* Vol. 32, n°10, p 887 – 893.
- **D. Fernández Abella<sup>1,2</sup> M. Da Costa<sup>2</sup> Y. Guérin<sup>3,4,5,6</sup> and J. L. Dacheux<sup>3,4,5,6</sup>.** Fertility of Undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4°C. *Animal* (2015), 9:2, pp 313-319.
- **Dumon, 2007.** L'insémination artificielle dans l'espèce canine. *Actualités. Acad. Vét. France.* Tom 160 – N°2.
- **Dym M. R., Raj H. G. M., Lin Y. C., Chemes H. E., Kotitie N. J., Nayfeh S. N., et French F. S., (1979).** Is FSH required for maintenance of spermatogenesis in aduiltrats, *J.Reprod. Fertile.*, vol. 1. (26), 175-181.
- **De belle feuille, s. (2002).** Les caténanes présentes dans l'épididyme et leur implication lors de la formation de la barrière hémato-épididymaire. Québec: institut nationale de la recherche scientifique- institut arnard Frappier.
- **Dadoune J.P et Demoulin A. (2001).** Structure et fonction du testicule. La reproduction chez les mammifères et chez l'homme. Edition INRA, France : 256-289.

## F

- **F. Lebas., 2000.** Les besoins vitaminique du lapin. Cuniculture 27, P2- 199 – 209.
- **Fickinger C.J., Howards S.S. and English H.F. (1978).**Ultra structural differences in efferent ducts and several regions of the epididymes of the hamster. Am. J. Anat, 152: 557- 585.
- **Favier A. (2003).** le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique.108-115.

## J

- **Jones RC 1998.** Evolution of the vertebrate epididymes. Journale of reproduction and fertility supplement 53, 163-181.
- **Jacque Buxeraud, Sébastien Faure 2021).** Actualité pharmaceutique, la vitamine C 604, p S24 - S26.
- **Jones, R., Hamilton, D. W., and Fawcett, D. W. (1979).** Morphology of the epithelium of the extra esticularrete testis, ductile efferent's and ducts epididymids of the adult male rabbit. Am J Anat, 156: 373 - 400.
- **Joly T. et Theau. Clément M. (2000).** Reproduction et physiologie de la reproduction. 7<sup>ème</sup> congrès mondial de cuniculture.A.S.F.C. valencia 'ombres et Lumières' :19-24.

## H

- **Hamon R., Thepot N. ET Salaun G. (1999).** Biologie de la reproduction des mammifères d'élevage. Editions Educagri, 132.
- **Hermo L. ET Robaire B. (2002).** Epididymal cell types and their functions. I: Robaire B., Hinton B.T. The epididymys: From Molecules to Clinical Practice. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York: 81-102.
- **Hoffer A. P., Hamilton D. W. ET Fawcett D. W. (1973).** The ultra structure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymys. Anat. Rec. 175: 169-201.
- **Hermo L., Adamali H. I. et Andonian S. (2000).** Immune localization of CA II and H<sup>+</sup> VATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymys. J. Androl., 21: 376-391.

- **Hermo L., Chong D.L., Moffatt P., Sly W.S., Waheed A. et Smith C.E. (2005).**Region and cell-specific differences in the distribution of carbonic anhydrase II, III, XII, and XIV in the adult rat epididymis. *J. Histochemical. Cytochem.*, 53 : 699–713.
- **Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C et Chapelle JP. (2007):** le stress oxydant, *Rev Med Liège*; 62:10:628-638.

## G

- **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.
- **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 pp13-31.
- **Grasse P. (1949).** *Traité de zoologie Anatomie, Systématique, Biologie.*- Paris : Ed. Masson et Cie : 979 p.
- **Girouard J. (2009).** Rôle des domaines membranaires rafts dans le transfert et la compartimentation des protéines impliquées dans la maturation épидидymaire des spermatozoïdes bovins. Thèse de Doctorat en physiologie-endocrinologie. Département d'obstétrique et gynécologie faculté de médecine université Laval. Québec

## K

- **Kikuchi K, Nagai T, Kashiwakazi N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, Soloy E and Kaneko H 1998.** Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymids stored at 4 degrees C. *Thriogenology* 50, 615-623.

## M

- **Mokrane Iguer-ouada., R Kaidi and Asma Amokrane.2020.** The effect of vitamin E and polyethylene glycol (PEG) association on chilled rabbit sperm: impact on sperm motility and oxidative stress status.
- **Mortimer, S.T., 1997,** A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. Hum. Report. Update 3, 403.
- **McLachan RI 1998.** The use of epididymal spermatozoa in assisted reproduction. Journal of reproduction and fertility supplement 53, 277- 284.
- **Mercier P. Rideaud P.** Bactériologie du sperme fraiche de lapin. Prod. Anim., 3(3), 215-221.
- **M.D. Mira, M. Ait Hammou, S. HadjadjAoul.** Phytothérapie et taxonomie des plantes médicinales spontanées dans la région de Tiaret (Algérie), Ethnopharmacologie 11 : 206- 218.
- **Muller Y.et Clos J. (1997).** La reproduction (Gonades, gamètes et fécondation). Edition Nathan, Paris : 9-31. Paris, 220 p
- **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., Palacio J., Paniagua R. et Nistal M.(1995).** The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. Andr. 27:195-206.
- **Martinet L. (1973).** Quelques aspects de la physiologie de la reproduction du lapin. Conférence, Session ITAUT Toulouse, sept : 1973.
- **Marie b N.E. (2006).** Anatomie et physiologie humaines. 6ème éd. Renouveau pédagogique, France : 1096.
- **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.
- **Mocé E., Purdy P.H et Grahama J.K 2009.** Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrin improves cryosurvival. Published by Elsevier B.V.

- **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.

## O

- **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.
- **Olson G.E. ET Hinton B.T. (1985)**. Regional differences in luminal fluid polypeptides of the rat testis and epididymys revealed by two-dimensional gel electrophoresis. J. Androl., 6: 20 34.

## P

- **Parez et Duplan.1987**. L'insémination artificielle bovine. -Paris : ITEB/UNCEIA. -256p.
- **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.
- **Pena et Linde-Forsberg 2000b**. Effects of equex. One or two step dilution and freezing and thawing rates on post-thaw Survival of dog spermatozoa. Thriogenology, vol. 54, n°6, p. 859 – 875.
- **P. Kathiravan, J. Kalatharan, G. Karthikeya, K. Rengarajan, G. Kadirvel, 2011**.Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system--a review, biology, medicine. Reproduction in domestic animals.
- **Poulab et al 2015**, International Journal of Basic Sciences & Applied Research. Vol., (4) 3, 190-195, 2015

## R

- **Robaire B. Hinto B.T. ET Orgebin-Cris M.C. (2006).** The epididymis. In: Neill J.D. ed. *physiol. of Reprod.* Third, New York: 1071-1148
- **Robaire B. et Hermo L. (1988).** Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure functions, and their regulation. In: Knobil E., Neill J. (éd.). *The physiology of Reproduction*, New York: 1085 p.

## S

- **Soranzo L., Dadoune J. P. et Fain-Maurel M. A. (1982).** Segmentation of the epididymal duct in mouse: an ultra structural study. *Reprod. Nutr. Dev.* 22: 999-1012.
- **Seiler P., Cooper T. G. ET Nieschlag E. (2000).** Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. *Int. J. Androl.* 23: 65-76.
- **Suzuki F. et Nagano T. (1978).** Development of tight junctions in the caput epididymal epithelium of the mouse. *Dev. Biol.* 63: 321–334.
- **Soranzo L., Dadoune J. P. et Fain-Maurel M. A. (1982).** Segmentation of the epididymal duct in mouse: an ultra structural study. *Reprod. Nutr. Dev.* 22: 999-1012.
- **Sullivan R. (2004).** Male fertility markers, myth or reality. *Anim. Reprod. Sci.*, 83: 341-347.

## T

- **Tamayo-Canul J, Alvarez M, Lopez-Uruena E, Nicolas M, Martinez-Pastor F, Anel E, Anel L, de Paz P 2011b.** Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymis. *Animal Reproduction Science* 126, 76–82
- **Touazi L, Aberkane B, Bellik Y, Moula N & Iguer-Ouada M (2018)** *Veterinary World* 11, 590-597.
- **Thibault C. ET Levasseur M.C. (2001).** La reproduction chez les mammifères et l'homme. Edition Quae (Paris): 940p.

- **Trasler J.M., Hermo L. ET Robaire B. (1988).**Morphological changes in the testis and epididymis of rat's treated with cyclo-phosphamide: a quantitative approach. *Biol. Reprod.*, 38: 463–479.

## W

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

## Z

- **Zhong R & Zhou D (2013).** *Journal of Integrative Agriculture* **12**, 1826-1838.

## Résumé

L'intérêt de la conservation du sperme épидидymaire du lapin réside dans plusieurs aspects. Premièrement, cela permet de préserver la fertilité des animaux mâles ayant des caractéristiques génétiques souhaitables. Ces échantillons de sperme peuvent être utilisés pour la reproduction ultérieure, même après la mort de l'animal. Cela contribue à maintenir et à préserver la diversité génétique des populations de lapins.

Deuxièmement, la conservation du sperme épидидymaire peut faciliter le transport et l'échange de matériel génétique entre différents élevages de lapins, ce qui peut être bénéfique pour l'amélioration génétique de l'espèce.

L'objectif de notre travail est d'améliorer la conservation du sperme épидидymaire du lapin en utilisant l'huile essentielle du « *Rosmarinus officinalis* » seule ou sous forme de complexes à 4°C. Nous nous sommes intéressés, particulièrement, à l'impact du « romarin » sur la conservation du sperme. Nous avons analysé la mobilité par l'analyseur informatique (CASA).

Les résultats ont montré que les milieux utilisés sont efficaces pour la préservation de la mobilité. Cependant, les meilleures VCL et VSL sont notées dans le milieu de l'HE seule et VitC seule. Par ailleurs, les complexes PEG/HE/vitC, HE/vitC et PEG/HE ont permis de maintenir la mobilité initiale (de T0) des spermatozoïdes pendant les 2 heures de conservation à T 4°C. Le PEG a certainement solubilisé l'huile essentielle du romarin qui a protégé les spermatozoïdes du stress oxydatif. La Vitamine C également a exercé son effet antioxydant pendant les 2 heures de réfrigération. Nous concluons que l'ajout du PEG et / ou de la VitC à l'HE n'améliore pas la mobilité des spermatozoïdes réfrigérés mais permet de la maintenir au même niveau de T0 jusqu'à T2.

**Mots clés :** Les huiles essentielles, *Rosmarinus Officinalis*, Sperme, Conservation.

## **Abstract**

The interest in the conservation of epididymal sperm in rabbits lies in several aspects. Firstly, it allows for the preservation of fertility in male animals with desirable genetic characteristics. These sperm samples can be used for future reproduction, even after the animal's death. This helps to maintain and preserve the genetic diversity of rabbit populations.

Secondly, the conservation of epididymal sperm can facilitate the transport and exchange of genetic material between different rabbit farms, which can be beneficial for the genetic improvement of the species.

The objective of our work is to improve the conservation of rabbit epididymal sperm using the essential oil of "*Rosmarinus officinalis*" alone or in complex form at 4°C. We were particularly interested in the impact of rosemary on sperm preservation. We analyzed the sperm motility using computer-assisted sperm analysis (CASA).

The results showed that the media used are effective in preserving motility. However, the best values for VCL and VSL were observed in the medium with only the essential oil (EO) and vitamin C alone. Furthermore, the complexes PEG/EO/vitamin C, EO/vitamin C, and PEG/EO helped maintain the initial motility (at T<sub>0</sub>) of spermatozoa during the 2-hour conservation at 4°C. PEG likely solubilized the essential oil of rosemary, which protected the spermatozoa from oxidative stress. Vitamin C also exerted its antioxidant effect during the 2 hours of refrigeration. We conclude that the addition of PEG and/or vitamin C to the essential oil does not improve the motility of refrigerated spermatozoa but helps maintain it at the same level as T<sub>0</sub> until T<sub>2</sub>.

**Keywords:** Essential oils, *Rosmarinus officinalis*, Sperm, Conservation.