

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

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

Contribution à l'étude de la conservation du
sperme du lapin à 4C°

Présenté par :

Khereddine Sarah & Touati Samra

Soutenu le 25/06/2024

Devant le jury composé de :

M^{me} Rahmani A

MCB

Président

M^{me} Talbi A

MAA

Encadreur

M^{me} Djouad S

MAA

Examineur

Année universitaire : 2023 / 2024

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier dieu le tout puissant de nous avoir donné la force et la patience d'accomplir ce travail et nous a permis d'être ce que nous sommes aujourd'hui.

*Nous adressons nos sincères remerciements à notre chère promotrice **M^{me} TALBI**, pour avoir proposé et d'encadrer ce travail et pour ses conseils et ses précieuses orientations, sa gentillesse et l'énergie qu'elle a apporté tout au long de ce travail.*

*Nous tenons particulièrement à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, en l'occurrence **M^{me} RAHMANI A** d'avoir accepté de présider le jury et **M^{me} DJOUAD** d'avoir accepté d'examiner et évaluer ce travail.*

*Nous tenons à remercier toute l'équipe du laboratoire, à leur tête **Mr IGUEROUADA M** et **M^{me} INOURI H** pour leur disponibilité et leur gentillesse.*

*Nous tenons à remercier **Mr AMIROUCHE** et **Mr BENZAADI** pour leur contribution à la réussite de ce travail.*

Enfin, nos remerciements s'adressent également à ceux qui nous ont apporté leur aide, et tous ceux qui ont contribué par leur soutien de près ou de loin, pour la réalisation de ce travail. Un grand merci à vous tous.

Dédicaces

A mon cher grand père qui nous a quittés, merci pour les moments précieux et les leçons de vie, merci pour ton aide et tes conseils. Je ne t'oublierai jamais et tu resteras toujours dans mon cœur et ma mémoire.

A maman et papa qui ont consacré leur vie à m'élever et m'éduquer et me soutenir dans les moments les plus difficiles de ma vie, je vous aime, je ne pourrai jamais vous rendre la pareille.

*A mon frère **YAHIA** et ma sœur **LILIA** avec qui j'ai partagé les plus beaux souvenirs de ma vie, merci pour votre amour inconditionnel, je vous souhaite tout le bonheur du monde.*

A mes grands-parents, merci pour vos douaa, que dieu vous protège pour moi.

*A mes oncles **SAID, MABROUK, DJAMEL** et leurs épouses ainsi qu'à mes chères tantes, merci pour votre soutien et votre aide.*

*A mon cousin **YAZID** et mon oncle **ELHADI**, merci pour vos conseils, votre aide et votre soutien, je vous souhaite la réussite dans votre vie.*

*A ma chère cousine et sœur **YASMINE** avec qui j'ai passée mon enfance, Merci pour ton aide et ton soutien, ton amitié je te souhaite tous le bonheur du monde.*

*A mes chères cousins et cousines **AMIROUCHE, AHMED, AYOUB, FARAH, MANAL, MAISSA, MIRA**, je vous aime beaucoup, je vous souhaite la réussite dans vos études et le bonheur dans vos vies.*

*A ma chère copine et sœur **LILIA**, merci pour ton aide et ton soutien ainsi qu'à toute ta famille.*

*A mes chères copines **NARIMANE** et **ROMAÏSSA**, merci pour les bons souvenirs passés ensemble, je vous souhaite la réussite dans vos vies, merci pour **KENZA, KAHINA, SARA, YASMINE, AMINA, RIMA**.*

*A ma binôme **SAMRA**, merci pour ton amitié, ton aide, et ta coopération, je n'oublierais jamais ta présence dans les moments difficiles, je te souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite ainsi qu'à toute ta famille.*

Sarah

Dédicaces

A ma chère grand-mère qui nous a quitté mais qui nous a laissé de bons souvenirs, que dieu l'accueille dans son vaste paradis.

A ma chère maman, ma source inépuisable de tendresse et de patience. Tes prières m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire ou écrire, je ne pourrais exprimer assez mon affection et ma profonde reconnaissance.

A mon cher papa, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai pour toi. Ce travail est le fruit de tes sacrifices et tes efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être.

*A mes frères **Nabil**, **Farid**, **Abdelhak**, **Idris** et mes deux chères sœurs **Siham** et **Sabah**. En témoignage de l'amour et de l'affection que je porte à votre égard, je vous remercie d'avoir été et d'être l'épaule sur laquelle je peux toujours compter.*

*A mes beaux- frères et mes- belles sœurs ainsi que mes nièces et mes neveux .a mon oncle **Youcef** et sa famille.*

*A ma deuxième famille qui m'a toujours considéré comme leur fille, à mon mari **ABDOU** qui m'a apporté tout son soutien et a toujours été à mes côtés, à ma belle-mère **MAMA BIBA** qui m'a soutenue tout au long de cette période et m'a traité comme sa fille, à mon beau-frère et sa femme et le petit prince **Rayan**, a mémé et mon oncle **AZIZ** , ainsi qu'à toute la famille **Rahmani** et **Touati** .*

*A mes copines **Maïssa** ,**Nawel**, **Sarah**, **Narimen**, **Romaïssa Sara**, **Yasmine**, **Kenza**, **Kahina** et **Amina**. Merci pour les bons moments, je vous souhaite que de la réussite et du bonheur.*

*A mon binôme **Sarah** avec qui j'ai tout partagé, j'ai eu de la chance de t'avoir comme binôme et comme copine. Merci pour ta compréhension et ton soutien. Je te souhaite tout le bonheur du monde.*

*Je remercie particulièrement mon frère **Abdelhak** de m'avoir inspiré et motivé à poursuivre mes études, malgré les difficultés que j'ai pu rencontrer durant mon parcours universitaire.*

SAMRA

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Sommaire	

INTRODUCTION.....	01
--------------------------	-----------

CHAPITRE I : ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE REPRODUCTION CHEZ LE LAPIN	03
---	-----------

I- La reproduction.....	03
--------------------------------	-----------

I-1. La puberté et la maturité sexuelle

I-2. La spermatogénèse chez le lapin	03
---	-----------

I-2-1. L'appareil génital mal.....	03
------------------------------------	----

I-2-2. La formation des spermatozoïdes	03
--	----

I-3.Composition de sperme du lapin.....	06
--	-----------

I-4. Facteurs influençant sur la qualité du sperme	08
---	-----------

I-4.1.L'âge	08
-------------------	----

I-4.2. La race	08
----------------------	----

I-4.3.La saison	08
-----------------------	----

I-4.4. L'alimentation	09
-----------------------------	----

I-4-5. Le rythme de récolte	09
-----------------------------------	----

CHAPITRE II : LA CONSERVATION DU SPERME	10
--	-----------

II.1. Récolte du sperme	10
--------------------------------------	-----------

II-1.1. Techniques de collecte	10
---	-----------

II-1.1.1 Collecte épидidymaire	10
--------------------------------------	----

II-1.1.2.Collecte par électro-éjaculat	10
--	----

II-1-1.3 .Collecte par vagin artificiel.....	11
--	----

II.2. l'analyse du sperme.....	11
II-2.1. L'analyse macroscopique	12
II-2.1.1. Le volume	12
II-2.1.2. La couleur	12
II-2.1.3. La viscosité	12
II-2.1.4. Le PH.....	13
II-2.1.5. L'odeur	13
II-2.2. Analyse microscopique.....	13
II-2.2.1. Mobilité (massale et individuelle)	13
II-2.2.2. Concentration	15
II-2.2.3. Morphologie	15
II-2.2.4. Viabilité	16
II.3. Evaluation de la qualité du sperme par le CASA.....	17
II.4. la conservation du sperme	18
II.4.1. La conservation à T° ambiante.....	19
II.4.2. La conservation par congélation	19
II.4.3. La conservation par réfrigération	19
CHAPITRE III : LA CONSERVATION DU SPERME PAR	
REFRIGERATION.....	20
III.1. Intérêt de la réfrigération	20
III-1.1. l'impact de la réfrigération sur la semence.....	20
III-1.2. Impact du stress oxydatif sur les spermatozoïdes.....	21
III.2. la dilution.....	22
III.3. les milieux de conservation	23
III-3.1. Le cholestérol.....	23
III-3.1.1. Définition	23
III-3.1.2. Le cholestérol et la membrane cellulaire.....	24
III-3.1.3. Le cholestérol et la conservation du sperme.....	24

III.3.2.le polyéthylène glycol (PEG)	25
III-3.2.1. Les propriétés avantageuses du PEG.....	26
III-3.2.2. Applications du PEG	27
CHAPITRE IV : MATERIELS ET METHODES	28
VI.1.Objectif du travail.....	28
VI.2.Les spécimens de lapin étudiés.....	28
VI.3.Collecte des échantillons de sperme étudié	
VI.3.1. Préparation du vagin artificiel	28
VI.3.2. Technique de récolte	30
VI.4. La dilution	31
IV.5. La réfrigération.....	32
CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS	33
V.1.Caractéristiques du sperme conservé.....	34
V.2 Interprétation des résultats de la VSL	35
II.3Interprétation des résultats de pourcentage des SPZ mobiles.....	37
III.4 Interprétation des résultats de pourcentage des SPZ progressives.....	40
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	42
Références bibliographiques	
Résumés.....	

Liste des Figures

Figure N°01 : Appareil génital du lapin mâle -----	04
Figure N°02 : Organisation du testicule et de l'épididyme -----	06
Figure N°03 : Spermatozoïde de lapin-----	07
Figure N°04 : Un vagin artificiel utilisé chez le lapin-----	11
Figure N°05 : Morphologie des spermatozoïdes normaux et anormaux-----	16
Figure N°06 : Terminologies standards des variables cinétiques mesurées par le système CASA-----	18
Figure N°07 : Structure chimique du cholestérol-----	24
Figure N°08 : Structure chimique du PEG-----	26
Figure N°09 : Matériel utilisé pour le vagin artificiel -----	30
Figure N°10 : les étapes de préparation du vagin artificiel -----	30
Figure N° 11 : Méthode de récolte -----	31
Figure N°12 : le gel du sperme du lapin-----	31
Figure N°13 : Les composants nécessaires pour la préparation du TRIS-----	32
Figure N°14 : Milieux de conservation-----	33
Figure N°15 : Le microscope CASA (Computer Assisted Semen Analyser) -----	34
Figure N°16 : Diagramme représentant la VSL des SPZ à T0 dans les différents traitements -----	36
Figure N°17 : Diagramme représentant la VSL des SPZ à T2 dans les différents traitements -----	37
Figure N°18 : Diagramme représentant la VSL des SPZ à T5 dans les différents traitements -----	38
Figure N°19 : Diagramme représentant la mobilité totale des SPZ à T0 dans les différents traitements -----	39
Figure N°20 : Diagramme représentant la mobilité totale des SPZ à T2 dans les différents traitements -----	40

Liste des Figures

Figure N°21 : Diagramme représentant la mobilité totale des SPZ à T5 dans les différents traitements -----	41
Figure N°22 : Diagramme représentant la mobilité progressive des SPZ à T0 dans les différents traitements -----	.42
Figure N°23 : Diagramme représentant la mobilité progressive des SPZ à T2 dans les différents traitements -----	43
Figure N°24 : Diagramme représentant la mobilité progressive des SPZ à T5 dans les différents traitements -----	44

Liste des tableaux

Tableau I : Principales caractéristiques de la semence des lapins pour le premier et le deuxième éjaculat-----	07
Tableau II : Notation de la mobilité massale du sperme d'après « Petitjean » -----	14
Tableau III : Notation de la mobilité individuelle des spermatozoïdes d'après « Andrieu » -----	15
Tableau IV : Les composants et les propriétés adéquates des tris buffer utilisés pour le lapin-----	23
Tableau V : Caractéristique du sperme conservé -----	35

Liste des abréviations

ADN	acidedésoxyribonucléique
ALH	amplitude of lateral head displacement
ATP	Adenosine Triphosphate
CHL	Cholesterol
CASA	computer –aided sperm analysis
DMSO	diméthylsulfoxyde
FIV	Fécondation in Vitro.
FDA	Food and Drug Administration
h	heure
HTK	Histidine-tryptophane –cétoglutarate
IA	Insémination artificielle
g	gramme
kDa	Kilodalton
LIN	linéarités du chemin curviligne
mm	millimètre
ml	millilitre
min	minutes
mOsmoles	mili-osmoles
NADP+	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OMS	Organisation mondiale de la santé
PEG	polyéthylène glycol
pH	potentielhydrogène
PBS	phosphate Buffered Saline
SPZ	Spermatozoïdes
ROS	Reactive Oxygen Species
rv	Rota-vapeur
STR	strength
sec	secondes
T°	Température

TBS	Tris buffered saline
μ l	microlitre
μ m	Micromètre
V	Volume
VCL	curvilinear velocity
VSL	straight-line velocity
WOB	Weight of Burden

Introduction

La biotechnologie de la reproduction répond aux divers besoins du secteur d'élevage en mettant l'accent sur la productivité, elle permet une meilleure répartition des espèces.

Pour améliorer la conservation de la biodiversité des espèces sauvages et domestiques, les biotechnologies tels que l'insémination artificielle, la cryoconservation des gamètes et des embryons, agissent dans le but commun qui est l'amélioration de la génétique et la santé des troupeaux. Il n'y a aucun doute que l'insémination artificielle (IA) est la biotechnologie de reproduction qui a eu le plus impacte durant les dernières années. C'est le point clé de l'organisation et la rentabilité en élevage, ainsi qu'un moyen d'amélioration génétique (**Decuadro, 2004**).

Plusieurs travaux ont été réalisés afin d'améliorer les connaissances en matière de la conservation in vitro du sperme, de nouvelles techniques ainsi que de nouveaux milieux de dilutions ont vus le jour et ont donné satisfaction (**Decuadro, 2004**).

Les spermatozoïdes (SPZ) peuvent être conservés pendant plusieurs années sans perdre leur pouvoir fécondant. Le délai entre la récolte de la semence et son utilisation dépend de la méthode d'insémination et de l'espèce animale choisie). En effet les spermatozoïdes utilisés peuvent être soit à l'état frais à température (T°) ambiante ou par réfrigération entre 4°C et 5°C ou à l'état congelé, la réussite de cette opération nécessite un bon milieu de conservation de ces SPZ afin de garder leurs viabilité. (**Claire, 2022**)

La recherche de conditions de stockage prolongé pour la semence sans perte de son pouvoir fécondant a fait l'objet de nombreux travaux, notamment sur les dilueurs. Les chercheurs ont utilisés des dilueurs « longue conservation » à base des tampons zwitterioniques et de l'albumine bovine chez les Porcins, le glycérol, le jaune d'œuf, le lait et l'albumine bovine ou humaine ont été aussi employés dans la conservation des gamètes des bovins, ainsi que le cholestérol, les vitamines C et E, certaines huiles essentielles, la cyclo-dextrine et des dilueurs synthétiques ont, quant à eux, été utilisés chez d'autres espèces comme le lapin et le coq (**Decuadro, 2004**).

Introduction

L'être humain s'intéresse de plus en plus au lapin et à ses différentes utilisations dans l'alimentation comme source de viande ou de l'habillement comme source de fourrure. Pour ses intérêts économiques, il essaye d'améliorer la rentabilité des élevages du lapin en faisant appel à la technique de l'insémination artificielle, qui permet une conduite en bande et de l'insémination des lapines avec une semence d'un mâle de qualité (**Kairouan, 2020**).

Le présent travail a pour objectif de démontrer et d'évaluer l'impact du cholestérol (CHL) seul ou associé au polyéthylène glycol (PEG) sur la conservation des spermatozoïdes de lapin réfrigérer à 4C°. Ainsi, ce document est structuré en 4 chapitres comme suit :

1. Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique sur l'anatomie et physiologie de la reproduction chez le lapin.
2. Le deuxième chapitre est consacré à la présentation de méthode de la conservation du sperme par réfrigération, ses intérêts, les milieux de conservation utilisés.....etc.
3. Le troisième chapitre est dédié
4. Le quatrième chapitre est consacré aux résultats obtenus et leurs interprétations

Nous terminons avec une conclusion et des perspectives.

CHAPITRE I : ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ LE LAPIN

I. La reproduction

La reproduction est un pilier fondamental de l'élevage, garantissant la continuité de la production, la rentabilité de l'exploitation, et la bonne gestion des effectifs pour répondre aux besoins du marché.

Le lapin est un mammifère de l'ordre des lagomorphes et de la famille des *Leporidaes*. Il est donc un mammifère *polytoque*, dont la reproduction se caractérise par une production de nombreux lapereaux en saison d'abondance alimentaire (Costuas *et al.*, 2015).

I.1 La puberté et la maturité sexuelle

C'est une étape clé du développement reproductif chez les lapins. Elle correspond à la période de la vie où ces animaux atteignent la maturité sexuelle et deviennent capables de se reproduire. Chez le mâle, la maturité sexuelle est atteinte à partir de 6 à 7 mois. Dès que le mâle atteint sa maturité sexuelle, ses testicules descendent de sa cavité abdominale vers son scrotum. Ils sont alors parfaitement visibles (Goëffon 2020). Pendant la puberté, les lapins commencent à manifester des comportements sexuels, tels que des marquages, des pulsions sexuelles. C'est à ce stade que les lapins deviennent fertiles et peuvent se reproduire, marquant ainsi le début de leur capacité à engendrer une descendance (Hulot *et al.*, 1982).

I.2 La spermatogénèse chez le lapin

La spermatogénèse est le processus de la formation des SPZ suite à un ensemble de divisions et différenciations cellulaires, elle se déroule dans les testicules à l'intérieur des tubes séminifères, elle dure 42 à 48 jours, ce processus débute de la puberté et se poursuit tout au long de la vie (Gidenn *et al.*, 2015).

I.2.1 L'appareil génital mâle

L'anatomie de l'appareil reproducteur du lapin mâle (Figure 1) possède beaucoup de similarités avec celui des autres mammifères, il se différencie durant la phase embryonnaire (Gruaz *et al.*, 2015) et il joue un rôle dans la production de sperme et son dépôt dans les voies génitales femelles.

CHAPITRE I : ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ LE LAPIN

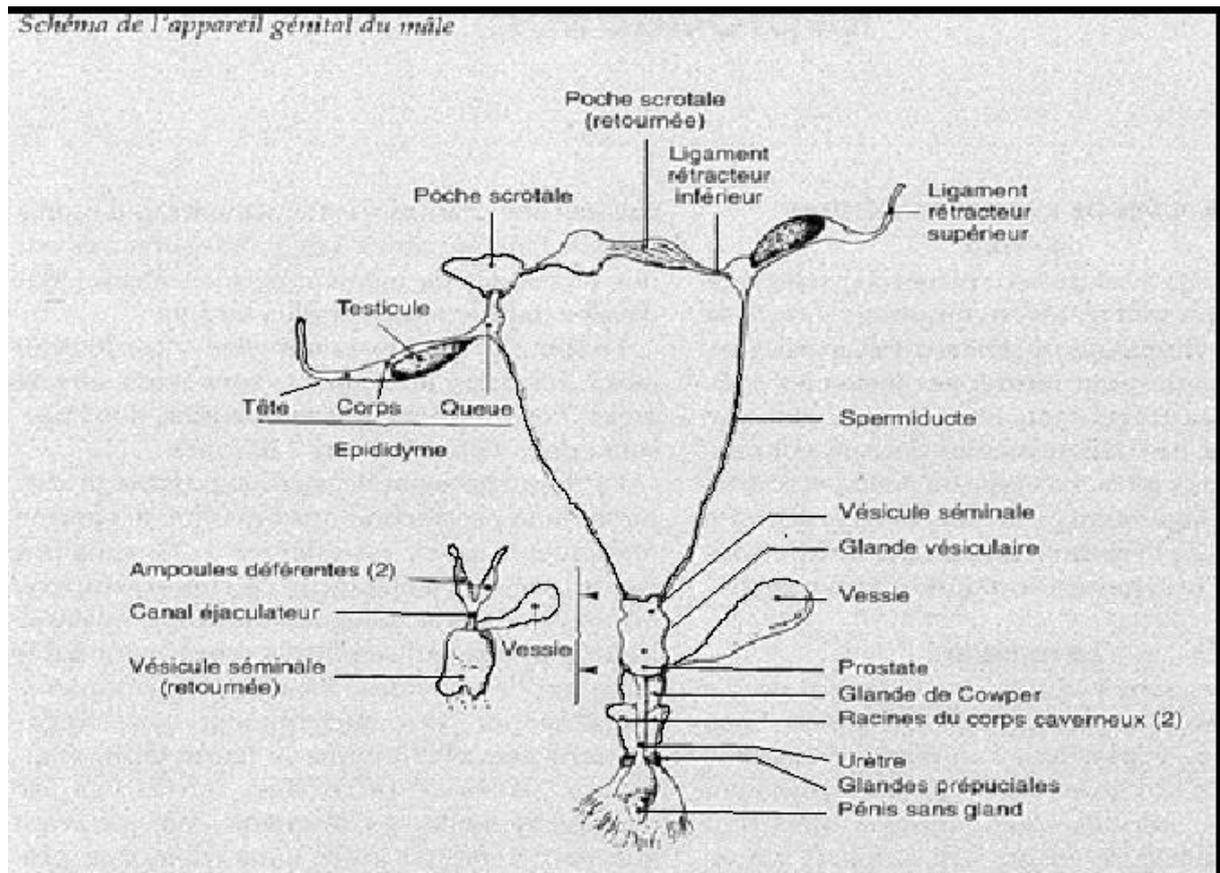


Figure N° 01 : Appareil reproducteur du lapin mâle (Lebas, 1996)

Cet appareil est composé de :

- **Les glandes génitales**

Les testicules (**Figure N°2**): De forme ovale, responsables de la maturité sexuelle et la production de spermatozoïdes et d'hormones mâles du lapin. Dès la naissance, les testicules se trouvent dans la cavité abdominale, leur développement est plus lente par rapport au reste du corps, à partir de 45 jours une accélération du développement est observé signifiant le début de la spermatogenèse ; la migration des testicules vers le scrotum se déroule généralement vers 3 mois. (**Gruaz et al., 2015**).

Les voies spermatiques

- **L'épididyme** : situé sur l'arrière du testicule assure le stockage et la maturation des spermatozoïdes. Il se divise en trois parties : la tête, le corps et la queue. (**Garreau et al., 2015**).

CHAPITRE I : ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ LE LAPIN

- **Le canal déférent** : Les canaux déférents faisant suite aux testicules font deux ou trois tours spirales avant de se détacher du peloton testiculaire. Ils se dirigent alors transversalement et d'avant en arrière vers l'axe du corps et forment, à leur point de jonction, une petite dilatation dans laquelle pénètre la terminaison des glandes annexes (**ITARD., 1970**).
- **Le pénis** : organe de copulation, son corps est cylindrique (40 à 50 mm). Le pénis du lapin est caractérisé par l'absence des glandes. (**Chikaodiri et al., 2020**).

Les glandes Annexes

- **Les vésicules séminales** : Sont des glandes importantes de l'appareil reproducteur masculin, qui participent à l'élaboration du sperme, stockent les spermatozoïdes et produisent un liquide riche en fructose pour les nourrir. Chez le lapin, les vésicules séminales sont également présentes et jouent un rôle similaire. (**Ardiaca, 2016**).
- **La prostate** : située près de la vessie et de l'urètre, produit un liquide alcalin qui aide à neutraliser l'acidité de l'urine et à favoriser la survie des spermatozoïdes. (**Ardiaca, 2016**).

I.2.2 La formation des spermatozoïdes

C'est un processus qui se déroule en deux phases:

- **Le cycle spermatogénique**

Il contribue à la réduction chromatique (chez le lapin, $2n = 44$ chromosomes), elle commence avec une spermatogonie ($2n$) pour donner à la fin un spermatozoïde (n), les spermatogonies se transforment en spermatocytes I, puis après la méiose en spermatocytes II et enfin en spermatides, ces derniers vont se transformer en SPZ par le processus de spermiogénèse et chaque SPZ est composé de trois parties (la tête, la pièce intermédiaire, la queue) (**Gidenn et al., 2015**).

CHAPITRE I : ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ LE LAPIN

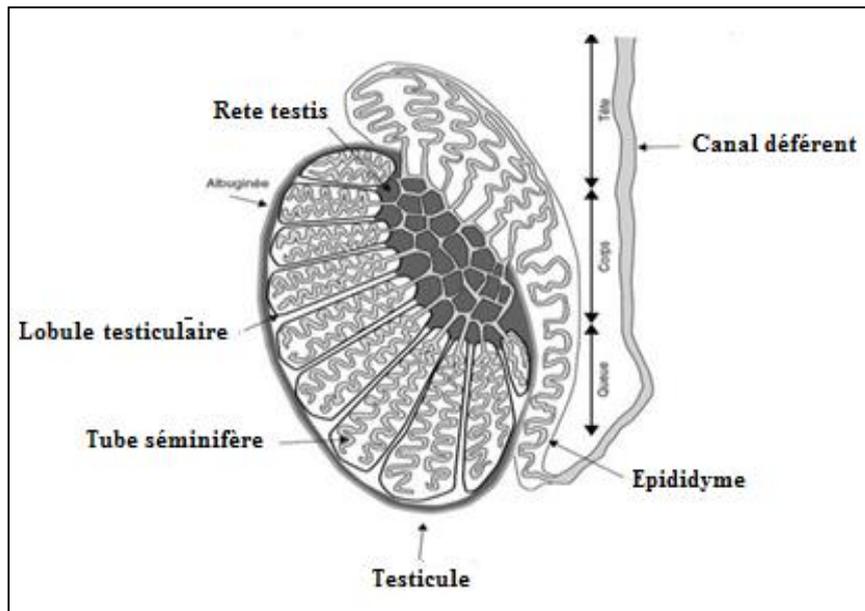


Figure N° 02 : Organisation du testicule et de l'épididyme (Gidenn *et al.*, 2015).

- **La maturation des spermatozoïdes**

Après les divisions cellulaires et les différenciations chromatiques, les SPZ formés dans les tubes séminifères commencent leur chemin vers l'épididyme à travers le rete testis, leur mobilité et le pouvoir fécondant ne se manifestent qu'à la fin du transit épidydimaire, plus exactement au niveau de la queue de l'épididyme qui est le lieu de stockage des SPZ. Chez le lapin la maturation épidydimaire varie de 8 à 11 jours. (Gidenn *et al.*, 2015)

I.3 Composition du sperme de lapin

La semence du lapin est constituée de deux parties : une partie fluide et une partie gélatineuse, cette semence est un mélange de SPZ produit par les testicules et le plasma séminal qui est quant à lui produit lors de l'éjaculation par l'épididyme et les glandes accessoires. (Chikaodiri *et al.*, 2020) (Figure N°3).

CHAPITRE I : ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ LE LAPIN

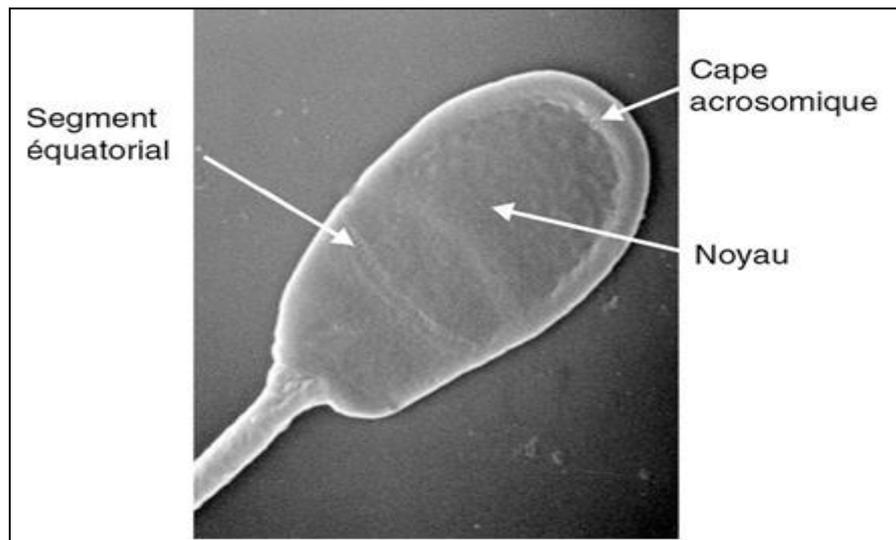


Figure N°03 : Spermatozoïde de lapin (Gidenn *et al.*, 2015).

La partie fluide représente le plasma séminal, elle contient une forte concentration de fructose, de citrate, ainsi que de myo-inositol, de glycérine, d'ergothène, de Glutamate, on trouve également certaines enzymes, protéines, électrolytes et petites gouttelettes lipidiques. (Chikaodiri *et al.*, 2020).

La partie gélatineuse (gel du sperme) provient de la vésicule séminale, elle contient une quantité significative de substances oestrogéniques, d'acide citrique et de petites quantités de fructose. (Chikaodiri *et al.*, 2020)(Tableau I).

Tableau I: Principales caractéristiques de la semence des lapins pour le premier et le deuxième éjaculat, (Alvarino, 2000)

Paramètres	Premier éjaculat	Deuxième éjaculat
Volume en ml (sans le gel)	0,1 - 1,1	0,2 - 0,5
Volume du "gel"	0,32 - 0,50	0,10 - 0,18
Pourcentage des éjaculats avec "gel"	54	15
Spermatozoïdes par ml (millions)	280 – 1050	420 - 800
% de spermatozoïdes mobiles	58 – 90	57 - 87
Taux de motilité des spz (note de 0 à 5)	2,3 - 3,3	2 - 4.8
Agglutination du sperme (note de 0 à 5)	1,2 - 2,0	0.8 – 0.16
pH de la semence	7,7 - 8,4	7.7 – 8.4

CHAPITRE I : ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ LE LAPIN

I.4 Les facteurs influençant sur la qualité du sperme

I.4.1 L'âge

L'âge des lapins influence significativement sur les paramètres de la semence (la concentration, le nombre de spermatozoïdes motiles, le volume et même le pH). Avec des mâles adultes présentant généralement une semence de meilleure qualité que les jeunes. A partir de 10 mois jusqu'à 18 mois, c'est la meilleure période pour utiliser les mâles dans la reproduction, les lapins âgés de 19 à 25 mois entrent en andropause, le volume de leur éjaculat ainsi que la concentration en spermatozoïdes baissent considérablement et des anomalies spermatiques peuvent apparaître (**Theau Clément, 2008**).

I.4.2 La race

Plusieurs paramètres peuvent montrer des variations importantes à propos des différentes races, parmi ces paramètres : le volume, le gel, la concentration, la mobilité des SPZ ainsi que les altérations morphologiques (**Dubiel *et al.*, 1985**).

I.4.3 La saison

Selon **Bonnano et Constanzo (1987)**, chez le lapin, l'activité spermatique est maximale au printemps et minimale à l'automne. Les lapins nés en hiver peuvent présenter des éjaculats moins concentrés en spermatozoïdes, tandis que ceux qui sont nés en été peuvent avoir un taux d'anomalies du flagelle plus élevé. Cette variation saisonnière est liée à la photopériode et à la température externe. Les variations observées sur les caractéristiques de la semence sont minimales dans des températures comprises entre 13°C et 26°C, par contre, elles sont élevées pour des températures supérieures à 30°C, des températures fréquentes en été pour des élevages de stabilisation mixte. La quantité et la qualité de la semence produite sont, donc, extrêmement sensibles à de fortes chaleurs.

CHAPITRE I : ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ LE LAPIN

I.4.4 L'alimentation

L'alimentation des mâles est un facteur important à maîtriser car les caractéristiques de la Semence et la libido sont affectées lorsque le niveau des apports nutritionnels est insuffisant. En effet, **Thierry Joly et al (2000)** ont rapporté qu'un régime alimentaire ne contenant que 13% de protéines brutes entraîne une diminution du volume de l'éjaculat et de sa concentration en spermatozoïdes.

I.4.5 Le rythme de récolte

La qualité et la quantité du sperme sont influencées par la fréquence de la collecte (**Theau-clement, 2000**), par exemple deux ou trois éjaculation par semaine n'altèrent pas la qualité de la semence, mais un prolongement peut la diminuer (**Meyer, 2009**).

II Conservation du sperme

La conservation du sperme est un processus qui nécessite généralement un ralentissement ou arrêt du métabolisme des spermatozoïdes, prolongeant ainsi leur vie (Yoshida 2000).

Selon Maria –Pilar (1999), la diminution de la température permet d'augmenter la durée de conservation des spermatozoïdes tout en préservant la capacité fécondante pour conserver ces SPZ, il est essentiel de suivre un processus de cryoconservation qui passe par trois étapes clés, la récolte, l'analyse et la conservation du sperme proprement dite.

II.1 Récolte du sperme

Chez le lapin, la récolte du sperme se fait 1 à 7 fois par semaine, soit par un rythme de collecte intensif (quotidien), intermédiaire (deux à trois fois par semaine) soit par un rythme extensif (une fois par semaine). La meilleure recueille du sperme, est obtenue avec le rythme extensif. (Meyer 2009).

II.1.1 Techniques de collecte

II.1.1.1 La collecte épидидymaire

La collecte épидидymaire est une nouvelle technique de la biotechnologie, utilisée pour recueillir les SPZ directement de l'épididyme, c'est une source importante de gamètes male, elle est utilisée généralement lors de l'IA ou la FIV et même la cryoconservation du sperme pour le but de sauvegarder des espèces ou des races, elle permet d'envisager aussi l'utilisation des animaux non collectables (vivants ou morts depuis quelques jours) (Ouennes *et al.* , 2015).

II.1.1.2 La collecte par électro-éjaculat

L'électro-éjaculat est une invention utilisée pour la collecte du sperme. Comparée à d'autres méthodes, elle est pratique, rapide et fiable. Elle peut être utilisée en dehors de la saison de reproduction et sur des animaux qui ne sont pas encore habitués aux manipulations. L'électro éjaculation consiste à insérer une sonde dans le rectum et à appliquer des impulsions

électriques de basse tension à court terme aux nerfs pelviens pour stimuler les muscles lisses de l'ampoule et du canal déférent, induisant ainsi l'éjaculation (**Martial grand, 1975**).

II.1.1.3. La collecte par vagin artificiel

Le vagin artificiel est un tube solide sur lequel est fixée une gaine en latex souple et un tube de collecte monté à son extrémité. Il est rempli d'eau chauffée à une température comprise entre 40 et 42°C (**Akpo et al., 2009**). Au moment de la récolte, une lapine stimulante munie d'un vagin artificiel préalablement préparé, placé entre ses pattes postérieures, est introduite dans la cage du mâle ; l'éjaculation a généralement lieu immédiatement après la présentation de la femelle au mâle. Sachant que le sperme collecté est très sensible aux variations thermiques, le tube de collecte doit être protégé par une gaine en polystyrène et maintenu à la température de 37°C (**Gidenn et al ., 2017**). (**Figure N°4**)



Figure N° 04 : Un vagin artificiel utilisé chez le lapin (**Photo personnelle**)

II.2 Analyse du sperme

L'analyse du sperme est une évaluation de sa qualité, effectuée pour diverses raisons, notamment pour déterminer la fertilité,, évaluer la qualité du sperme avant sa conservation ou son utilisation dans l'insémination artificielle. Les résultats de l'analyse peuvent aider à identifier les problèmes de fertilité masculine, tels que les anomalies du sperme ou des spermatozoïdes. Ces anomalies peuvent être causées par les infections, les lésions testiculaires, les déséquilibres hormonaux, les problèmes de santé généraux ou l'exposition à

des toxines environnementales. L'analyse du sperme comprend deux tests, un, macroscopique qui consiste à évaluer le volume, la couleur, le pH et la viscosité ; et un test microscopique qui consiste à évaluer la concentration, la mobilité, la morphologie et la vitalité des spermatozoïdes (**Baril et al ., 1993**).

II.2.1. Analyse macroscopique

Elle est réalisée juste après la récolte. Immédiatement après avoir retiré le tube, le volume, la couleur, la viscosité, le PH et l'odeur du sperme sont notés (**Gidenn et al ., 2017**)

II-2.1.1 Le volume : Le volume du sperme collecté est mesuré à l'aide d'un tube de collecte gradué. Celui des lapins est généralement faible, allant de 0,2 à 1,5 ml, avec une moyenne de 0,5 ml, le volume du sperme peut varier en fonction d'un certain nombre de facteurs, notamment l'âge, la race, l'état de santé du lapin, ainsi que la fréquence et la méthode de collecte (**Najjar et al .,2013**).

II-2.1.2 La couleur : Elle est généralement blanchâtre, elle dépend de sa concentration en SPZ. En effet, avec des rapports sexuels fréquents le sperme peut devenir plus transparent et le nombre de ses SPZ peut diminuer. Le sperme rouge témoigne la présence du sang, la couleur marron signifie un sang dégradé (lésion interne) et le sperme gris, la présence de pus (**Tourmente, 2023**).

II-2.1.3 La viscosité: Elle dépend de sa concentration en spermatozoïdes. Le sperme de lapin a généralement une viscosité faible, elle varie en fonction de l'âge, la race, l'état de santé du lapin ainsi que la fréquence et la méthode de collecte (**Keddari et al., 2017**) . Selon l'OMS (2010), la viscosité est semi quantitative, elle est observée à partir de l'écoulement du sperme dans les extrémités de la pipette, et est notée comme suit :

- 0 : viscosité normale, gouttes séparées
- + : viscosité augmentée, gouttes non séparées (filaments plus ou moins longs)
- ++ : viscosité très augmentée / fort éjaculat très visqueux

II-2.1.4 Le pH: L'analyse du pH du sperme de lapin est une étape cruciale pour évaluer sa qualité. Cette analyse doit être effectuée immédiatement après la collecte du sperme à l'aide d'un pH-mètre ou de bandelettes réactives. La valeur du pH du sperme normal du lapin varie généralement entre 6,8 et 7,3, c'est un indicateur important de la fertilité (**Bencheikh, 1994**). Le pH est mesuré par le dépôt d'une goutte de sperme bien homogénéisé sur une bandelette de papier pH, le résultat apparaît après 20 à 30 secondes de dépôt, en comparant la couleur obtenue à la gamme étalon (**Post., 2019**).

II-2.1.5 L'odeur: L'analyse de l'odeur du sperme n'est pas une procédure standard, car il n'existe pas de consensus médical ou scientifique sur l'importance de l'odeur du sperme comme critère de diagnostic. Cependant, l'odeur du sperme varie d'un animal à l'autre et peut être affectée par l'alimentation, l'hydratation et l'état de santé général, elle peut être affectée aussi par une mauvaise hygiène, une infection ou certains médicaments. De manière générale, le sperme a une odeur douce et légèrement sucrée en raison de la présence de divers composant organiques, notamment les sucres, les protéines et les acides aminés (**Baril et al., 1993**).

II.2.2. Analyse microscopique

L'analyse microscopique consiste à examiner la mobilité massale, la mobilité individuelle, la concentration, la morphologie et la viabilité des spermatozoïdes

II.2.2.1 La mobilité massale : Elle se réfère au mouvement des spermatozoïdes en masse, déterminée en observant le sperme au microscope à un faible grossissement (x10). La mobilité massale est un indicateur de la vitalité du sperme, elle est évaluée en plaçant une goutte de sperme pur entre une lame et une lamelle et en observant sous grossissement (x10). Le mouvement observé des SPZ est noté de 0 à 9 selon la grille de **Petitjean (1965) (Tableau II) (Lankri et al., 2019)**.

Tableau II : Notation de la mobilité massale du sperme d'après **Petitjean (1965)**

Note	Aspects du mouvement
0	Le sperme ne présente aucun spermatozoïde
1	Les spermatozoïdes sont immobiles
2	Un petit nombre de spermatozoïdes oscillent à leur place, ils sont agités
3	Un grand nombre de spermatozoïdes agités mais ne se déplacent pas
4	Présence de spermatozoïdes mobiles, ceux qui sont immobiles, et d'autres qui bougent sur place,
5	Ressemble à (4) avec dominance des spermatozoïdes à mobiles, une mobilité moyenne et non homogène
6	La majorité des spermatozoïdes sont mobiles, une bonne motilité homogène
7	Ressemble à (6) avec début d'un mouvement de vagues
8	Ressemble à (7) avec un lent mouvement de vagues
9	Mobilité excellente en vagues énergiques à aspect de tourbillons,

II.2.2.1 La mobilité individuelle : Elle correspond au mouvement de chaque spermatozoïde, observée sous microscope optique au fort grossissement. Elle est généralement exprimée en pourcentage de spermatozoïdes mobiles, et évaluée après dilution dans un sérum physiologique, puis Observée au grossissement (x 40). Les types de mouvements individuels des SPZ sont noté de 0 à 4 selon l'échelle d'Andrieu (1974) (**Tableau III**) (Lankri et al., 2019).

Tableau III: Notation de la mobilité individuelle des spermatozoïdes d'après **Andrieu (1974)**

Note	Aspects du mouvement
0	Absence de mobilité
1	Les spermatozoïdes ne se déplacent pas mais présentent un mouvement du flagelle
2	Les spermatozoïdes présentent un lent déplacement avec dominance du mouvement circulaire
3	Le mouvement des spermatozoïdes est heurté, ils se déplacent suivant une hélice de diamètre égale à leur longueur
4	Les spermatozoïdes se déplacent rapidement le suivant une hélice d'un diamètre faible

La mobilité massale et la mobilité individuelle du sperme de lapin sont des paramètres importants pour évaluer la qualité et la fertilité du sperme

II.2.2.2 La concentration : Elle peut être mesurée en diluant le sperme et en comptant le nombre de spermatozoïdes dans un volume connu sous un microscope. Elle est exprimée en spermatozoïdes par millilitre. La concentration normale de spermatozoïdes chez le lapin est comprise entre 150 et 500×10^6 spermatozoïdes/ml. Elle peut être variée en fonction du mâle et de la fréquence de l'éjaculation (MEYER 2008, elle est généralement mesurée par l'utilisation d'un hémocytomètre, selon l'OMS, la cellule de Neubauer et la cellule de Mallassez sont les plus utilisées pour avoir un bon résultat (Post., 2019).

II.2.2.3 La morphologie : Elle est évaluée en observant la forme et la taille de la tête, du cou et de la queue. La tête du spermatozoïde doit être ovale et lisse, avec un contour régulier attaché au corps, qui doit être fin et régulier. La queue du spermatozoïde doit être d'une épaisseur uniforme et plus fine que la pièce intermédiaire. L'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes est réalisée à l'aide de différentes techniques, telles que la coloration au Papanicolaou ou au Diff-Quik, avec une observation au microscope. L'OMS a établi des critères d'évaluation de la morphologie des spermatozoïdes. (Mieussetr. 2019).

Morphologiquement normal		Tête de forme ovale très régulière, 4,0-5,0 µm de long, 2,5-3,0 µm de large, région acrosomique bien définie, homogène, de contour net et représentant 40-70% de la surface, pièce intermédiaire représentant 1,5-2 fois la longueur de la tête, dans l'axe de la tête, pièce principale mesurant environ 45 µm, dans l'axe de la pièce intermédiaire, de contour régulier et d'aspect homogène	
Anomalies de la tête	Allongé		Longueur plus grande que la normale et largeur normale
	Aminci		Largeur plus petite que la normale et longueur normale
	Microcéphale		Longueur et largeur plus petites que la normale; dans cette catégorie entrent les têtes rondes
	Macrocéphale		Longueur et largeur plus grandes que la normale
	Multiple		>1 tête / spermatozoïde, accolées ou dissociées
	Base anormale		Anomalies de contour ou de texture de la région postacrosomique
	Acrosome anormal ou absent		Anomalies de contour, de taille ou inhomogénéité de la région acrosomique - absence d'acrosome
Anomalies de la pièce intermédiaire	Reste cytoplasmique		Prise en compte uniquement des restes cytoplasmiques ayant une surface supérieure au tiers de la surface d'une tête normale
	Amincie		Diamètre de la pièce intermédiaire inférieur ou égal à celui de la pièce principale dans sa partie initiale
	Angulée		Axe de la pièce intermédiaire et axe de la tête ou axe de la pièce principale formant un angle net ou flagelle non implanté dans l'axe de la tête
Anomalies du flagelle	Absent		Têtes isolées comptées dans cette catégorie (on ne recense pas conjointement les flagelles isolés dans la grille)
	Écourté		Flagelle significativement écourté (<5 fois la longueur de la tête), souvent épaissi
	Irrégulier		Diamètre de la pièce principale variable, présentant des rétrécissements ou des élargissements
	Enroulé		Flagelle enroulé autour de la tête ou en dehors de la tête
	Multiple		>1 flagelle / spermatozoïde, pièce intermédiaire commune ou multiple

Figure N°05 : la morphologie des spermatozoïdes normaux et anormaux (EUSTACHE. 2000)

II.2.2.4 La viabilité : L'examen de viabilité des spermatozoïdes est crucial pour évaluer leur santé et leur capacité reproductive, il permet de déterminer si les spermatozoïdes sont vivants ou morts en mettant en évidence l'état de la membrane plasmique. Pour réaliser cet examen, une méthode courante consiste à utiliser la coloration d'éosine-nigrosine, Cette technique implique de réaliser un frottis, de le sécher à l'air et enfin de compter 100 cellules sous microscope en recherchant la

présence de spermatozoïdes vivants. Lorsque la membrane est perméable, le spermatozoïde est considéré comme mort et se colore en rose. En revanche, s'il est imperméable, il est vivant et ne prend pas la couleur. Les valeurs normales pour la viabilité des spermatozoïdes sont généralement supérieures ou égales à 50% (Corteel, 1974) .

II.3 . Évaluation de la qualité du sperme par le CASA

Le CASA signifie computer-aided sperm analysis, il s'agit d'une méthode semi-automatisée qui a pour but d'analyser les paramètres du sperme tel que la mobilité, la concentration, la morphologie, la viabilité, mais aussi les paramètres cinétiques à travers une analyse fine du mouvement flagellaire non observable (Hamilton ,2019)

Le système se compose d'un microscope optique à Contraste de phase négatif, mené d'une caméra connectée à un logiciel informatique qui Permet la numérisation des images, capturées, et un appareil photo numérique. Il est nécessaire de se déplacer sur la chambre de comptage pour avoir différents champs, selon Douglas Hamilton (2005) la distribution des spermatozoïdes n'est pas homogène mais ne présente pas un impact sur la qualité des résultats (poste, 2019).

Chaque image du champ de vision du microscope est transmise par la caméra ou le logiciel la convertit ensuite en image numérique. Avant de capturer chaque champ, la luminosité doit être réglée manuellement sur le microscope après la mise au point .Les paramètres que le logiciel peut fournir sont des paramètres cinétiques (Figure N°06), l'OMS donne les définitions suivantes des principaux paramètres :

VSL (Straight line velocity) : la vitesse en ligne droite ($\mu\text{m/s}$) 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 (μm) correspondant à la distance maximale obtenue en calculant pour chaque point

constituant la trajectoire sa distance par rapport à la position moyenne (selon la trajectoire moyenne).

- LIN (linearity) : la linéarité correspond au ratio VSL/VCL en pourcentage et illustre la direction de la trajectoire

- STR (Straightness) : la rectitude de trajectoire correspond au ratio VSL/VAP et représente la linéarité de la trajectoire moyenn

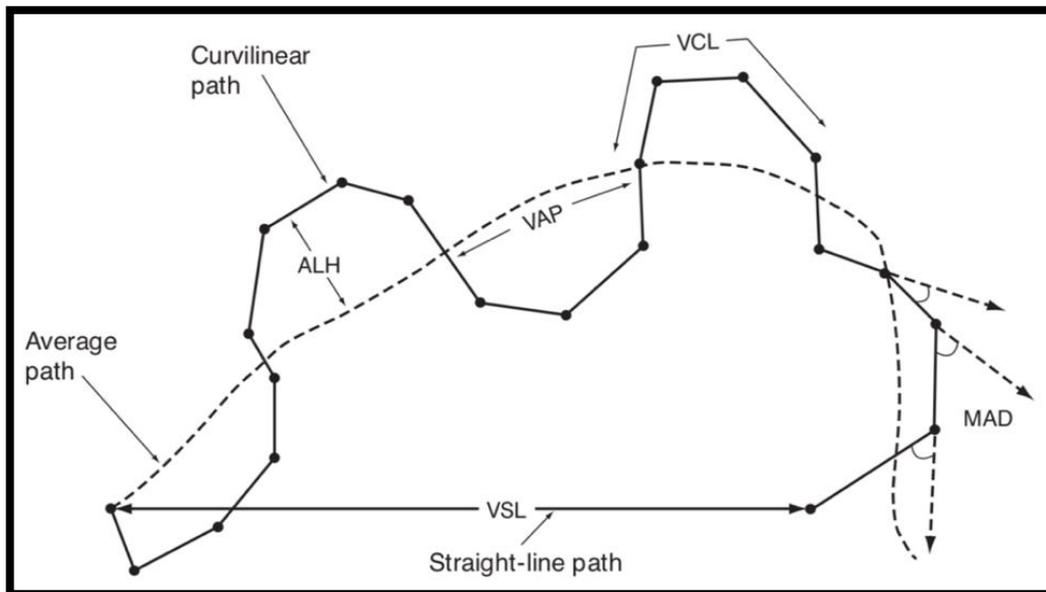


Figure N° 06 : Terminologies standards des variables cinétiques mesurées par le systèmes CASA (l’OMS, 2010)

II.4 .la conservation du sperme

La cryoconservation du sperme est une technique utilisée pour conserver les ressources génétiques menacées et faciliter les techniques de reproduction assistée en offrant la possibilité de stocker le sperme pour une utilisation future. Le sperme du lapin peut être conservé à des températures ambiantes, par réfrigération (4C°) ou par congélation (-196C°), en utilisant différentes méthodes et diluants pour maintenir la motilité des spermatozoïdes. Pour garantir le succès de l’insémination artificielle chez le lapin, la qualité du sperme doit être évaluée à l’aide de techniques analytiques fiables telles que le système CASA (Christian Meyer, 2009) .

II.4.1. La conservation à T° ambiante

La conservation de sperme du lapin à température ambiante est généralement limitée en raison du développement bactérien qui peut altérer sa qualité. Les études indiquent que le sperme de lapin conservé à température ambiante peut se dégrader rapidement, avec une diminution significative de la motilité des spermatozoïdes en quelques jours seulement. En effet, dès le cinquième jour, une grande partie des spermatozoïdes peut devenir non motile en raison de la contamination bactérienne, ce qui touche sa viabilité et sa capacité à la fécondation. Cette technique est déconseillée en raison de ces effets néfastes sur sa qualité et sa survie. (DUMESNIL,1957)

II.4.2. La conservation par congélation

Cette méthode consiste à conserver les spermatozoïdes à des températures très basses pour une utilisation future. Le diluant utilisé pour la conservation du sperme de lapin contient des substances telles que les TRIS, le glucose, l'acide citrique, le diméthylsulfoxyde (DMSO), le glycérol et le jaune d'œuf. Ces substances sont ajoutées pour protéger les spermatozoïdes des dommages cellulaires causés par la congélation (Meyer ,2009).

II.4.3. La conservation par réfrigération

La conservation du sperme par réfrigération consiste à refroidir la semence et la stocker à une température déterminée entre 4C° et 15C° (Decuadro, 2004).

CHAPITRE III : LA CONSERVATION DU SPERME PAR REFRIGERATION

Un sperme réfrigéré est un sperme conservé à 4°C, dans un milieu contenant des Cryoprotecteurs, pendant 48h (**Tainturier et al., 2013**).

III.1.Intérêt de la réfrigération

La réfrigération est une méthode de conservation qui permet de mettre en valeur le développement génétique de certaines espèces dont la semence ne supporte pas la congélation mais se comporte normalement à la réfrigération. (**Decuadro, 2004**). Selon **Yang et al (2018)**, la paillette réfrigéré est facile à utiliser et ne demande pas beaucoup de matériel, contrairement à la paillette congelée qui nécessite un temps de décongélation contrôlé avant l'utilisation. La réfrigération permet, donc, une utilisation de la paillette à la fois plus rapide et moins précise une fois celle-ci est sortie de son lieu de stockage ; de plus la réfrigération est moins couteuse que la congélation, car cette dernière nécessite un système de congélation puis de décongélation et un stockage dans l'azote liquide (**Chamoin, 2022**).

III.1.1Impact de la réfrigération sur la semence

Peu importe le mode de conservation utilisée, la mobilité spermatique fini toujours par diminuer dans le temps. Au moment de la réfrigération, la mobilité spermatique diminue significativement par rapport à la semence fraîche, en effet, la conservation du sperme à 4°C diminue le métabolisme des SPZ, ce qui permet d'économiser leurs réserves énergétique et de maintenir leur mobilité qui est restaurée après réchauffement (**Decuadro-Hansen.2004**).

D'autre part, la réfrigération exerce des modifications du potentiel de la membrane mitochondriale, ce qui diminue la production d'ATP nécessaire pour la mobilité des SPZ (**Chamoin, 2022**).

Il est aussi prouvé que la bicouche lipidique de la membrane plasmique change son état physique, et perd une partie de sa fluidité ainsi ses fractions lipidiques prennent la forme du gel, lorsque la température est proche de 0°C, ce phénomène est appelé la transition de phase lipidique. Selon **Oldenhof et al (2013)**, la plage de température durant laquelle le changement de phase a lieu dépend de la composition de la membrane et la présence d'agents Cryoprotecteurs ; une membrane qui contient plus de cholestérol, sa T° de transition est basse

CHAPITRE III : LA CONSERVATION DU SPERME PAR REFRIGERATION

et elle est plus résistante à la transition de phase lipidique. cette dernière affecte également les protéines de la membrane plasmique et entraîne des changements dans leurs conformations et des altération de leurs fonctions, cela rend la membrane plasmique plus perméable aux échanges entre les milieux intra et extra cellulaires la réfrigération à également un impacte sur différentes organites et éléments intracellulaires tels que le cytosquelette et l'ADN ; une partie de cytosquelette est endommagée lors de la réfrigération accompagné d'une polymérisation de l'actine. Selon **Waterhouse et al (2009)**, après 48h de conservation du sperme par réfrigération l'ADN spermatique commence à s'endommager avec une corrélation au taux de survie des SPZ (**Chamoïn, 2022**).

III.1.2 Impact du stress oxydatif sur les spermatozoïdes

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la quantité d'antioxydants disponibles et utilisables par l'organisme, les radicaux libres sont des molécules impliqués dans des réactions chimiques qui accompagnent la vie cellulaire, ils sont potentiellement néfastes pour l'organisme et peuvent altérer le bon fonctionnement des cellules. Certains facteurs peuvent augmenter considérablement la production de radicaux libres tels que la pollution et le stress (**Desport et al., 2002**).

La membrane plasmique des SPZ est une cible privilégiée du stress oxydatif a cause de sa richesse en gras polyinsaturés, l'attaque oxydative sur la membrane forme des peroxydes lipidiques. Plus la concentration de ces derniers est élevée, une diminution de la mobilité et de la viabilité des SPZ est observée accompagnée d'une faible activité des enzymes antioxydants. La mitochondrie est également une cible des radicaux libres, ces derniers exercent un dérèglement de leur flot d'électron ce qui mène à la production de plus de radicaux libres. Une attaque trop intense des radicaux libres sur les mitochondries engendre l'apoptose des SPZ (**Desport et al., 2002**).

Nair et al (2006) ont démontré que la réfrigération du sperme entraîne un stress oxydatif en diminuant l'action des enzymes antioxydants suite à leur fuite dans le milieu extérieur a cause de l'augmentation de la perméabilité membranaire liée à la transition de phase lipidique.

CHAPITRE III : LA CONSERVATION DU SPERME PAR REFRIGERATION

Les SPZ réfrigérés peuvent garder leur capacité de fécondation jusqu'à 3 à 5 jours, puis ils connaissent une chute de fertilité, mais moins importante que s'ils sont conservés à T° ambiante. Pour préserver la semence par réfrigération, il est nécessaire de surveiller attentivement chaque étape de préparation de la semence, telles que la dilution et le refroidissement. (**Decuadro, 2004**)

III.2 La dilution

La conservation de la semence chez les mammifères domestiques passe obligatoirement par la dilution qui se fait immédiatement après la récolte (<15min) dans un milieu qui garde la survie des SPZ et qui répond à certaines conditions (**Decuadro.2004**).

- Un pH entre 6.7 et 7.3 et une pression osmotique de 280 à 400mOsmoles.
- Une présence des nutriments tels que le glucose, fructose, glutamineetc.
- Avoir des solutions tampon tels que le Tris et des ions minéraux qui maintiennent le pH.
- Une présence des Cryoprotecteurs sous forme de lipoprotéine animale ou végétale tels que le jaune d'œuf.
- Avoir des antibiotiques qui ont un rôle de protéger les SPZ contre la flore-microbienne banale et des pathogènes opportunistes.

Après un teste d'une quinzaine de dilueurs, **Bravo et al (2012)** ont démontré que le TBS (Tris bufferd saline) garanti une meilleure conservation du sperme, en revanche le jaune d'œuf assure une viabilité plus que le PBS (phosphate Bufferd Saline) ou le lait écrémé (**Dolmos et al .2015**). (**Tableau IV**)

CHAPITRE III : LA CONSERVATION DU SPERME PAR REFRIGERATION

Tableau IV: Les composants et les propriétés adéquates des tris buffer utilisé pour le lapin (Boiti et al., 2005).

Composants et propriétés	Quantités
Tris	3.029 g
Acide citrique H ₂ O	1.676 g
D-glucose déshydraté	1.250 g
Streptomycine	75.000 UI
G-pénicilline	166.200 UI
L'eau distillée	100 ml
pH	7.14
Osmolarité	299 mOsm/kg

III.3 Les milieux de conservation

La conservation du sperme a un impact sur plusieurs fonctions cellulaires, la membrane plasmique est une cible majeur qui subit des modifications chimiques , morphologiques ou mécaniques , de plus des lipides membranaires sont affectés en raison de leur sensibilité au radicaux libres , ces effets néfastes justifient les efforts de recherche menés dans l'amélioration des méthodes de conservation et le développement des milieux à base de différents cryoprotecteurs : le polyéthylène glycol (PEG) , le cholestérol , la Vitamine C/E et le jaune d'œuf (Labbé et al., 2003)

III.3.1 Le cholestérol

III .3.1.1 Définition

Le cholestérol est un corps gras fait partie de la famille des lipides. Sa formule moléculaire brute est C₂₇H₄₆O. Les molécules de cholestérol contiennent un noyau stéroïde

CHAPITRE III : LA CONSERVATION DU SPERME PAR REFRIGERATION

doté d'une fonctionnalité alcool (OH). Il peut se combiner avec les acides gras en raison de réactions d'estérification. (Figure 07)

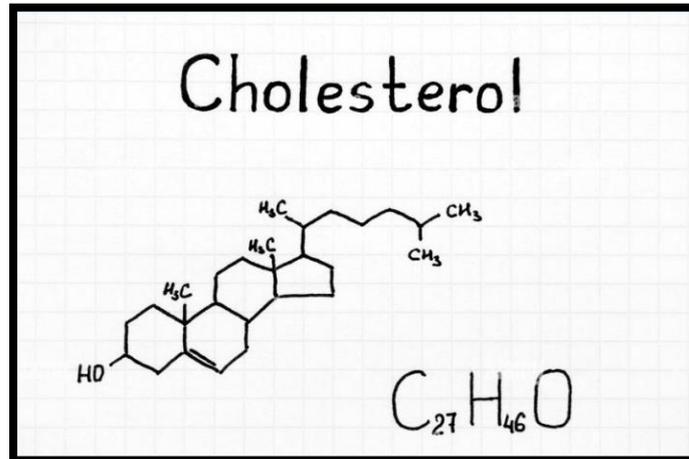


Figure N°07 : La Structure chimique du cholestérol (Minaeva. 2017)

III.3.1.2 Le cholestérol et la membrane cellulaire

Le cholestérol est un composant structurel des membranes cellulaires (Charie 2019), au niveau de laquelle il représente 30 à 45% des lipides. En raison de ses propriétés amphipathiques, il s'insère dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique, où il s'associe aux sphingolipides et aux protéines transmembranaires de manière complexe et hétérogène, formant des microdomaines appelés radeaux Lipidiques avec des compositions lipidiques différentes. La teneur du radeau libre en cholestérol est 3 à 5 fois supérieure à celle de la bicouche environnante. Par conséquent, ils ont une structure plus ordonnée et compacte que les bicouches environnantes. (Delmas et al., 2019).

III.3.1.3 Le cholestérol et la conservation du sperme

Selon Cheeseman (1993), un problème fondamental est rencontré dans l'insémination artificielle relié à la teneur élevée en acide gras insaturée de la membrane des SPZ. Les acides gras insaturés ont tendance à se lier à l'oxygène et former plusieurs liaisons peroxydes induites par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui endommagent directement les composants phospholipidiques de la membrane cellulaire

CHAPITRE III : LA CONSERVATION DU SPERME PAR REFRIGERATION

(**Bayomy et al .,2023**). Il est prouvé qu'une modification de la composition lipidique des membranes plasmiques des spermatozoïdes affecte leur survie (**Amorim et al., 2009**)

Lorsque la membrane est à l'état fluide, les phospholipides et les protéines peuvent se déplacer latéralement à l'extérieur de la membrane, dès que cette dernière se refroidit les phospholipides subissent une transition de l'état liquide à l'état de gel cristallin, les chaînes acyles grasses phospholipidiques se redressent et s'allongent, ce qui donne une membrane plus ordonnée et emballée, où le mouvement des lipides et des protéines sont restreint. En conséquence de l'agrégation des protéines et la transition de phase lipidique, la membrane devient instable et la fonctionnalité est perdue (**Moce et al., 2010**).

Plusieurs auteurs ont observé quelques spermatozoïdes produits par différentes espèces peuvent être divisés en deux groupes, ce qui est lié à leur résistance. Les spermatozoïdes subissent un « choc-froid ». Certaines espèces produisent des spermatozoïdes très sensibles au choc thermique (sangliers, taureaux, béliers ou étalons), d'autres espèces sont moins sensibles (chats et chiens) et d'autres encore sont très résistantes au Choc thermique (lapins, humains, volailles), en général les espèces résistantes aux chocs froids ont des niveaux plus élevés d'acides gras polyinsaturés et un rapport molaire cholestérol/phospholipides plus élevé (**Moce et al., 2010**).

III.3.2 Le polyéthylène glycol (PEG)

Le polyéthylène glycol est un polymère synthétique polyvalent et hautement hydrophile avec différentes longueurs de chaîne et de nombreux groupes terminaux fonctionnels et de masse moléculaire <20 000g/mol. Il a des applications à large spectre dans la recherche biophysique, biochimique et biologique. Il est aussi un ingrédient dans l'industrie alimentaire, les produits cosmétiques ainsi que dans la thérapie médicale. sa formule générale est HO-(CH₂CH₂O)_n-H, où n est le nombre d'unités d'oxyde éthylène (**Figure N°08**).

CHAPITRE III : LA CONSERVATION DU SPERME PAR REFRIGERATION

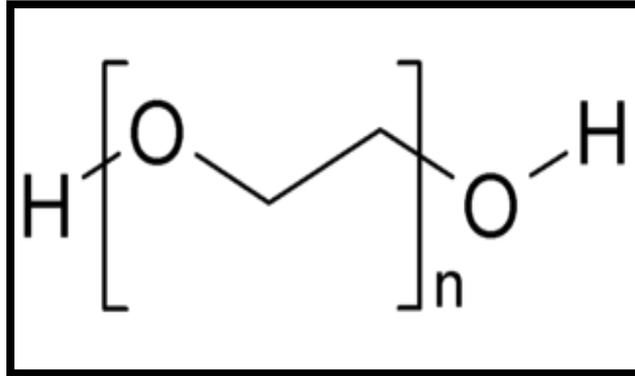


Figure N°08: La Structure chimique du PEG (Sherif, 2024)

III.3.2.1 Les propriétés avantageuses du PEG

- **La solubilité dans l'eau :** Les PEG sont des polymères hydrophiles et leur solubilité dans l'eau les rend idéaux pour les applications biologiques, de plus ils sont hautement solubles dans de nombreux solvants organiques tels que le méthanol, l'éthanol et le dichlorométhane. Le PEG de faible masse moléculaire peut être utilisé comme solvant avec ou sans ajout d'eau. Il a la capacité à dissoudre des molécules organiques mais également des sels inorganiques. Le PEG dans l'eau peut être considéré comme un Co-solvant de l'eau qui fait baisser la polarité de la solution pour permettre une meilleure solubilité des produits organiques. (Balès, 2014).
- **Faible toxicité :** Les PEG sont généralement reconnus comme sûrs et approuvés par la FDA pour être utilisés dans l'industrie alimentaire et médicale et dans les utilisations biologiques. En effet, les PEG d'un poids moléculaire de 1 à 5 kDa peuvent être administrés aux cobayes dans des solutions à 10 % (Gaballa et al., 2023).
- **Le poids moléculaire:** Les PEG sont synthétisés avec différentes longueurs de chaîne et une large gamme de poids moléculaires. Cependant, les molécules PEG qui sont couramment utilisées dans différents domaines médicaux et pharmaceutiques appartiennent à la plage de poids moléculaire allant de 0,4 kDa à 50 kDa. Ceux qui ont un poids moléculaire plus élevé sont généralement utilisés pour conjuguer de petites molécules telles que les oligonucléotides, les protéines et les peptides (Gaballa et al., 2023).

CHAPITRE III : LA CONSERVATION DU SPERME PAR REFRIGERATION

III.3.2.2 Applications du PEG

Le PEG et ses dérivés sont largement utilisés, sans problèmes, dans de nombreux domaines, médical, pharmaceutique et cosmétique, précisément ceux d'un poids moléculaire allant jusqu'à 10 kDa. En effet, les PEG dont le poids moléculaire est compris entre 0,2 et 9,5 kDa sont approuvés par la FDA pour un usage humain (**Gaballa et al., 2023**).

- **Domaine médicale :** En raison de leur solubilité élevée dans l'eau, leur non-toxicité, leur biocompatibilité et leur faible immunogénicité, le PEG et ses dérivés sont largement utilisés dans le domaine médical. Ils sont utilisés dans de nombreuses applications telles que les traitements des plaies. Les PEG de haut poids moléculaire sont utilisés comme conservateurs et agents de restauration pour prévenir l'apoptose dans la transplantation d'organes. En outre, Valuckaite et al. 2013 ont rapporté que le PEG d'un poids moléculaire de 15 à 20 kDa représente un adjuvant potentiel à la solution d'histidine-tryptophane –cétoglutarate (HTK) dans la transplantation d'organes qui pourrait prolonger la durée de survie de l'implant pendant le prélèvement d'organes (**Sherif et al., 2023**).
- **Domaine pharmaceutique :** Dans le domaine pharmaceutique, le PEG est utilisé dans de nombreuses formulations conventionnelles, soit en tant qu'additif, soit en tant que composant actif (**Sherif et al., 2023**).
- **Domaine cosmétique :** Les PEG à faibles masses moléculaires sont principalement employés dans le domaine de la cosmétique en tant que solvant et/ou humectant. Ils sont utilisés dans la formulation de nombreux produits cosmétiques en tant que solvant en raison de leur stabilité mécanique et chimique, ainsi que de leur pouvoir de solubilisation élevé des molécules organiques. De plus, ce polymère est flexible en fonction de la longueur de sa chaîne.

Le PEG est utilisé comme humectant pour retenir l'humidité et éviter le dessèchement du cosmétique lui-même et de la peau. Cette efficacité est due à la présence de deux

CHAPITRE III : LA CONSERVATION DU SPERME PAR REFRIGERATION

atomes d'hydroxyle et d'oxygène en fin de sa chaîne, qui favorisent ce phénomène de rétention par liaison hydrogène avec les molécules d'eau. Par ailleurs, Les groupes fonctionnels terminaux du polymère permettent la fixation de molécules organiques, augmentant ainsi la taille du substrat, les PEG de haut poids moléculaire peuvent être utilisés comme liants, stabilisants d'émulsion ou agents de contrôle de la viscosité (changement de taille moléculaire **(Balès, 2014)**).

VI.1.Objectif du travail

L'objectif de cette étude est d'améliorer la conservation du sperme par réfrigération en évaluant l'effet protecteur du cholestérol (CHL) et du polyéthylène glycol (PEG) sur le sperme réfrigéré, en les ajoutant seuls ou associés (CHL/PEG) au milieu de conservation.

VI.2.Les spécimens de lapin étudiés

Les lapins ayant fait l'objet de cette étude proviennent d'un clapier qui se trouve à Amizour (wilaya de Bejaia). Le choix s'est porté sur 05 individus dont 3 males et 2 femelles disponibles et dont l'âge varie entre 7mois et 9 mois. Ces individus ont été logés dans des cages métalliques et gardées dans l'animalerie de l'université.

Nous avons laissé les animaux s'adapter à leur nouvel environnement avant de procéder à la récolte de leur sperme et le conserver dans les différents milieux que nous avons préalablement préparé, à une température 4C° avec un suivi régulier par l'analyse des échantillons chaque 1 heure.

VI.3.Technique de collecte des échantillons de sperme étudié

Dans notre travail nous avons utilisé la technique de collecte seule disponible. Il s'agit de la collecte par vagin artificiel

VI.3.1 Préparation du vagin artificiel

. Pour la préparation du vagin artificiel, nous avons utilisé un ensemble d'outils représentés dans la (**Figure N° 09**)

- **La Capote**

Pour préparer le vagin artificiel nous avons d'abord coupé les doigts du gant à l'exception du pouce noué. Après avoir retourné le gant sur sa face interne, nous l'avons mis dans la capote à travers la petite extrémité (1). Avant de l'attacher aux deux extrémités, un quart de tour est réalisé avec le gant pour avoir des plis imitant les replis du vagin (2, 3, 4) et éliminant le gel au moment de la récolte du sperme qui se fait dans un tube gradué placé au

niveau de la petite extrémité (5). Juste avant la récolte, nous avons chauffés le vagin artificiel en remplissant l'espace créé entre la capote et le gant avec de l'eau chaude à 40 jusqu'à 42°C (6) (Figure N°10).

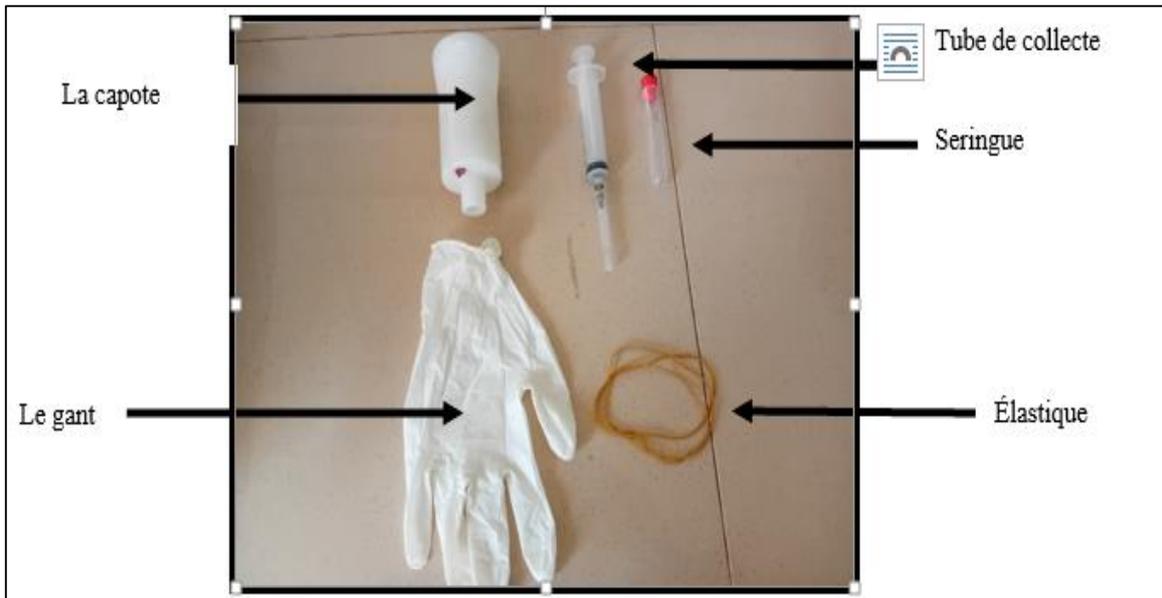


Figure N°09 : Matériel utilisé pour le vagin artificiel (photo personnelle)



Figure N°10 : Étapes de préparation du vagin artificiel (photos personnelles)

VI.3.2. Technique de la récolte

Elle consiste tout d'abord à introduire une lapine dans la cage du mâle puis lorsque ce dernier tente de la saillir, nous avons placé le vagin artificiel tout en plaçant sa grande extrémité orientée vers le pénis. Dès que ce dernier sera en contact avec les replis du gant gonflés et chauds, l'éjaculation aura lieu et le sperme sera récolté (**Figure N°11**).



Figure N° 11: Méthode de récolte (photos personnelles)

Après la récolte nous avons éliminé le gel (**Figure N°12**) et gardé le tube de collecte à température de 37C°.



Figure N°12 : le gel de sperme du lapin (Photo personnelle).

Une fois cette étape est terminée, le volume de l'échantillon récolté a été mesuré à l'aide d'un épandeur gradué. Sa concentration et sa mobilité massale ont été mesurées à l'aide de CASA par la mise de la semence récolté dans la cellule de **Makler**.

VI.4.La dilution

Un total de 06 échantillons de sperme a été récolté et dilué avec le TRIS préalablement préparé en mélangeant les composants suivants (**Figure N°13**) et en agitant le mélange pendant 30 minutes.

- 1.513g de tris buffer.
- 0.85g d'acide citrique
- 0.625g de glucose.
- 0.05g de pénicilline.
- 50ml d'eau distillé.



Figure N°13 : Le composant nécessaire pour la préparation de TRIS (Photo personnelle).

Nous avons préparé les milieux de conservation que nous avons testée comme suit :

- TRIS (figure 13).
- CHL : 20mg chl + 5ml TRIS.
- PEG: 18mg de poudre de PEG+ 5ml TRIS.
- CHL/PEG in-situ: 20mg CHL + 180mg peg broyé et mélangé avec 5ml TRIS.
- CHL/PEG -rv:20mg de poudre CHL/PEG-rv + 5ml TRIS.

Tous les milieux préparés sont agité pendant 2h.

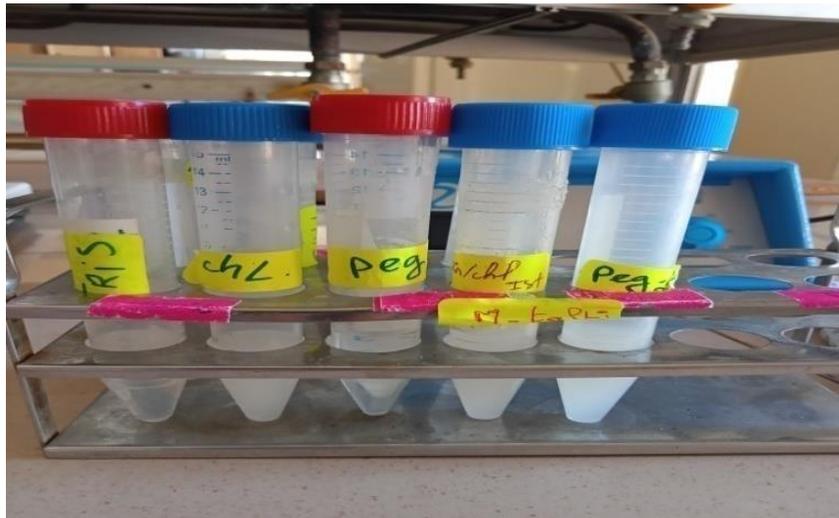


Figure N°14: Les milieux de conservation (Photo personnelle).

- **Protocol de dilution**

Après la récolte nous avons mesuré le volume de l'éjaculat pour ajouter 4 volumes de TRIS, puis partager le volume finale du sperme dilué sur 5 tubes. A chaque tube nous avons ajouté un volume d'un des milieux de conservation à tester (**Figure N°15**).

VI.5.La réfrigération

Immédiatement après la récolte, nous avons :

- Observé la mobilité des SPZ à l'état frais.
- Dilué la semence avec le TRIS, une dilution de 1/5 (un volume du sperme avec 4 volumes du TRIS).
- Préparé une série de 5 tubes à essai dans lesquels nous avons mis un volume du sperme dilué avec un volume de chaque milieu de conservation.
- Analysé la mobilité des SPZ avec l'analyseur du sperme (CASA) à T0 avant la réfrigération.
- Mis les 5 tubes dans un réfrigérateur à 4C°.
- Refais l'analyse chaque une heure jusqu'à 5h de réfrigération.

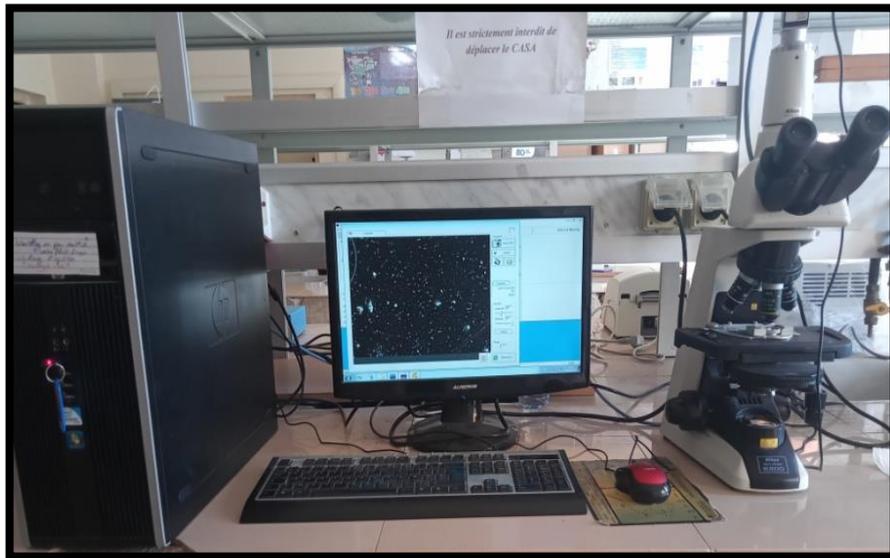


Figure N°15 : L'analyseur CASA (Computer Assisted Semen Analyser)
(Photo personnelle).

IV.1.Caractéristiques du sperme conservé

Après l'examen macroscopique et microscopique du sperme des lapins étudiés, réalisé immédiatement après sa récolte, nous avons mesuré et regroupé les valeurs de son volume, de sa concentration et de sa mobilité massale dans le **Tableau V**.

Tableau V : Caractéristiques du sperme conservé.

Paramètres Récolte	volume (ml)	Concentration (ml/spz)	Motilité massale
Sperme 1	0.15	425.1*10 ⁶	3.5
Sperme 2	0.1	446.1*10 ⁶	3
Sperme 3	0.375	474.3*10 ⁶	4
Sperme 4	0.3	388.8*10 ⁶	4.5
Sperme 5	0.12	376.5*10 ⁶	4.5
Sperme 6	0.3	418.7*10 ⁶	4.5

L'analyse de ce tableau nous a permis de faire les observations suivantes :

- **Le volume** : Ce paramètre varie entre 0.1ml et 0.375ml. d'après les chercheurs le volume du sperme du lapin est généralement faible allant de 0,2 à 1,5 ml, avec une moyenne de 0,5 ml (**Najjar et al., 2013**)
- **La concentration** : elle varie entre 376.5x10⁶ ml/spz et 474.3x10⁶ ml/spz, est acceptable puisque selon **Meyer (2008)** la concentration normale de spermatozoïdes chez le lapin est comprise entre 150 et 500 × 10⁶ spermatozoïdes/ml, mais inférieures à celle trouvée par **Boulbina (2011)** et qui est de 734,9 x 10⁶ spz/ml. Elle peut varier en fonction du mâle et de la fréquence de l'éjaculation.
- **La mobilité massale** : une motilité massale est notée dans les échantillons de spermes analysés. Celle-ci est comprise entre 6 et 8 selon l'échelle de Petitjean(1965) et elle est supérieure à celle obtenue par (**Theau-Clément et al., 2011**).

Après l'analyse des échantillons préparés et réfrigérés à différents temps, T0 (après la récolte) , T2 (après 2heurs de réfrigération) , T5 (après 5 heures de réfrigération) , certains paramètres de mobilité sont enregistré sur le CASA (VSL , mobilité totale et mobilité progressive) et les résultats obtenus sont présentés sous forme de diagramme en bâtonnets à l'aide d'un logiciel de traitements des données « statview 5.0. Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA ».

V.2 Interprétation des résultats de la VSL

A T0

Comme le montre la Figure N°16, A T0, la VSL de tous les milieux examinés est supérieure ou égale à 14 μm à l'exception du complexe CHL/PEG in-situ (11 $\mu\text{m}/\text{sec}$), le CHL représente la valeur de VSL la plus élevée (17 $\mu\text{m}/\text{sec}$) suivi du TRIS avec une valeur de 16.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$

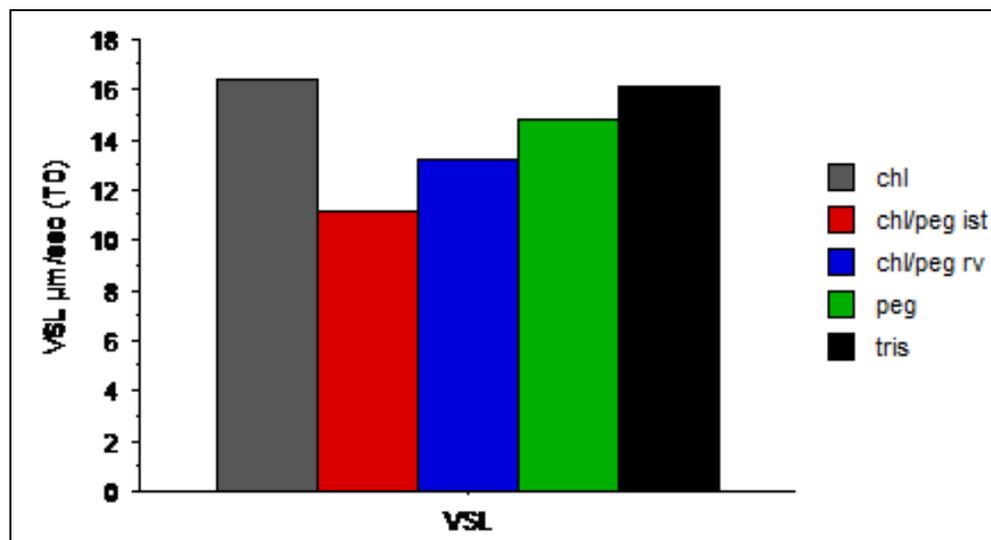


Figure N°16 : Diagramme représentant la VSL des SPZ à T0 dans les différents traitements.

Après la récolte (T0) le CHL représente le meilleur traitement à cause de ses multiples effets sur la membrane des cellules. En 1998 Crockett a démontré que le cholestérol stabilise la membrane en réduisant sa perméabilité membranaire (Mocé et al., 2010). A ce moment le cholestérol a déjà effectué son rôle protecteur de la membrane des spermatozoïdes.

A T2

Selon la **Figure 17**, après 2h de conservation à 4C°, la VSL de tous les traitements est légèrement diminuer par rapport à T0, une meilleur VSL est observée dans le complexe CHL/PEG -rv (8.5µm/sec), ensuite le TRIS (7.5µm/sec), et le PEG (6.8µm/sec), puis le CHL (5µm/sec)et le complexe CHL/PEG-in-situ (5.5µm/sec)

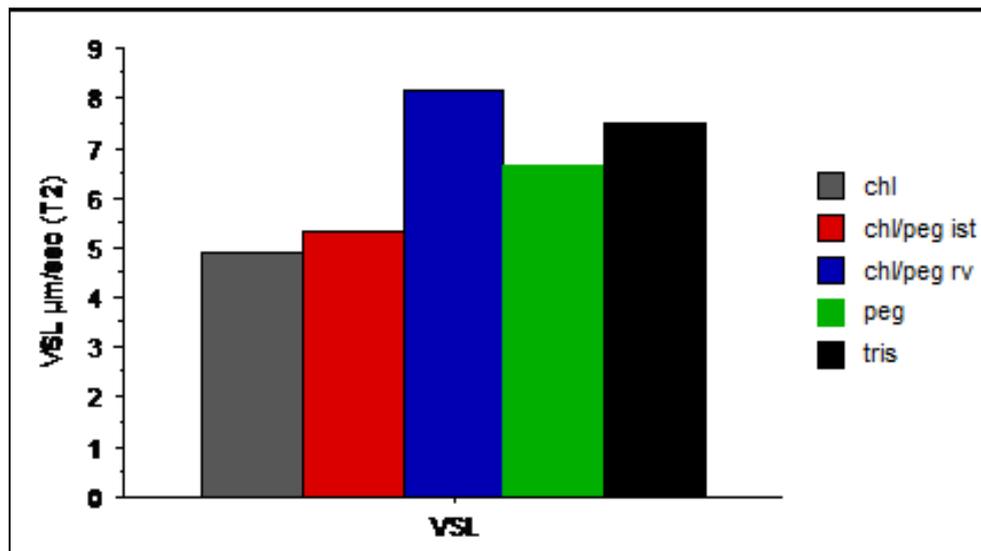


Figure N°17 : Diagramme représentant la VSL des SPZ à T2 dans les différents traitements.

En Plus de la spécificité du cholestérol dans la stabilisation de la membrane, son association avec le PEG lui donne une meilleure solubilité et disponibilité, car le PEG a une capacité de solubiliser les molécules organiques/ inorganiques (**balès.2014**) , En effet le PEG est utilisée pour améliorer la solubilité par dispersion solides de différents médicaments peu solubles dans l'eau (**Amokrane et al., 2020**).

En ce temps, la VSL des spermatozoïdes conservés dans le complexe CHL/PEG -rv est meilleure que celle dans le complexe CHL/PEG in-situ. Cela est probablement dû à la meilleure solubilité offerte par le PEG associé au CHL par la méthode du rota-vapeur que celle du PEG ajouté in-situ.

A T5

D'après la figure ci-dessus, on constate qu'après 5h de réfrigération, la VSL de tous les traitements est proches à celle notée à T2 avec une légère diminution, à l'exception du PEG qui a montré une augmentation de VSL de 6.8µm/sec à 10.2µm/sec.

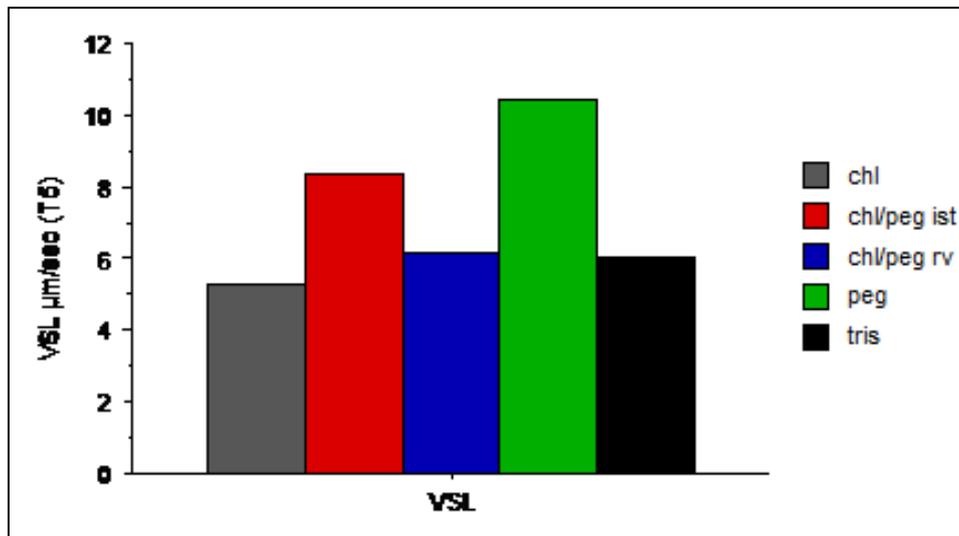


Figure N°18 : Diagramme représentant la VSL des SPZ à T5 dans les différents traitements.

Grâce à ses interactions favorables avec la coenzyme NADP⁺, le PEG accroît l'activité enzymatique. Étant donné que le NADP⁺ participe à divers processus biologiques impliqués dans la synthèse de l'ATP, le PEG favorise une plus grande disponibilité de ce dernier pour les spermatozoïdes (Pancera et al., 2002). Nous supposons aussi que le peg a solubilisé les substances organiques antioxydantes du milieu tel que la vitamine E ce qui a mieux conservé les spermatozoïdes.

V.3 Interprétation des résultats de pourcentage des SPZ mobiles

A T0

La Figure 19 montre le pourcentage des SPZ mobiles à T0. Les meilleurs pourcentages sont observés dans les milieux à base de TRIS et de CHL (83% et 79% successivement) et pour les autres traitements leur mobilité totale varie entre 63% et 67%, cela signifie qu'après la récolte, tous ces milieux ont conservé la mobilité et la viabilité des SPZ.

Le TRIS est connu pour être un bon dilueur qui garantit une bonne conservation du sperme (Dolmos et al .2015). A T0, le TRIS a donné un effet immédiat, probablement grâce au D-glucose qui le compose et qui a été une source d'énergie pour les spermatozoïdes.

Le cholestérol, quant à lui, joue un rôle dans la protection et l'amélioration de la mobilité et de la viabilité des SPZ (Lusignan, 2011).

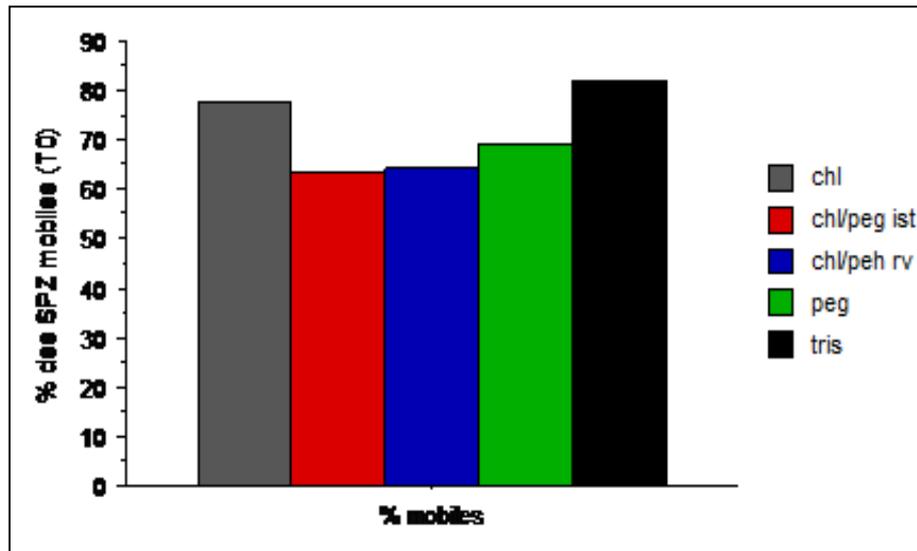


Figure N°19 : Diagramme représentant la mobilité totale des SPZ à T0 dans les différents traitements.

A T2

L'aspect de la mobilité totale des SPZ à T2 dans les différents traitements est illustré sur la figure N° 20. D'après cette figure, on constate qu'après 2h de refroidissement, le pourcentage des SPZ mobiles a diminué au niveau de tous les traitements mais il a resté toujours important. Le traitement à base de PEG nous a donné les meilleurs résultats par rapport aux autres (64%). Grâce à ses interactions favorables avec la coenzyme NADP+, le PEG accroît l'activité enzymatique. Étant donné que le NADP+ participe à divers processus biologiques impliqués dans la synthèse de l'ATP, le PEG favorise une plus grande disponibilité de ce dernier pour les spermatozoïdes. (Pancera et al., 2002), Une chute de pourcentage de mobilité des SPZ est observé dans le milieu a base de cholestérol (de 79% à 37%). Cela est probablement dû à l'épuisement du cholestérol dans ce milieu et donc à la diminution de son effet protecteur.

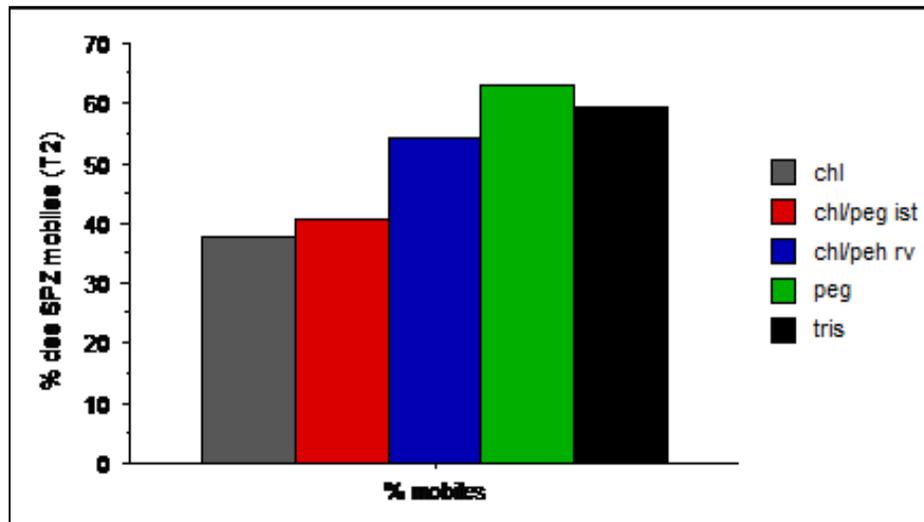


Figure N°20 : Diagramme représentant la mobilité totale des SPZ à T2 dans les différents traitements.

A T5

Comme le montre la figure ci-dessus, après 5h de réfrigération, le milieu à base de PEG garde toujours le meilleur pourcentage avec une augmentation importante (90%), et une légère augmentation pour le milieu de complexe CHL/PEG in-situ (55%) ; malgré la diminution de la mobilité dans les autres milieux (TRIS, CHL, CHL/PEG-rv), ces derniers ont gardé un pourcentage de mobilité supérieur à 40% .

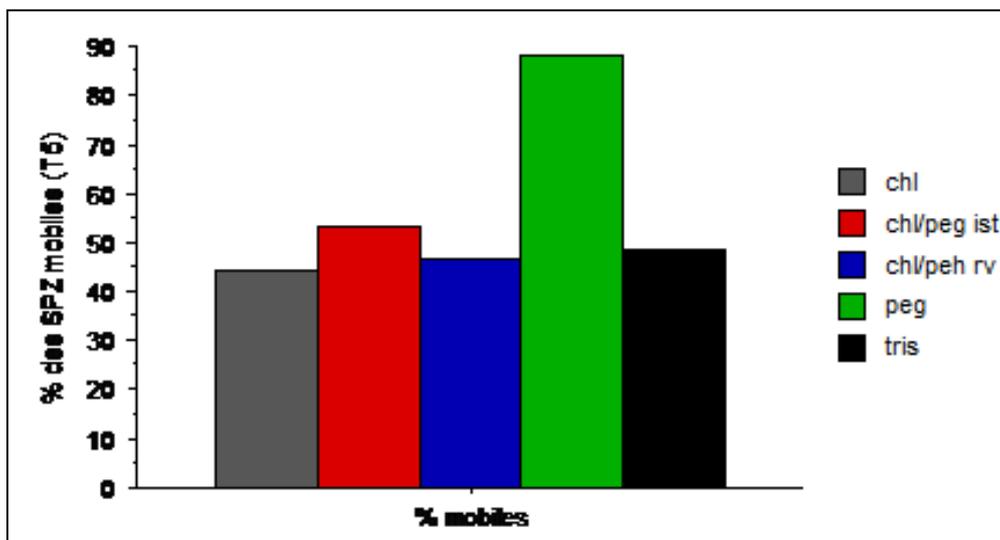


Figure N°21 : Diagramme représentant la mobilité totale des SPZ à T5 dans les différents traitements

V.4 Interprétation des résultats de pourcentage des SPZ progressives

Les résultats des pourcentages des SPZ progressives dans des traitements différents à différents temps sont présentés dans les diagrammes ci-dessous (**Figures N° 22, N°23 et N°24**)

A T0

A T0 les milieux à base de cholestérol et de TRIS représentent les pourcentages le plus élevées des SPZ progressives avec un pourcentage de 55% ensuite le PEG (39%) et le complexe CHL/PEG-rv (34%) puis le complexe CHL/PEG in-situ (30%). On peut expliquer ces résultats par le rôle connu du TRIS et du cholestérol dans la conservation du sperme où le cholestérol qui est un important composant de la membrane cellulaire responsable de son renforcement (**Mocé et al., 2010**). Et le TRIS qui garde la survie des SPZ et répondant à certains de leurs besoins (**Dolmos et al., 2015**) (**Figure N°22**).

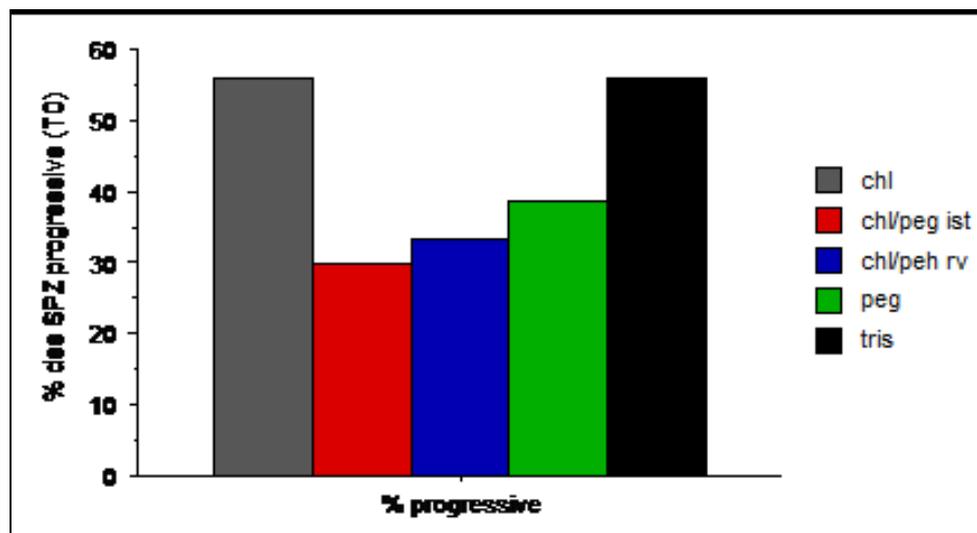


Figure N°22 : Diagramme représentant la mobilité progressive des SPZ à T0 dans les différents traitements.

A T2

Après deux heures de conservation à 4C°, les meilleurs pourcentages de la mobilité progressive sont enregistrés dans les traitements à base de TRIS, du complexe CHL/PEG-rv et de PEG successivement. Une chute remarquable est enregistrée dans le milieu à base de cholestérol et de complexe CHL/PEG in-situ (**Figure N°23**).

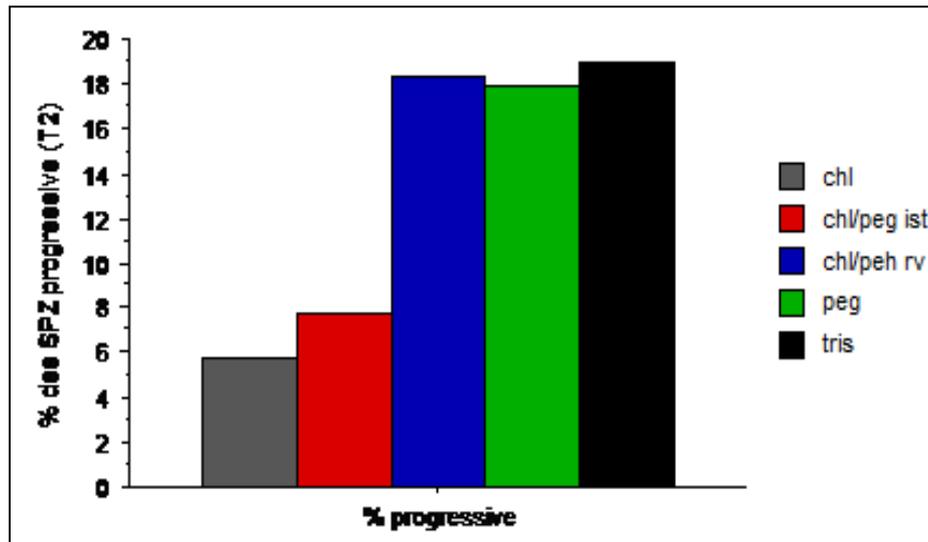


Figure N°23 : Diagramme représentant la mobilité progressive des SPZ à T2 dans les différents traitements

Les effets bénéfiques du cholestérol et du PEG sur la conservation des spermatozoïdes, permet d'avoir ces pourcentages élevés, d'un coté le cholestérol qui est connu pour son rôle structurel dans l'architecture cellulaire qui permet le renforcement de la membrane plasmique (Mocé et al., 2010), et d'autre coté le PEG qui est utilisée pour améliorer la solubilité par dispersion solides de différents médicaments peu solubles dans l'eau (Amokrane et al., 2020). Donc malgré la non solubilité du cholestérol, son association avec le PEG (complexe CHL/PEG-rv) a protégé les SPZ.

A T5

A T5, nous avons observé une diminution du nombre des SPZ progressifs dans tous les milieux à l'exception de PEG. Cette diminution est plus remarquable dans le milieu à base de cholestérol dans le quel on suppose que l'épuisement du cholestérol consommé par les spermatozoïdes durant les 5 heures de leur réfrigération est responsable de la perte de leur protection Par contre dans le milieu peg, cette protection est conservée grâce à l'action directe du peg ainsi que celle des antioxydants solubilisés par le peg tel que la vitamine E. en effet, selon Togo et al (1999) , le PEG joue un rôle important dans la protection des membranes cellulaires contre les agressions physiques et chimiques

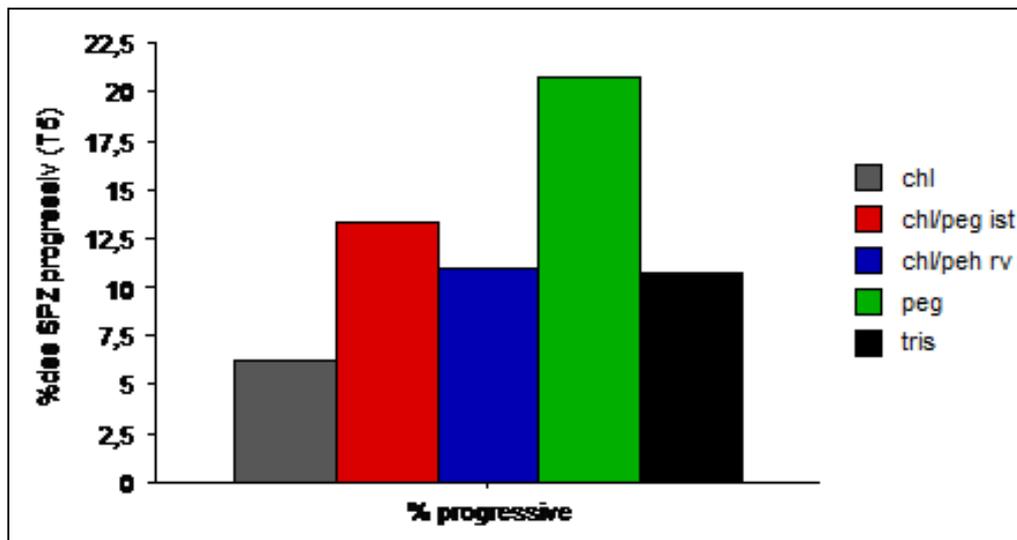


Figure N°24 : Diagramme représentant la mobilité progressive des SPZ à T5 dans les différents traitements

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Notre travail a pour objectif la contribution à l'étude de la conservation du sperme du lapin à 4°C et ceci par l'évaluation de l'impact du cholestérol (CHL) seul ou associé au polyéthylène glycol (PEG) sur la conservation de ses spermatozoïdes réfrigérés.

Les résultats obtenus montrent l'efficacité du PEG dans la conservation de la mobilité des spermatozoïdes du lapin à 4°C. En effet à T5 de réfrigération, le traitement PEG a montré les meilleurs valeurs de VSL, de mobilité totale et de mobilité progressive. Cela est probablement dû à son pouvoir de réparation de la membrane plasmique.

Par ailleurs, nous avons constaté l'effet du PEG dans la solubilité du cholestérol, puisque nous avons observé que la mobilité des spermatozoïdes est meilleure dans les traitements PEG/Chlrv et PEG/Chlinst par rapport à celui du cholestérol seul. L'association du cholestérol et du PEG améliore, donc, la viabilité et la mobilité des SPZ du lapin durant la conservation à 4°C.

D'autre part, nous avons remarqué qu'après 5 heures de réfrigération, les paramètres de mobilité sont meilleurs dans l'association PEG/Chl préparée in-situ que dans l'association PEG/Chl préparée au rotavapeur. Dans ce dernier, les spermatozoïdes étaient plus rapides à T2 et le pourcentage des mobile plus important, ce qui a probablement conduit à l'épuisement de ces molécules.

Ces résultats recommandent l'utilisation de ces milieux pour conserver les SPZ par réfrigération à 4°C pendant une durée qui peut y arriver jusqu'à 5 heures. Mais aussi ouvrent des perspectives intéressantes, en effet, d'autres concentrations de PEG et de chl dans l'association, devraient être testées pour déterminer la concentration optimale permettant une meilleure conservation des spermatozoïdes réfrigérés.

Des essais in vivo d'insémination artificielle sont indispensables pour vérifier si les spermatozoïdes conservés dans les traitements qui ont prouvé leur efficacité dans notre étude (PEG et PEG/Chl) engendrent une bonne fertilité et prolificité, ce qui amènerait à les introduire dans la routine de l'insémination artificielle.

A

1. **Ardiaca ,M. Bonvehi ,C. Cuesta ,M . Gomez A &Montesinos, A (2016)**. Seminal vesiculitis in three pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J Am Anim Hosp Assoc.*;52(5): 335-340.
2. **Amokrane, A., Kaidi, R., & Iguer-Ouada, M. (2020)**.The effect of vitamin E and poly ethylene glycol (PEG) association on chilled rabbit sperm: Impact on sperm motility and oxidative stress status. *CryoLetters*, 41(1), 19-25.
3. **Alvariño, J. M. R. (2000)**. Reproductive performance of male rabbits. In *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress (Vol. 8, No. 1, pp. 13-35)*.
4. **Andrieu ,R (1974)** .Conservation du sperme de lapin sous forme liquide. E.N.S.A., Montpellier, pp. 10.
5. **Akpo, Y., Dotché, I. O., Tobada, P., Djago, Y., Youssao Abdou Karim, I., & Kpodékon, M. T. (2018)**. Insémination artificielle des lapins de race commune au Bénin: dilueurs à base de produits locaux. *Livestock Research for Rural Development*, 30, 142.
6. **Amorim, E. A. M., Graham, J. K., Spizziri, B., Meyers, M., & Torres, C. A. A. (2009)**. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 58(2), 210-214.

B

7. **BARIL .G, .P. CHEMINEAU, Y. CONGNIE, Y. GUERIN, B. LEBOEUE, P. ORGEUR&J.C. VALET, (1993)**. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins . *Etude FAO Production et Santé Animale*, 83 : 231 p.
8. **Balès , N (2014)** . LES PEGS . Thèse de doctorat . université de Qubec à Chikoutimi . Canada.
9. **Boulbina, I., AinBaziz, H., Ilès, I., Belabbas, R., Benali, N., Zenia, S., & Temim, S. (2012)**. Effet de la saison de naissance sur l'âge d'entrée en puberté et les caractéristiques de la semence chez le lapin mâle de population locale algérienne (*OryctolagusCuniculus*). *Livestock Research for Rural Development*, 24, 1.
10. **Bonanno, A., & Costanzo, D. (1987)**. The effect of physiological and climatic factors on the main reproductive traits of artificially inseminated rabbits.

- 11. Bayomy, M. F., Hassab El-Nabi, S. E., Attia, Z. I., Saeed, A. M., El-Kassas, S., Eliraqy, E. Z., & El Kassas, T. A. (2023).** Sperm lipid profile status of New Zealand rabbits during chilled storage for up to 72 hours concerning the addition of glutathione and taurine: An in vitro study. *Journal of Medical and Life Science*, 282-295.

C

- 12. Claire-LD ,(2022) .** Premiers résultats de l'insémination artificielle par voie vaginale avec l'AlphaVision chez la vache laitière.thèse docteur vétérinaire , Oniris - Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Agroalimentaire et de l'Alimentation.
- 13. Costuas, K., Garreau, A., Bulou, A., Fontaine, B., Cuny, J., Gautier, R., ... & Cordier, S. (2015).** Combined theoretical and time-resolved photoluminescence investigations of [Mo 6 Br i 8 Br a 6] 2- metal cluster units: *evidence of dual emission. Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(43), 28574-28585.
- 14. Chikaodiri ,H. Onuoha.(2020).** Reproductive Physiology of Male Rabbits:A Key Factor in Buck Selection forBreeding (Paper Review). *Advances in Reproductive Sciences*, 8, 97-112.
- 15. Corteel,J (1975).** Effet du« LAVAGE » sur la conservation des spermatozoïdes *.Ann.biol.anim.bioch.biophys,15(3),525-528.*
- 16. Chamoin ,C (2022).** Evaluation de l'impact des dilueurs sur la concentration en ProAKAP4, biomarqueur de qualité spermatique, dans le sperme réfrigéré de bovin (Doctoral dissertation).

D

- 17. Dolmos,C.Hanzen,C,AmpueroCasquino,H, Ordonnez Rodriguez, C., &Sumar Kalinowski, J (2015).** Prélèvement, analyse et conservation du sperme du mâle des petits camélidés sud-américains
- 18. Decuadro-Hansen, G. (2004).** La réfrigération et la congélation du sperme: expérience chez l'animal. *Gynécologie obstétrique & fertilité*, 32(10), 887-893.
- 19. Du Mesnil Du Buisson,F(1957).**CONSERVATION DU SPERME DE VERRAT SANS DILUTION : CON- DITIONS D'EXAMEN. *Annales de zootechnie*, 6 (4), pp.391-399.

- 20. Desport, J. C., & Couratier, P. (2002).** Stress oxydant et maladies neurodégénératives Oxydative stress in neurodegenerativediseases. *Nutr. Clin. Métabolisme*, 16, 253-259.
- 21. DUBIEL, A., KROLINSKI, J. and KARPIAK, C(1985).** Semen quality in different breeds of rabbits in different seasons. *Med. Weterynaryja*, 41 (11): 680-684.
- 22. Delmas,P Padilla,F&C.Poilbout(2019).** Le cholestérol cellulaire, un régulateur important de la douleur inflammatoire .*Med Sci (Paris) 2019 ; 35 : 115–118.*
- 23. Douglas-Hamilton, D. H., Smith, N. G., Kuster, C. E., Vermeiden, J. P., & Althouse, G. C. (2005).** Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *Journal of andrology*, 26(1), 115-122.

G

- 24. Gaballa, ,S.Shimizu,A . Ando,T. Takata,H . Emam,H . Ramadan, E& Ishida, T. (2023).** Treatment-induced and pre-existing anti-PEG antibodies: prevalence.*clinical implications, and future perspectives. Journal of Pharmaceutical Sciences.*
- 25. Gidden ,T(2015).** le lapin de la biologie à l'élevage.ÉditionsQuae . *1ère édition. PP288.*
- 26. Garreau, H., Theau-Clement, M., & Gidenne, T. (2015).** Anatomie, taxonomie, origine, évolution et domestication. *Le lapin: de la biologie à l'élevage (Gidenne T., et al.), Quae*, 13-32.

H

- 27. Hulot, F., Mariana, J. C., & Lebas, F. (1982).** L'établissement de la puberté chez la lapine (folliculogénèse et ovulation). Effet du rationnement alimentaire. *Reproduction Nutrition Développement*, 22(3), 439-453.

K

- 28. Kirouani, M. (2020).***amélioration de la conservation du sperme aviaire à la température de 4C°.* (Thèse de doctorat). institut des Sciences Vétérinaires- Blida. Université Saad Dahleb ,Algérie

29. **Keddari ,D.Korichi,O (2017)**. Les performances de la reproduction des lapins de la population locale. institut des Sciences Vétérinaires- Blida. Algérie

L

30. **Lankri, L. Boudour,K. Aichouni ,A& Rechachou ,F (2019)**. Effet de la fréquence de récolte de sperme sur sa qualité chez des lapins de souche *ITELV 2006*.
31. **Labbé, C Mello, F., Garcia, J. S., Godoy, L. C., Depincé, A.,, & Streit Jr, D. P. (2017)**. The effect of cryoprotectant agents on DNA methylation patterns and progeny development in the spermatozoa of *Colossoma macropomum*. *General and Comparative Endocrinology*, 245, 94-101
32. **Lusignan,MF (2011)**.Étude du mécanisme de protection des spermatozoïdes de mammifères par le lait. (Thèse de doctorat). Université de Montréal .Canada.

M

33. **Meyer,C(2009)**. L'insémination artificielle de la lapine. *Montpellier Document technique et de recherche CIRAD*, 13 p.
34. **Martial Grand,V(1975)**. Electro- éjaculation des ruminants - Énoncé de position dictionnaire terminologique. Association canadienne des médecins vétérinaires.
35. **Mieusster (1997)**.Morphologie des spermatozoides.Andrologie, 7, n~4, 419-426
36. **Mocé, E. Blanch, E. Tomás, C., & Graham, J. K. (2010)**. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 57-66.

N

37. **Najjar , A. Ben Mrad , M (2013)** . acteurs de variations de la qualité du spermogramme du lapin reproducteur.
38. **Nair, Faruque, S. M., Biswas, K., Udden, S. N., Ahmad, Q. S., Sack, D. A., G. B., & Mekalanos, J. J. (2006)**. Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16), 6350-6355.

O

39. **Ouennes ,H . Afri-Bouzebda ,F. Bouzebda ,Z. ChoualKh&Djaout ,A (2015).**
Récolte, conservation et caractéristiques du sperme épидидymaire chez le bélier.
7ème Séminaire International de Médecine Vétérinaire ISVK - 11 & 12.

P

40. **Post,L(2019).**Validation de méthode du CASA (Computer-AidedSpermAnalysis)
Hamilton Thorne CEROS II pour son application en routine dans un laboratoire de
spermiologie. *Médecine humaine et pathologie. dumas-02328744*
41. **Pancera, S. M., da Silva, L. H., Loh, W., Itri, R., Pessoa Jr, A., & Petri, D. F. (2002).**The effect of poly (ethylene glycol) on the activity and structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase in solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 26(4), 291-300.*
42. **Pilar , M . de Castro , V . Salvador,J .Lavara,V (1999).**Effet du nombre de spermatozoïdes sur la fertilité de la semence conservée 24 heures chez le lapin . *Ann Zootech 48 407-412.*

T

43. **Theau-Clément,M (2008).**facteurs de réussite de l'insimination chez la lapine et méthodes d'induction de l'oestrus .*INRA prod Anim,21(3) , 2221-230*
44. **Tourmente,C(2023).**Le sperme:son odeur, sa couleur, sa composition.<https://www.allodocteurs.fr/sexo-homme-sperme-le-sperme-son-odeur-sa-couleur-sa-composition-12543.html>.
45. **Tainture ,D. Benchafi,D .Briand ,L . Topie , E &Kamga –Waladjo ,AR (2013).**production et conservation de la semence animal. Article de synthèse. *Revue africain de santé et de production animale E.I.S.M.V de Dakar*
46. **Togo, T., Alderton, J. M., Bi, G. Q., & Steinhardt, R. A. (1999).** The mechanism of facilitated cell membrane resealing. *Journal of cell science, 112(5), 719-731.*

W

47. **Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009).** Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics, 25(9), 1189-1191.*

Y

48. **Yoshida, M. (2000).** Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproduction Science*, *Volumes 60–61*, Pages 349-355
49. **Yang, Y., & Guo, Y. (2018).** Unraveling salt stress signaling in plants. *Journal of integrative plant biology*, *60*(9), 796-804.

Résumé

L'objectif de cette étude est d'identifier le ou les milieux dans lequel les spermatozoïdes pourraient garder leur viabilité et leur mobilité jusqu'à 5h de conservation à 4C°.

Nous avons testé l'effet du cholestérol et du polyéthylène glycol (PEG) ainsi que leur association sur la conservation de sperme du lapin, et nous les avons comparés ensuite au sperme dilué avec le TRIS.

Les résultats de notre étude ont montré que le PEG est le traitement qui a conservé au mieux la viabilité et la mobilité des spermatozoïdes pendant les 5h suivant leur réfrigération à 4C°, par ailleurs il est important de noter qu'à T2 c'est le complexe CHL/PEG qui a donné les meilleurs paramètres de mobilité et de viabilité .

En conclusion le PEG est le meilleur traitement pour la conservation du sperme du lapin à 4C° , son association avec le cholestérol dont certes des résultats acceptables sur les deux premières heures , mais le PEG comme traitement unique donne un meilleur résultats au – delà de deux heures de réfrigération.

Abstract

The aim of this study is to identify the environments in which the spermatozoa could keep their viability and mobility until 5 hours of conservation at 4C°.

We have tested the effect of the cholesterol and polyethylene-glycol and also the effect of their combination upon the conservation of the rabbit's sperm and then we have compared them to the diluted sperm with the TRIS.

The results of our study showed that the PEG (Polyethylene glycol) is the treatment which has reached a better conservation of both the viability and mobility of the spermatozoa during 5 hours after their refrigeration at 4C°; Besides, it should be observed that at 2 hours, it is the "complex" which has given the best mobility and viability parameters.

In conclusion, the PEG is by far the best treatment for the preservation of the rabbit's sperm at 4°C. Its combination (association) with the cholesterol certainly gives acceptable results during the first two hours but, however, the PEG as a unique and single treatment gives a better result beyond a 2 hours refrigeration.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد الأوساط الحية للحيوانات المنوية بحيث تتمكن من الحفاظ على حيويتها وحركتها حتى 5 ساعات من التبريد لقد اختبرنا تأثير الكوليسترول (Chl) والبولي إيثيلين جلايكول (PEG) و المركب CHL/PEG في الحفاظ على الحيوانات المنوية ثم نقوم بمقارنة الحيوانات المنوية التي قمنا بتمديدتها باستخدام TRIS تشير نتائج الدراسة إلى أن

PEG هو الوسط التي تحافظ على أفضل حيوية وحركة الحيوانات المنوية لمدة 5 ساعات بعد التبريد 4 درجة، لذلك، من المهم ملاحظة أن بعد ساعتين من التبريد مجمع CHL PEG هو الذي يوفر أفضل الحركة للحيوانات المنوية

في الختام، فإن PFG هو أفضل وسط للحفاظ على الحيوانات المنوية عند الأرناب، من جهة أخرى إرتباطها الكوليسترول يمنح نتائج المقبولة في أول ساعتين، ولكن PEG من دون أي إرتباط يمنح نتيجة أفضل حتى أكثر من ساعتين من التبريد.

Mots clés : réfrigération , sperme, cholestérol ,conservation , récolte .