

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abderrahmane Mira - BEJAIA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences biologiques de l'Environnement

Spécialité : Biologie Animale



Réf : .....

## Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master

### Thème

*Synthèse bibliographique sur L'intérêt du  
cholestérol dans la conservation du sperme  
du lapin*

*Réalisé par :*

*M<sup>elle</sup> : BOUTIH Amira*

*M<sup>elle</sup> : BOUTIH Rima*

*Membres de jury :*

Président : *M<sup>r</sup> IGUER-OUADA M.*

Promotrice : *M<sup>me</sup> TALBI A.*

Examinatrice : *M<sup>me</sup> SADEDDINE O.*

Année Universitaire : 2019-2020.

# *Remerciements*

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

*Nous remercions également notre Promotrice **M<sup>me</sup> TALBI** pour son encadrement, pour toutes les choses qu'elle nous a appris, ses efforts, son aide, ses précieux conseils, ses exigences de faire un vrai travail de recherche scientifique*

*Nous tenons aussi à exprimer nos sincères remerciements aux membres de jury: **Mr IGUER-OUADA** et **M<sup>me</sup> SAAD- EDDINE** d'avoir accepté de juger ce modeste travail.*

*En dernier lieu, nous remercions chaleureusement toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

**MERCI**

*Amira et Rima*



# *Dédicaces*

J'exprime mon profond respect et ma sincère gratitude aux êtres qui me sont les plus chers, je leur offre ce modeste travail

**A** mes parents **ATHMANE** et **HASSINA** qui ont été toujours à mes côtés avec leur soutien, encouragement, protection, amour, sacrifices.

(Que dieu les protèges et les gardes pour nous)

**A** mes deux chers frères **MASAOUD KARIM** et **ABDNOUR**, que je les souhaite la réussite dans leurs études et leur vie.

**A** ma tante **HASSINA** et ses enfants, **IDIR**, **FATIMA** et **OUAHAB**, qui a toujours été comme notre 2<sup>ème</sup> mère, avec son amour et son encouragement et son offre. (Que dieu les protèges).

**A** toute ma famille.

**A** mon binôme, cousine et chère sœur **RIMA** pendant tous les moments que nous avons partagé ensemble à l'université, et à sa famille.

**A** ma cousine, amie, sœur **SAMIRA** et sa famille.

**A** mon amie, copine, sœur **OUARDIA** et sa famille.

**A** toute ma 2<sup>ème</sup> famille mes chères amies, copines et sœurs :

**SALOUA, ASSMA, HANNANE, WISSAM, ZAHIRA, FATIMA, SYLIA, ALIMA, SABRINA, DJOHRA, KENZA, SAMIA, NESSRINE, LINDA, SOUMIA.**

**Et à toute la promotion de 2<sup>ème</sup> année master B.A. surtout HASSINA et TIMHINANE**

2019/2020.

*Amira*

# *Dédicaces*

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

*M*es chers parents **DJILALI** et **MALIKA**, symbole de courage, patience et de tendresse.  
*M*aman, je te remercie d'avoir cru en moi, et pour m'avoir encouragée pendant toute la période de mes études.

*M*on père, qui est resté éveillé et épuisé pour ma réussite tout au long de ma carrière scolaire.

*M*es chères frères **ALI**, **DJIHAD** et **FAWZI** qui ont toujours été la pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle et exemple de résistance et de réussite.

*M*a grande sœur **FIROUZE** et son mari **MOKRANE** et toute sa famille.

*M*a chère petite sœur **KARIMA**, je lui souhaite la réussite dans ces études.

*M*a chère sœur **FATIMA** qui nous a quitté et que je n'oublierai jamais (que dieu l'accueille dans son vaste paradis).

*M*on binôme, cousine et chère sœur **AMIRA** à tous les moments que nous avons partagés à l'université, et sa famille surtout ma tante **HASSINA** (sa mère)

*M*on fiancé **TAHER** et sa famille

*T*oute ma 2ème famille mes chères amies, copines et sœurs :

**SALOUA, ASSMA, HANNANE, WISSAM, ZAHIRA, FATIMA, SYLIA, ALIMA, SABRINA,  
DJOHRA, KENZA, SAMIA, NESSRINE, LINDA, SOUMIA**

*E*t toute la promotion de 2ème année master **B.A 2019/2020**.

*Rima*

*Liste Des abréviations :*

<b>ABRÉVIATION</b>	<b>SIGNIFICATION</b>
<b>ADN</b>	<b>Acide désoxyribonucléique</b>
<b>AG</b>	<b>Acide Gras</b>
<b>APC</b>	<b>Agents cryoprotecteurs</b>
<b>AGPI</b>	<b>Acides Gras Polinsaturés</b>
<b>°C</b>	<b>Degré Celsius</b>
<b>CASA</b>	<b>Computer Assisted Sperm Analysis</b>
<b>CLC</b>	<b>Cholesterol-loaded cyclodextrin</b>
<b>DMSO</b>	<b>Diméthyl-sulfoxyde.</b>
<b>ex</b>	<b>Exemple</b>
<b>g</b>	<b>gramme</b>
<b>GPI</b>	<b>glycosylphosphatidylinositol</b>
<b>HDL</b>	<b>high-Density Lipoproteins</b>
<b>IA</b>	<b>Insémination artificielle</b>
<b>kg</b>	<b>kilogramme</b>
<b>M</b>	<b>Mole</b>
<b>m</b>	<b>Mètre</b>
<b>MDA</b>	<b>DNA fragmentation and malondialdehyde</b>
<b>mg</b>	<b>milligramme</b>
<b>ml</b>	<b>millilitre</b>
<b>mn</b>	<b>Minute</b>
<b>NaCl</b>	<b>Chlorure de Sodium</b>
<b>PC</b>	<b>phosphocholine</b>
<b>PEG</b>	<b>Polyéthylène glycol</b>
<b>pH</b>	<b>potentiel hydrogène</b>
<b>pK</b>	<b>Point Kilométrique</b>
<b>ROS</b>	<b>Reactif Oxygen Species</b>
<b>spz</b>	<b>Spermatozoïde</b>
<b>THAM</b>	<b>Tris Hydroxyméthyl Aminométhane</b>
<b>Tris</b>	<b>Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane.</b>
<b>Zn</b>	<b>zinc</b>
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	<b>Sulfate de zinc</b>
<b>μ</b>	<b>micro</b>

*Liste des figures:*

<b>N°</b>	<b>TITRE</b>	<b>PAGE</b>
<b>1-a-</b>	<b>vue d'un spermatozoïde complet de lapin.</b>	<b>02</b>
<b>1-b-</b>	<b>tête du spermatozoïde de lapin.</b>	<b>02</b>
<b>02</b>	<b>Organisation du testicule et de l'épididyme.</b>	<b>04</b>
<b>03</b>	<b>Vagin artificiel.</b>	<b>06</b>
<b>04</b>	<b>Représentation schématique d'une membrane plasmique (Modèle mosaïque fluide de la structure des membranes)</b>	<b>19</b>
<b>05</b>	<b>Une représentation schématique d'une membrane.</b>	<b>21</b>
<b>06</b>	<b>Structure de cholestérol.</b>	<b>23</b>
<b>07</b>	<b>(A) Cholestérol. (B)La position du cholestérol dans une bicouche phospholipidique.</b>	<b>23</b>
<b>08</b>	<b>Une représentation stylisée de l'arrangement des phospholipides.</b>	<b>25</b>
<b>09</b>	<b>Structure d'un phospholipide.</b>	<b>25</b>
<b>10</b>	<b>Une membrane biologique.</b>	<b>26</b>
<b>11</b>	<b>Modèle d'une protéine membranaire intrinsèque.</b>	<b>27</b>

# **Sommaire**

Liste des abréviations

Listes des figures

Sommaire

Introduction

**CHAPITRE I : Sperme du lapin**

<b>I. Définition et composition du sperme .....</b>	<b>2</b>
I.1. La semence .....	2
<b>II. La spermatogenèse.....</b>	<b>3</b>
II.1. Le cycle spermatogenèse.....	3
II.2. Maturation des spermatozoïdes.....	3
<b>III. Caractéristiques du sperme de lapin .....</b>	<b>4</b>
<b>IV. les facteurs influençant sur le sperme du lapin.....</b>	<b>4</b>
IV.1. Le type génétique et l'âge .....	4
IV.2. L'environnement physique.....	5
IV.3. L'alimentation.....	5
<b>V. Les méthodes de collecte du sperme.....</b>	<b>6</b>
V.1. le vagin artificiel.....	6
V.2. Electroéjaculation.....	7
<b>VI. Les méthodes d'évaluation du sperme.....</b>	<b>7</b>
VI.1. Analyse macroscopiques.....	7
VI.1.1. La couleur.....	7
VI.1.2. Volume de l'éjaculat.....	7
VI.2. Analyse microscopique.....	8
VI.2.1. Concentration.....	8

VI.2.2. Détermination de la motilité massale.....	8
VI.2.3. La motilité individuelle des spermatozoïdes.....	9
VI.2.4. Pourcentage de spermatozoïdes mobiles.....	9

**CHAPITRE II : Conservation du sperme du lapin**

<b>I. Les méthodes de conservation du sperme.....</b>	<b>11</b>
I.1.La congélation.....	11
I.2.Conservation à l'état frais (réfrigération).....	12
<b>II. Les milieux de conservation.....</b>	<b>12</b>
II.1. La solution de TRIS.....	13
II.2. La vitamine E.....	13
II.3. vitamine c .....	14
II.4. Le polyéthylène glycol (PEG).....	15
<b>III. Agents cryoprotecteurs.....</b>	<b>16</b>
III.1. Le jaune d'œuf.....	16
III.2. Le glycérol .....	16
III.3. Les sucres.....	17

**CHAPITRE III : Le cholestérol et la membrane plasmique**

<b>I. La membrane plasmique.....</b>	<b>18</b>
<b>I.1. Définition et structure de la membrane biologique.....</b>	<b>18</b>
I.2. Dynamique et fluidité .....	19
I.3. Définition et structure de la membrane spermatique .....	20
I.4. Les composants de la membrane spermatique .....	21
I.4.1. Les lipides .....	21
I.4.1.1 Définition .....	21

I.4.1.2. les différents types des lipides .....	22
a-Le cholestérol .....	22
Définition et structure .....	22
Localisation et synthèse de cholestérol .....	23
b-Les phospholipides .....	24
Définition et structure .....	24
Interactions des protéines lipidiques.....	25
I.4.2. les protéines membranaires .....	26
I.4.2.1. Définition et structure .....	26
I.4.2.2. Les types des protéines membranaires .....	27
a-Les protéines intégrales ou intrinsèques .....	27
b-Les protéines périphériques ou extrinsèques .....	27
II. Les dommages de la membrane pendant la conservation .....	29
III. Le cholestérol .....	30
III.1. Les Cyclodextrines .....	30
III.2. L'effet du cholestérol sur la membrane .....	31
III.3. L'efflux de cholestérol responsable du changement de la fluidité membranaire.....	32
IV. L'intérêt du cholestérol sur la membrane spermatique.....	32
Conclusion.....	35
Références bibliographiques	
Liste des annexes	
Résumé	

# **Introduction**

### **Introduction :**

La conservation est une technique de reproduction essentiel qui sert à stocker le sperme à longue période, son objectif est de produire une banque de spermatozoïdes pour l'insémination artificielle, faciliter l'échange et améliorer le matériel génétique entre les populations animales éloignés, conserver les espèces en voie de disparition et préserver la biodiversité des espèces menacées (**Mocé et al., 2010b ;Bailey et al., 2000**).

Le lapin est un animal de laboratoire précieux et le plus adapté à la recherche scientifique, en raison de sa taille et son coût et l'accessibilité des organes génitaux. Son sperme caractérisé par la résistance aux variations de température, ce qui permis de l'utilisé dans la cryoconservation (**Naughton et al., 2003**). Cette dernière se réalise par 2 méthodes qui sont :la réfrigération et la congélation.

Pendant la cryoconservation le sperme subit des changements physico-chimiques et biologiques aux niveaux des membranes des spermatozoïdes, et de nombreux stress prévenants de changements de température. Elle cause des dommages irréversibles qui conduisent à la mort cellulaire. Il est indispensable de maîtriser ces changements a fin d'apporter aux spermatozoïdes les composants qui les aident à résister à ces changements. Ces composants sont des milieux de conservation qui contiennent des éléments nutritifs, sources d'énergie et des agents cryoprotecteurs.

Puisque le cholestérol est un composant essentiel de la membrane et est considéré comme un agent cryoprotecteur ajouté au milieu de conservation, notre présent travail est basé sur son intérêt dans la protection de la membrane plasmique du spermatozoïde de lapin et donc dans la conservation du sperme.

**CHAPITRE I**  
**Sperme du lapin**

## I. Définition et composition du sperme :

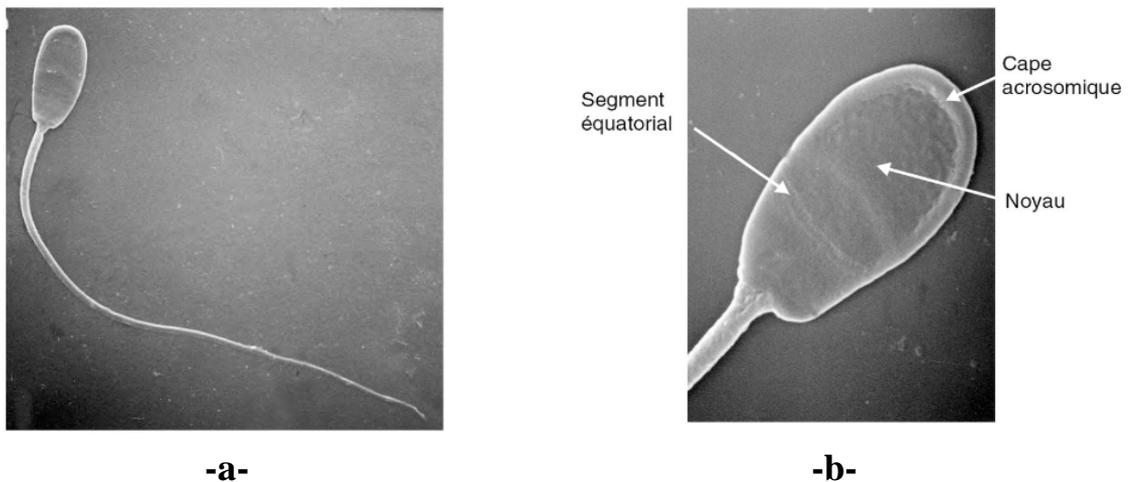
### I.1. Le sperme :

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

Le spermatozoïde (Figure 1 -a-) se compose essentiellement de :

- la tête (Figure 1 -b-), de forme ovoïde ( $7 \times 4 \times 0,5 \mu$ ) qui comprend notamment le noyau contenant les chromosomes et l'acrosome ;
- la pièce intermédiaire, qui contient la gaine mitochondriale, l'essentiel des mitochondries de la cellule. Elle est le siège de la production énergétique nécessaire au mouvement ;
- le flagelle, qui mesure de 45 à 55  $\mu$ , est l'organe moteur responsable du déplacement.

Figure 1 :



-a- : vue d'un spermatozoïde complet de lapin (Fortun-Lamothe *et al.*, 2015).

-b- : tête du spermatozoïde de lapin (Fortun-Lamothe *et al.*, 2015).

## **II. La spermatogenèse :**

La spermatogenèse désigne l'ensemble des divisions et des différenciations cellulaires qui conduisent, à partir d'une cellule sexuelle de base (ou cellule-souche ou spermatogonie), à la production des spermatozoïdes. La spermatogenèse comporte deux étapes, la phase d'élaboration proprement dite (ou cycle spermatogénétique) dans les tubes séminifères et la phase de maturation au niveau de l'épididyme (**Fortun-Lamothe et al., 2015**).

### **II.1. Le cycle spermatogenèse :**

Transformation des spermatogonies (cellules germinales) en spermatocytes I (2n chromosomes), et après la méiose en spermatocytes II (n chromosomes). Chaque spermatocyte II donne deux spermatides. Au cours d'une métamorphose complexe, chaque spermatide se transforme en spermatozoïde.

La spermatogenèse se déroule dans le testicule, à l'intérieur des tubes séminifères, de la périphérie du tube séminifère vers la lumière, en suivant une courbe hélicoïdale, Elle dure de 42 à 48 jours et est continue à partir de la puberté (**Fortun-Lamothe et al., 2015**).

### **II.2. Maturation des spermatozoïdes :**

Les spermatozoïdes ne possèdent pas leur pleine capacité de fertilisation au moment de quitter le testicule. Les spermatozoïdes subissent au cours de leur passage dans l'épididyme des modifications morphologiques et physiologiques, dont la plus importante est probablement l'acquisition du pouvoir fécondant (**Orgebin-Crist, 1967**).

L'épididyme (**Figure 2**) est un tube long de 2 à 2,5 m, replié sur lui-même. Il est composé d'une partie renflée, la tête, qui coiffe le pôle antérieur du testicule, une partie plus mince, le corps, et une partie plus dilatée, la queue de l'épididyme.

En résumé, le transit épидидymaire permet le transport (contractions), le stockage (queue de l'épididyme) et l'acquisition de la motilité des spermatozoïdes. Chez le lapin, la durée de la maturation épидидymaire varie de 8 à 11 jours (**Fortun-Lamothe et al., 2015**).

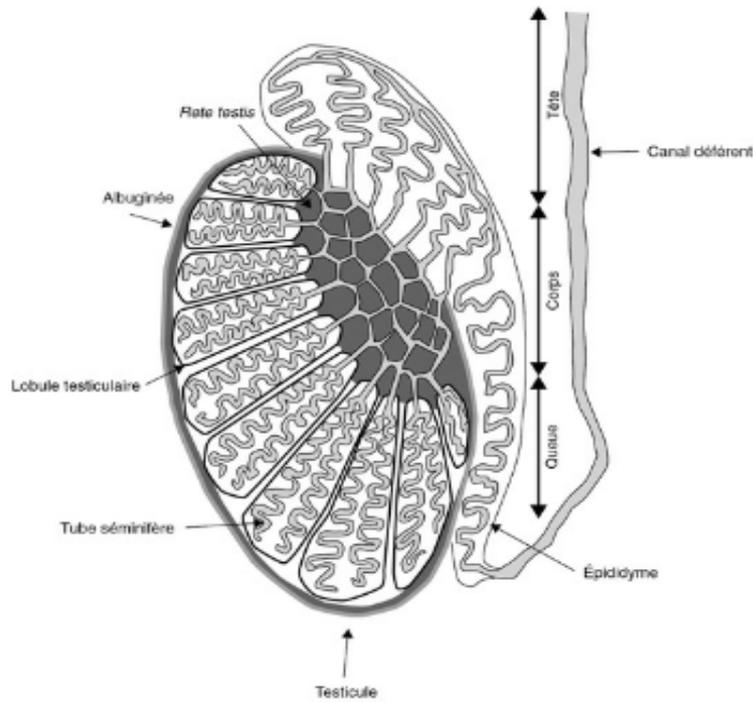


Figure N<sup>o</sup>2: Organisation du testicule et de l'épididyme (Fortun-Lamothe *et al.*, 2015).

### III. Caractéristiques du sperme de lapin :

Contrairement aux autres espèces domestiques, le sperme du lapin se caractérise par un faible volume et une faible concentration de spermatozoïdes (entre 0,4 et 0,5 mL et 150 et 500\*10<sup>6</sup> spermatozoïdes/mL). Ces caractéristiques dépendent également de la race ou de la lignée génétique. En outre, le plasma séminal du lapin présente une glycoprotéine d'origine épидидyinaire qui inverse le processus de capacitation du sperme ainsi que des gouttelettes et des vésicules de taille similaire au spermatozoïde. La fonction de ces gouttelettes et vésicules n'est pas complètement claire (Mocé et Vicente, 2009).

### IV. les facteurs influençant sur le sperme du lapin :

#### IV.1. Le type génétique et l'âge :

Les caractéristiques biologiques de la semence (volume, concentration, motilité, altérations morphologiques...) sont très variables entre et intra races, mais en moyenne les valeurs de ces paramètres augmentent avec l'âge des mâles collectés (de 5 mois à 24 mois) ainsi que les résultats de fertilité et de prolificité des femelles inséminées (Joly et Theau-Clément, 2000).

#### **IV.2. L'environnement physique :**

La spermatogenèse du lapin montre une variation saisonnière liée à la photopériode et à la température externe, l'activité étant maximale au printemps et minimale à l'automne. Pour des températures comprises entre 13°C et 26°C, peu de variations sont observées sur les caractéristiques de la semence. Par contre, pour des températures élevées supérieures à 30°C, température fréquente en été pour des élevages en semi plein air, la supplémentation en zinc dans la ration alimentaire (245 mg ZnSO<sub>4</sub>, soit 100 mg Zn/kg) permet de limiter la baisse de production de spermatozoïdes observée en automne (+ 31 106 spermatozoïdes par rapport au témoin). Le zinc est un oligo-élément qui influence directement la synthèse des hormones gonadotropes de l'axe hypothalamo-hypophysaire et stéroïdiennes (androgène et testostérone). Cependant, bien que les mâles semblent capables de s'adapter en quelques semaines à un stress thermique (tous les jours : 22 heures à 32°C et 2 heures à 25°C), la quantité et la qualité de la semence produite sont extrêmement sensibles à de fortes chaleurs couplées à une forte hygrométrie (85 % pendant 6 semaines). En effet, les caractéristiques de la semence ne retrouvent jamais leurs valeurs initiales (**Joly et Theau-Clément, 2000**).

#### **IV.3. 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, un régime alimentaire ne contenant que 13% de protéines brutes entraîne une diminution du volume de l'éjaculat, de la concentration en spermatozoïdes ainsi qu'un abaissement des performances de reproduction des femelles inséminées. La supplémentation en vitamines liposolubles de type A, D3, E d'un aliment standard couvrant les besoins des mâles ne permet pas d'améliorer la quantité et la qualité de la semence produite (nombre de spermatozoïdes, volume, concentration, anomalies morphologiques), ni le comportement sexuel du jeune mâle. Par contre, l'association des 2 vitamines C et E modifie le statut oxydatif des mâles et les caractéristiques de la semence. La supplémentation en alpha tocophérol (200 mg/kg) et en acide ascorbique (1 g/litre de boisson) devrait permettre une meilleure résistance aux stress osmotiques et oxydatifs et en conséquence, une meilleure aptitude à la congélation de la semence (**Joly et Theau-Clément, 2000**).

## **V. Les méthodes de collecte du sperme :**

Le sperme peut être recueilli par électroéjaculation, stimulation manuelle des organes génitaux internes, ou avec un vagin artificiel utilisant un animal de saut (**Hopper et King, 2014**).

### **V.1. le vagin artificiel (Figure 3) :**

La collecte de sperme s'effectue par utilisation d'un vagin artificiel rempli d'eau chaude (environ 45 ° C). Les animaux doivent être habitués dès leur jeune âge à la stimulation manuelle. Les mâles doivent être entraînés pendant deux ou trois semaines pour donner un bon éjaculat, le succès de la collecte dépend de plusieurs facteurs par exemple la stimulation générée par la femelle. Le vagin contient deux extrémités, la plus large est en contact avec le pénis, l'autre extrémité est reliée à un tube en plastique (**Bouhala et Boukerran, 2014**).

Pour la récolte du sperme, la femelle est introduite dans la cage du mâle. Dès que le mâle tente de la chevaucher, l'opérateur immobilise la femelle. Le vagin artificiel soutenu par la main libre est placé ventralement sous l'arrière-train de la lapine de manière qu'il soit bien adhérent à la région périnéale faisant correspondre l'ouverture du vagin artificiel à l'orifice du vagin réel. Dès que le pénis arrive au contact du vagin, l'éjaculation a lieu et le mâle tombe sur le côté, poussant parfois un cri. L'opérateur retourne le vagin en position verticale et le sperme s'écoule dans le tube collecteur qui est aussitôt bouché puis placé dans un bloc portoir isolant (**Akpo et al., 2009**).



**Figure N°3 : Vagin artificiel (photo personnelle).**

## **V.2. Electroéjaculation :**

L'électroéjaculation est une intervention qui sert à prélever le sperme lors de l'examen de l'aptitude à l'utilisation pour la reproduction, l'électroéjaculation est une méthode pratique, rapide et fiable pour la récolte du sperme. L'électroéjaculation permet de provoquer l'éjaculation par une stimulation électrique, Un générateur produit de l'électricité qui est transmise par l'intermédiaire d'électrodes à l'animal (**Rigal, 2008**). On peut l'utiliser en dehors de la saison de reproduction ainsi que pour les animaux qui n'ont pas été accoutumés et ceux qui ne sont pas habitués aux manipulations. Comparativement à l'usage d'un vagin artificiel, les femelles ne sont pas requises pour le chevauchement, il n'y a qu'un risque réduit de transmission de maladie, L'électroéjaculation comprend l'insertion d'une sonde dans le rectum et l'application d'impulsions électriques à faible tension pendant une courte durée sur les nerfs pelviens pour stimuler les muscles lisses de l'ampoule et du canal déférent et induire l'éjaculation (**ACMN., 2019**).

## **VI. Les méthodes d'évaluation du sperme :**

Immédiatement après collecte, les prélèvements sont placés dans un bain marie à 37°C afin de procéder à l'évaluation de la semence. La couleur est déterminée par observation de la semence dans le tube de collecte transparent. Le pH, le volume du sperme total et sans gel sont mesurés respectivement par un pH-mètre et par lecture directe sur le tube gradué servant à la collecte (**Boulbina, 2012**).

### **VI.1. Analyse macroscopiques :**

#### **VI.1.1. La couleur :**

La couleur du sperme du lapin est généralement blanchâtre, son opacité dépend principalement de la concentration spermatique. Cette couleur peut être modifiée par la présence d'autres éléments anormaux comme la couleur jaune liée à la présence d'urine, la couleur grise liée à la précipitation au fond du tube ou bien la couleur rougeâtre ou rose liée à la présence du sang (**Bouhala et Boukerram, 2014**).

#### **VI.1.2. Volume de l'éjaculat :**

La quantité de sperme varie selon l'état physiologique de l'individu, l'âge, la saison, les méthodes de récolte, la race ou encore les conditions sanitaires et alimentaires (**hanzen, 2016**). La mesure de volume de l'éjaculat s'effectue par lecture directe à l'aide des

graduations du tube de collecte, la lecture se fait sans tenir compte de la partie mousseuse de l'éjaculat (**Baril et al., 1993**).

## **VI.2. Analyse microscopique :**

### **VI.2.1. Concentration :**

Le sperme devient plus clair au fur et à mesure que sa concentration en spermatozoïdes diminue (**Hanzen, 2016**). L'objectif de cette mesure est de pouvoir déterminer le nombre de spermatozoïdes par millilitre de semence pure en utilisant le minimum de semence possible. La concentration spermatique de lapin varie généralement de 150 à  $500 \times 10^6$  spermatozoïdes/ml de semence éjaculée.

Plusieurs possibilités existent pour mesurer cette concentration (**Baril et al., 1993**) :

- Appréciation visuelle directe de la consistance de l'éjaculat.
- Comptage exact avec un hématimètre.
- Mesure de la densité optique dans un spectrophotomètre.

### **VI.2.2. Détermination de la motilité massale :**

L'emploi du terme motilité et non mobilité signifie que les spermatozoïdes se meuvent par eux-mêmes et ne se déplacent pas passivement.

La motilité du spermatozoïde est due à la contraction du filament axial. L'examen de la motilité doit se faire le plus rapidement possible après le prélèvement en le maintenant rigoureusement à une température voisine de 38°C. La progression des spermatozoïdes est habituellement rectiligne. Au cours de leur déplacement, ils subissent une rotation autour de leur grand axe. Dans la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes sont immobiles. Leur motilité dépend de leur présence dans un milieu de pH et de température, renfermant en quantités adéquates nutriments et ions, conditions offertes une fois qu'ils sont présents dans les sécrétions séminales. On comprend ainsi pourquoi leur motilité peut facilement être inhibée en cours de prélèvement par la présence de contaminants chimiques sur les lames, ou d'urine. La motilité massale dépend essentiellement de trois facteurs : la concentration, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et de la vitesse de déplacement des spermatozoïdes. Ils doivent être pris en considération dans l'interprétation du score de la motilité massale (**hanzen, 2016**).

### **VI.2.3. La motilité individuelle des spermatozoïdes :**

L'examen de la motilité individuelle est préférentiellement réalisé une fois après dilution (10 à 40 fois) du sperme dans un dilueur ("extender") ou dans du sérum physiologique préalablement chauffé. Ces milieux seront idéalement préparés avant l'examen pour éviter toute modification du pH, préjudiciable à la motilité des spermatozoïdes. Le récipient sera placé sur une plaque chauffante. La motilité sera déterminée au moyen d'un microscope à contraste de phase en plaçant une goutte de sperme entre lame et lamelle. Trois à cinq champs proches du centre de la goutte, seront ainsi examinés au grossissement 200 à 500 et la moyenne est calculée. La motilité d'un spermatozoïde peut être considérée comme bonne quand il traverse le champ du microscope relativement rapidement avec des mouvements de rotation de la tête (spermatozoïdes fléchants ou traceurs). Certains (50 %) spermatozoïdes présentent des mouvements circulaires imputables à l'implantation abaxiale de leur queue. D'autres se déplacent de manière curviligne ou plus lentement. Les analyseurs d'image de type CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) permettent de quantifier de manière plus précise la nature et la vitesse des déplacements.

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

L'examen de la motilité individuelle est intéressant car il fournit indirectement des informations intéressantes sur l'intégrité de la membrane du spermatozoïde et son intégrité morphologique. Ainsi un pourcentage élevé de spermatozoïdes mobiles joint à un pourcentage élevé de spermatozoïdes morts donnera à penser à une mauvaise manipulation du sperme plus qu'à un sperme anormal. De même une faible motilité est souvent corrélée avec un pourcentage élevé de formes anormales ou de spermatozoïdes morts (**Hanzen, 2016**).

### **VI.2.4. Pourcentage de spermatozoïdes mobiles :**

Cette mesure est réalisée en déposant une goutte de semence diluée entre la lame et la lamelle et en l'examinant au microscope. Le grossissement est d'environ 200 et la platine chauffante est à 37-38 C. La dilution de la semence pour une observation correcte doit être comprise entre 60 et  $200 \times 10^6$  spermatozoïdes/ml. L'observateur décide, après l'examen successif de 5 champs d'une même préparation, d'une estimation visuelle du pourcentage de spermatozoïdes mobiles. Pour un observateur entraîné, cette mesure est assez répétable. Pour l'apprentissage et l'entraînement régulier, il est nécessaire de comparer cette estimation

visuelle du pourcentage de spermatozoïdes vivants donné par le test de coloration différentielle éosine/ nigrosine. Pour un opérateur entraîné, la corrélation entre ces deux déterminations est généralement élevée (0.90) (**Baril et al., 1993**).

## **CHAPITRE II**

### **Conservation du sperme du lapin**

## **I. Les méthodes de conservation du sperme :**

La cryoconservation du sperme comporte plusieurs étapes, ce qui influe sur la structure et la fonction des spermatozoïdes: prolongation, cryoprotection, refroidissement et congélation, stockage et décongélation. La membrane plasmique est le principal site de lésion des spermatozoïdes cryoconservés et les principaux dommages surviennent pendant la congélation et la décongélation, entraînant une perte importante de spermatozoïdes viables. Le succès de la cryoconservation du sperme du lapin dépend de nombreux facteurs, comme les cryoprotecteurs, la vitesse de refroidissement/congélation et de décongélation. Pendant le processus de refroidissement, de congélation et de décongélation, les spermatozoïdes sont soumis à une série de changements radicaux dans leur environnement physique et chimique. Le premier changement auquel les spermatozoïdes doivent faire face est le refroidissement de la température corporelle jusqu'au point de congélation de l'eau, qui provoque des transitions de phase des lipides dans les membranes des spermatozoïdes (**Andrabi, 2007**).

### **I.1.La congélation :**

La congélation est une méthode de conservation qui a révolutionné l'IA. En effet, elle a permis une diffusion large et facile de la semence aussi bien dans le temps que dans l'espace. Elle utilise l'azote liquide dans laquelle la semence est conservée à -196°C. Cette conservation est rendue possible grâce à l'action cryoprotectrice de certains produits tels que le glycérol. Cette méthode peut permettre la conservation des semences pendant 20 ans si les paillettes restent immergées dans l'azote liquide (**Youbare, 2013**).

La congélation des semences est la seule technique capable d'assurer un transport plus sûr, une utilisation plus large et diffuse et une réserve continue de la semence de mâles de haute valeur génétique. La possibilité de disposer d'une banque de sperme permettra de diffuser du matériel génétique de bonne qualité dans de nombreux élevages qui autrement ne pourraient en bénéficier, même après le décès des mâles reproducteurs. Les facteurs qui influencent le plus la réussite du processus sont la vitesse de refroidissement et de décongélation et le cryoprotecteur utilisé. Pendant la congélation, surtout de -5 à -10 °C, des cristaux de glace se forment à l'extérieur de la cellule et quelques cas également à l'intérieur. Les cas extérieurs, dont le diamètre est inversement proportionnel à la vitesse de réfrigération, entraînent une soustraction de l'eau et augmentent la concentration saline dans l'espace interstitiel et déterminent par osmose une déshydratation de la cellule. Des vitesses de refroidissement élevées donnent donc lieu à des cristaux très petits, tandis que les gelures lentes peuvent

endommager les spz. La formation de glace endocellulaire endommage irréversiblement la membrane cellulaire; pour éviter ce phénomène il faut adopter une vitesse de congélation qui permet à la majeure partie de l'eau cellulaire de s'échapper. Pour réduire les dommages causés par la congélation, la vitesse idéale est celle qui n'endommage pas la cellule pour la formation de cristaux intracellulaires (rapide) ou de cristaux externes tropgrands (lents). Malheureusement les spz de lapin présentent une perméabilité très faible de la membrane et donc la congélation est particulièrement problématique. Toutefois, même avec des vitesses de congélation appropriées il est nécessaire d'ajouter des substances (cryoprotecteurs) qui, d'une part, ont un effet protecteur sur les spz. Et de l'autre modifient les caractéristiques de la solution en réduisant le diamètre des cristaux et le point cryoscopique pour donner ainsi plus de temps de déshydratation aux spz (Castellini et Dal bosco, 1998). la congélation est donc une technique exigeante et coûteuse (Fadlet *al.*, 2003).

### **I.2. Conservation à l'état frais (réfrigération) :**

La conservation de la semence fraîche à 4°C réduit le métabolisme des spermatozoïdes ce qui permet une économie de leur réserves énergétiques et une bonne conservation de leur mobilité qui est restaurée après réchauffement. En revanche, des altérations membranaires se produisent et entraînent, pour certains individus, une baisse du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. La conservation de la semence fraîche entre 15–20 °C maintient le métabolisme des spermatozoïdes mais les rend plus sensibles aux éléments toxiques métabolisables (Decuadro-hensen, 2004).

Elle ne peut être utilisée que dans un délai maximum de 3 jours et est conservée à 5°C. Il faut éviter le choc thermique en faisant baisser la température de 5°C toutes les 10 mn, entre 37°C, 22°C et 5°C toutes les 5 mn jusqu'à 5°C (Youghare, 2013).

Les taux de fécondation sont plus faibles avec le sperme congelé qu'avec le sperme frais (OEB., 1996). les résultats en matière de fertilité des spermatozoïdes de lapin congelés/décongelés sont toujours inférieurs à ceux obtenus à partir de spermatozoïdes frais, Seules quelques études ont montré des résultats positifs avec du sperme congelé/décongelé chez cette espèce (Fadlet *al.*, 2003).

## **II. Les milieux de conservation :**

Il existe à présent plusieurs dilueurs utilisés au niveau des laboratoires mais aussi en industries avicoles dans les plans d'insémination artificielle. Le dilueur par sa composition,

apporte les nutriments nécessaires aux spermatozoïdes (Amrane et Hidri, 2013). La présence de certaines protéines et lipoprotéines dans les dilueurs protège les spermatozoïdes des effets néfastes de la dilution et du refroidissement/réchauffement brutal en agissant au niveau de leurs membranes (Decuadro-Hansen, 2004). La qualité du sperme réfrigéré dépend des propriétés et de la composition du milieu diluant, Le sperme doit être en contact avec un extenseur approprié, capable de créer un environnement métaboliquement et physiologiquement favorable à la survie des spermatozoïdes, les protégeant du choc froid et de la croissance bactérienne inutile (Fadl *et al.*, 2003).

### II.1. La solution de TRIS :

Le tris- (hydroxyméthyl) aminométhane (THAM) est un composé tampon couramment utilisé. Il peut induire de façon réversible la phase d'ondulation (lorsque la température est supérieure à la température de pré-transition) à température ambiante, indiquant que l'interaction entre ces petites molécules et les lipides peuvent avoir une influence significative sur la morphologie et les propriétés de la membrane (Mou *et al.*, 1994).

C'est un alcool aminé de base faible, possède un tampon pK et pH favorable pour les réactions physiologiques. Il possède à peu près la même capacité tampon que le sang normal. Contrairement aux autres tampons, il pénètre les cellules et est un tampon intracellulaire efficace (Sirieix *et al.*, 1997).

En général, les dilueurs à base de Tris (Tris, acide citrique et fructose ou glucose) sont la base des dilueurs fréquemment utilisés pour la cryoconservation des spermatozoïdes de lapin (Mocé et Vicente, 2009). Le Tris est couramment employé en biologie pour la préparation de solutions tampons (Giusti *et al.*, 2002).

### II.2. La vitamine E :

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols qui comprend 4 substances : l' $\alpha$ -tocophérol, qui est la vitamine E proprement dite, le  $\beta$ -tocophérol, le  $\gamma$ -tocophérol et le  $\delta$ -tocophérol (Cuvelier *et al.*, 2003). C'est l'antioxydant majeur des milieux lipidiques (huiles, membranes biologiques) briseur de chaîne dans les membranes biologiques, prévient les dommages oxydatifs toxiques en piégeant les oxyradicaux réactifs (Liebler, 1993).

Elle est susceptible d'être impliquée dans de nombreux processus physiologiques, en protégeant les cellules contre les dommages oxydatifs. Elle peut donc protéger l'intégrité des tissus et jouer un rôle important dans les processus de vie (**Azzi et Stocker, 2000**).

Elle joue un rôle physicochimique dans la stabilisation des membranes biologiques qui contiennent des niveaux élevés d'AGPI. Les propriétés de type liquide de la chaîne d'hydrocarbures de la vitamine E peuvent jouer un rôle important dans la stabilisation de la structure membranaire *in vivo* (**Lucy, 1972**). L'addition alimentaire de la vitamine E améliore l'activité sexuelle et atténue les effets négatifs de la température élevée sur la qualité du sperme des lapins mâles pendant les saisons chaudes dans les régions subtropicales (**Hashemet et al., 2013**).

Elle peut améliorer la motilité, la vitalité et le nombre de spermatozoïdes intacts après congélation. Cela signifie que la vitamine E est un facteur important pour une cryoconservation réussie du sperme (**Kargar et al., 2017**).

En effet, la vitamine E est considérée comme le composant principal du système antioxydant des spermatozoïdes. Elle a un effet positif sur la motilité, le potentiel de membrane mitochondriale et l'intégrité de la membrane et de l'ADN des spermatozoïdes congelés (**Amini et al., 2015**). Le rôle de la vitamine E dans l'intégrité de la membrane est associé non seulement à ses propriétés antioxydantes, mais aussi au contrôle de l'activité phospholipase et à la stabilisation directe des membranes par interaction avec les phospholipides (**Surai et al., 1998**).

### **II.3. vitamine c :**

C'est un micronutriment essentiel au fonctionnement métabolique normal du corps (**Carr et Frei, 1999**). Largement reconnu comme un antioxydant naturel dans les systèmes biologiques, étant un acide dibasique faible et soluble dans l'eau au pH physiologique (**Cossins et al., 1998**).

La vitamine C est capable de se former comme antioxydant soit en réagissant directement avec un certain nombre de radicaux oxy- ou peroxy dans la phase aqueuse, on a longtemps supposé que sa fonction antioxydante se limitait à la phase aqueuse de la cellule et du système circulatoire.

Elle sert aussi indirectement à protéger les composants de la membrane susceptibles d'endommager les radicaux libres. Certaines des découvertes relativement récentes démontrant le rôle antioxydant de la vitamine C dans la protection des membranes et d'autres compartiments hydrophobes contre les dommages causés par les radicaux libres oxydatifs **(Beyer, 1994)**.

L'acide ascorbique est un antioxydant hydrosoluble bien connu qui réagit avec la ROS et protège ainsi les composants cellulaires (p. ex., protéines, lipides et acides nucléiques) contre les dommages oxydatifs induit des améliorations significatif dans le niveau de MDA, la motilité progressive, la viabilité et l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes des spécimens térasotpermiqes. L'acide ascorbique peut diminuer la fragmentation de l'ADN induite par ROS, recycler la vitamine E inactive et réduire la peroxydation lipidique **(Fanaei et al., 2014)**.

#### **II.4. Le polyéthylène glycol (PEG) :**

Le poly (éthylène glycol) (PEG) est un polymère hautement étudié pour la modification covalente de macromolécules et de surfaces biologiques pour de nombreuses applications pharmaceutiques et biotechniques **(Roberts et al., 2002)**.

Ce sont des molécules à haut poids moléculaire issues de l'industrie de la pétrochimie. Ils sont constitués d'une longue chaîne carbonée aliphatique, plus ou moins hydrosoluble grâce à ses fonctions éthers et alcools. Cette famille de molécules présente l'avantage de ne pas être toxique **(Caillat et al., 2015)**.

Le polyéthylène glycol (PEG) a été recommandé comme matériau de stockage thermique en raison de sa chaleur de fusion relativement plus élevée, de son comportement de fusion congruent, de sa meilleure résistance à la corrosion et de son point de fusion approprié **(Wang et al., 2009)**.

Le PEG fait baisser la polarité des solutions pour permettre une meilleure solubilité des produits organiques. tel que la vitamine E dans le milieu de conservation du sperme **(Amokrane et al., 2020)**.

### **III. Agents cryoprotecteurs :**

Au cours de la cryoconservation, les spermatozoïdes subissent un stress tel que des changements dans l'équilibre thermo-osmotique et les températures pendant le refroidissement, le gel et le réchauffement. Ces changements entraînent la formation de cristaux de glace, ce qui est l'un des principaux facteurs biophysiques qui causent la mort des spermatozoïdes. Des agents cryoprotecteurs (APC) qui imprègnent la membrane cellulaire sont nécessaires pour accroître la fluidité de la cellule et la déshydrater partiellement, abaisser le point de congélation et réduire ainsi l'engourdissement et la taille des cristaux de glace intracellulaires formés (**Rosato et Iaffaldano, 2013**).

#### **III.1. Le jaune d'œuf :**

le jaune d'œuf est couramment utilisé dans les dilueurs pour la congélation des spermatozoïdes des lapins, sa concentration variant de 10 % à 20 % (**Mocé et Vicente, 2009**). Les phospholipides du jaune d'œuf peuvent atténuer les lésions de refroidissement des spermatozoïdes en se liant aux lipoprotéines de faible densité de la membrane et en augmentant la perméabilité de la membrane, bien qu'ils ne modifient pas la composition intrinsèque de la membrane et/ou ses propriétés physiques (**Andrabi, 2007**).

#### **III.2. Le glycérol :**

Est un cryoprotecteur perméable osmotiquement actif (**Andrabi, 2007**), et essentiel dans tous les dilueurs conventionnels pour la congélation des spermatozoïdes. Pendant la congélation, les spermatozoïdes sont protégés, car le glycérol réduit la concentration des sels extracellulaires pendant le temps de déshydratation et augmente le pourcentage d'eau non concentré à une température donnée. Les spermatozoïdes sont apparemment séquestrés dans des noyaux étroits d'eau non gelée entre de gros cristaux de glace (**Vidament, 2005**). Les résultats obtenus avec des spermatozoïdes de lapin congelés avec du glycérol comme seul CPA sont, en général, inférieurs à ceux obtenus avec des spermatozoïdes frais et des spermatozoïdes congelés avec d'autres CPA (éthylène glycol, DMSO ou amides) (**Mocé et Vicente, 2009**). Par exemple, Fox et Burdick (1963) ont observé que la qualité des spermatozoïdes s'améliorait lorsque la concentration de glycérol ou d'éthylène glycol dans l'extenseur était abaissée à 4 % (au lieu de 8 %) (**Mocé et Vicente, 2009**).

De nombreux auteurs ont confirmé que la cryoconservation des spermatozoïdes des lapins est améliorée lorsque des APC à haute perméabilité sont utilisées (comme l'éthylène glycol ou le DMSO) au lieu du glycérol. Des études ultérieures ont observé que l'éthylène glycol présentait une toxicité inférieure au thanglycérol dans les spermatozoïdes de lapin, mais cette CPA n'offrait pas une protection suffisante aux spermatozoïdes pendant la cryopréconversion. De plus, certains auteurs ont signalé que l'ajout d'APC (glycérol orethylèneglycol) aux spermatozoïdes à des températures élevées (37 C) au lieu de 5 C est bénéfique, en raison du fait que la perméabilité augmente lorsque la température augmente (**Mocé et Vicente, 2009**).

### III.3. Les sucres:

En particulier les disaccharides tels que le saccharose et le tréhalose, peuvent améliorer la qualité du sperme cryoconservé, Ces sucres ont deux propriétés importantes : (1) ils déshydratent les cellules à des températures sous-glaciaires élevées, en inhibant la formation de glace et en permettant un refroidissement rapide avant que les concentrations de solutés intracellulaires n'atteignent des niveaux critiques; (2) ils ont une température de transition vitreuse élevée par rapport aux APC conventionnellement perméables, permettant le stockage à long terme des cellules à des températures inférieures à zéro et même supérieures à zéro (**Rosato et Iaffaldano, 2013**).

Le tréhalose, connu sous le nom de  $\alpha$ -D-glucopyranosyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside, est un disaccharide non réducteur du glucose. Le tréhalose pourrait être utilisé pour stabiliser des systèmes simples, comme les lipides et les protéines, ainsi que des produits biologiques plus complexes. Comme le tréhalose pourrait réduire la formation de cristaux de glace intracellulaires et maintenir la structure protéique pendant la cryoconservation des spermatozoïdes, il a été utilisé pour améliorer la qualité des spermatozoïdes post-dégel chez les animaux de mammifères (**Zhu et al., 2017**).

# **CHAPITRE III**

## **Le cholestérol et la membrane plasmique**

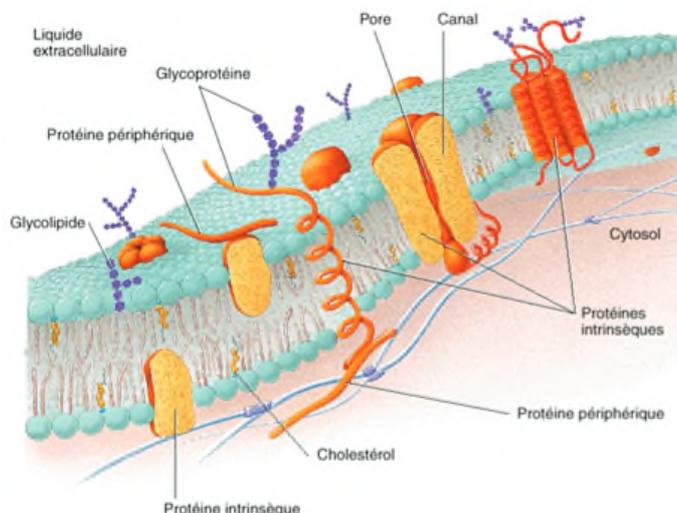
Un changement de la température corporelle d'un organisme a des conséquences immédiates sur ses membranes. Certaines propriétés de la membrane sont particulièrement importantes à préserver. L'ordre, la phase, l'épaisseur et les propriétés de perméabilité de la membrane peuvent tous être des caractéristiques critiques, et une certaine restructuration de la membrane pendant les fluctuations de température est nécessaire pour les maintenir, le cholestérol est un choix pratique pour remodeler la membrane. En raison des multiples influences du cholestérol sur les propriétés physico-chimiques / fonctionnelles des membranes, tout ajustement du taux de cholestérol aura cependant plus d'un effet unique. Par exemple, à une température corporelle basse, un animal peut réduire sa teneur en cholestérol dans la membrane plasmique pour empêcher la membrane de devenir trop rigide. Si, cependant, l'activité d'une protéine membranaire particulière nécessite une interaction chimique directe avec le cholestérol, alors l'épuisement du cholestérol pourrait compromettre certains aspects de la fonctionnalité de la membrane (**Crockett, 1998**).

### **I. La membrane plasmique :**

#### **I.1. Définition et structure de la membrane biologique :**

Les membranes biologiques sont des complexes moléculaires de nature essentiellement lipoprotéique séparant le soi cellulaire (Certains virus sont également entourés d'une enveloppe lipoprotéique), dont elles font partie, de l'environnement, ou alors, à l'intérieur même d'une cellule, quand il en existe, des compartiments distincts. Elles sont dotées d'une propriété remarquable, c'est leur asymétrie. Pour les enzymes, le site actif, asymétrique, opère de façon asymétrique même sur les molécules symétriques les membranes par leur asymétrie contribuent à la réalisation de processus vitaux pour la cellule. Elles comportent en général au moins autant de protéines que de lipides, souvent plus de protéines que de lipides (**Etemadi, 1980**).

Ces membranes sont loin d'être des enveloppes inertes. Le modèle de 'mosaïque fluide' a été introduit dès 1972 par Singer et Nicolson. Ce modèle décrit les membranes biologiques comme étant constituées d'une double couche de phospholipides, dans laquelle les chaînes hydrophobes se font face, traversées par des protéines membranaires. Les lipides y sont en perpétuel mouvement de diffusion latérale, via le mouvement brownien, et les protéines membranaires se déplacent également, mais plus lentement que les lipides qui les entourent (**Harb, 2012**). Cette structure est représentée dans la figure 04 :



**Figure 04 : Représentation schématique d'une membrane plasmique. (Modèle mosaïque fluide de la structure des membranes) (Harb, 2012).**

### I.2. Dynamique et fluidité :

Dans le vivant, les deux feuillets constitutifs des membranes sont asymétriques et il a été montré qu'il existait des échanges de lipides entre ces deux hémimembranes. La phase lipidique des membranes biologiques est fluide dans les conditions physiologiques et permet donc le déplacement des constituants. Les lipides peuvent se déplacer soit par une simple rotation sur eux-mêmes, soit par diffusion latérale dans le feuillet dont ils font partie, soit beaucoup plus rarement, en changement de feuillet (principe du flip-flop). Une enzyme, la flipase, est en générale requise pour permettre le changement de feuillet.

L'amplitude de ces mouvements dépend à la fois de la température et de la concentration lipidique elle-même. La fluidité est facilitée par une augmentation de la température et par la présence d'insaturations dans les queues hydrophobes des phospholipides, et ralentie par la présence de chaînes saturées ainsi qu'une forte proportion de cholestérol. En effet, la présence d'insaturations induit un encombrement stérique plus volumineux de la chaîne carbonée. Cette géométrie engendre un désordre plus important dans l'agencement des lipides dans la bicouche, ce qui se traduit finalement par une plus grande fluidité de celle-ci.

Les mouvements dans le plan de la membrane concernent les protéines et les lipides. Ils sont rendus possibles par l'agitation moléculaire, et, surtout, par le fait que les interactions entre molécules de la membrane sont des interactions faibles. Tous les facteurs modifiant les

interactions faibles entre constituants de la membrane pourront influencer sa fluidité. La mobilité des phospholipides est donc un facteur important qui conditionne de nombreuses fonctions biologiques.

La grande variété de lipides et de protéines au sein d'une même cellule en fait un système complexe fortement inhomogène. Les membranes sont ainsi caractérisées par des hétérogénéités de distribution et d'état de phase.

La nature des protéines membranaires insérées dans la membrane varie en fonction du type cellulaire et de la localisation subcellulaire. Certaines de ces protéines se lient seulement à la surface tandis que d'autres sont transmembranaires : une région est insérée dans la membrane, le reste dépasse d'un côté ou des deux côtés de la membrane. Les domaines protéiques du côté extracellulaire sont liés à la signalisation entre les cellules. Les domaines enfouis dans la membrane forment des canaux et de pores, qui permettent le transport des molécules ou d'ions à travers la membrane. Les domaines du côté cytosolique ont un large éventail de fonctions qui vont de l'ancrage des protéines du cytosquelette au déclenchement des voies de signalisation intracellulaires.

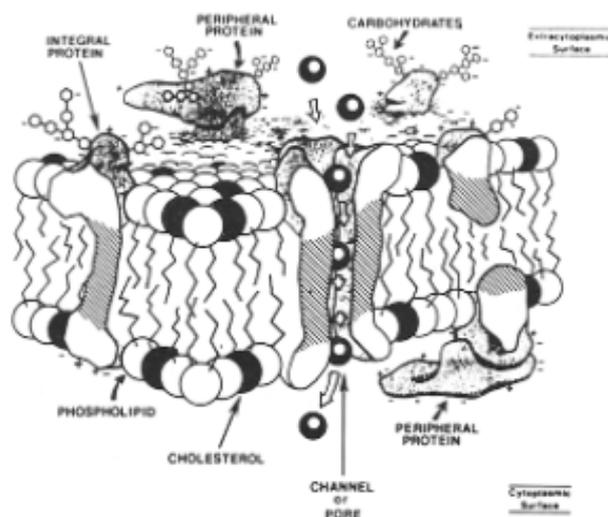
La complexité des membranes biologiques et leurs interactions avec les composants intra et extracellulaires rendent les investigations directes difficiles. Les nombreux modèles de membranes artificielles développées ont joué un rôle important dans la compréhension de leurs caractéristiques chimiques et fonctionnelles (**Harb, 2012**).

### **I.3. Définition et structure de la membrane spermatique :**

Les membranes spermatiques sont composées de lipides et de protéines disposés en bicouche avec les extrémités hydrophiles (aimant l'eau) des lipides à l'extérieur et les chaînes d'acyle gras hydrophobes (qui détestent l'eau) à l'intérieur. Les protéines sont entremêlées avec les lipides (**Amann et Pickett, 1987**).

Elle joue un rôle très actif dans la capacité de fécondation des spermatozoïdes et dans le dialogue spermatozoïde-ovocytaire. Sa constitution biochimique est l'un des principaux domaines d'intérêt dans l'étude de la physiologie et de la pathologie des spermatozoïdes (**Lenzi et al, 1996**).

La figure 05 ci-dessous présente une conception générale d'une membrane :



**Figure 05 : Une représentation schématique d'une membrane (Amann et Pickett, 1987).**

La membrane est composée de lipides (principalement des phospholipides et de cholestérol) et de protéines (périphériques et intégrales). La structure des protéines intégrales permet la formation de régions à la fois hydrophiles (gris foncé) et hydrophobes (striées). Les régions hydrophobes permettent l'intercalation des protéines dans l'intérieur hydrophobe de la bicouche lipidique. Les groupes glucidiques (représentés sur la surface supérieure) se trouvent probablement uniquement sur le côté extracellulaire des membranes plasmiques. Le canal ou pore facilite le transport de petites molécules à travers la membrane. Les groupes de tête de phospholipides sont représentés comme des sphères, bien qu'en réalité ils diffèrent par leur taille et leur forme, tout comme la nature des chaînes latérales d'acyle gras (Amann et Pickett, 1987).

### **I.4. Les composants de la membrane spermatique :**

#### **I.4.1. Les lipides :**

##### **I.4.1.1 Définition :**

Les lipides sont les principaux constituants structurels des membranes cellulaires, et il est actuellement bien établi qu'ils ne sont pas des éléments inertes mais jouent plutôt un rôle actif dans les processus de détection, de transduction et d'exécution des programmes de prolifération et de mort (Wright *et al.*, 2004).

Les lipides représentent entre 20 et 80 % de la masse des membranes cellulaires animales. Ils constituent un mélange hétérogène de phospholipides, de glycolipides et de stérols. Ils forment une barrière structurale plus ou moins perméable entre le cytoplasme cellulaire et le compartiment extracellulaire, ainsi qu'une matrice permettant le fichage ou l'incorporation des protéines (**Rejraji et al., 2009**).

### **I.4.1.2. les différents types des lipides :**

On distingue trois grands groupes de lipides entrants dans la composition des membranes plasmiques:

- ✓ les lipides complexes composés d'au moins trois éléments de nature différente. Ils comprennent les phosphoglycérides (phospholipides et plasmalogènes) et les glycolipides (glycérides complexes, sphingolipides et lipopolysaccharides).
- ✓ les lipides simples ou neutres. Ils contiennent un ou deux composants et sont généralement neutres. Ils englobent principalement les acylglycérols ou glycérides (mono-, di- et triglycérides), les acides gras (AG) et les stérols. Ces derniers pouvant être libres, estérifiés, sulfatés ou liés à un sucre.
- ✓ Les protéolipides, constitués d'une protéine et d'une ancre lipidique permettant le fichage de la protéine dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique (**Rejraji et al., 2009**).

#### **a-Le cholestérol :**

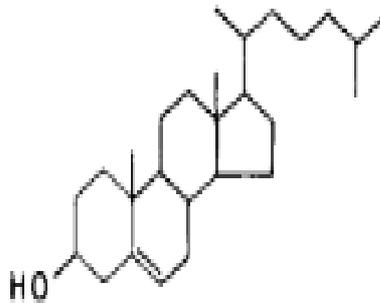
La distribution du cholestérol entre les membranes d'une cellule n'est pas uniforme. En fait, il est très disproportionné, le cholestérol se produisant à une concentration beaucoup plus élevée dans la membrane plasmique que dans de nombreuses membranes intracellulaires. La molécule de cholestérol est située de telle sorte que l'hydroxyle se trouve à proximité immédiate de l'ester de phospholipide carbonyle (**Yeagle, 1985**).

#### **Définition et structure :**

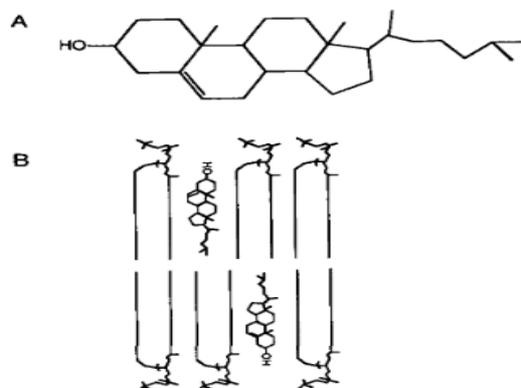
Le cholestérol est l'un des principaux composants lipidiques des membranes plasmiques des animaux avec de multiples effets sur les propriétés physiques des membranes, notamment l'ordre des membranes (fluidité), le comportement des phases, l'épaisseur et la perméabilité. Le cholestérol affecte également les attributs fonctionnels des membranes cellulaires tels que les activités de diverses protéines intégrales (**Crockett, 1998**). Le cholestérol est une

molécule hydrophobe et insoluble. Il ne peut donc se dissoudre dans un dilueur afin d'être directement incorporé à la semence (Salmon, 2015).

Sa structure est représentée dans les figures 06 et 07 ci-dessous :



**Figure 06 : Structure de cholestérol (Schroeder et al., 1991).**



**Figure 07: (A) Cholestérol. (B) La position du cholestérol dans une bicouche phospholipidique (Crockett, 1998).**

#### **Localisation et synthèse de cholestérol :**

Le cholestérol semble être enrichi dans le feuillet interne de la plupart des membranes de surface de cellules de mammifères examinées (Schroeder *et al.*, 1991).

Le réticulum endoplasmique et le peroxysome sont tous deux des sites de biosynthèse du cholestérol dans les hépatocytes de mammifères (**Crockett, 1998**).

### **b-Les phospholipides :**

#### **Définition et structure :**

Les phospholipides sont représentés comme ayant un groupe de tête sphérique avec des chaînes d'acyle gras s'étendant vers l'intérieur de la membrane. Cette disposition lamellaire oriente toutes les chaînes d'acyle gras pour fournir une barrière hydrophobe à travers laquelle l'eau et les molécules dissoutes dans l'eau ne passent que difficilement. Par conséquent, les molécules passent ou sont normalement transportées à travers des canaux ou des pores formés par des protéines. Peu ou pas de passage de molécules hydrophiles se produit dans les régions d'une membrane dépourvues de pores ou de canaux. Pour des raisons discutées plus loin, des changements délétères dans une membrane, résultant en des arrangements anormaux de phospholipides, peuvent permettre le passage rapide de molécules qui, autrement, passeraient très lentement à travers les membranes. Normalement, différents phospholipides sont disposés aléatoirement d'une manière boîteuse, et sont libres de se déplacer latéralement à l'intérieur d'un feuillet de la bicouche de la membrane (**Amann et Pickett 1987**). Cette structure est représentée dans les figures 08 et 09 ci-dessous :

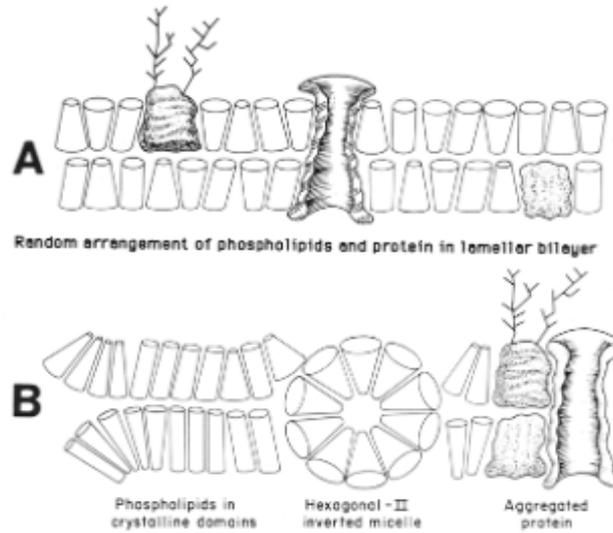


Figure 08 : Une représentation stylisée de l'arrangement des phospholipides (Amann et Pickett 1987).

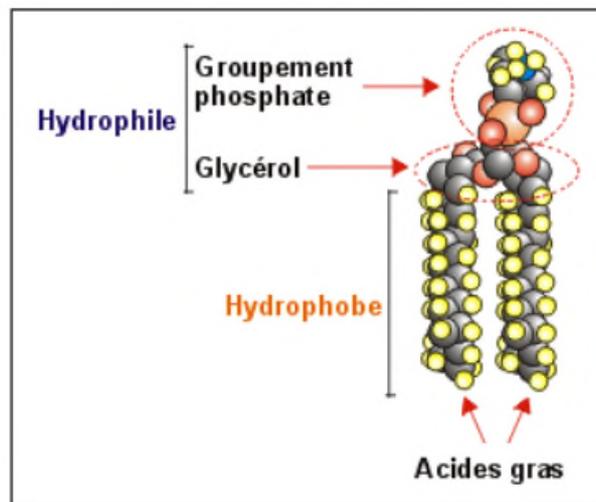


Figure 09 : Structure d'un phospholipide (Harb, 2012).

### Interactions des protéines lipidiques :

Les molécules de lipides peuvent être extraites ou échangées de la membrane plasmique des spermatozoïdes par des lipoprotéines spécifiques et des protéines de transfert de lipides (transport des lipides facilité par porteur). Ce processus semble jouer un rôle important dans la modification de la composition lipidique au site extracellulaire du plasma membrane des

spermatozoïdes pendant la capacitation. Un autre type d'interaction lipidique des protéines, qui est pertinent pour la capacité de fertilisation des spermatozoïdes, est l'interaction lipidique des protéines qui entraîne le couplage de la protéine à l'améno-membrane. Cela peut être sous la forme de liaisons protéine covalentes avec des chaînes d'acides gras (par exemple, des protéines myristoylées), des an-chors glycosylphosphatidylinositol (GPI) ou via des interactions protéiques électrostatiques avec des groupes de tête de lipides (via le groupe de tête phosphocholine de PC ou la fraction glycosidique des glycolipides) (Flesch et Gadella, 2000).

### I.4.2. les protéines membranaires :

#### I.4.2.1. Définition et structure :

Les protéines sont des substances amphiphiles, par la nature de leur colonne vertébrale, emportant des liaisons peptidiques, elles sont hydrophiles, par leur chaîne latérale elles portent des régions polaires, chargées ou hydrophobes (Etemadi, 1980). Les protéines membranaires sont classées selon leur degré d'association, aux membranes intrinsèques et extrinsèques comme il est indiqué dans la figure 10 ci-dessous :

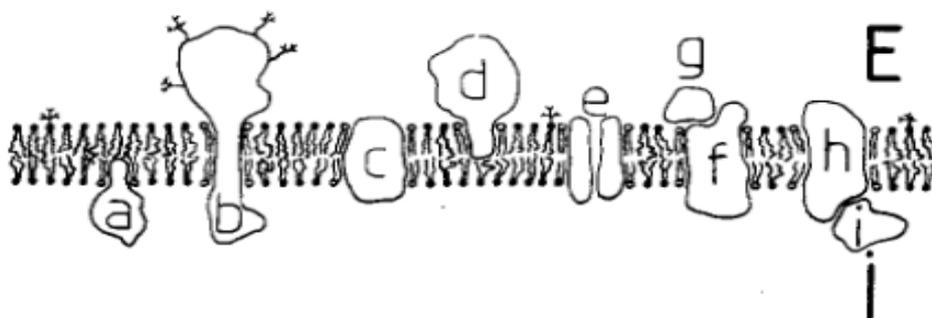


Figure 10 : Une membrane biologique (Etemadi, 1980).

(E) représente le côté non cytoplasmique et (I) le côté cytoplasmique. On y reconnaît en (a) une protéine intrinsèque de type endoprotéine, les glycolipides sont orientés vers le feuillet non cytoplasmique, les glycoprotéines comme en (b) ont la même orientation, (b), (c), (d), (e), (f) et (h) représentent les protéines intrinsèques de type ectoprotéines. On voit que ces protéines peuvent être plus ou moins enfouies dans la bicouche lipidique ; parmi elles la protéine (b) est une glycoprotéine transmembranaire, la protéine (d) ne présente pas une exposition du côté cytoplasmique, la protéine (e) est organisée en oligomère permettant le passage des ions ou des molécules. Si l'ouverture du passage nécessite de l'énergie ce sera le transport actif. En (g) et en (i) des protéines périphériques du côté non cytoplasmique et du

coté cytoplasmique sont montrées en interaction avec les protéines intrinsèques respectivement protéine(f) et protéine (h). En c est représentée une protéine intrinsèque largement enfouie clans la partie hydrophobe. On reconnaît les lipides interfaciaux au contact des protéines intrinsèques (Etemadi, 1980).

#### **I.4.2.2. Les types des protéines membranaires :**

##### **a-Les protéines intégrales ou intrinsèques :**

Elles sont fortement liées aux membranes par des forces hydrophobes. Les protéines intrinsèques ont tendance à s'agréger et à précipiter en solutions aqueuses à moins qu'on ne les solubilise avec des détergents ou des solvants organiques miscibles à l'eau, comme le butanol ou le glycérol. Certaines protéines intrinsèques sont si fortement liées aux lipides qu'il est nécessaire de se placer en conditions dénaturantes pour les en débarrasser. Les protéines intrinsèques solubilisées sont purifiées par plusieurs méthodes de fractionnement. Ce type de protéine est représenté dans la figure 11 ci-dessous :

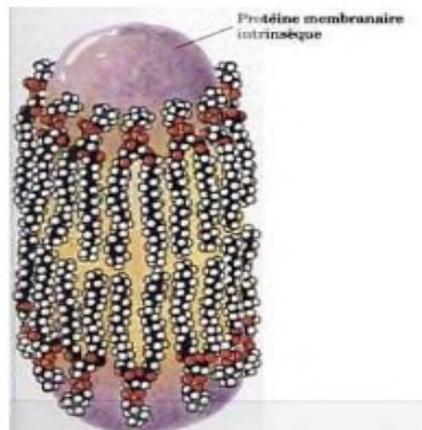


Figure 11 : Modèle d'une protéine membranaire intrinsèque (Harb, 2012).

##### **b-Les protéines périphériques ou extrinsèques :**

Elles sont dissociées des membranes par des techniques relativement douces qui laissent la membrane intacte, telles que le traitement par des solutions de sels de force ionique

élevée (ex. NaCl 1M), par des agents chélateurs des métaux, ou des changements de pH. Les protéines périphériques, le cytochrome c par exemple, sont stables en solutions aqueuses et ne se lient pas aux lipides. Elles s'associent à la membrane en se liant à sa surface, avec les groupements de tête de ses lipides ou avec des protéines intrinsèques, par interactions électrostatiques et liaisons hydrogènes. Les protéines périphériques débarrassées de la membrane se comportent comme des protéines globulaires hydrosolubles et peuvent être purifiées en tant que telles (**Harb, 2012**).

## **II. Les dommages de la membrane pendant la conservation :**

Pendant le processus de cryoconservation, un certain nombre de cellules souffrent d'une viabilité plus faible et d'un dysfonctionnement subléta. De nombreux stress sur les spermatozoïdes, dont la déstabilisation de la membrane plasmique, Comme le lipide est un constituant principal de la membrane plasmique des spermatozoïdes, la détérioration de la membrane peut se manifester par le changement de sa composition lipidique. Ainsi la diminution des acides gras insaturés liés aux phospholipides et l'augmentation du pourcentage d'acides saturés (**Purdy et Graham, 2004; Chakrabarty et al., 2007**).

Au fur et à mesure que les spermatozoïdes sont refroidis, la transition de phase membranaire se produit, les lipides s'agrègent en micro domaines, ce qui diminue la fonction de la membrane et induit des espaces membranaires entre le gel et les domaines membranaires fluides restants (**Mocé et al., 2010 b**). Cependant, lorsque le rapport du cholestérol aux phospholipides polyinsaturés est inférieur à peut-être 1: 2, le refroidissement entraîne le mouvement des molécules de phospholipides ayant une structure similaire dans des domaines où elles subissent une transition de phase d'un état liquide à un état cristallin (**Amann et Pickett, 1987**).

Le choc dû au froid est mis en évidence par la présence de nombreux spermatozoïdes nageant de manière circulaire, une perte prématurée de motilité, une diminution de la production d'énergie, une augmentation de la perméabilité de la membrane et une perte de molécules et d'ions intracellulaires. La survenue d'un choc froid ne se limite pas aux spermatozoïdes, mais se produit dans la plupart des cellules exposées à de basses températures sans geler (**Amann et Pickett, 1987**).

La cryoconservation des spermatozoïdes provoque des lésions cellulaires irréversibles entraînant une perte significative de spermatozoïdes viables après cryoconservation, Cela conduit à une réduction de la fertilité des spermatozoïdes cryoconservés par rapport aux échantillons non cryoconservés. Bien que la formation de cristaux de glace intracellulaires due à une vitesse de congélation inadéquate puisse être une source majeure de cryodommages pour de nombreux types cellulaires , ce n'est pas pour les spermatozoïdes , par conséquent, la déstabilisation de la membrane plasmique est probablement la principale source de cryodommages pour les spermatozoïdes . D'autres dommages cellulaires importants sont induits lors de la cryoconservation en raison de stress osmotique et oxydatif (**Glazar et al., 2009**).

la congélation et la décongélation induisent des altérations énormes du volume d'eau cellulaire, qui confèrent une contrainte mécanique considérable aux membranes cellulaires. Lors du refroidissement, les transitions de phase modifient l'ultrastructure de la membrane du sperme. La cryoconservation affecte la composition lipidique et l'organisation des membranes plasmiques du sperme. Les dommages ultra-structuraux aux membranes dus à la cryoconservation les stabilisent, prédisposant les spermatozoïdes à des défauts morphologiques importants, tels que des acrosomes manquants et anormaux. Les transitions de phase et autres modifications ultrastructurales des membranes plasmiques pendant le refroidissement et le réchauffement peuvent jouer un rôle dans la faible fertilité des spermatozoïdes cryoconservés (**Bailey et al, 2000**).

L'agrégation des protéines pourrait entraîner une augmentation de la perméabilité de la membrane et une diminution de la fonction métabolique (**Amann et Pickett, 1987**).

Les dommages à la membrane sont l'une des principales raisons de la motilité et de la fertilité réduites des spermatozoïdes pendant la cryoconservation entraînant la mort cellulaire (**Chakrabarty et al., 2007**).

une augmentation profonde de l'hydrophobicité de la membrane cellulaire est l'un des principaux mécanismes par lesquels les spermatozoïdes acquièrent le potentiel de résister ou de combattre des facteurs de stress tels que le cryodommage (**Chakrabarty et al., 2007**).

Les membranes du sperme jouent un rôle important dans la résistance du sperme aux dommages causés par le choc du froid (**Mocé et al., 2010 b**).

### **III. Le cholestérol :**

#### **III.1. Les Cyclodextrines :**

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques obtenus par dégradation enzymatique de l'amidon qui possèdent une face hydrophile externe et un noyau hydrophobe interne. Ces molécules ont une forte affinité pour les stérols *in vitro* (**Mocé et al., 2010 b**), qui peut encapsuler des composés hydrophobes, tels que le cholestérol, pour les rendre solubles, ont été utilisées pour insérer ou éliminer le cholestérol des membranes synthétiques et cellulaires (**Mocé et al., 2010a**). Lorsque le cholestérol est couplé à la cyclodextrine, le complexe permet l'incorporation de cholestérol dans tous les compartiments de membranes cellulaires. La méthyl  $\beta$ -cyclodextrine est la cyclodextrine la plus utilisée pour le traitement de la semence en raison de sa meilleure affinité pour le cholestérol (**Salmon, 2015**). Les

spermatozoïdes incubés avec du CLC avant la congélation ont permis de récupérer des pourcentages plus élevés de cellules mobiles et viables après cryoconservation (**Purdy et Graham, 2004**).

### **III.2. L'effet du cholestérol sur la membrane :**

Il est également bien connu que les variations du taux de cholestérol membranaire ont un impact majeur sur les propriétés physiques de la bicouche lipidique membranaire, comme l'ordre des phospholipides, les changements dans la fluidité membranaire, et le module d'élasticité de la membrane, une mesure de la déformabilité de la membrane (**Byfield et al., 2004**). Le cholestérol module la fluidité des membranes en interagissant avec les chaînes d'acyle gras des phospholipides et le rapport cholestérol: phospholipides est un déterminant important de la fluidité des membranes. Ce rapport est très élevé (0,88–0,99) chez les spermatozoïdes des espèces dont le sperme résiste au choc du froid (lapin et humain) et faible (0,38 et 0,45) chez les spermatozoïdes des espèces dont le sperme est sensible au choc dû au froid (taureau et bœlle) (**Mocé et al., 2010 b**).

Le cholestérol a de multiples effets sur les membranes, y compris la stabilisation de la membrane aux basses températures, la réduction de la perméabilité de la membrane, la facilitation des caractéristiques morphologiques de la membrane et l'activation des interactions cellule-cellule, influant sur la transition de phase de la membrane, fournissant des micro-environnements (chimiques et / ou physiques) appropriés pour les protéines associées aux membranes et servant d'antioxydant membranaires (**Mocé et al., 2010a**). La stabilisation membranaire se produit lorsque la membrane subit la transition de phase, de la phase fluide à la phase gel, lorsque la température diminue. Lorsque le cholestérol est ajouté aux liposomes, la température de transition de phase lipidique des membranes liposomales est réduite, et si le cholestérol est suffisamment ajouté, la transition de phase était éliminée. L'incorporation et l'élimination du cholestérol des membranes cellulaires sont notés pour de nombreux types cellulaires, y compris le sperme. En particulier, les cyclodextrines qui ont un centre hydrophobe, éliminent efficacement le cholestérol des membranes plasmiques des spermatozoïdes, induisant la capacitation des spermatozoïdes (**Purdy et Graham, 2004**).

Des taux de cholestérol membranaires élevés inhibent la cristallisation des chaînes hydrocarbonées membranaires à basse température, éliminant ainsi la transition de phase (**Purdy et Graham, 2004**).

### **III.3. L'efflux de cholestérol responsable du changement de la fluidité membranaire :**

L'une des premières modifications décrites lors de la capacitation des spermatozoïdes de mammifères est la perte de cholestérol de la membrane plasmique. Le cholestérol et le desmostérol sont les principaux stérols retirés de la membrane spermatique par des accepteurs de stérol comme l'albumine et le HDL «high-density lipoproteins» présents dans le 28 milieu extracellulaire. Pendant la maturation épидидymaire du spermatozoïde, le cholestérol est incorporé en grande quantité dans la membrane spermatique. Ce cholestérol sert à stabiliser la membrane plasmique du spermatozoïde pendant le transit épидидymaire et dans le tractus génital femelle jusqu'à l'arrivée à l'oviducte afin d'éviter une capacitation trop précoce. La fluidité membranaire (notamment la mobilité des phospholipides dans la bicouche) est limitée tout comme la perméabilité membranaire aux ions ou encore l'insertion de protéines. Cette conformation de la membrane plasmique pourrait rendre difficile l'extraction de cholestérol pour initier la capacitation. Il a récemment été montré que le stress oxydatif contribuait grandement à faciliter l'efflux de cholestérol. En effet, les stérols peuvent être oxydés pendant la capacitation ce qui augmente leur hydrophilicité et donc leur extrait de la membrane spermatique par l'albumine. L'efflux de cholestérol de la membrane spermatique lors de la capacitation entraîne une augmentation de la fluidité membranaire qui est connue pour être responsable de l'activation de la voie de signalisation menant à la phosphorylation des protéines spermatiques. De plus, le spermatozoïde subit, après l'efflux de cholestérol, des modifications architecturales sous l'influence de la relocalisation des microdomaines membranaires. Les microdomaines membranaires (également appelés «radeaux lipidiques») sont enrichis en cholestérol, en sphingolipides et en protéines impliquées dans la signalisation cellulaires. Les microdomaines sont décrits comme des structures dynamiques permettant de concentrer certaines molécules et d'en exclure d'autres afin de favoriser les interactions protéines-protéines. Toutefois, après l'efflux de cholestérol, ces microdomaines sont relocalisées au niveau de la crête apicale de l'acrosome pour permettre l'arrimage de la membrane acrosomique à la membrane plasmique afin d'initier la fusion membranaire (Salmon, 2015).

### **IV. L'intérêt du cholestérol sur la membrane spermatique :**

Le cholestérol joue un rôle important dans de nombreuses fonctions du sperme, y compris les propriétés de la membrane, le traitement du sperme avec des cyclodextrines

chargées de cholestérol augmente les taux de cryosurvie et la qualité du sperme après la décongélation (Mocé et al., 2010a). il a également un rôle important dans la réduction de la perméabilité des membranes spermatiques (Salmon, 2015).

Le cholestérol a un rôle dans le contrôle de la fluidité des chaînes hydrocarbonées du phospholipide des membranes, apportant une structure cohérente stable sur une large gamme de températures et permettant une variation de la composition en acides gras, qui elle-même influe sur la fluidité de la membrane (Darin-Bennett et White, 1977).

Il contrôle la structure de la membrane en interagissant avec les chaînes hydrocarbonées phospholipidiques et, à des températures inférieures à la transition de phase, force les chaînes à part, rendant la membrane plus stable, réduisant ainsi la sensibilité de la membrane du sperme aux effets du froid (Mocé et al., 2010 b).

L'ajout du cholestérol aux membranes améliore la stabilité du sperme pendant la cryoconservation, et améliore l'intégrité et la qualité des spermatozoïdes après décongélation (Oliveira et al., 2010).

Le cholestérol joue un rôle important dans la stabilisation des membranes des spermatozoïdes. Pendant la capacitation, les membranes spermatiques perdent du cholestérol, ce qui les rend plus fusogéniques, permettant ainsi à la réaction acrosome de se produire. La capacitation des spermatozoïdes peut être induite, en ajoutant des cyclodextrines au sperme, qui induisent un efflux de cholestérol à partir de la membrane du sperme. De même, lorsque les spermatozoïdes sont refroidis ou congelés, les membranes subissent une transition de phase, qui se traduit par un réarrangement des lipides et des protéines membranaires et une perte de lipides des membranes, qui à son tour provoque une agrégation de protéines et de lipides au sein de la membrane, et une perte de perméabilité membranaire sélective, résultant en des spermatozoïdes qui sont prématurément capités. Étant donné que l'efflux de cholestérol, de la membrane du spermatozoïde, joue un rôle important dans sa capacitation, il est possible que l'augmentation de la teneur en cholestérol du sperme, en utilisant la technologie CLC, puisse réduire la capacitation prématurée du sperme, augmentant ainsi la durée de vie d'une cellule de sperme cryoconservée, en plus d'augmenter le nombre de spermatozoïdes qui survivent à la cryoconservation (Purdy et Graham, 2004).

En général, plus il y a de cholestérol présent, moins la partie d'une membrane est flexible ou fluide. Le cholestérol aide à maintenir les phospholipides dans un arrangement lamellaire aléatoire (**Amann et Pickett, 1987**).

Le traitement CLC en augmentant le cholestérol membranaire favorise ainsi l'incorporation d'agent cryoprotecteur avant la congélation et réduit le transfert d'eau au travers les membranes pendant la cryoconservation, protégeant ainsi les fonctions spermatiques (**Salmon, 2015**).

# **Conclusion**

**Conclusion :**

D'après notre recherche bibliographique, le sperme frais présente un taux du succès dans l'insémination artificielle très satisfaisant, contrairement au sperme cryoconservé qui présente des taux du succès plus variables.

Le cholestérol est un cryoprotecteur bénéfique aux cellules puisqu'il renforce la membrane du spermatozoïde et garde sa stabilisation et sa résistance contre le choc thermique lors de la cryoconservation.

**Références**  
**Bibliographique**

**-A-**

**Akpo Y., Dotché I. O., Tobada P., Djago Y., Youssao Abdou Karim I. et Kpodékon M. T., 2009.** Insémination artificielle des lapins de race commune au Bénin : dilueurs à base de produits locaux. *Livestock Research for Rural Development*, 30 (8).

**Amann R. P. et Pickett B. W., 1987.** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7 (3) 145-173.

**Amini M. R., Kohram H., Zare Shahaneh A., Zhandi M., Sharideh H. et Nabi M. M., 2015.** The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cell Tissue Bank*, 16: 587-592.

**Amokrane A., Kaidi R. et Iguer-Ouada M., 2020.** The effect of Vitamin E and Poly Ethylene Glycol (PEG) association on chilled rabbit sperm: impact on sperm motility and oxidative stress status. *CryoLetters* 41 (1), 19-25.

**Amrane Y. et Hidri N., 2013.** Optimisation de la conservation par réfrigération du sperme aviaire. Mémoire Fin d'Etude des Sciences Biologiques de l'Environnement. Université de Abderrahmane Mira, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Béjaïa, 53p.

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

**Azzi A. et Stocker A., 2000.** Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research*, 39: 231-255.

**-B-**

**Bailey J. L., Bilodeau J. F. et Cormier N., 2000.** Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. Minireview, *Journal of Andrology*, 21 (1), January/February: 1-7.

**Baril G., Chemineau P., Cognie Y., Guérin Y., Leboeuf B., Orgeur P. et Vallet J. C. 1993.** Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome. pp. 129-135.

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

**Bouhala S. et Boukerram N., 2014.** Optimisation de la conservation du sperme de lapin par congélation. Mémoire de Fin d'étude, Université Abderrahmane Mira, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Bejaia, 83 p.

**Boulbina I., AinBaziz H., Ilès I., Belabbas R., Benali N., Zenia S. et 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 (*Oryctolagus Cuniculus*). *Livestock Research for Rural Development* 24 (1), p 10.

**Byfield F. J., Aranda-Espinoza H., Romanenko, V. G., Rothblat G. H. et Levitan I., 2004.** Cholesterol Depletion Increases Membrane Stiffness of Aortic Endothelial Cells. *Biophysical Journal*, 87(5), 3336-3343.

-C-

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

**Carr A. C. et Frei B., 1999.** Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69: 1086-1107.

**Castellini C. et Dal bosco A., 1998.** Inseminazione artificiale nel coniglio: fisiologia del maschio, produzione e conservazione del seme. *Large Animals Review*, 4, 3: 87-94.

**Chakrabarty J., Banerjee D., Pal D., De J., Ghosh A. et Majumder G.C., 2007.** Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology*, 54: 27-35.

**Cossins E., Lee R. et Packer L. 1998.** ESR studies of vitamin C regeneration, order of reactivity of natural source phytochemical preparations. *Biochemistry and molecular biology international*, 45 (3), July: 583-597.

**Crockett E. L., 1998.** Cholesterol Function in Plasma Membranes from Ectotherms: Membrane-Specific Roles in Adaptation to Temperature. *AMER. ZOOL.*, 38: 291-304.

**Cuvelier C., Dotreppe O. et Istasse L., 2003.** Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann. Méd. Vét.*, 147: 315-324.

**-D-**

**Darin-Bennett A. et White I. G., 1977.** Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14(4): 466–470.

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

**-E-**

**Etemadi A. H., 1980.** Tendances organisationnelles des constituants des membranes biologiques et les problèmes de l'asymétrie de leur distribution. *BIOCHIMIE*, 62 : 111-134.

**-F-**

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

**Fanaei H., Khayat S., Halvaei I., Ramezani V., Azizi Y., Kasaeian A., Mardaneh J., Parvizi M. R. et Akrami M., 2014.** Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples. *Iranian Journal of Reproductive Medecine*, 12(2), 103-110.

**Flesch F. M. et Gadella B. M., 2000.** Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469 : 197-235.

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

**-G-**

**Giusti F., Mansis S. et Pucci B., 2002.** Influence des interactions protiques sur les cinétiques de polymérisation du tris(hydroxyméthyl)acrylamidométhane (THAM) et de ses dérivés. *New J. Chem*, 26, 1724-1732.

**Glazar A. I., Mullen S. F., Liu J., Benson J. D., Critser J. K., Squires E. L. et Graham J. K., 2009.** Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology*, 59 (2), 201–206.

**-H-**

**Hanzen Ch., 2016.** La propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme des ruminants.

**Harb F. (2012).** Etude d'un système biomimétique simple: diffusion brownienne et mobilité électrophorétique d'une protéine membranaire modèle insérée dans une bicouche lipidique supportée. Thèse de Doctorat de Physique eu Science de la Matière. Université Aix Marseille, Faculté de Biophysique, Marseille, 182p.

**Hashem N. M., El-Hady A. A. et Hassan O., 2013.** Effect of vitamin E or propolis supplementation on semen quality, oxidative status and hemato-biochemical changes of rabbit bucks during hot season. *Livestock Science*, 157: 525-526.

**Hopper R. M. et King E. H., 2014.** Evaluation of Breeding Soundness: Basic Examination of the Semen. *Bovine Reproduction*, 68-78.

**-J-**

**Joly T. et Theau-Clément M., 2000.** Reproduction et Physiologie de la Reproduction. Valencia 2000 "Ombres et Lumières", 19-24.

**-K-**

**Kargar R., Forouzanfar M., Ghalamkari G. et Nasr Esfahani M. H., 2017.** Dietary flax seed oil and/or Vitamin E improve sperm parameters of cloned goats following freezing-thawing. *Cryobiology*, 74: 110-114.

**-L-**

**Lenzi A., Picardo M., Gandin L. et Dondero F., 1996.** Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*, Vol. 2, No. 3, pp. 246-256.

**Liebler D. C., 1993.** The Role of Metabolism in the Antioxidant Function of Vitamin E. *Critical Reviews in Toxicology*. 23(2): 147-169.

**Lucy J. A., 1972.** Functional and structural aspects of biological membranes: a suggested structural role for vitamin e in the control of membrane permeability and stability. *Annal of the New York Academy of Sciences*, 203: 4-11.

**-M-**

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

**Mocé E., Blanch E., Tomás C., et Graham J. K., 2010 a.** Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *Reprod. Dom. Anim.*, 45, 57–66.

**Mocé E., Purdy P.H., et Grahama J.K., 2010 b,** Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 118: 236-247.

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

**-N-**

**Naughton C. K., Nelson D. R. et Thomas A. J., 2003.** Development of an inexpensive artificial vagina for semen collection from rabbits. *Journal of Andrology*, Vol. 24, No. 5: 712-715.

**-O-**

**Oliveira C. H., Vasconcelos A. B., Souza F. A., Martins-Filho O. A., Silva M. X., Varago F. C. et Lagares M. A., 2010.** Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, 118(2-4): 194-200.

**Orgebin-Crist M. C., 1967.** Maturation of Spermatozoa in The Rabbit epididymis : Fertilizing ability and embryonic mortality in does inseminated with epididymal spermatozoa. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 7(4): 373-389.

**O.E.B., 1996.** Procède de dilution et de conservation du sperme de lapin. Gazette, Office Européen des Brevets, France. pp. 1-7.

**-P-**

**Purdy P. H. et Graham J., 2004.** Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology, 48(1): 36-45.

**-R-**

**Rejraji H., Saez F. et Drevet J. R., 2009.** Évolution de la composante lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes durant la maturation épидидymaire. Androl, 19, 17-28.

**Rigal F. B. G., 2008.** Comparaison de la qualité de la semence de taureaux collectés à l'électro-éjaculateur ou au vagin artificiel. Thèse de Doctorat en Vétérinaire. Université Paul-Sabatier, Toulouse, 99 p.

**Roberts M. J., Bentley M. D. et Harris J. M., 2002.** Chemistry for peptide and protein PEGylation. Advanced Drug Delivery Reviews, 54: 459-476.

**Rosato M. P. et Iaffaldano N., 2013.** Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. Theriogenology, 79: 508-516.

**-S-**

**Salmon M. V. (2015).** Le cholestérol comme agent cryoprotecteur pour la congélation des semences animales. Thèse de Doctorat en Science Animal. Université de Laval, Québec, Canada, 234 p.

**Schroeder F., Jefferson J. R., Kier A. B., Knittel J., Scallen T. J., Wood W. G. et Hapala I., 1991.** Membrane Cholesterol Dynamics: Cholesterol Domains and Kinetic Pools. Membrane Cholesterol Domains, P.S.E.B.M., Vol. 196, 235-252.

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

**Surai P., Kostjuk I., Wishart G., Macpherson A., Speake B., Noble R., Ionov I. et Kutz, E., 1998.** Effect of Vitamin E and Selenium Supplementation of Cockerel Diets on Glutathione Peroxidase Activity and Lipid Peroxidation Susceptibility in Sperm, Testes, and Liver. *Biological Trace Element Research*, 64: 119-132.

-V-

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

-W-

**Wang W., Yang X., Fang Y. et Ding J., 2009.** Preparation and performance of form-stable polyethylene glycol/silicon dioxide composites as solid-liquid phase change materials. *Applied Energy*, 86: 170-174.

**Wright M. M., Howe A. G. et Zarembeg V., 2004.** Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. *Biochem. Cell Biol.*, 82: 18-26.

-Y-

**Yeagle P. L., 1985.** Cholesterol and the cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 822 : 267-287.

**Youbare B. (2013).** Insemination artificielle bovine au burkina faso : bilan et perspectives. Thèse de Doctorat Des Sciences et Medecine Veterinaires. Université Cheikh Anta Diop, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie, Dakar, 156 p.

-Z-

**Zhu Z., Fan X., Pan Y., Lu Y. & Zeng W., 2017.** Trehalose improves rabbit sperm quality during cryopreservation. *Cryobiology*, 75: 45-51.

*Site web :*

**ACMN. 2019.** Association Canadienne Des Médecins vétérinaires. Site Web : <https://www.veterinairesauCanada.net/news-events/news/2019-annual-report>. Consulté Août 2020.

*Annexes :*

**Annexe n°1 :** Les qualités du sperme selon le pourcentage des spermatozoïdes mobiles :

<b>NOTE</b>	<b>DESCRIPTION</b>
<b>(1)</b>	<b>un sperme de faible qualité</b>
<b>(2)</b>	<b>Un sperme de qualité correcte</b>
<b>(3)</b>	<b>Un sperme de bonne qualité</b>
<b>(4)</b>	<b>Un sperme de très bonne qualité</b>

**Résumé :**

L'objectif de notre synthèse bibliographique est de déterminer l'intérêt du cholestérol dans la conservation du sperme du lapin .

La conservation du sperme est soit par réfrigération ou par congélation. Dans les deux cas, un milieu de conservation contenant des cryoprotecteurs nécessaires à la survie des spermatozoïdes est indispensable.

Les milieux de conservation du sperme sont nombreux ainsi que leurs composants, à savoir, la Vit E et la Vit C qui ont un effet antioxydant, le PEG qui a un rôle de solubilisation des composants organiques et le cholestérol lié au cyclodextrine (CLC) qui renforce et stabilise la membrane plasmique du spermatozoïde.

Le cholestérol est un cryoprotecteur, il joue un rôle essentiel dans la préservation et la stabilisation de la structure membranaire du spermatozoïde cryoconservé.

**Mots clés : Cholestérol, Sperme du lapin , cryoconservation, Membrane plasmique.**

**Abstract :**

The objective of our bibliographic synthesis is to determine the interest of cholesterol in the storage of rabbit sperm.

The preservation of the sperm is either by refrigeration or by freezing, In both cases, a storage medium containing the necessary cryoprotectants to the survival of sperm is essential.

Sperm storage media are numerous as well as their components, namely Vit E and Vit C which have an antioxidant effect, PEG which has a role of solubilizing organic components and cholesterol bound to cyclodextrin (CLC) which strengthens and stabilizes the plasma membrane of the spermatozoa.

Cholesterol is a cryoprotector, it plays an essential role in the preservation and stabilization of the membrane structure of cryopreserved spermatozoa.

**Keywords: Cholesterol, Rabbit sperm, cryopreservation, Plasma membrane.**