

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة سعد دحلب البليدة (1)
Université SAAD DAHLEB-Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie
Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biologie et physiologie de la reproduction

Thème

**Etude Comparative De L'Effet De Deux Dilueurs (Tris Et Galap)
Sur La Conservation De Semence Du Lapin Par Le Système
CASA à 4°C**

Présenté par :

Soutenu le : 16/07/2025

Nom et prénom : CHARIF Marwa

Nom et prénom : MEBDOUA Maissa

Devant le jury :

MME BENAZOUZ F.

MCA /USDB1

Présidente

Mr BESSAAD MA.

MCA/USDB1

Examineur

Mme TARZAALI D.

MCA/USDB1

Promotrice

Année universitaire : 2024/2025

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nous remercions ALLAH, le tout puissant et le miséricordieux, de nous avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à terme notre mémoire de Master.

Un grand merci à notre promotrice Dr **TARZAALI D**, Maître de conférences A, à l'institut des sciences vétérinaires de l'université de Blida 1, qui a accepté d'encadrer ce travail, et pour sa disponibilité, merci beaucoup pour l'intérêt que vous avez toujours manifesté par vos conseils, critiques constructives qui ont valorisé ce travail.

Nous remercierions les membres du jury :

Dr **BENAZOUZ F**, Maître de conférences A, à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Blida 1, nous tenons à vous assurer nos sincères remerciements pour avoir accepté la présidence du jury. Vos conseils éclairés ne manqueront pas d'enrichir cette étude et nous vous sommes très reconnaissantes de votre contribution.

Dr **BESSAAD MA**, Maître de conférences A, à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Blida 1, pour avoir accepté très aimablement de faire partie de ce jury de mémoire et pour votre apport critique sur ce travail. Sincères remerciements.

Nous exprimons toute notre reconnaissance à Professeur **BOUYOUCHEF A**, Directeur du laboratoire de LBRA pour nous avoir accueilli au sein du laboratoire et nous avoir permis de réaliser notre partie expérimentale. Avec une pensée particulière à Mme **BENTOURA Cihame** et Mlle **KABIR Wafa**, ingénieurs au laboratoire, pour leur aide et encouragement au cours de la réalisation de ce travail. Sincères remerciements.

Finalement, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

En hommage à Allah, je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance pour Sa guidance et Son soutien constants tout au long de ce cheminement. Ce mémoire dépasse le simple cadre d'un travail académique ; il incarne mes rêves, mes aspirations et le fruit de mes efforts.

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études

A mes chères sœurs Fatna , Assia , saïda et ilham Soundous pour leurs encouragements et leur soutien moral.

A mes chers frères, Messoud , tayab, pour leur appui et leur encouragement,

A toute ma 2ème famille. Mes amies :

Ikram, khaoula , maroua

MAISSA

Dédicaces

Je tiens avant tout à exprimer ma gratitude envers ALLAH, Pour m'avoir guidé et soutenu tout au long de la réalisation de ce mémoire.

A ma mère et mon père, le symbole d'amour, de don et de patience, que dieu vous bénisse pour moi.

A mon joyau précieux wissam.

A mes frères.

A ma plus chère amie khawla.

A ma binôme de pfe, maïssa.

MARWA

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre I : Données bibliographiques	
I.1. Généralités sur l'anatomie et physiologie l'appareil génital mâle	2
I.1.1 Anatomie de l'appareil génital mâle	2
I.1.1.1 Testicules	2
I.1.1.2 Epididyme	3
I.1.1.3 Canal déférent	3
I.1.1.4 Urètre	3
I.1.1.5 Pénis	3
I.1.1.6 Glandes annexes	4
I.1.2. Physiologie de la reproduction du lapin	4
I.1.2.1.Développement des gonades	4
I.1.2.2 Puberté	5
I.1.2.3. Spermatogenèse	5
I.1.2.4. Maturation des spermatozoïdes	6
I.2. Sperme du lapin	6
I.2.1. Composition du sperme	7
I.2.1.1 Spermatozoïdes	7
I.2.1.2. Plasma séminal	7
I.2.1.3. Gel	7
I.2.2. Caractères du sperme	8

I.2.2.1. Couleur	8
I.2.2.2. Volume	8
I.2.2.3. pH	8
I.2.2.4. Motilité massale	8
I.2.2.5. Motilité individuelle	8
I.2.2.6. Concentration	9
I.2.2.7. Vitalité	9
I.2.2.8. Morphologie	9
I.2.3. Anomalies du sperme	10
I.2.3.1. Anomalie de la tête	10
I.2.3.2. Anomalies de la pièce intermédiaire	11
I.2.3.3. Anomalies du flagelle	12
I.2.4. Facteurs influençant sur la production et la qualité du sperme	12
I.2.4.1. Age et race	12
I.2.4.2. Saison	13
I.2.4.3. Nutrition	13
I.2.4.4. Température	13
I.2.4.5. Fréquence de collecte	13
I.2.5. Conservation de sperme	14
I.2.5.1. A l'état frais « réfrigération »	14
I.2.5.2. Congélation	14
I.2.6. Principes généraux	14
I.2.6.1. Utilisation des dilueurs	14
I.2.6.2. Caractéristiques du milieu de dilution	15

I.2.6.3. Composition des dilueurs	15
I.2.7. Différents dilueurs utilisés pour le lapin	16
Chapitre II : Matériel et méthodes	
II.1 Objectifs	17
II.2 Lieu et durée de l'expérimentation	17
II.3. Bâtiment d'élevage	17
II.4 Aliment	18
II.5 Eau de boisson	18
II.6 Matériel	19
II.6.1. Matériel biologique	19
II.6.2. Matériel non biologique	19
II.7 Méthodes	19
II.7.1 Préparation des dilueurs	20
II.7.2 Récolte de la semence	21
II.7.2.1 Préparation des mâles à la récolte de la semence	21
II.7.2.2 Préparation du matériel de récolte de la semence	21
II.7.2.3 Technique de récolte	22
II.7.3 Analyse du sperme	23
II.7.3.1 Examen macroscopique	23
II.7.3.2 Examen microscopique	25
II.7.3.2.1. Manipulation du système CASA	25
II.7.3.2.2. Estimation de la motilité massale	26
II.7.3.2.3. Motilité individuelle	28

II.7.3.3. Détermination de la concentration	28
II.7.3.4. Estimation de la vitalité	30
II.7.3.5. Évaluation de la morphologie	31
II.7.4 Étapes de dilution du sperme de lapin et conservation par réfrigération	32
Chapitre III : Résultats et discussion	
III.1 Résultats	33
III.1.1 Analyse de la semence fraîche avant conservation à 4°C	33
III.1.1.1. Taux de la récolte spermatique utile	33
III.1.1.1.1. Analyse macroscopique	34
III.1.1.1.2 Analyse microscopique	35
III.1.2. Effet des dilueurs sur la qualité spermatique durant la conservation à 4 °C	38
III.1.2.1. Motilité progressive	38
III.1.2.2. Vitalité	39
III.2. Discussion	42
III.2.1. Analyse de la semence fraîche avant conservation (J0)	42
III.2.1.1 Analyse macroscopique	42
III.2.1.2. Analyse microscopique	43
III.2. Analyse de la semence fraîche et diluée durant la conservation à 4°C (J1, J2 et J3)	45
III.2.1. Motilité progressive	45

III.2.2. Vitalité	45
Conclusion	49
Références bibliographiques	50
ANNEXE	

Liste des figures

Figure 1 : Appareil reproducteur de lapin mâle (Lebas et <i>al.</i> , 1996).	2
Figure 2 : Etapes de la spermatogenèse (Campeau-Péloquin et Roy, 2019).	6
Figure 3 : Structure du spermatozoïde de lapin (Mariana, 2006).	7
Figure 4 : Illustrations des anomalies de taille de la tête de spz (Auger et Eustache, 2000).	10
Figure 5 : Illustrations des anomalies de forme et de texture de la tête de spermatozoïdes (Auger et Eustache, 2000).	11
Figure 6 : Illustrations les anomalies de la pièce intermédiaire de spermatozoïdes (Auger et Eustache, 2000).	11
Figure 7 : Illustrations des anomalies du flagelle (Auger et Eustache, 2000).	12
Figure 8 : Bâtiment d'élevage cunicole)	17
Figure 9 : Cages individuelles	17
Figure 10 : Aliment granulé.	18
Figure 11 : Bac d'eau	18
Figure 12 : Lapins de souche synthétique	19
Figure 13: Différentes étapes du protocole expérimental	20
Figure 14 : Etapes de préparation du dilueur D2.	21
Figure 15 : Préparation du vagin artificiel	22
Figure 16 : Etapes des la techniques de la récolte (a : femelle sur la cage ; b : vagin artificielle près du périnée ; c : chevauchement du mâle	22
Figure 17 : Evaluation de la couleur	24
Figure 18 : Mesure du pH	24
Figure 19: Conservation des échantillons à 37 ° (a: bouteille thermique ; b:bain marie)	25
Figure 20 : Système CASA	26

Figure 21 : Étapes de l'évaluation de la motilité massale (a : préchauffage de la lame ; b : homogénéisation de la semence ; c : une goutte desperme sur la lame ; d : observation)	27
Figure 22 : Etapes d'évaluations de la concentration des spermatozoïdes (a : fixation de la semence ; b : homogénéisation; c : dépôt de la semence diluée dans la cellule de Thoma ; d : Observation au microscope)	29
Figure 23: Etapes de l'évaluation de la vitalité (a, b, c, d, e)	30
Figure 24 : Observation des spermatozoïdes vivants (a) et morts (b) après coloration à l'éosine-nigrosine (a, b et c)	31
Figure 25 : Différentes anomalies observées par le système CASA	31
Figure 26 : Pourcentage des spermatozoïdes normaux et anormaux	36
Figure 27 : Pourcentage des anomalies morphologiques des spermatozoïdes.	37
Figure 28: Effet des dilueurs D1 (Galap) et D2 (Tris) sur la progression des spermatozoïdes en fonction de la durée de conservation de la semence. F : semence fraîche (témoin), D : dilueur, J : jour.	38
Figure 31 : Effet du dilueur D1 sur la vitalité des spermatozoïdes en fonction de la durée de conservation. F : fraîche, D : dilueur, J : jour.	40
Figure 32 : Effet du dilueur D2 sur la vitalité des spermatozoïdes en fonction de la durée de conservation. F : fraîche, D : dilueur, J : jour.	40
Figure 33 : Comparaison entre la vitalité de la semence fraîche et les deux dilueurs	41

Liste des tableaux

Tableau 1 : Grille de Roca (2005) pour la notification de la couleur de la semence	23
Tableau 2 : Echelle de Petit jean (1965) pour notation de la motilité massale.	27
Tableau 3: Echelle d’Andrieu (1974) pour la notation de la motilité individuelle.	28
Tableau 4: Taux des réponses aux sollicitations et des semences analysées des lapins mâles	33
Tableau 5 : Valeurs moyennes des paramètres macroscopique de la semence fraîche	34
Tableau 6 : Valeurs moyennes des paramètres macroscopique (Motilité massale et individuel, concentration et la vitalité) de la semence fraîche	35

Liste des abréviations

CASA : Computer Assisted Sperm Analysis.

DMSO : Diméthyle Sulfoxide.

EG : Éthylène Glycol.

pH : Potentiel hydrogène.

MM : Motilite Massale.

MI : Motilité individuelle.

SPZ : Spermatozoïdes

PI : Piece intermediare.

Résumé

L'objectif de notre expérimentation est d'analyser l'effet de deux dilueurs, Galap (D1) et Tris (D2) sur la qualité macroscopique et microscopique de la semence, collectée chez six lapins de souche synthétique, âgés de 20 mois et conservé à une température de 4 °C pendant (24, 48 et 72 heures).

Nous avons utilisé le système CASA (computer assisted sperm analysis) pour l'analyse des paramètres microscopiques de la semence. Les résultats de l'analyse microscopique de cette dernière ont montré qu'il y a une différence entre les deux dilueurs en ce qui concerne la motilité du D1 ($j_1 = 4,25\%$ vs $j_3 = 1,25\%$) et du D2 ($j_1 = 0,34$ vs j_2 et $j_3 = 0\%$) et la vitalité du D1 ($j_1 : 58,2\%$ vs $j_3 = 25\%$) et pour le D2 ($j_1 = 17$ vs $j_3 = 0$). Nos résultats indiquent que le dilueur D1 (Galap) avait un meilleur effet sur la conservation de la semence du lapin de la souche synthétique par rapport au dilueur D2 (TRIS).

En conclusion, nous avons constaté que la vitalité et la motilité de la semence du lapin de la souche synthétique sont influencées par le type du dilueur et la durée de conservation de la semence.

Mots clés : semence, lapin, souche cunicole synthétique, Galap, tris, vitalité spermatique, mobilité spermatique, CASA.

المخلص

هدف تجربتنا هو تحليل تأثير موسعين، جالاب (D1) وتريس (D2)، على جودة السائل المنوي من حيث الحجم والمجهري، جُمعت من ستة أرناب من سلالات اصطناعية، بعمر 20 شهرًا، وحُفظت في درجة حرارة 4 درجات مئوية لمدة (24، 48، و72 ساعة).

استخدمنا نظام تحليل الحيوانات المنوية بمساعدة الحاسوب (CASA) لتحليل المعايير المجهرية للسائل المنوي. أظهرت نتائج التحليل المجهرى للأخير أنه يوجد فرق بين المخفين فيما يتعلق بحركة $d1 = 4.25$ (D1 مقابل $d3 = 1.25$ ٪) و $d1 = 0.34$ (D2 مقابل $d2 = 0$ و $d3 = 0$ ٪) وحيوية $d1: 58.2$ (D1 مقابل $d3 = 25$ ٪) و $d1 = 17$ (D2 مقابل $d3 = 0$). تشير نتائجنا إلى أن المخفف (Galap D1) كان له تأثير أفضل على حفظ السائل المنوي لأرناب السلالة الاصطناعية مقارنة بالمخفف (TRIS D2).

وفي الختام، وجدنا أن حيوية وحركة السائل المنوي لأرناب السلالة الاصطناعية تتأثر بنوع المخفف ومدة حفظ السائل المنوي.

الكلمات المفتاحية: السائل المنوي، الأرناب ، السلالة الاصطناعية ، Galap، Tris، الحيوية ، الحركة ، CASA.

Abstract

The objective of our experiment is to analyze the effect of two extenders, Galap (D1) and Tris (D2) on the macroscopic and microscopic quality of semen, collected from six synthetic strain rabbits, aged 20 months and stored at a temperature of 4 °C for (24, 48 and 72 hours).

We used the CASA (computer aided sperm analysis) system for the analysis of microscopic parameters of semen. The results of the microscopic analysis of the latter showed that there is difference between the two diluents regarding the motility of D1 (d1 = 4.25% vs d3 = 1.25%) and D2 (d1 = 0.34 vs d2 and d3 = 0%) and the vitality of D1 (d1: 58.2% vs d3 = 25%) and for D2 (d1 = 17 vs d3 = 0. Our results indicate that the diluent D1 (Galadi) had a more favorable effect on the conservation of rabbit semen compared to the diluent D2 (TRIS).

In conclusion, we found that the vitality and motility of the rabbit's semen are influenced by the type of diluent and the duration of conservation of the semen.

Keywords: Semen, rabbit, synthetic cunicol strain, Galap, tris, motility, vitality , CASA.

Introduction

Introduction

L'élevage de lapins en Algérie a connu un redémarrage significatif ces dernières années, soutenue par la mise en place par les autorités de divers mécanismes de financement visant à développer cette filière. Ces initiatives ont pour objectif de valoriser la production animale et de varier l'offre en protéines animales dans le pays (Mouhous et *al.* , 2020).

La mise en place de l'insémination artificielle (IA) constitue un outil fondamental pour accroître la productivité de la cuniculture en Algérie. La réussite de cette technique repose sur plusieurs facteurs, en particulier la qualité de la semence utilisée. Une évaluation précise des caractéristiques du sperme, telles que la motilité, la vitesse de déplacement et la morphologie des spermatozoïdes, est essentielle pour garantir la fertilité des doses inséminées. L'utilisation de systèmes d'analyse assistée par ordinateur, comme le système CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), offre une évaluation objective et standardisée de ces paramètres, renforçant ainsi la fiabilité de l'analyse spermatique (Van der Horst, 2020). L'insémination artificielle chez les lapins requiert l'utilisation de dilueurs spécifiques destinés à préserver la viabilité des spermatozoïdes en leur fournissant un milieu nutritif adapté. Ces dilueurs favorisent ainsi la survie des spermatozoïdes *in vitro* lors de la conservation à court terme. Ils permettent de maintenir les caractéristiques du sperme pendant une période généralement comprise entre 24 et 72 heures, à une température réfrigérée (Di Iorio, 2014).

L'objectif de notre travail est de faire une étude sur l'effet de deux dilueurs différents le Galap (D1) et le Tris (D2) sur la conservation de sperme à 4°C en prenant en compte quelques paramètres macroscopiques et microscopiques de la semence des lapins mâles adultes de la souche synthétique.

CHAPITRE I :

Données bibliographiques

I.1. Généralités sur l'anatomie et physiologie l'appareil génital mâle

I.1.1 Anatomie de l'appareil génital mâle

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

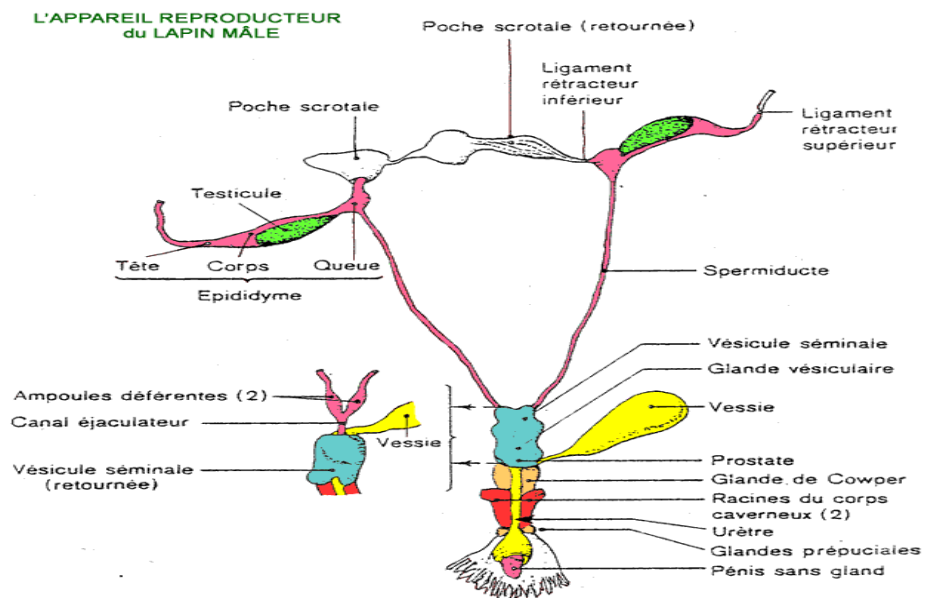


Figure 1 : Appareil reproducteur de lapin mâle (Lebas et *al.*, 1996).

I.1.1.1 Testicules

Les testicules sont deux organes ovales, de 2 à 4 cm de longueur, qui se trouvent à l'extérieur de la cavité pelvienne, dans une poche de peau plissée nommée "scrotum". Ils sont protégés par une enveloppe conjonctive résistante appelée "albuginée" et peuvent se rétracter dans la cavité abdominale (en cas de peur par exemple) et redescendre dans les bourses grâce à un muscle : le crémaster. Ils s'adaptent à la température ambiante pour maintenir le sperme à la bonne température (Boussit, 1989). Les testicules sont divisés en plusieurs lobules testiculaires qui contiennent les tubes séminifères, où se produit la spermatogenèse. Entre les tubes séminifères se situe le tissu interstitiel qui assure la fonction endocrine (Soler et *al.*, 1994).

I.1.1.2 Epididyme

L'épididyme est l'un des composants majeurs du système d'excrétion (Klinefelter, 2002), situé sur la face postérieure du testicule. C'est un long canal extrêmement replié sur lui-même à l'intérieure d'une tunique conjonctive. Il permet le transport et la maturation des spermatozoïdes. Ce tube très contourné forme des lobules séparés par des travées conjonctives présente trois grandes parties anatomiques : la tête, le corps et la queue (Barone, 1978).

I.1.1.3 Canal déférent

Après la queue de l'épididyme, on trouve le canal déférent, qui mesure entre 12 et 15 cm de long et qui a une épaisseur assez importante. Sa fonction principale est de transporter les gamètes mâles (les spermatozoïdes) jusqu'à l'urètre grâce à un péristaltisme basal additionné d'une motricité brusque lors de l'éjaculation (Barone, 2001 ; Bonnes et *al.*, 2005).

I.1.1.4 Urètre

L'urètre est un canal d'une longueur de 12 à 13 cm, dont seulement 8 à 9 cm correspondent à la partie pénienne. Il remplit deux fonctions principales : l'excrétion de l'urine et du sperme. Il prend son origine à partir de la vessie et parcourt l'intérieur du pénis jusqu'à son extrémité (Brone, 2001).

I.1.1.5 Pénis

Le pénis est un organe tubulaire court, légèrement effilé, mesurant environ 8 cm de long. Il constitue à la fois la voie externe d'excrétion et l'organe de copulation. Au repos, il est orienté en biais vers l'arrière, tandis qu'en érection, il se redresse vers l'avant en position horizontale, atteignant alors une longueur comprise entre 3 et 5 cm (Boussit, 1989).

I.1.1.6 Glandes annexes

Les glandes annexes, telles que la prostate, les vésicules séminales et les glandes bulbo-urétrales, participent à la production du liquide séminal. Ce liquide a pour rôle de diluer les spermatozoïdes, ce qui favorise leur survie et facilite leur déplacement à travers les voies génitales féminines (Hegelen et Thiriet, 2012).

- Vésicule séminale : la vésicule séminale, bien qu'impaire, présente une forme bilobée. Les canaux déférents s'y rejoignent pour former le canal éjaculateur, qui s'ouvre ensuite dans l'urètre prostatique. Lorsque la pression augmente au sein de cette glande, l'éjaculation devient possible (Van Praag, 2015).
- Glandes vésiculaires : Elle présente une forme ovale, cette glande s'ouvre dans l'urètre par deux canaux excréteurs (Boussit, 1989). Elle est responsable de la formation de la masse gélatineuse de l'éjaculat, également appelée glande de la coagulation (Campos et *al.*, 2014)
- Prostate : La prostate est la principale glande accessoire de l'appareil génital, se distingue par son volume important et sa teinte claire. Elle est localisée sous les glandes vésiculaires et s'ouvre dans l'urètre par l'intermédiaire de quatre à six conduits.
- Glandes para-prostatiques: Situées de part et d'autre des ampoules déférentielles, ces glandes s'ouvrent sur les côtés de l'urètre, recouvrant partiellement les ampoules déférentielles, voire parfois la vésicule séminale. Elles jouent un rôle essentiel dans l'élaboration du sperme.
- Glandes bulbo-urétrales (glandes de Cowper): Glande bilobée située postérieurement à la prostate, la glande bulbo-urétrale s'ouvre dans l'urètre caverneux par deux paires de canaux (Boussit, 1989).

I.1.2. Physiologie de la reproduction du lapin

I.1.2.1.Développement des gonades

La différenciation des gonades débute le 16^{ème} jour suivant la fécondation, tandis que la synthèse des hormones androgènes commence au 19^{ème} jour de gestation. Toutefois, les canaux de Müller commencent à régresser dès le 20^{ème} jour, et la formation de la prostate s'amorce au 21^{ème} jour. Au 24^{ème} jour, le développement des canaux de Wolff est bien avancé, parallèlement à la régression confirmée des canaux de Müller (Alvarino, 2000). Les testicules se développent moins vite que le reste du corps, avant d'entrer dans une phase de croissance très rapide après l'âge de cinq semaines.

Les glandes annexes suivent un schéma de croissance similaire, mais leur développement est légèrement décalé dans le temps et survient plus tardivement (Lebas et *al.*, 1996).

I.1.2.2 Puberté

La puberté chez les lapins débute généralement entre 4 et 6 mois, survenant plus tôt chez les races de petite de taille que chez les grandes races (Harcourt-brownf, 2002). Il a été constaté que chez les lapins, la puberté survient avant que le sperme n'apparaisse dans l'éjaculat, ce qui signifie que la puberté et la maturité sexuelle sont des étapes distinctes. La puberté chez les lapins se manifeste lorsque leurs testicules commencent à produire des androgènes, ce qui entraîne la stimulation des glandes accessoires pour sécréter du fructose et de l'acide citrique (Skinner, 1967).

I.1.2.3. Spermatogenèse

Elle se déroule en trois phases : la prolifération des spermatogonies ; la méiose, au cours de laquelle un spermatocyte donne quatre spermatides haploïdes, et la différenciation des spermatides en spermatozoïdes, ou spermatogenèse (Figure 2) (Marie-Hélène et *al.*, 2010). Chez le lapin, la spermatogenèse débute entre 40 et 50 jours après la naissance. Avec apparition des premiers spermatozoïdes peu viables dans les éjaculats à 110 jours d'âge. La durée d'évolution vers le stade final du spermatozoïde est de 38 à 41 jours (Martinet, 1973). Au cours de la spermatogenèse, deux évolutions essentielles se produisent (Postière, 2002) :

- La réduction du nombre de chromosomes de $2n$ à n , au cours d'une méiose.
- La maturation des cellules germinales conduit, à partir des spermatides, à la formation de cellules très spécialisées, les spermatozoïdes.

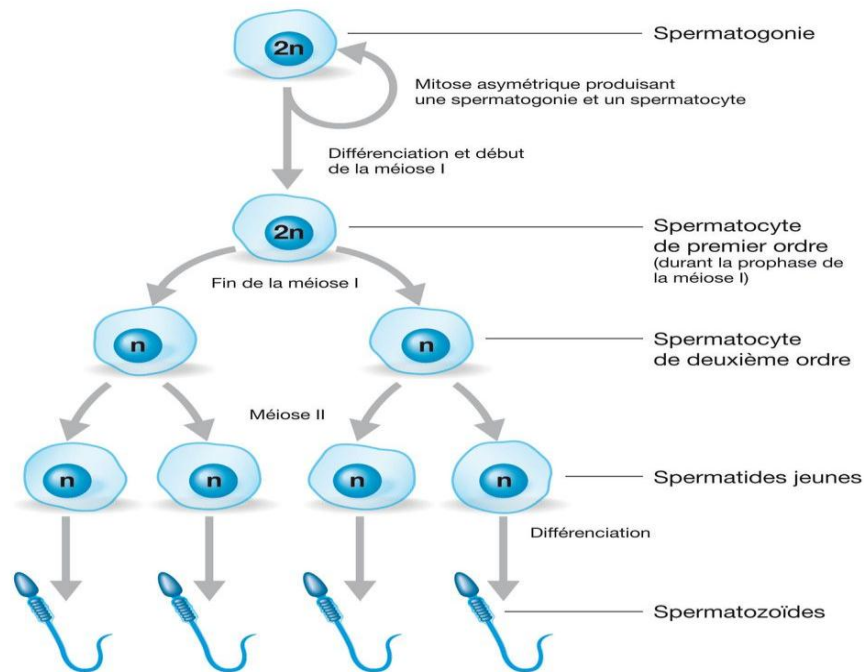


Figure 2 : Etapes de la spermatogénèse (Campeau-Péloquin et Roy, 2019).

I.1.2.4. Maturation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes recueillis directement dans les tubes séminifères sont presque immobiles. Leur capacité à se déplacer n'apparaît qu'à la fin de leur passage dans l'épididyme, plus précisément dans la queue de celui-ci. Par conséquent, les spermatozoïdes prélevés au niveau des tubes séminifères, ainsi qu'au début de l'épididyme, ne sont pas encore capables de féconder. Le transit à travers l'épididyme assure leur transport, leur stockage dans la queue, ainsi que l'acquisition de leur motilité (Gidenne, 2015).

I.2. Sperme du lapin

Les animaux sont un sperme qui est un mélange des spermatozoïdes et le plasma séminal, mais certains animaux comme le lapin, le sperme contient un autre élément essentiel qui est le gel (Boussit, 1989).

I.2.1. Composition du sperme

I.2.1.1 Spermatozoïdes

La forme du spermatozoïde du lapin est comparable à celle des autres mammifères (Figure 3). Sa tête, de forme ovoïde, sa longueur est de 7 μm , sa largeur est de 4 μm , son épaisseur est de 0,5 μm et la longueur de la queue est de 45 μm . Les trois quarts de la surface supérieure de la tête sont recouverts par l'acrosome, avec un épaississement visible le long de son bord. En coupe longitudinale, la tête du spermatozoïde révèle une chromatine nucléaire très condensée, enveloppée par le complexe acrosomial. L'axonème, au niveau de la queue, est constitué d'une structure typique avec deux microtubules centraux entourés de neuf doublets périphériques, eux-mêmes entourés de neuf fibres accessoires (Castellini et *al.*, 2005).

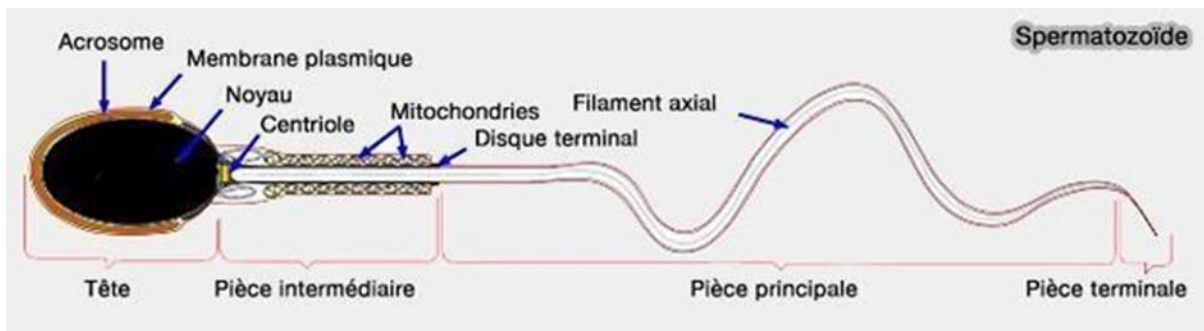


Figure 3 : Structure du spermatozoïde de lapin (Mariana, 2006).

I.2.1.2. Plasma séminal

Le plasma séminal est un mélange des sécrétions originaire de l'épididyme et des glandes annexes. Il inclue une phase fluide et une autre gélatineuse. Au moment de l'éjaculation le rôle de ce liquide est essentiel dans le transport des gamètes, en plus d'assurer diverses fonctions biologiques. Son pH se situe entre 6,8 et 7,3 et sa pression osmotique avoisine les 308 millismoles. Le plasma séminal peut influencer de manière significative les propriétés de la semence grâce à sa composition (Boussit, 1989).

I.2.1.3. Gel

Les glandes annexes sécrètent ce gel micro-gélatineux, qui est plus ou moins consistant, transparent et faiblement soluble. Il peut compliquer les étapes de dilution du sperme, d'où la nécessité de séparer l'autre fraction spermatique, soit en la faisant glisser le long de la paroi du tube, soit à l'aide

d'une pipette Pasteur ou d'une paille. La présence ou l'absence de ce gel doit être notée afin de caractériser l'éjaculat ainsi que le mâle (Boussit, 1989).

I.2.2. Caractères du sperme

I.2.2.1. Couleur

La couleur du sperme chez le lapin est généralement blanchâtre, et son opacité varie en fonction de la concentration en spermatozoïdes. Toutefois, cette coloration peut être modifiée par la présence d'éléments anormaux. Par exemple, une teinte jaunâtre peut indiquer une contamination par de l'urine, une coloration grisâtre peut résulter de précipitations au fond du tube, tandis qu'une couleur rougeâtre ou rosée peut révéler la présence de sang (Boussit, 1989).

I.2.2.2. Volume

Boussit (1989), préconisent l'utilisation d'un tube de collecte gradué après l'enlèvement du gel. Le volume de la semence peut ainsi varier entre 0,3 et 6,0 ml (Alvarino, 2000).

I.2.2.3. pH

Le pH-mètre permet de mesurer immédiatement le sperme après le prélèvement (Najjar et Ben Mrad, 2013). Il varie généralement entre 6,8 et 8,4, et constitue un bon indicateur de la qualité spermatique (Alvarino, 2000).

I.2.2.4. Motilité massale

L'observation microscopique évalue les mouvements de la masse des spermatozoïdes, d'une goutte de sperme non dilué déposée sur une lame (Bencheikh, 1995). L'observation se réalise à un grossissement de x10 (Najjar et Ben Mrad, 2013). Une note comprise entre 0 et 9 est attribuée selon l'échelle de Petit Jean (Boussit, 1989).

I.2.2.5. Motilité individuelle

La motilité individuelle correspond au mouvement propre à chaque spermatozoïde. Pour l'évaluer, le sperme frais est dilué dans une solution tampon Tris (Tris-acide citrique-glucose) selon un rapport de 1:5. L'observation est réalisée à 37°C au microscope, avec un grossissement de 40x

(Najjar et Ben Mrad, 2013). La motilité est ensuite notée sur une échelle de 0 à 4, selon le barème établi par Adrieu (Boussit, 1989).

I.2.2.6. Concentration

La concentration du sperme correspond au nombre de spermatozoïdes présents dans un millilitre de sperme. Pour le comptage, le sperme est dilué dans une solution fixatrice composée de 10 ml de formol à 35 % (v/v) dissous dans 1 litre de solution saline (NaCl 0,9 %), selon Ariola et *al.* (2001). D'après les travaux de Boussit (1989), la précision du comptage est optimale avec une dilution au 1/200. La concentration spermatique se situe généralement entre 300 et 700 x 10⁶ spermatozoïdes par millilitre. Le dénombrement est réalisé à l'aide d'une cellule hématimétrique, telle que la cellule de Thoma (Raphaël et *al.*, 2004).

I.2.2.7. Vitalité

La méthode de la coloration vitale à l'éosine-nigrosine permettant de distinguer les spermatozoïdes vivants des morts après un comptage de 200 cellules. Les spermatozoïdes morts, dont la membrane est perméable, se colorent en rose, tandis que les vivants, ayant une membrane intacte, restent incolores (Alvarino, 2000). Ce colorant est couramment utilisé car il permet d'évaluer à la fois la viabilité et la morphologie des spermatozoïdes.

La viabilité peut également être évaluée par le test HOST (test de gonflement hypo-osmotique), qui cible principalement la membrane de la queue du spermatozoïde. Ce test repose sur la réaction de la membrane à un milieu hypo-osmotique, permettant d'apprécier son intégrité fonctionnelle (Theau-Clément, 2005).

I.2.2.8. Morphologie

La morphologie des spermatozoïdes chez le lapin est évaluée par le frottis coloré à l'éosine-nigrosine la morphologie des spermatozoïdes chez le lapin est évaluée. Cette technique permet de distinguer les spermatozoïdes normaux des anormaux. L'observation se fait au microscope à un grossissement de 100x.

I.2.3. Anomalies du sperme

Selon David et *al.* (1975), les anomalies les plus courants sont (Figure 4,5) :

I.2.3.1. Anomalie de la tête

- Tête allongée** : Le grand axe est allongé par rapport à la normale, tandis que le petit axe conserve une longueur normale.
- Tête amincie** : Le petit axe est réduit par rapport à la normale, tandis que le grand axe conserve une longueur normale.
- Tête microcéphale** : Le grand axe et le petit axe sont tous deux plus courts que la normale.
- Tête macrocéphale** : Le grand axe et le petit axe sont tous deux plus grands que la normale.
- Tête multiple** : un seul spermatozoïde peut avoir plus de deux têtes à la fois.
- Tête à acrosome anormal ou absent** : L'acrosome normal couvre entre 40 et 70 % de la surface du spermatozoïde. Il joue un rôle essentiel dans l'interaction entre les spermatozoïdes et l'ovocyte.
- Tête présentant une base (région post-acrosomique) anormale** : Cette anomalie résulte d'un défaut de morphogénèse affectant la tête et/ou la partie distale du noyau.

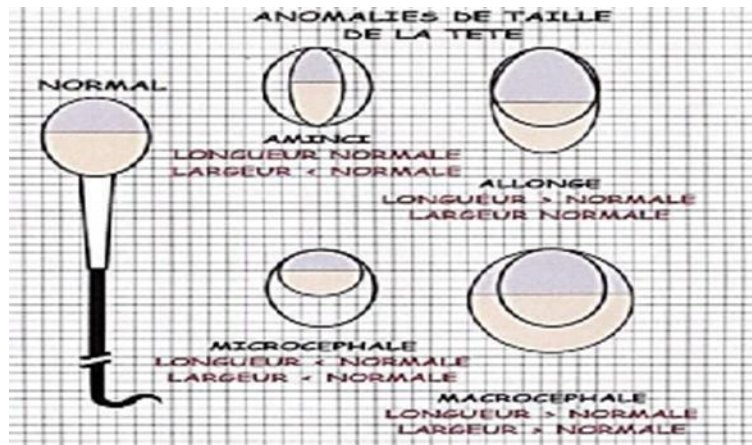


Figure 4 : Illustrations des anomalies de taille de la tête de spz (Auger et Eustache, 2000).

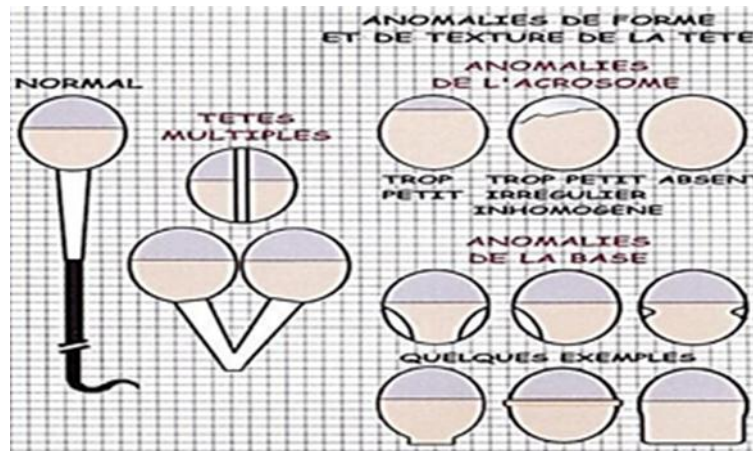


Figure 5 : Illustrations des anomalies de forme et de texture de la tête de spermatozoïdes (Auger et Eustache, 2000).

I.2.3.2. Anomalies de la pièce intermédiaire

Selon David et *al.* (1975), les Anomalies de la pièce intermédiaire sont (Figure 6) :

- Le reste cytoplasmique :** Une anomalie est reconnue lorsque la surface dépasse un tiers de celle d'une tête normale.
- Pièce intermédiaire grêle :** Cela indique une absence de formation de la gaine mitochondriale.
- Pièce intermédiaire enroulée :** La pièce intermédiaire et l'axe de la tête forment un angle bien défini.

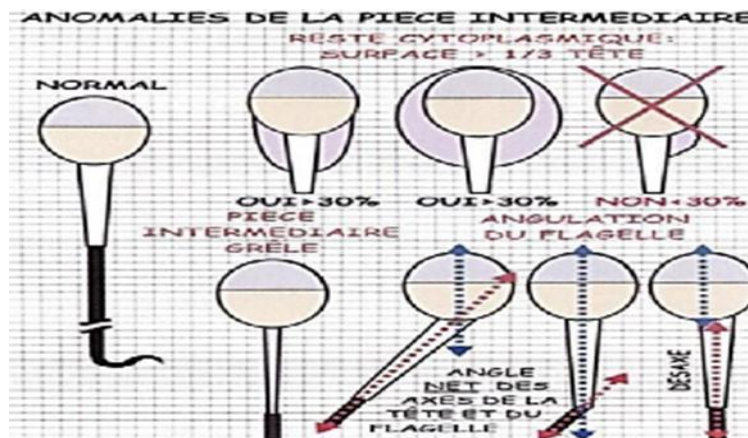


Figure 6 : Illustrations des anomalies de la pièce intermédiaire de spermatozoïdes (Auger et Eustache, 2000).

I.2.3.3. Anomalies du flagelle

Selon David et *al.* (1975) (Figure 7) :

- Flagelle absent** : ou lorsque la pièce connective est peu développée.
- Flagelle court** : Flagelle dont la longueur est inférieure à cinq fois celle de la tête.
- Flagelle irrégulier** : Lorsque le diamètre du flagelle varie, présentant des zones de rétrécissement ou d'élargissement.
- Flagelle enroulé** : Flagelle enroulé autour de la tête ou positionné à l'extérieur de celle-ci.
- Flagelle multiple** : Un spermatozoïde contient plusieurs flagelles, la pièce intermédiaire étant commune ou multiple.

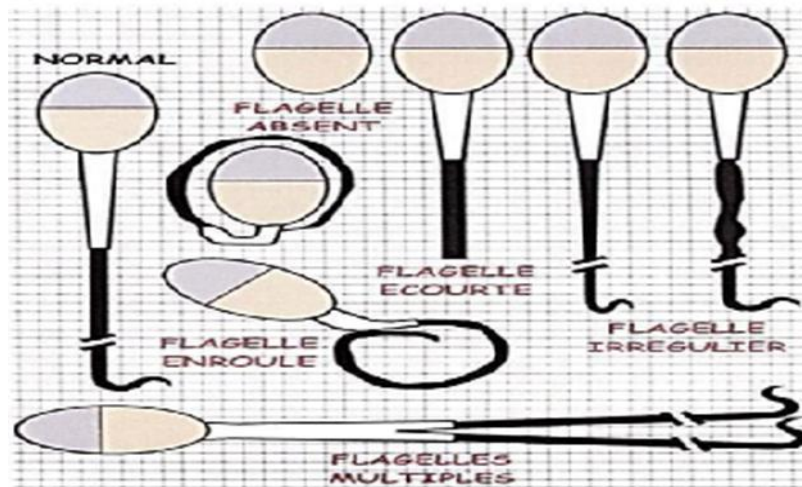


Figure 7 : Illustrations des anomalies du flagelle (Auger et Eustache, 2000).

I.2.4. Facteurs influençant sur la production et la qualité du sperme

I.2.4.1. Age et race

L'origine génétique est responsable de la qualité et la quantité de la semence produite par le mâle (Alvarino, 2000). L'âge des mâles influence significativement sur la concentration et le nombre des spermatozoïdes motiles obtenus par éjaculat. En effet les mâles adultes de 9 à 12 mois ont une semence de concentration et un nombre de spermatozoïdes motiles plus élevé que celle des mâles jeunes de 4 à 5 mois (Theau-Clément, 2009).

I.2.4.2. Saison

De nombreuses études ont mis en évidence les variations saisonnières de l'activité sexuelle du lapin mâle à l'état naturel. Ainsi, la reproduction est particulièrement intense durant la période des jours croissants, généralement de février à juillet, puis elle devient quasiment nulle en automne (Lebas, 2009).

I.2.4.3. Nutrition

L'alimentation des mâles constitue un facteur influençant les caractéristiques de la semence et la libido, surtout lorsque les apports nutritionnels sont insuffisants (Joly et Theau-Clément, 2000). Il faut que l'aliment donné aux lapins contienne plus de 15% de protéines (Nizza et Meo et Taranto, 2000).

I.2.4.4. Température

La spermatogenèse est influencée par la température, qui touche la qualité du sperme, la concentration et le volume des éjaculats (Joly et Theau-Clément, 2000). Lorsque la température ambiante dépasse 30°C, l'activité sexuelle du lapin diminue entraînant une baisse de la spermatogenèse ainsi que la qualité de la semence (Finzi, 1990 ; Lebas, 2009). En revanche, les températures basses (inférieures à 10°C, voire proches de 0°C) ne semblent pas affecter les activités sexuelles des lapins (Lebas, 2009).

I.2.4.5. Fréquence de collecte

Bien que la production de sperme varie considérablement d'un mâle à l'autre et d'un éjaculat à l'autre chez un même individu, la fréquence des collectes a un impact direct sur la quantité et la qualité de la semence. Un rythme de collecte trop fréquent entraîne une augmentation du nombre de spermatozoïdes immatures et une diminution des taux de fertilité (Joly et Theau-Clément, 2000).

I.2.5. Conservation de sperme

La réfrigération et la congélation ; deux techniques permettant la conservation de la semence à moyen et à long terme avec des bénéfices. La réfrigération permet de conserver la semence pendant quelques heures à plusieurs jours, tandis que la congélation autorise une dissociation complète entre les phases de collecte et d'insémination (Boussit, 1989).

L'intérêt de conserver la semence de lapin pendant une période de 24 à 72 heures a fait l'objet de plusieurs études ces dernières années. Cette possibilité améliorerait l'organisation des centres de diffusion de semence. En effet, une baisse de la température permet d'allonger la durée de conservation tout en préservant la capacité fécondante du sperme (Viudes De Castro et Vicente et Lavara, 1990).

I.2.5.1. A l'état frais « réfrigération »

La conservation de la semence animale à l'état frais nécessite une dilution immédiate après le prélèvement. Le maintien de la semence fraîche à 4 °C ralentit le métabolisme des spermatozoïdes, ce qui préserve leurs réserves énergétiques et assure une bonne conservation de leur mobilité, laquelle est rétablie après réchauffement (Decuadro-Hansen, 2004).

I.2.5.2. Congélation

La cryoconservation consiste à préparer une suspension cellulaire destinée à être stockée à une température inférieure à -80°C. Cette méthode permet de conserver la suspension pendant de nombreuses années et de l'utiliser après décongélation à température corporelle (Amann, 1998).

I.2.6. Principes généraux

I.2.6.1. Utilisation des dilueurs

Les spermatozoïdes conservés par réfrigération ou congélation doivent être dilués dans des dilueurs de qualité (England, 1993). En effet, ces dilueurs jouent un rôle essentiel ; ils protègent les spermatozoïdes des effets néfastes liés à la baisse de la température et permettent d'obtenir une concentration finale de spermatozoïdes préalablement définie (Peña et Linde-Forsberg, 2000 ; Stănescu et Alin, 2015).

I.2.6.2. Caractéristiques du milieu de dilution

Un milieu favorisant la survie des spermatozoïdes doit répondre à plusieurs critères (Decuadro-Hansen, 2004):

- Chez les mammifères domestiques, le pH doit être entre 6,7 et 7,3.
- Il doit contenir des éléments nutritifs tels que le glucose, le fructose, la glutamine, etc., afin de prévenir l'épuisement des spermatozoïdes.

- Il doit inclure des solutions tampons (Tes, Pipes, Hepes, Tris, etc.) ainsi que des ions minéraux pour assurer le maintien du pH.
- Il doit contenir des lipoprotéines d'origine animale ou végétale, qui jouent un rôle protecteur des membranes lors du processus de congélation et de décongélation.
- Il doit comporter des antibiotiques visant à contrôler la flore microbienne normale ainsi que les pathogènes opportunistes.

I.2.6.3. Composition des dilueurs :

Parmi les principaux composants des dilueurs les plus couramment utilisés, on trouve :

a) Jaune d'œuf

Son utilisation a démontré une amélioration du pouvoir fécondant. Il est généralement employé à une concentration de 20 % V/V (Foulkes, 1977). Le jaune d'œuf contient des phospholipides et des lipoprotéines (LDL) qui offrent une protection efficace à la membrane des spermatozoïdes tout en lui apportant un soutien nutritionnel (Manjunath et *al.*, 2002).

b) Antibiotiques

Ils limitent la prolifération bactérienne, car la majorité des éjaculats sont contaminés par des bactéries (Althouse et *al.*, 2000).

c) Iméthyl sulfoxide (DMSO)

Découvert en 1959 par Lovelock et Bishop, ce cryoprotecteur intracellulaire se caractérise par une pénétration rapide, ce qui permet de réduire la durée de l'équilibration avant congélation (Billard et Legendre, 1980).

d) Ethylène-glycol (EG)

Les chercheurs ont démontré que l'EG agit comme un cryoprotecteur (Martins-Bessa et Rocha et Mayenco-Aguirre, 2006). Swelum et *al.* (2011) , ont constaté que l'éthylène glycol améliore la qualité des spermatozoïdes en augmentant leur viabilité, en préservant l'intégrité de l'acrosome et de la membrane, et en réduisant les anomalies liées à la mobilité.

e) Glycérol

L'éthylène glycol est le cryoprotecteur le plus utilisé dans le monde. Il agit à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des spermatozoïdes en pénétrant rapidement dans les cellules. Cette pénétration modifie la formation des cristaux de glace en les rendant plus arrondis, ce qui réduit le risque de perforation des membranes cellulaires lors de la congélation (Stănescu et Alin, 2015).

I.2.7. Différents dilueurs utilisés pour le lapin

Les dilueurs à base de Tris (Tris, acide citrique et fructose ou glucose) sont la base des dilueurs fréquemment utilisés pour la cryoconservation des spz de lapin (Mocé et Graham, 2008). Plusieurs dilueurs ont été mis au point par des chercheurs, Il est reconnu que le jaune d'œuf et le lait contiennent des protéines qui assurent une protection et une stabilisation des membranes des spermatozoïdes (Feldman et Nelson, 2004).

- De plus, Bue (1992), ont démontré que l'utilisation d'un dilueur à base de lait écrémé permet d'obtenir de bons résultats en termes de mobilité et de vitalité des spermatozoïdes après réfrigération.
- Iguer-ouada et Verstegen (2001), ont également démontré que le jaune d'œuf contribue à préserver la mobilité et l'intégrité acrosomiale des spermatozoïdes pendant leur réfrigération.
- Ponglowhapan et *al.* (2004), ont démontré que l'ajout de sucres, tels que le glucose ou le fructose, au dilueur permet de maintenir une mobilité supérieure à 70 % pendant jusqu'à 8 jours de conservation à 5 °C.

CHAPITRE II :

Matériel et méthodes

II.1 Objectifs

Notre étude vise à comparer l'effet de deux dilueurs différents (Galap et leTris) sur la conservation de la semence du lapin à une température de 4°C., sur une durée de (24, 48,72h)

II.2 Lieu et durée de l'expérimentation

L'expérimentation a été réalisée dans le clapier de la station expérimentale de l'Université de Blida 1, ainsi qu'au laboratoire de recherche en biotechnologie de la reproduction animale (LBRA) de l'université de Blida 1. Notre expérimentation s'est déroulée le mois de Mai 2025.

II.3. Bâtiment d'élevage

Le bâtiment d'élevage cunicole est d'une superficie de 184 mètres carrés (Figure 8), équipé d'une structure métallique et d'une toiture en plaques d'éternit, il permet une ventilation naturelle. Des néons sont installés dans l'ensemble du bâtiment et restent allumés pendant les manipulations. À l'entrée principale, un couloir dessert deux salles de maternité situées à droite, ainsi qu'une grande salle d'engraissement à l'arrière. Les murs sont équipés de deux fenêtres de type vasistas, assurant un éclairage naturel. Les animaux sont hébergés dans des cages (voir figure 9) mesurant 70 cm de longueur, 40 cm de largeur et 30 cm de hauteur. Chaque cage est dotée d'une mangeoire et d'un système d'abreuvement à tétine.



Figure 8 : Bâtiment d'élevage cunicole



Figure 9 : Cages individuelles

II.4 Aliment

Les lapins sont nourris avec une alimentation granulée spéciale à volonté, ce produit est fabriqué à Boumerdes (Figure 10), dans des trémies métalliques installées dans chaque bâtiment d'élevage.



Figure 10 : Aliment granulé.

II.5 Eau de boisson

La source de l'eau donnée aux lapins est le réseau local d'eau potable. Chaque matin, des bacs en plastique de 6 litres, reliés au système de conduits, sont remplis d'eau potable et fraîche (Figure 11).



Figure 11 : Bac d'eau

II.6 Matériel

II.6.1. Matériel biologique

Les lapins mâles de souche synthétique (n=6), sont adulte, âgé de 20 mois. Ayant un poids moyen de $3,015 \pm 0,342$ Kg (Figure12). Ces lapins ont été préparés en amont pour la collecte de la semence.

- 01 lapines « boute-en-train » à été utilisé pour le prélèvement de la semence, durant l'expérimentation. L'ensemble des lapins présentaient un bon état sanitaire.



Figure 12 : Lapins de souche synthétique

II.6.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique est présenté dans l'Annexe A.

II.7 Méthodes

Les différentes étapes du protocole expérimental sont représentées dans la figure 13.

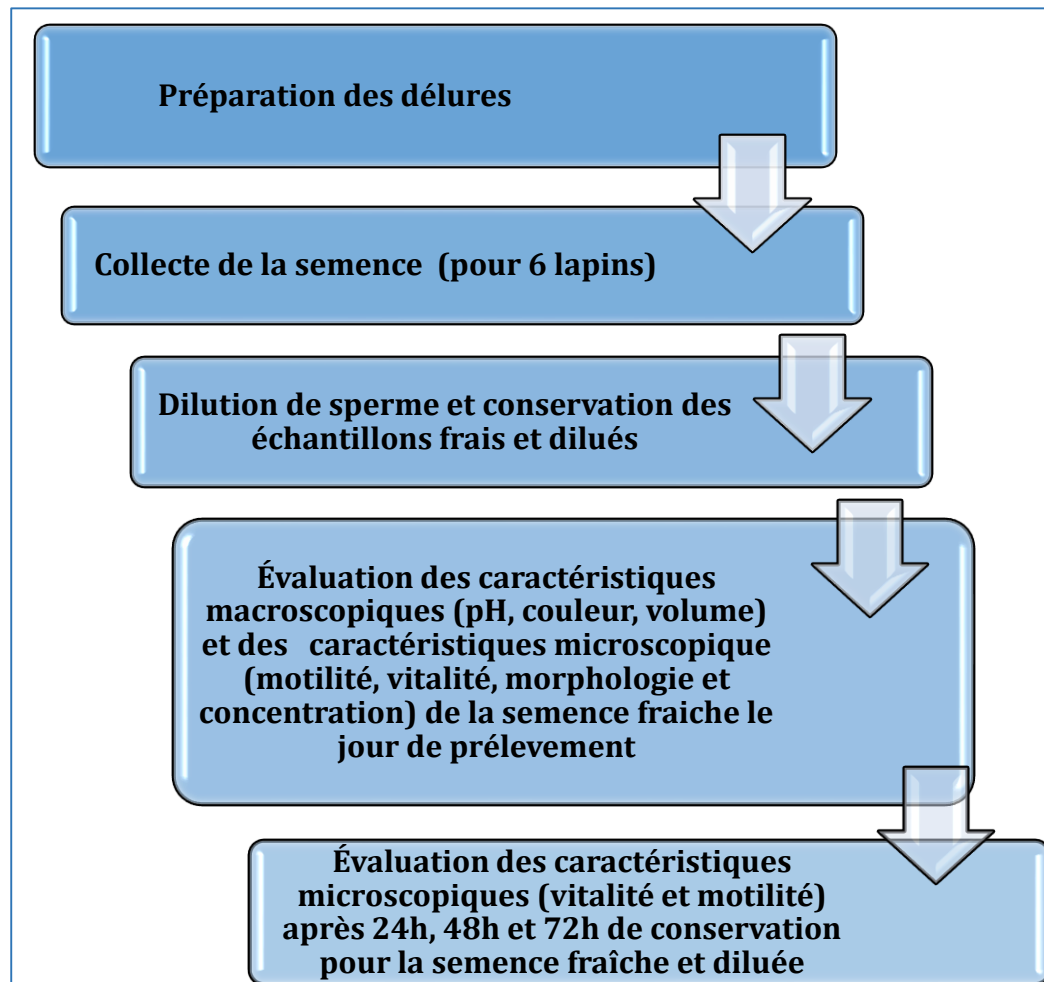


Figure 13 : Différentes étapes du protocole expérimental

II.7.1 Préparation des dilueurs

Deux dilueurs sont utilisés dans cette expérimentation, Galap (D1) et Tris (D2), ces deux derniers sont utilisés chez les lapins.

- Pour le dilueur Galap (D1) : c'est un produit commercialisé dont nous n'avons pas pu avoir la composition.
- Pour le dilueur Tris (D2) : C'est un dilueur que nous avons préparé nous-même, dont la composition est présentée dans l'annexe A. Les étapes de préparation du dilueur D2 sont illustrées dans la figure 14.

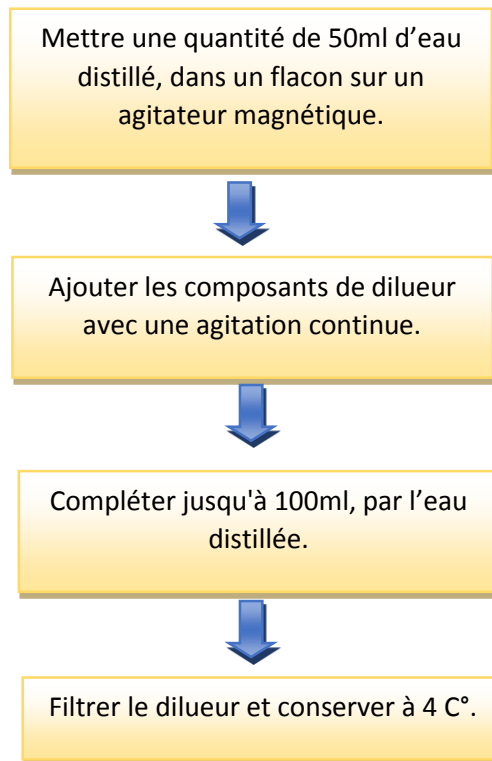


Figure 14 : Etapes de préparation du dilueur D2.

II.7.2 Récolte de la semence

II.7.2.1 Préparation des mâles à la récolte de la semence

Avant le début de la période expérimentale, tous les mâles ont été entraînés quotidiennement pour s'habituer à la collecte avec le vagin artificiel ceci en utilisant une femelle « boute en train ».

II.7.2.2 Préparation du matériel de récolte de la semence

Avant le récolte, le vagin artificiel est d'abord bien nettoyé et réchauffé avant l'utilisation à l'aide d'un bain marie maintenue entre 55 et 60°C pour avoir à son intérieur une température égale à 37°C (Figure15), le tube de collecte gradué est placé à son extrémité pour pouvoir récolter la semence.



Figure 15 : Préparation du vagin artificiel.

II.7.2.3 Technique de récolte

Tous d'abord, nous stimulons le mâle en plaçant la femelle sur la cage du mâle pendant 5min (Figure 16 a). Après, introduire la femelle dans la cage en tenant le vagin artificiel entre ses membres postérieurs, près du périnée, en orientant le vagin vers le pénis afin de faciliter l'intromission du pénis (Figure 16 b, c). Lors de l'éjaculation, le mâle bascule en arrière ou sur le côté, émettant parfois un cri caractéristique.

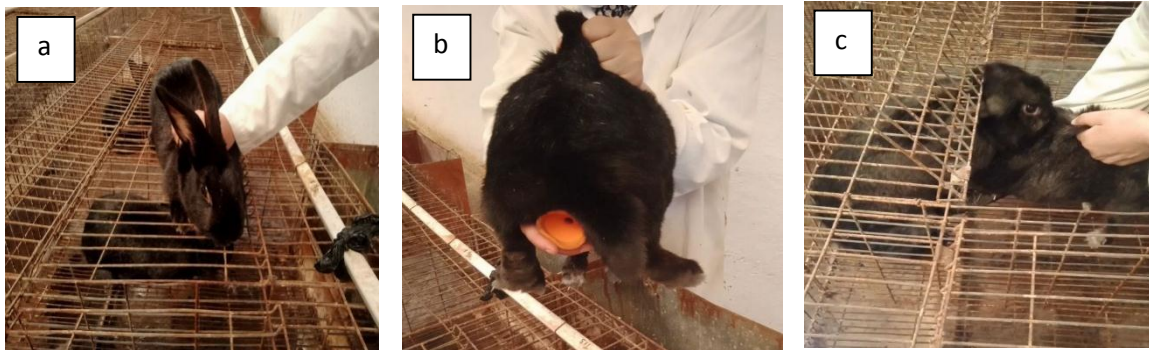


Figure 16 : Etapes de la technique de la récolte (a : femelle sur la cage ; b : vagin artificielle près du périnée ; c : chevauchement du mâle.)

II.7.3 Analyse du sperme

II.7.3.1 Examen macroscopique

La première étape d'analyse macroscopique se déroule au niveau du clapier et doit se faire immédiatement après la récolte du sperme. Nous débutons l'analyse en évaluant la couleur, le volume et le pH.

- ❖ **Volume** : La quantité de la semence est mesurée directement dans le tube gradué utilisé pour la collecte (Figure 17).
- ❖ **Couleur** : La couleur est évaluée par l'observation de la semence éjaculée dans un tube de collecte transparent (Figure 17). Une note de 0 à 3 est attribuée à l'échantillon selon la grille citée par Roca et *al.* (2005).

Tableau 1 : Grille de Roca (2005) pour la notification de la couleur de la semence.

Note	Couleur
0	Jaune : urine
	Rosâtre ou rougeâtre : le sang
1	Sperme blanc aqueux
2	Sperme blanc laiteux
3	Sperme blanc nacré ou blanc ivoire



Figure 17 : Evaluation de la couleur.

pH : Le pH de l'éjaculat est mesuré à l'aide d'un papier indicateur pH. Ce papier permet de déterminer le pH dans une plage allant de 0 à 14. La couleur obtenue est comparée avec la couleur sur la boîte (Figure 18).



Figure 18 : Mesure du pH.

II.7.3.2 Examen microscopique

Après la récolte, Les tubes contenant la semence sont maintenu dans une bouteille thermique contenant de l'eau à 37°C (figure 19 a) et transporter au laboratoire de recherche en reproduction animale de l'Institut des Sciences Vétérinaires (LBRA) pour la partie analyse microscopique. Le prélèvement doit être déposé directement dans un bain marie à 37°C (figure 19b).

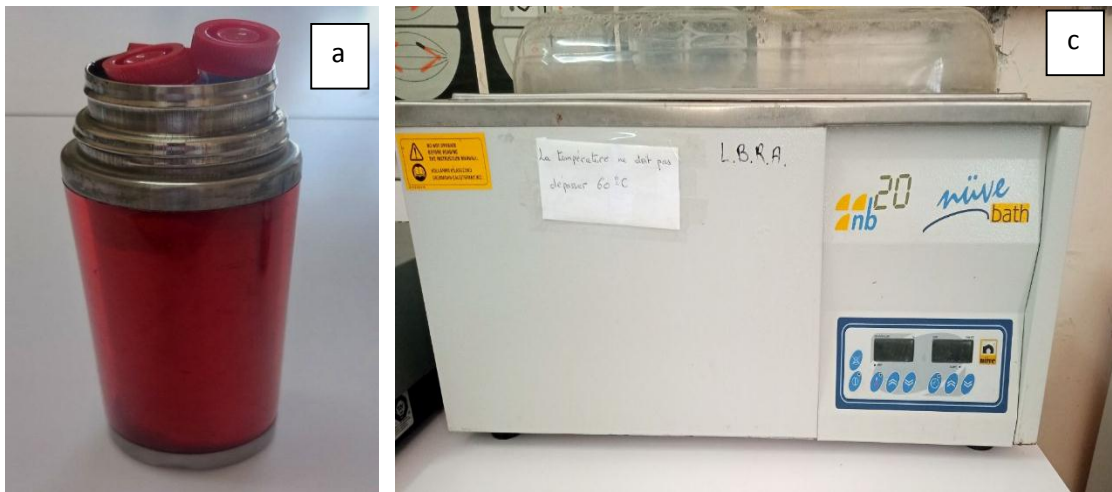


Figure 19: Conservation des échantillons à 37 ° (a: bouteille thermique ; b: bain marie).

II.7.3.2.1. Manipulation du système CASA :

Le système CASA (Computer Analyser System Assisted) est un système informatisé d'analyse de sperme qui comprend un microscope Nikon Eclipse E 200 équipé d'une plaque chauffante et d'objectifs à contraste de phase négatif (x100, x200, x400, x600), une caméra Nikon et un moniteur hp. Le logiciel utilisé pour l'analyse de la mobilité est le SCA ver (version 5.1, Microptic Barcelone, Espagne), qui permet de quantifier le nombre de spermatozoïdes ayant un déplacement lent, moyen, rapide et progressif, ainsi que les paramètres de vitesse, l'angle et la rectitude des trajectoires. Ce système permet également d'évaluer la vitalité, la morphologie et la concentration des spermatozoïdes (Figure 20).



Figure 20 : Système CASA.

II.7.3.2.2. Estimation de la motilité massale

La motilité massale est le mouvement d'ensemble des spermatozoïdes. Cette dernière est estimée directement après la collecte par observation d'une goutte de sperme déposée sur une lame sous microscope optique au grossissement X10. Une note est attribuée selon l'échelle de Petitjean de 0 (pas de spermatozoïdes) à 9 (aspect de tourbillon) (Tableau 2). Pour observer, nous passons par les différentes étapes (Figure 21).

- Déposer la lame sur la plaque chauffante du système CASA pour éviter le choc thermique de la semence (Figure 21 a).
- Mélanger le tube de la semence circulairement avant de prélever la goutte par une micropipette (10µl) (Figure 21 b).
- Déposer la goutte sur une lame préchauffée puis étaler, faire l'observation par un objectif x10 (Figure 21 c).
- Observer sur CASA les mouvements puis attribuer un score (Figure 21 d).

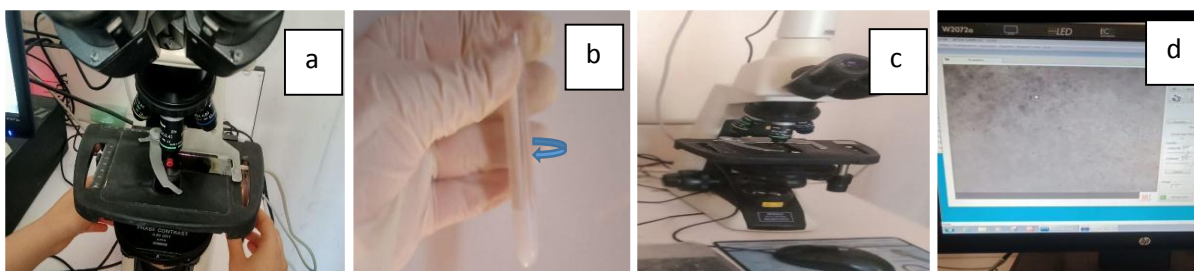


Figure 21 : Étapes de l'évaluation de la motilité massale (a : préchauffage de la lame ; b : homogénéisation de la semence ; c : une goutte des permes sur la lame ; d : observation).

Tableau 2 : Echelle de Petitjean (1965) pour notation de la motilité massale.

Note	Nature et intensité du mouvement
0	Pas de spermatozoïdes
1	Spermatozoïdes immobiles.
2	Quelques spermatozoïdes agités, oscillants sur place.
3	Beaucoup de spermatozoïdes agités sans déplacement notable.
4	Quelques spermatozoïdes immobiles, quelques spermatozoïdes agités sur place, quelques spermatozoïdes mobiles.
5	Même chose que 4 mais plus de spermatozoïdes mobiles. Motilité assez Bonne mais pas homogène.
6	La quasi-totalité des spermatozoïdes se déplace. Motilité bonne et homogène.
7	Même chose que 6 avec amorce de mouvements de vagues lents.
8	Même chose que 7 avec mouvements de vague distinct lents.
9	Vagues énergétiques, aspect de tourbillons, motilités excellentes

II.7.3.2.3. Motilité individuelle

Avec une micropipette réglable, Prélever 10 microlitres de semence fraîche et les diluer dans 290 microlitres de sérum physiologique à savoir une dilution au 1/30 puis homogénéiser la solution contenant les spermatozoïdes. Mettre 10 microlitres de la semence diluée entre la lame et la lamelle, puis observer au Microscope du système CASA (grossissement X10). Cette observation, nous permet dans un premier lieu d'évaluer le type de mouvements des spermatozoïdes et de les noter en utilisant l'échelle d'Andrieu (1974) (Tableau 3) qui va de 0 à 4 (Boussit, 1989 ; Baril et *al.*, 1993).

Tableau 3 : Echelle d'Andrieu (1974) pour la notation de la motilité individuelle.

Note	Motilité individuelle
0	Spermatozoïdes immobiles.
1	Les spermatozoïdes ont des mouvements de flagelle sans déplacement.
2	Les spermatozoïdes se déplacent lentement. Les mouvements circulaires dominants
3	Les spermatozoïdes ont des mouvements heurtés. Leur déplacement s'effectue le long d'une hélice de diamètre sensiblement égal à leur longueur ou de cercle de larges diamètres
4	Les spermatozoïdes se déplacent rapidement le long d'une hélice de faible diamètre.

Le système CASA nous a également permis de mesurer la motilité progressive des spermatozoïdes pour chaque échantillon analysé.

II.7.3.3. Détermination de la concentration

La concentration des spermatozoïdes par millilitre est déterminée par le comptage direct des spermatozoïdes dans un échantillon dilué et fixé de sperme. L'évaluation se déroule en plusieurs étapes à l'aide d'un hématimètre de type cellule de Thoma.

- Diluer 10 ul de semence fraîche avec 1990 ul du formol 10% (Figure 22a).

- Après dilution et fixation du sperme, homogénéiser la solution à l'aide d'un vortex avant manipulation (Figure 22b).
- Déposer la lamelle sur la cellule de Thoma et en introduisant une goutte de semence diluée à la bordure de chaque chambre de la cellule de Thoma à l'aide d'une micropipette, puis laisser la cellule reposer pendant 10min (Figure 22 c).
- Compter le nombre de spermatozoïdes dans les 8 carreaux diagonaux (Figure 22d°)

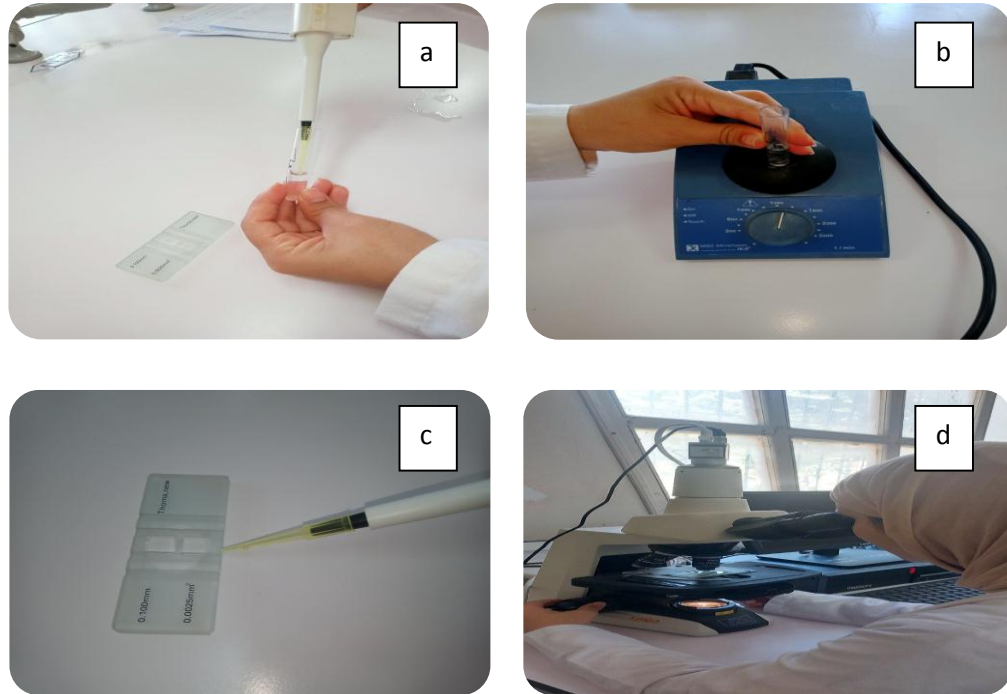


Figure 22 : Etapes d'évaluations de la concentration des spermatozoïdes (a : fixation de la semence ; b : homogénéisation ; c : dépôt de la semence diluée dans la cellule de Thoma ; d : Observation au microscope).

Le calcul de la concentration des spz se fait à l'aide de la formule suivante :

$$C = N \times 200 / 64 \text{ (106 spz)}$$

C = Concentration des spz par ml.

N = Nombre des spz comptés dans les huit carreaux.

D = Facteur de dilution.

II.7.3.4. Estimation de la vitalité

L'évaluation de la vitalité des spermatozoïdes a été réalisée par la technique de coloration à l'éosine-nigrosine (Bamba, 1998), qui se déroule en plusieurs étapes (Figure 23) :

- a. Déposer 10 μ L de sperme pur sur une lame à l'aide d'une micropipette.
- b. Ajouter 10 μ L de l'éosine.
- c. Ajouter 10 microlitres de nigrosine et homogénéiser le mélange avec l'embout de la micropipette.
- d. Etaler avec une autre lame puis laisser sécher.
- e. Observation sous microscope à un grossissement x 20 et comptage de 200 spermatozoides.

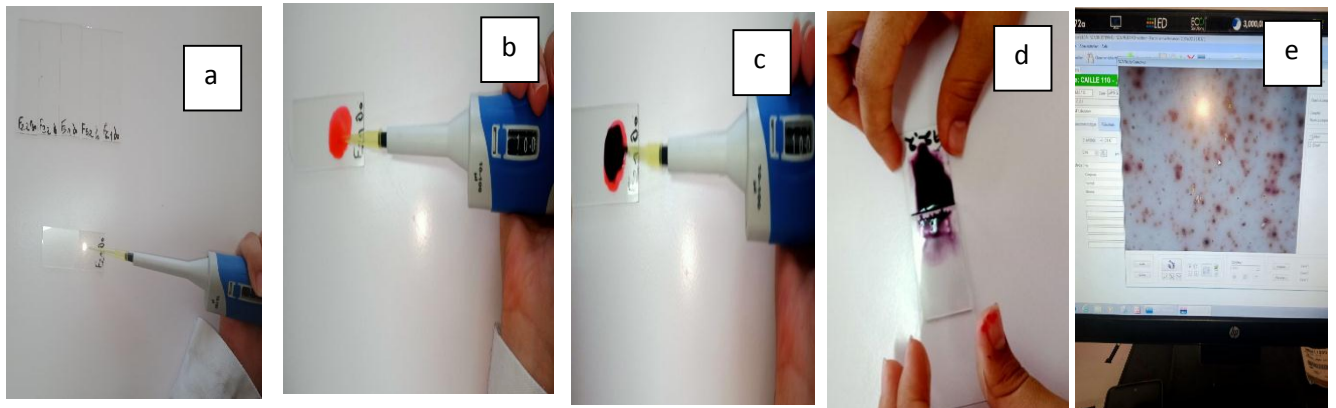


Figure 23 : Etapes de l'évaluation de la vitalité (a, b, c, d, e).

- Les spermatozoïdes dont la tête est colorée en rouge sont morts tandis que les spermatozoïdes vivants ont une tête colorée en blanc (Figure 24).

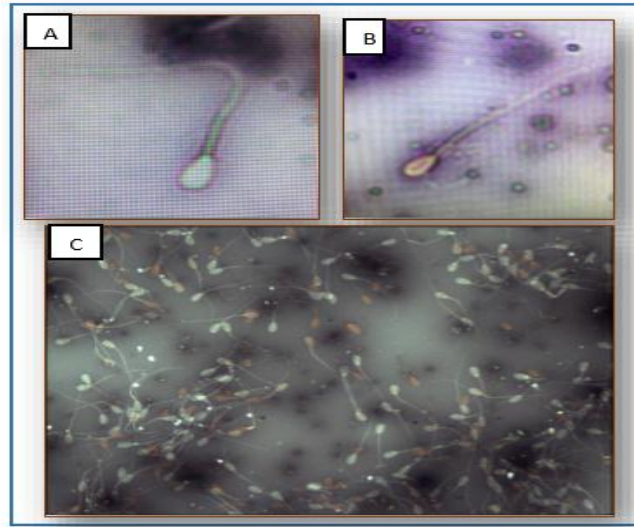


Figure 24 : Observation des spermatozoïdes vivants (a) et morts (b) après coloration à l'éosine-nigrosine (a, b et c).

II.7.3.5. Évaluation de la morphologie

Les anomalies de morphologie des spz sont recherchées et comptés sur le frottis ayant servi pour l'évaluation de la vitalité. L'observation se fait avec le système CASA plusieurs types d'anomalies des spermatozoides peuvent être distinguée : anomalie de la tête, gouttelette cytoplasmique, de la pièce intermédiaire ou de la queue (flagelle) (Figure 25). Les anomalies sont comptées sur 200 spermatozoides.

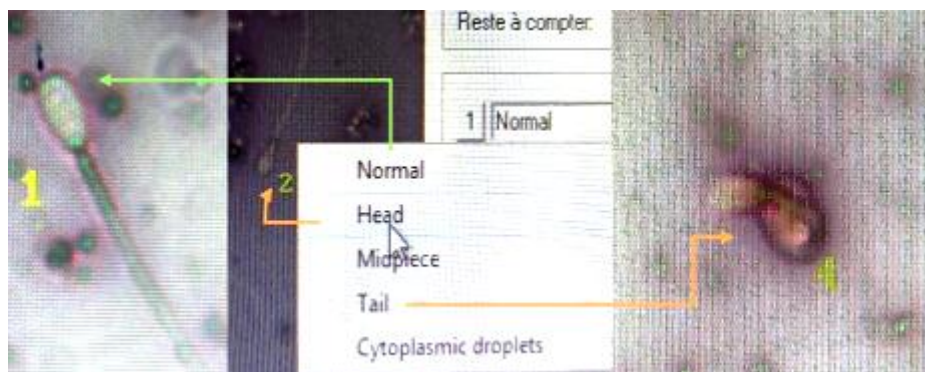


Figure 25 : Différentes anomalies observées par le système CASA.

II.7.4 Étapes de dilution du sperme de lapin et conservation par réfrigération

Après l'analyse de la semence fraîche le premier jour, une dilution de 1/30 est réalisée pour tous les échantillons prélevés avec deux dilueurs (D1 : Galap et D2 : Tris) dans des tubes à eppendorff identifiés. Ces derniers ainsi que la semence fraîche ont été conservés à 4C° dans un réfrigérateur durant la période de l'étude où nous avons fait une 1^{er} lecture après 24 h de conservation, une 2^{ème} lecture 48 h après et une dernière lecture après 72h de conservation à 4C°.

CHAPITRE III

Résultats et discussion

III.1 Résultats

Dans ce chapitre, nous présentons nos résultats en deux parties distinctes :

- La première partie aborde la qualité des semences fraîches le jour de la récolte.
- La deuxième partie concerne l'effet des dilueurs et la durée de conservation sur la qualité de semence.

III.1.1 Analyse de la semence fraîche avant conservation à 4°C

Connaître la qualité du sperme avant sa réfrigération est essentiel pour évaluer les modifications des spermatozoïdes. C'est pour cette raison que nous avons débuté l'analyse de la semence immédiatement après sa collecte. Il est à noter que sur les six lapins utilisés, un seul n'a pas donné de semence.

III.1.1.1. Taux de la récolte spermatique utile

Les valeurs moyennes du taux de la réponse positive aux sollicitations chez les lapins mâles sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4: Taux des réponses aux sollicitations et des semences analysées des lapins mâles

Nombre d'animaux étudiés	6
Nombre de sollicitations	12
Nombre de semences collecté	10
Nombre de semences observé	10
Nombre de semences éliminé	0
Causes d'élimination	
Présence de sang	0
Présence d'urine	0
Réponse aux sollicitations	
Taux de réponse aux sollicitations (%)	83,33
Taux de semence utilisés (%)	100

Le tableau 4 présente une analyse des taux de réponses aux sollicitations des semences des lapins mâles, en utilisant un échantillon de 6 lapins et 12 sollicitations. Nous avons remarqué que le taux de réponse aux sollicitations était de 83,33%, un seul sujet n'a pas donné de semence. Le taux des semences analysées est de 100 %.

III.1.1.1.1. Analyse macroscopique

Les résultats des paramètres macroscopiques de la semence fraîche sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Valeurs moyennes des paramètres macroscopique de la semence fraîche

N° du Lapin	Couleur	Volume sans gel (ml)	pH
1	1	0,5	7,8
2	2	0,9	7,25
3			
4	2	0,8	7
5	1	0,5	7
6	1	0,6	7
(Moyenne $\pm$ SD)	1,4 $\pm$ 0,49	0,66 $\pm$ 0,16	7,21 $\pm$ 0,31

- **Couleur**

Nous avons remarqué que sur les six lapins utilisés dans notre partie expérimentale, la semence avait présenté un score moyen de 1,4 $\pm$ 0,49.

- **Volume**

Le volume moyen de la semence chez les lapins de la souche synthétique est de 0,66 $\pm$ 0,16 ml.

- **pH**

La valeur moyenne du pH obtenue est de $7,21 \pm 0,31$.

III.1.1.1.2 Analyse microscopique

Les résultats des paramètres microscopiques de la semence fraîche sont présentés dans le tableau 6.

- **Motilité massale**

Le score de motilité massale varie entre 3,25 et 7 selon l'échelle de petit jean 0 à 9. Avec une motilité massale moyenne de $5,25 \pm 1,32$.

- **Motilité individuelle :**

Le score varie entre 2,5 et 3,5 représente selon le tableau de 0 à 4 d'Andrieu. Avec une motilité individuelle moyenne de $2,95 \pm 0,33$, soit un taux de 73,75%

- **Concentration**

La concentration en spermatozoïdes de la semence fraîche analysée dans notre étude est en moyenne de $99,49 \pm 66,44 \times 10^6$ spz/ml.

- **Vitalité**

Après la coloration par l'éosine-nigrosine. Le pourcentage des spz vivants est en moyenne de 55,55% et celui des spermatozoïdes morts est en moyenne de $44,45 \pm 14,56\%$.

Tableau 6 : Valeurs moyennes des paramètres macroscopique (Motilité massale et individuel, concentration et la vitalité) de la semence fraîche

N° des lapins	Motilité Massale (%)	Motilité Individuelle(%)	Concentration $\times 10^6$ Spz /ml	Vitalité (%)
1	6	3	28,75	57,5
2	6,5	3,5	170,35	55
3				
4	5	3	40,62	44
5	3,25	2,75	70,13	39,75
6	7	2,5	187,4	81,5
(Moyenne $\pm$ SD)	5,55 $\pm$ 1,32	2,95 $\pm$ 0,33	99,49 $\pm$ 66,44	55,55 $\pm$ 14,56

- Morphologie des spermatozoïdes**

Selon les résultats illustrés dans la figure 26, nous pouvons remarquer que 55,55% des spermatozoïdes sont normaux, alors que le pourcentage de spermatozoïdes anormaux est estimé à 44,45%. La plupart des anomalies sont liées à la queue avec une moyenne de 29,7%, suivie par la pièce intermédiaire avec un taux de 10,32% Un faible pourcentage est trouvé pour les anomalies de la tête avec une moyenne de 1,08%, et 4,35% pour les anomalies liées à la gouttelette cytoplasmique (Figure 27).

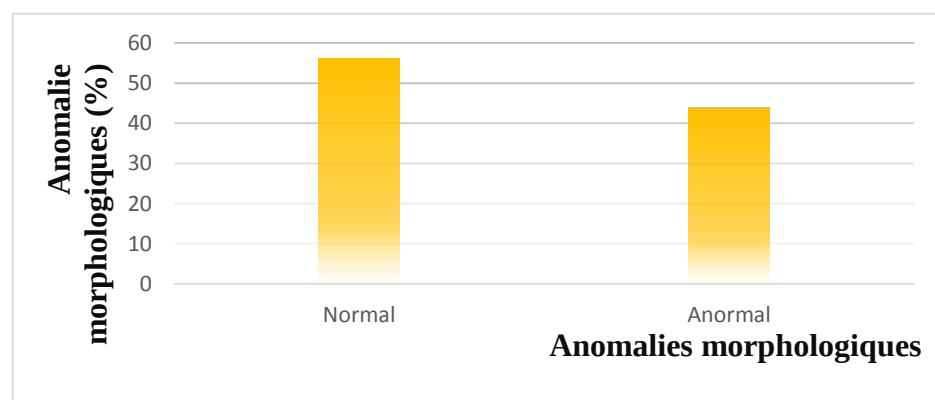


Figure 26 : Pourcentage des spermatozoïdes normaux et anormaux.

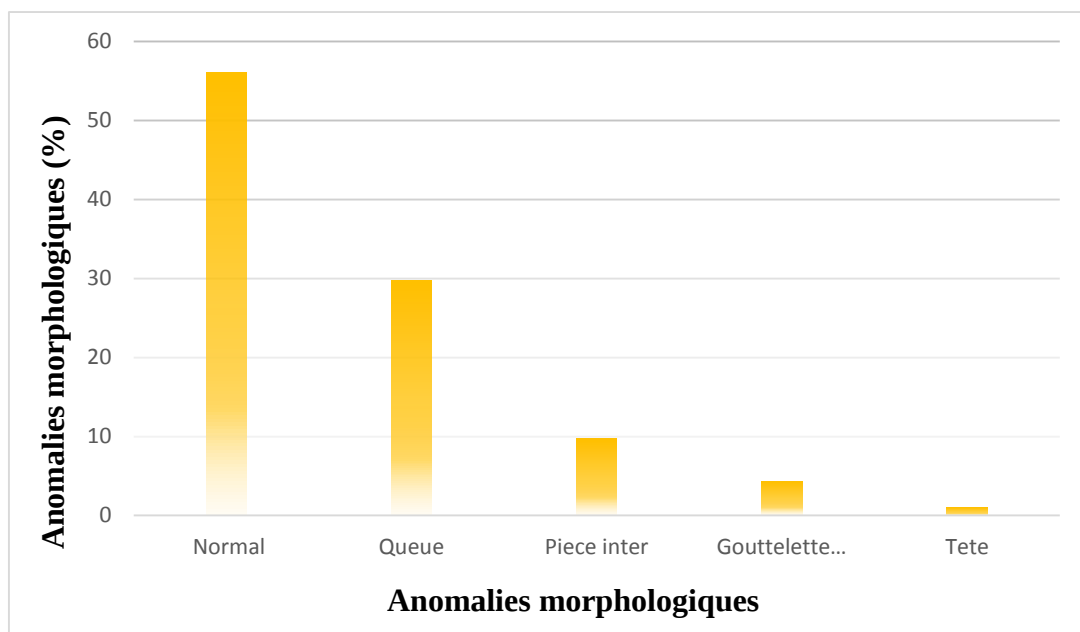


Figure 27 : Pourcentage des anomalies morphologiques des spermatozoïdes.

III.1.2. Effet des dilueurs sur la qualité spermatique durant la conservation à 4 °C

Nous avons utilisé le système CASA pour évaluer les effets des deux dilueurs (D1 : Galap ; et D2 : Tris) et la durée de conservation de J1 à J3 sur les paramètres microscopiques à savoir la motilité et la vitalité des spermatozoïdes chez les lapins de souche synthétique.

III.1.2.1. Motilité

La figure 28 illustre l'effet des dilueurs sur la motilité (progressive et non progressive) des spermatozoïdes, conservés à 4 °C.

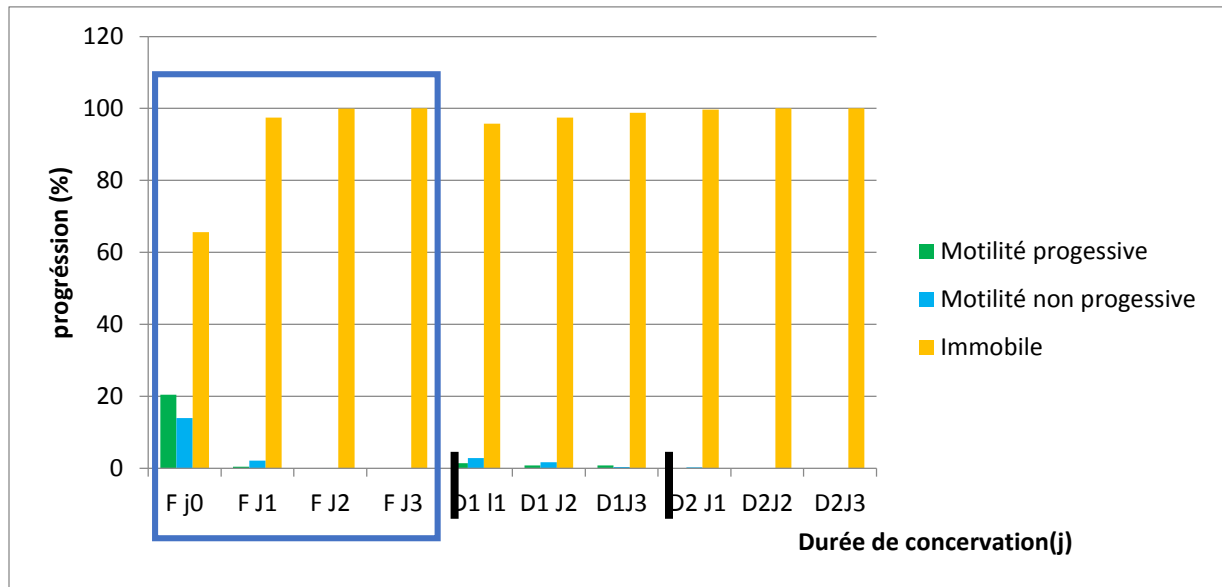


Figure 28 : Effet des dilueurs D1 (Galap) et D2 (Tris) sur la progression des spermatozoïdes en fonction de la durée de conservation de la semence. F : semence fraîche (témoin), D : dilueur, J : jour.

Les résultats de l'analyse de la semence fraîche juste après la collecte (J0) a révélé un taux de motilité de 34,38% (progressive : 20,43% ; non progressive : 13,95%) et immobile est de 65,62%. Nous avons constaté que la motilité a diminué les jours suivants (J1 : 0,42% ; J2 et j2 : 0%). De même pour la motilité non progressive (J1 : 2,11 % J2 : 0,03% et J3 : 0 %).

➤ **Pour le dilueur D1 :**

- La motilité progressive diminue avec la durée de conservation. Elle est de 1,4% à J1 ; de 0,8% à J2 et J3.

- La progression non progressive diminue elle aussi avec la durée de conservation. Elle diminue de J0 à J1 pour atteindre 2,85%, continue à diminuer le J2 à 1,7%, et diminue encore à J3 pour atteindre 0,4%.

- Le pourcentage de spermatozoïdes immobiles augmente de J0 à J1 pour atteindre 95,75%, atteint 97,5% à J2, et continue jusqu'à atteindre 98,8% à J3.

➤ **Pour le dilueur D2 :**

- la motilité progressive est de 0,1% à J1, et diminue encore jusqu'à atteindre 0% à J2 et J3.

- la motilité non progressive diminue jusqu'à 0,24% à J1, et atteint 0% à J2 et J3.

- Le pourcentage des spermatozoïdes immobiles augmente avec la durée de conservation jusqu'à 99,66% à J1, et atteint 100% à J2 et J3.

Les résultats obtenus ont montré que la semence conservée à 4 °C présente une baisse rapide de la motilité de la semence fraîche (j1 : 2,53) ainsi que celle diluée dans le deuxième dilueur (Tris) (j1 : 0,34). Cependant, la semence diluée dans la solution de Galap maintient sa mobilité jusqu'au 3ème jour (J3 : 1,2%).

III.1.2.2.Vitalité

Après la récolte (J0), le taux moyen de la vitalité (spermatozoïdes vivants) est de 55,55%.

• **Pour le dilueur D1**, il est de 58,2 % à J1, puis diminue pour atteindre une valeur de 50% à J2 puis à J3 elle est de 25% (Figure 31).

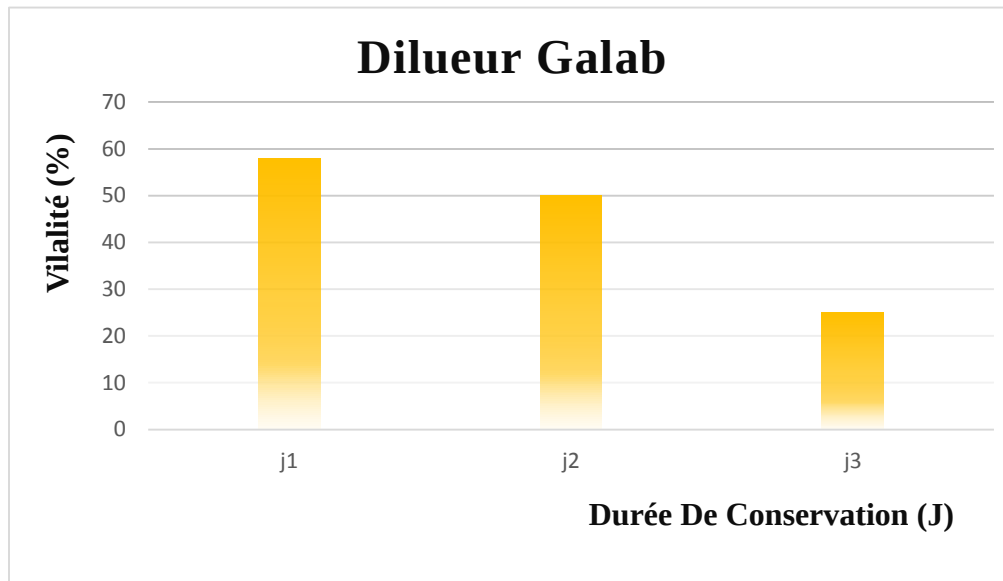


Figure 31 : Effet du dilueur D1 sur la vitalité des spermatozoïdes en fonction de la durée de conservation. F : fraîche, D : dilueur, J : jour.

- **Pour le dilueur D2**, la vitalité est de 17% à J1 puis elle diminue pour atteindre une valeur de 13% à J2, et continue à baisser jusqu'à 0% à J3 (Figure 32).

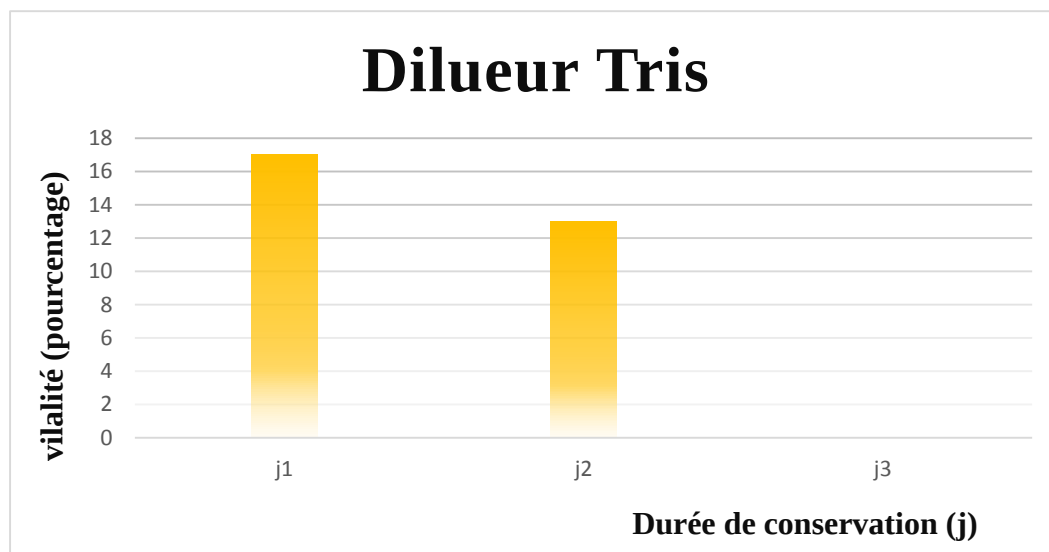


Figure 32 : Effet du dilueur D2 sur la vitalité des spermatozoïdes en fonction de la durée de conservation. F : fraîche, D : dilueur, J : jour.

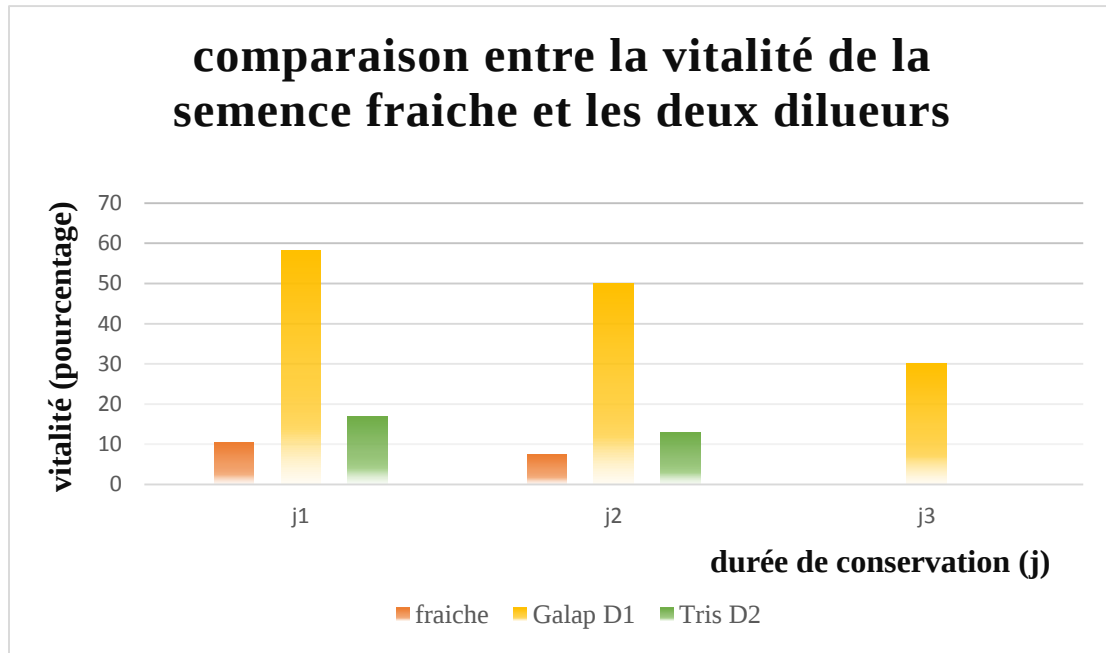


Figure 33 : Comparaison entre la vitalité de la semence fraiche et les deux dilueurs.

Les résultats obtenus ont montré une baisse du taux moyen de la vitalité des spermatozoïdes conservés à 4 °C à l'état frais et dilués dans les deux dilueurs (D1 :Galap et D2 :Tris) au cours des trois jours de conservation. Cependant, la semence diluée par la solution de Galap avait enregistré un taux de vitalité supérieur à celui de la semence fraiche et de celle diluée avec le deuxième dilueur (D2:Tris).

III.2.Discussion

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de deux dilueurs, Galap (D1) et Tris (D2) sur les paramètres spermatiques du lapin de souche synthétique après une conservation à 4°C

III.2.1. Analyse de la semence fraîche avant conservation (J0)

III.2.1.1 Analyse macroscopique

- **Volume**

Le volume spermatique moyen rapporté dans nos résultats ($0,66 \pm 0,16$ ml) est conforme à la norme (0,3-0,9 ml). Toutefois, Nous avons trouvé que nos résultats étaient inférieurs par rapport aux moyennes du volume d'éjaculat enregistré par Mathur *et al.*, (1989), ainsi que celui de Pascual *et al.*, (2004) (1,13ml et 0,90ml respectivement).

Les différences de volume d'éjaculat peuvent être attribuées à des variations de l'activité des glandes sexuelles accessoires en réponse à l'hormone testostérone (El-Kamash *al.*, 2000).

- **pH:**

La valeur moyenne du pH observé chez nos lapins de souche synthétique est de ($7,21 \pm 0,31$). Nos résultats sont conformes à la norme, qui est d'environ 7,1. Cependant, des résultats proches ont été rapporté par Mathur *et al.*, (1989) (7,23). Selon Abd El-Ghaffar (1992), le pH joue un rôle en tant qu'indicateur de la sécrétion normale des glandes accessoires et de la capacité des spermatozoïdes à survivre.

- **Couleur**

Dans notre expérimentation nous avons enregistré une note de 1,4 (couleur blanche laiteuse clair). Toutefois, Roca *et al.*, (1993), ont observé une couleur crémeuse pour la semence. Et ils ont rapportés une corrélation positive entre la couleur et la concentration spermatique. Selon Alvarino (1993), la couleur serait un indicateur de la qualité du sperme.

III.2.1.2. Analyse microscopique

- **Motilité massale et individuelle**

Lors de l'analyse de la motilité massale, nous avons observé un score de $5,55 \pm 1,32$ pour la souche synthétique. Le taux de motilité massale est similaire à celui rapporté par Theau-Clément *et al.* (2015) (5,73%).

Concernant la motilité individuelle, les taux observés étaient de $2,95 \pm 0,33$, soit 73,75%. Nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par Pascual *et al.*, (2004) (47,01%), ainsi qu'à ceux rapportés par Roca *et al.*, (2005) (66,88 %). Cependant, nos résultats sont inférieurs par rapport à ceux rapportés par Di Iorio *et al.* (2014), chez les lapins Blanca italiana ($76,00 \pm 0,98$) et par Carluccion *et al.* (2019), chez la race Néo-Zélandaise ($78,80 \pm 1,70\%$).

Les différences observées dans la motilité des spermatozoïdes pourraient être attribuées aux variations de l'activité de la glande pituitaire, qui influence la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH). Cette dernière, à son tour, affecte la production de testostérone par les cellules de Leydig dans le tissu interstitiel des testicules (Seleem, 2005).

- **Progressivité**

Dans nos conditions expérimentales, la valeur de la progression des spermatozoïdes enregistrées (20,43%) est inférieure aux normes (30%-90%) (Theau-Clément *et al.*, 1996). Toutefois, les résultats que nous avons obtenus sont inférieurs à ceux rapportés par Mathur *et al.*, (1989) (68,92 %). Et de ceux rapportés par Theau-Clément *et al.*, (2015) (42,6 %).

- **Concentration en spermatozoïdes**

La concentration de spermatozoïdes par éjaculat enregistré ($99,487 \times 10^6$ spz/ml), est inférieure à la normale ($250-600 \times 10^6$ spz/ml). Nos résultats sont inférieurs à ceux rapportés par Mathur *et al.* (1989), (934×10^6 spz/ml), par Roca *et al.*, (2005) ($465,71 \times 10^6$ spz/ml) ainsi qu'à ceux rapportés par Di Iorio *et al.* (2014), ($645 \pm 32,00 \times 10^6$ spz/ml). Cependant, nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Pascual *et al.* (2004), ($99,6 \times 10^6$ spz/ml). La variation de la concentration des spermatozoïdes pourrait être liée à des différences entre les races, l'âge, les

conditions environnementales, le niveau de testostérone, la taille du corps et le poids des testicules (Abd El-Ghaffar, 1992), ainsi qu'à la dégénérescence de l'épithélium germinale et à l'atrophie des tubules séminifères (Zeidan *et al.*, 1997).

- **Vitalité**

Le taux des spermatozoïdes vivants de la souche synthétique enregistré dans notre partie expérimentale est de 55,55% $\pm$ 14,56%. Mathur *et al.* (1989) et Carluccio *et al.* (2004), ont apporté un taux de vitalité supérieur à celui obtenu dans notre partie expérimentale (89,97 % et 92,20%, respectivement). La vitalité peut être affectée par des facteurs comme la nutrition, la fréquence de collecte ou la température.

- **Morphologie**

Nous avons enregistré un taux d'anomalies morphologiques de 44,95%. Cependant, les anomalies les plus obtenues sont celles de la queue (29,7%). Nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par Mathur *et al.*, (1989) (16,59 %) et de ceux rapportés par Carluccio *et al.* (2004), (2,4%). Marai *et al.* (2002), ont attribué l'augmentation du taux de spermatozoïdes anormaux aux défauts de la spermatogenèse, en particulier au dernier stade de différenciation des spermatides. Ces anomalies pourraient également être liées aux procédures de préparation des échantillons spermatiques (facteur de dilution et des lames qui vont servir à l'analyse morphologique assistée par ordinateur (Davis, 1993).

III.2. Analyse de la semence fraîche et diluée durant la conservation à 4°C (J1, J2 et J3)

Cette partie étude a évalué les effets de deux dilueurs, Galap (D1) et Tris (D2), sur la préservation de la qualité du sperme de lapins de souche synthétique, conservé à 4 °C pendant 24, 48 et 72 heures. En utilisant le système CASA pour analyser les paramètres microscopiques (motilité et vitalité), nos résultats ont montré que le dilueur Galap (D1) maintenait mieux la vitalité et la mobilité progressive des spermatozoïdes que le Tris (D2), en particulier pour des durées de conservation prolongées.

III.2.1. Motilité

Le taux de la motilité chez la souche synthétique diluée avec le dilueur D1 est supérieur à celle diluée par le dilueur D2 tout le long de la durée de conservation. Les résultats obtenus sont de l'ordre suivant:

- Pour le dilueur D1 la motilité baisse progressivement. À J1 elle est de 4,25% (1,4%+ 2,85%), à J2 :2,25% (0,8%+ 1,7%), et à J3 :1,2% (0,8%+0,4%).
- Pour le dilueur D2 la motilité individuelle est faible à J1 : 0,34% (0,1%+0,24%), et devient nul à J2 et J3.

À partir de ces résultats, il paraît que le dilueurs D1 (Galap) a un effet favorable sur la motilité jusqu'au 3^{ème} jour (J3 : 1,2%), alors que l'effet du dilueurs D2 (Tris) s'épuise au j1 : 1,4% (0,1%+0,24%).

III.2.2. Vitalité

Le taux des spermatozoïdes vivants de la souche synthétique après conservation est de l'ordre suivant :

- Pour le dilueur (D1) nous avons enregistré un taux de vitalité de 58,2% à J1, puis ce dernier diminue pour atteindre une valeur de 50% à J2 et elle continue à baisser pour atteindre 25% à J3.
- Pour le dilueur (D2) elle est de 17% à J1 puis elle diminue pour atteindre une valeur de 13% à J2, et continue à diminuer jusqu'à 0% à J3.

Une diminution du taux de vitalité des spermatozoïdes est observée pour les deux types de dilueurs (D1 et D2) au cours de la période de conservation (J1 à J3) à 4°C. Néanmoins, la semence diluée par la solution de Galap avait enregistré un taux de vitalité supérieur à celui de la semence fraîche et de celle diluée avec le deuxième dilueur (D2 : Tris).

Ces résultats sont en accord avec la littérature récente, qui souligne le rôle crucial de la composition des dilueurs dans la préservation du sperme. Par exemple, une étude de **Martínez-Pastor et al. (2021)** a montré que les dilueurs enrichis en agents protecteurs de membrane et en antioxydants améliorent significativement la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes lors de la conservation à froid, chez le lapin comme chez d'autres espèces. Les performances supérieures observées avec Galap dans notre étude pourraient être attribuées à sa formulation, qui contient probablement de tels composants protecteurs, contrairement aux dilueurs à base de Tris qui, bien que largement utilisés, manquent parfois d'additifs suffisants pour contrer les dommages causés par le froid (**Kumar et al., 2022**).

Par ailleurs, la diminution de la mobilité et de la vitalité observée avec le temps dans les deux dilueurs confirme la détérioration progressive de la qualité du sperme bien conservé dans les conditions de stockage réfrigéré (**Pérez-Guzmán et al., 2023**). Cependant, la meilleure conservation avec Galap indique que le choix du dilueur est déterminant pour prolonger la durée de vie du sperme sans compromettre son potentiel fécondant. Ce constat est cohérent avec les travaux de **Martínez-Pastor et al. (2021)**, qui ont montré que les formulations de dilueurs adaptées à des espèces et souches spécifiques permettent de meilleurs résultats de conservation.

Fait intéressant, bien que la mobilité progressive ait chuté nettement dans les deux dilueurs, la vitalité s'est relativement mieux maintenue avec Galap, ce qui suggère que ce dilueur protège mieux l'intégrité membranaire et l'activité métabolique des spermatozoïdes. Cette observation est appuyée par des recherches récentes montrant que les dilueurs contenant des substrats énergétiques et des stabilisateurs de membrane peuvent réduire la peroxydation lipidique et maintenir la fonction spermatique durant la conservation (**Chen et al., 2023**).

Les résultats obtenus dans ce travail montrent qu'il est possible d'utiliser la semence diluée avec la solution de Galap, conservée à 4°C pour une insémination artificielle 24 h après le prélèvement

où nous avons constaté que la mobilité progressive et la vitalité sont meilleures par rapport à la semence fraîche ou celles diluée avec le Tris. Cependant, il reste plus intéressant de pratiqué l'insémination artificielle avec la semence fraîche le jour même du prélèvement (Vitalité progressive : 20,34 ; vitalité ; 55,55%).

Conclusion

Conclusion

A l'issue de notre expérimentation, qui a pour objectif d'étudier l'effet de deux dilueurs et de la durée de conservation sur la semence de lapin de souche synthétique, nous pouvons conclure que :

- Les dilueurs utilisés ont un effet sur la vitalité, la motilité ; nous avons noté des valeurs variables.
- Le dilueur D1(Galap) a montré de meilleures performances que le dilueur D2 (Tris) en termes de maintien de la motilité et vitalité des spermatozoïdes pendant la conservation à 4°C.
- Diminution de la mobilité et de la vitalité observée avec le temps dans les deux dilueurs confirme la détérioration progressive de la qualité du sperme conservé à 4°C.
- En résumé, l'utilisation de dilueurs adaptés, la réfrigération à 4°C et l'insémination rapide permettent de conserver efficacement la semence de lapin pendant maximum 2 jours après le début de la conservation à 4 °C.

Pour approfondir ces résultats, il est indispensable de les valider par des études complémentaires menées sur des échantillons plus larges. Il conviendrait également de réaliser des inséminations artificielles afin d'évaluer l'efficacité réelle des dilueurs, en analysant les taux de fertilité et de prolificité.

Références
Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- Abd El-Ghaffar AE. (1992). Some studies on the artificial insemination in rabbits. Ph.D. Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, Benha Branch, Egypt.
- Alhouse GC, Kuster C, Clark SG, Weisiger RM. (2000). Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, 53(5): 1167–1176.
- Alvarino, J.M.R. (1993). Control de la reproduccion en el conejo. Edit. MAPA Mundiprensa, Madrid, pp. 137.
- Alvariño J.M.R. (2000). Reproductive performance of male rabbits. In : Proc. 7th World Rabbit Congresses. Valencia, vol. 8(1), 13–35.
- Amann RP. (1998). Cryopreservation of sperm. In: Knobil E., Neill J.D. (Eds.). *Encyclopedia of reproduction*. Volume 1. Academic press, San Diego ; p.773–783.
- Arencibia Arrebola DF, Rosario Fernandez LA. (2009). Consideraciones prácticas acerca de la calidad del semen de Conejos aplicado en estudios de toxicología de la fertilidad. *Redvet Revista Electrónica Veterinaria*, 8(10): 1–18.
- Auger J., Eustache F. (2000). Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie*, N°4, 358–373.

B

- Bamba K, Cran DG. (1988). Effect of rapid warming of bull and rabbit semen. *J Reprod. Fertil.*; 82: 501-507.
- Barone, R. (1976). *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Vigot Frères Éditeurs, Paris.
- Barone, R. (1978). *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Vigot Frères Éditeurs, Paris.
- Barone, R. (2001). *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Tome 4 : *Splanchnologie II*. Ed. Vigot, 920 p.

- Bencheikh N. (1995). Effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoïdes récoltés chez le lapin. INRA, station d'amélioration génétique des animaux, Auzeville, France.
- Bencheikh N. (1995). Effet de la fréquence de la collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoïdes récoltés chez le lapin. *Ann. Zootech*, 44, 263–274.
- Billard R, Legendre M. (1980). Cryoconservation du sperme de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* R.).
- Bonnes G., Desclaude J., Drogoul C., et al. (2005). Reproduction des animaux d'élevage. 2e éd., Ed. Educagri, 407 p.
- Boussit D. (1989). Reproduction et insémination artificielle en cuniculture chez le lapin. Association française de cuniculture, diffusion Lavoisier TEC et DOC.
- Boussit, D. (1989). Reproduction et insémination artificielle en Cuniculture. Association Française de Cuniculture, Ed. Lempdes France, 234 p.
- Bue P. (1992). Contribution à l'étude de la conservation d'une semence de chien pendant 48 h à +4°C : choix d'un milieu et influence du glycérol. Thèse Méd. Vét., Nantes ; n°127, p. 81. (Références 28 et 29 = doublon).

C

- Cabannes CR. (2008). Comparaison des méthodes d'évaluation de la qualité de la semence dans l'espèce bovine, canine et humaine. Thèse de doctorat vétérinaire, ENVT, 107 p.
- Campos ACN, et al. (2014). Male rabbit reproductive physiology. *Standard Research Journal of Agriculture Sciences*, 2(8): 120–128.
- Castellini C., et al. (2005). Comparison of different dietary sources of PUFA n-3 on semen characteristics of rabbit bucks. *Reprod. Dom. Anim.* (Abstr. 386), 180.
- Chen, L. et al. (2023). Role of antioxidants in sperm preservation: A review. *Theriogenology*, 180, 123-131.

D

- David G, Bisson JP, Czyglik F et al. (1975). Anomalie morphologique des spermatozoïdes humains. J. Gyn Obstet Biol Reprod, 4, suppl. I : 17–36.
- Davis RO, Gravance CG. (1993). Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. Fertil. Steril., 59, 412–417.
- Davis RO, Gravance CG, Overstreet JW. (1995). A standardized test for visual analysis of human sperm morphology. Fertility and Sterility, 63: 1058–1063.
- Decuadro-Hansen G. (2004). La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal. Gynécologie Obstétrique & Fertilité, 32, 887–893.
- Di Iorio M., et al. (2014). Comparison of Different Extenders on the Preservability of Rabbit Semen Stored at 5°C for 72 Hours. Italian Journal of Animal Science, 13(4): 3444.
- DSA. (2017). Directory of agricultural statistics of the Wilaya of Tizi-Ouzou. Economic Statistics and Surveys Service. Department of Agricultural Services.
- El-Kamash HA, et al. (2000). Effects of intramuscular injection of GnRH on semen characteristics of buck rabbits under different seasons. Inter. Conf. On Anim. Prod. And Health, Giza, Egypt, p. 587–592.

E

- England GCW. (1993). Cryopreservation of dog semen: a review. J. Reprod. Fertil., Suppl. 4: 243–255.

F

- FAOSTAT. (2013). Données statistiques de la FAO, production agricole. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QL/E> (consulté le 25 Mai 2025 à 18 : 10)
- Feldman EC, Nelson RW. (2004). Canine and feline endocrinology and reproduction, p. 1016–104.
- Finzi A. (1990). Recherches pour la sélection de souches de lapins thermotolerants. Options Méditerranéennes, Série Séminaires, 8: 41–45.
- Foulkes JA. (1977). the separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 49: 277–284.

- Francisco DAA, Luis ARF. (2003). Analysis of seminal quality, a tool in fertility experimental toxicology study, p. 44–46.
- Fortun-Lamothe L., et al. (2015). Le lapin : de la biologie à l'élevage. Ed. Quae, France, 39–83.

G

- Garcia-Tomas M., et al. (2006). Heterosis, direct and maternal genetic effects on semen quality traits of rabbits. *Livestock Science*, 100: 111–120.
- Gidenne T. (2015). Le lapin : De la biologie à l'élevage. Ed. Quae, 270 p.

I

- Iguer-ouada M., Verstegen JP. (2001). Long-term preservation of chilled canine semen. *Theriogenology*, 55(2): 671–684.

J

- Joly T., Theau-Clément M. (2000). Reproduction et physiologie de la reproduction, 7e Congrès Mondial de Cuniculture, Valencia, ASF.

K

- Khalil MH. (2002). The Giza White rabbits (Egypt). In: Rabbits genetic resources in Mediterranean countries, CIHEAM, Zaragoza, N°38, p. 23–36.
- Klinefelter GR. (2002). Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis, p. 353–369.
- Kumar, S. et al. (2022). Comparative effects of Tris and novel extenders on semen quality during refrigeration. *Animal Reproduction Science*, 240, 106805.

L

- Lebas F., et al. (1996). Le lapin : Élevage et pathologie. FAO éd. Rome.

M

- Madrp. (2017). Recherche agronomique. Ministère de l'Agriculture et Développement rural, <http://madrp.gov.dz/>

- Manjunath P., et al. (2002). Major proteins of bovine seminal plasma bind to LDL fraction of egg yolk. *Biol. Reprod.*, 67: 1250–1258.
- Marai, I.F.M., Habeeb, A.A.M., & Gad, A.E. (2002). Rabbits productive, reproductive and physiological performance traits as affected by heat stress: a review. *Livestock Production Science*, 78, 71–90.
- Marie-Hélène, P., Christophe, G., Nadia, P., Cendrine, G.S., Dominique, S., Marie-Roberte, G., Georges, P., & Philippe, D. (2010). Analyse de la spermatogenèse ex vivo : application à l'analyse de la toxicité testiculaire (REACH). *Toxicologie Analytique et Clinique*, 26, 305–310.
- Martinet L. (1973). Quelques aspects de la physiologie de la reproduction du lapin. Session ITAVI, Toulouse.
- Martínez-Pastor, F. et al. (2021). Advances in semen extender formulations for improved sperm preservation. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 645789.
- Martins-Bessa A., et al. (2006). Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 66(9): 2047–2055.
- Mariana R. (2006). Complete diagram of a human spermatozoa. Wikimedia Commons.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Complete_diagram_of_a_human_spermatozoa_fr.svg. (consulté le 10 Juin 2025 à 11 :45)
- Mathur, A.K., Srivastava, R.S., Rawat, P.S., & Kalra, D.B. (1989). Seasonal variation in the semen characters of Soviet Angora rabbit bucks. *Animal Reproduction Science*, 19, 293–298.
- Mocé, E., et Graham, J.K., “In vitro evaluation of sperm quality”. *Anim. Reorod. Sci.* (2008), 105: 104-118
- Mouhous, A., et al. (2019). L'efficacité des aides de l'Etat en relation avec les performances de production : cas des élevages cunicoles. 18e Journées de la Recherche Cunicole, Nantes.
- Mouhous, A., et al. (2020). Sustainability and profitability of commercial rabbitries in Tizi-Ouzou, Algeria. 12th World Rabbit Congress, Nantes.

- Najjar, Ben Mrad. (2013). Facteurs de variations de la qualité du spermogramme du lapin reproducteur.
- Nizza A., et al. (2000). Influence of dietary protein content on libido and semen characteristics. 7th World Rabbit Congress, Valencia, p.217–223.

P

- Pascual, J.J., García, C., Martínez, E., Mocé, E., & Vicente, J.S. (2004). Rearing management of rabbit males selected by high growth rate: the effect of diet and season on semen characteristics. *Reprod. Nutr. Dev.*, 44, 49–63.
- Peña AI., Linde-Forsberg C. (2000). Effects of Equex, dilution steps and freezing/thawing rates. *Theriogenology*, 53: 859–875.
- Pérez-Guzmán, M. et al. (2023). Time-dependent changes in sperm quality during cold storage: Mechanisms and mitigation strategies. *Andrology*, 11(2), 345-357.
- Ponglowhapan S., et al. (2004). Influence of glucose and fructose in extenders. *Theriogenology*, 62(8) : 1498–1517.
- Posière SCGJ. (2002). Récolte de semence de chat : comparaison des méthodes. Thèse de doctorat vétérinaire, ENV Alfort, 95 p.

R

- Raphaël B., et al. (2004). Projet cryoyster : congélation de laitance d’huître creuse. *Crassostrea gigas*.
- Roca, J., Martinez, S., Orengo, J., Parrilla, I., Vázquez, J.M., & Martinez, E.A. (2005). Influence of constant long days on ejaculate parameters of rabbits reared under Mediterranean natural conditions. *Livestock Production Science*, 94, 169–177.

S

- Seleem, T.S.T. (2005). Some reproductive, productive and physiological aspects of purebred and crossbred Flander and New Zealand White rabbits under Egyptian environmental conditions. 4th International Congress on Rabbit Production in Hot Climate, Sharm El Sheikh, Egypt, 161–168.

- Silva, R. et al. (2024). Species-specific extender optimization for enhanced semen preservation. *Theriogenology*, 185, 45-53.
- Skinner JD. (1967). Puberty in the male rabbit. *J. Reprod. Fertil.*
- Soler C., et al. (1994). Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *Int J Androl*, 17(5) : 271–278.
- Stănescu PM, Alin IB. (2015). Comparative Studies. ISSN 1843-5270.
- Swelum AA., et al. (2011). Comparing ethylene glycol with glycerol for buffalo bull semen. *Theriogenology*, 76(5) : 833–842.

T

- Theau-Clement M. (2005). Préparation de la lapine à l'insémination. 11èmes Journées de la Recherche Cunicole.
- Theau-Clément, M., Bolet, G., Sanchez, A., Saleil, G., & Brun, J.M. (2015). Some factors that influence semen characteristics in rabbits. *Animal Reproduction Science*, 157, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.011>

V

- Van der Horst G. (2020). CASA in domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106350>.
- Van Praag E. (2015). Testicules tombants chez le lapin mâle non-castré. *MediRabbit*. [Consulté le 09/06/2022].
- Viudes de Castro MP., et al. (2004). Sperm kinetic parameters among rabbit lines. 8th Annual Conf. ESDA, Warsaw.
- Viudes de Castro MP, Vicente JS et Lavara R (1999). Effet du nombre de spermatozoïdes sur la fertilité de la semence conservée 24 heures chez le lapin. *Ann Zootech*, 48, 407-412.

Z

- Zeidan, A.E.B., Marai, I.F.M., Abd El-Kariem, M.A., & Ibrahim, Z.A. (1997). Effects of intratesticular injection of gonadotropin-releasing hormone on reproductive performance of low fertile male rabbits under Egyptian summer conditions. 4th International Conf. on Animal Production and Health, Giza, Egypt, 557–561.

ANNEXE

Annexe A

Matériel et réactifs utilisé dans la partie expérimentale

1. Matériel utilisé pour la préparation du dilueur Tris (D2).

❖ La composition du dilueur Tris (D2) est présentée dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Quantité des produits utilisés pour la préparation du dilueur Tris (D2)

Nom des produits	Dilueur 1 Tris (Viudes de Castro et <i>al</i> ,.2012)
Tris (hydroxymethyl aminométhane)	3,026g
Acide citrique	1,7g
Glucose	1,25g
Antibiotique	0,1g
Eau distillée	100ml

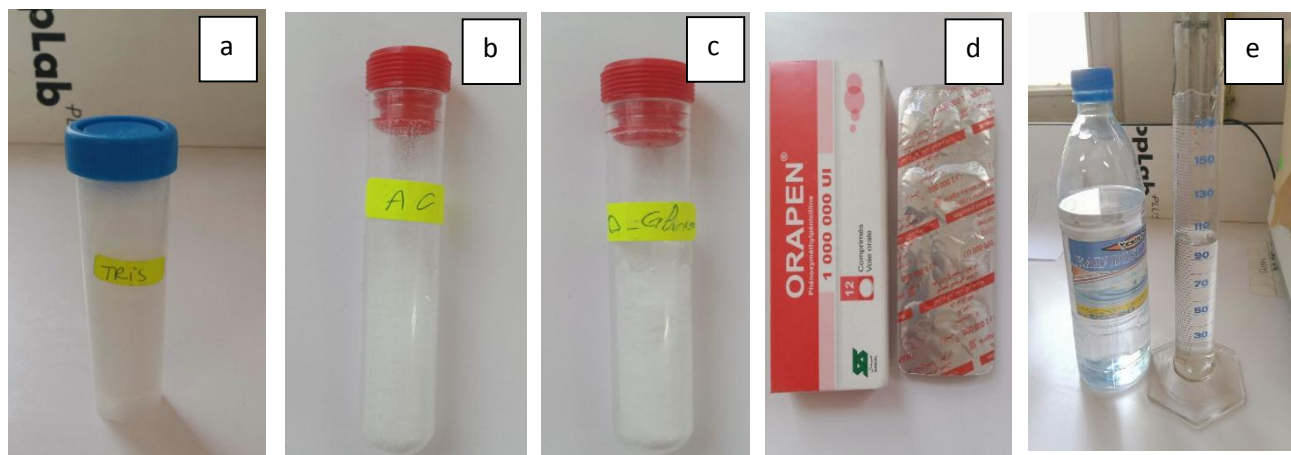


Figure 1 : Compositions du dilueur Tris (D2) : a : Tris ; b : Acide citrique ; c : D-Glucose ; d : Antibiotique ; e : Eau distillée.

❖ Le matériel utilisé pour la préparation du dilueur est illustré dans la figure suivante :

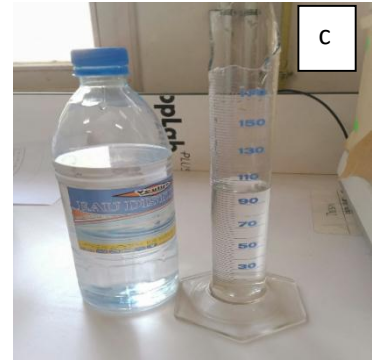
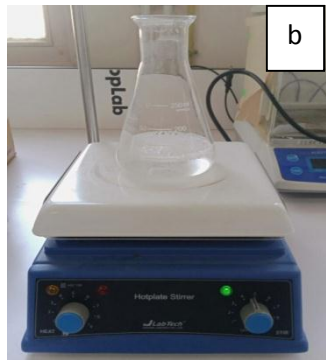


Figure 2 : Matériel utilisé pour la préparation du dilueur D2 : (a : balance de décision ; b : agitateur magnétique et un bécher ; c : tube en verre gradué)

2. Matériel pour la collecte de la semence et analyse macroscopique

La collecte de sperme chez le lapin nécessite d'avoir le matériel suivant :

- Plaque chauffante et cristalliseur pour chauffer et le vagin artificiel (figure 1).
- Les tube gradues stérile pour le prélèvement de la semence, voir la couleur et Volume (Figure 2).
- Papier pH pour déterminer le pH de la semence (figure 3).



Figure 1 : Plaque chauffante avec un
Vagin artificiel.



Figure 2 : Tube gradue.



Figure 3 : Papier pH.

3. Réactifs et solution pour l'analyse de la semence

- Eosine-nigrosine pour l'analyse de la vitalité (figure 4).
- Formol a 10% pour l'analyse de la concentration (figure 5).



Figure 4 : Eosine-nigrosine.

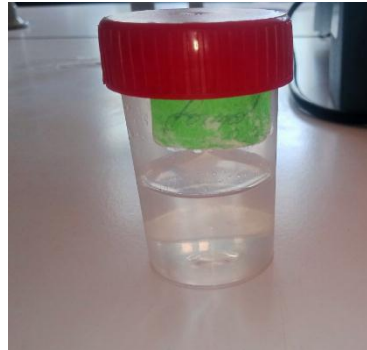


Figure 5 : Formol a 10%.

4. Matériel de laboratoire pour la dilution et l'analyse de la semence

- Bain marie pour garder la température de la semence à 37°C (figure 7).
- Vortex pour homogénéisation des solutions (figure 8).
- Dilueurs Galap D1 et Tris D2 (figure 9).



Figure 7 :Bain-marie



Figure 8 : Vortex

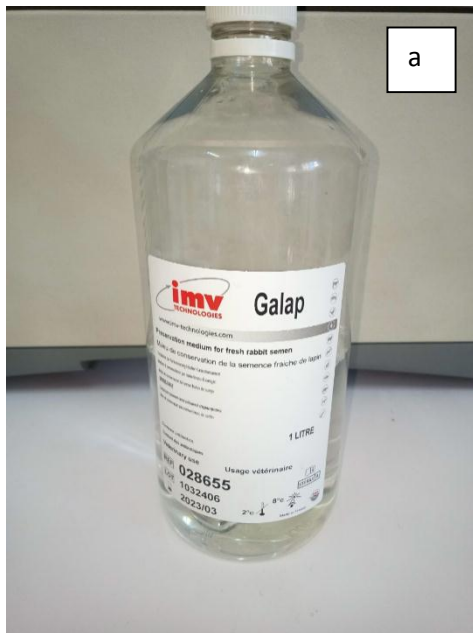


Figure 9 : Dilueur Galap (a) et Tris(b).

- Cellule Thoma pour l'analyse de la concentration (figure 10).
- Micropipette de 10 et 1000 microlitres (figure 11).
- Tubes sec (figure 12).
- Tubes eppendorf (figure 13).
- embouts (jaune et bleu) à usage unique pour les différents prélèvements (figure 14).
- Lames et lamelle pour la différente observation microscopique (figure 15).



Figure 10 : Cellule de Thoma



Figure 11 : Micropipette



Figure 12 : Tube sec.



Figure 13 : Tubes eppendorf.

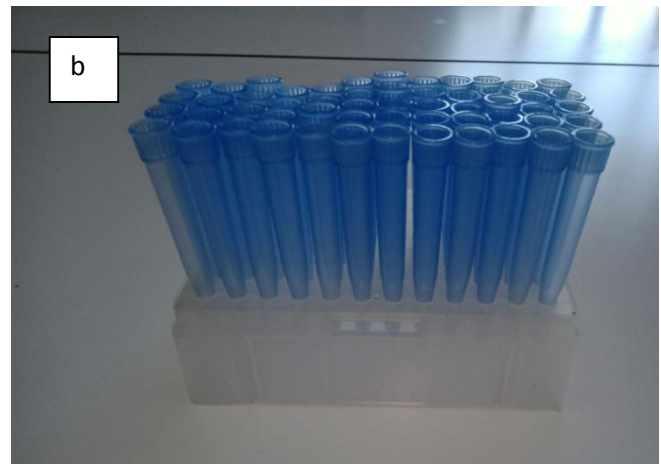
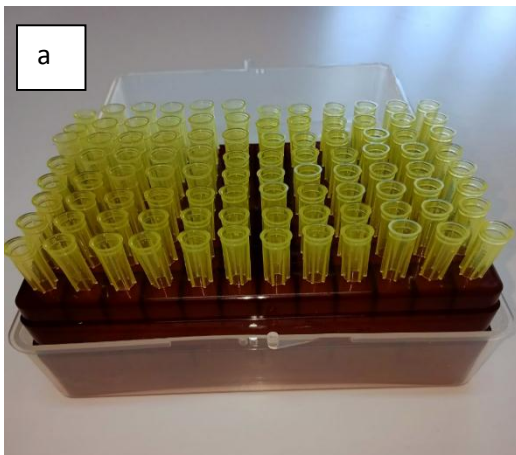


Figure14 : Embouts (jaune (a) et bleu (b)).

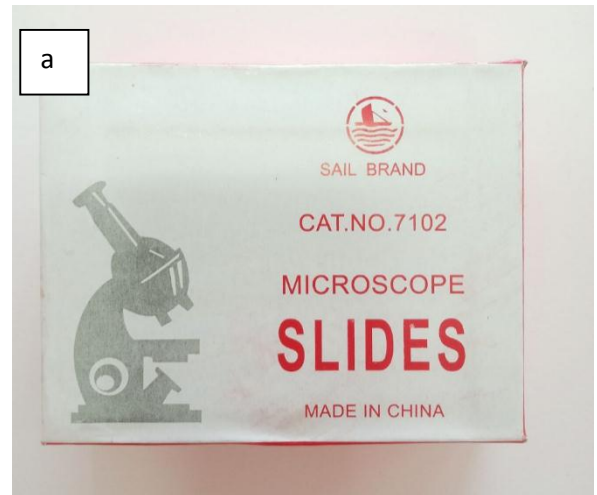
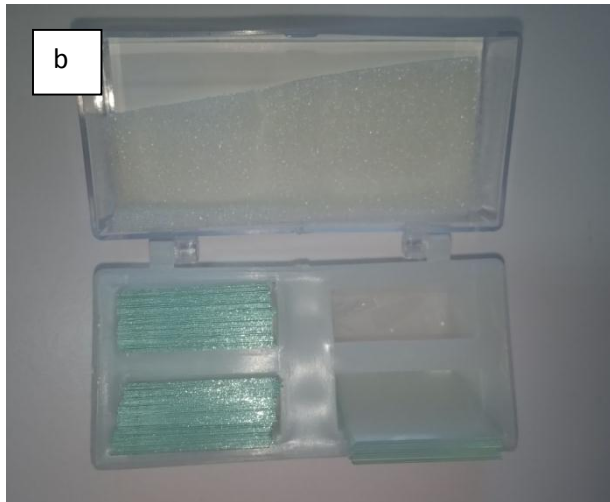


Figure 15 : Lames (a) et lamelles (b).

-System CASA (computer assisted sperm analysis) pour l'analyse microscopique de la semence (figure 16).



Figure 16: System CASA.

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة سعد دحلب البلدية (1)
Université SAAD DAHLEB-Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie
Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biologie et physiologie de la reproduction

Thème

**Etude Comparative De L'Effet De Deux Dilueurs (Tris Et Galap)
Sur La Conservation De Semence Du Lapin Par Le Système
CASA à 4°C**

Présenté par :

Soutenu le : 16/07/2025

Nom et prénom : CHARIF Marwa

Nom et prénom : MEBDOUA Maissa

Devant le jury:

MME BENAZOUZ F.

MCA /USDB1

Présidente

Mr BESSAAD MA.

MCA/USDB1

Examineur

Mme TARZAALI D.

MCA/USDB1

Promotrice

Autorisation de dépôt
accordée par
Dr. Bessaad Mohamed El Amin
le 25-09-2025

Année universitaire : 2024/2025