

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université SAAD DAHLEB BLIDA 1
Institut des Sciences Vétérinaires

THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de
DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : Sciences Vétérinaires

Option : Reproduction Animale

Présentée par

AMOKRANE ASMA

Thème

Biotechnologie de la reproduction de la lapine locale

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
BOUMAHDI-MERAD Z.	Professeur	Univ de Blida1	Présidente
KHELEF D.	Professeur	ENSV d'Alger	Examineur
MIMOUNE N.	Professeur	ENSV d'Alger	Examinatrice
ABDELLI A.	MCA	Univ de Bouira	Examineur
LAFRI M.	Professeur	Univ de Blida1	Invité d'honneur
IGUER-OUADA M.	Professeur	Univ de Bejaia	Invité d'honneur
KAIDI R.	Professeur	Univ de Blida1	Rapporteur

Année Universitaire : 2022/2023

*A la mémoire de mon très cher père
A ma très chère mère,
A mon cher époux,
A mes chers frères et sœurs,
A mes chers Aymen, Amine et Rihem
A ma famille et belle-famille,
A mes amis.*

Remerciements

Mes vifs remerciements sont adressés à mon directeur de thèse, Pr. KAIDI R., professeur à l'université de Blida1, pour m'avoir proposé ce sujet ainsi que pour son encadrement et sa patience. Qu'il trouve ici l'expression de ma grande estimation et mon respect.

Mes remerciements les plus sincères se dirigent vers le Pr. IGUER-OUADA M., professeur à l'université de Bejaia qui m'a accueillie, dans le Laboratoire de Recherche Associé en Ecosystèmes Marins et Aquacole et m'a dirigé dans la réalisation de ma thèse. Je le remercie pour la confiance qui m'a accordé, pour son soutien, son encouragement et sa rigueur dans le travail ainsi que ses conseils précieux. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de respect et de reconnaissance.

Mes sincères remerciements vont au Pr. BOUMAHDI-MERAD Z. pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et de présider le jury de ma thèse. Je remercie également Pr. KHELEF D., Pr. MIMOUNE N. et Dr. ABDELLI A. pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail de thèse en acceptant de l'examiner.

Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail ;

Dr. FATMI S. du département de Génie des procédés. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Tout le personnel de l'INRA de Oued Ghir de Bejaia, à savoir Mr. TARIKT et Mr. MANSOURI H.

L'ingénieur de laboratoire de Recherche Associé en Ecosystèmes Marins et Aquacole, Mme. INOURI A, ainsi que toutes les personnes que j'ai rencontrées dans ce laboratoire et qui m'ont aidé de près ou de loin.

Tous mes étudiants de Master que j'ai encadré dans le laboratoire de Recherche Associé en Ecosystèmes Marins et Aquacole.

Liste des abréviations

ABP: Androgen Building Protein.

ABTS :Acide 2,2'-bis(3 - éthylbenzothiazoline - 6-sulfonique)

ADN :Acide désoxyribonucléique.

AG : Acides gras

AGPI: Acides gras polyinsaturés

ALH: Amplitude of lateral head displacement.

ATP: Adenosine Triphosphate.

BCF: Beat Cross Frequency

°C: Celsius

C: Carbone.

CASA: Computer Assisted Sperm Analyzer

CAT: Catalase.

CHL:Cholesterol

Cm:centimètre.

CPAs: Agents Cryoprotecteurs.

D: Dark

DMSO: diméthylsulfoxyde

ERO : espèce réactive d'oxygène.

FIV : Fécondations in vitro.

FSH: Follicle Stimulating Hormon

g: gramme

GnRh: Gonadotropin-Releasing Hormon.

GSH-Px : Glutathion peroxydase.

hCG : Gonadotrophine Chorionique humaine.

IA : Insémination Artificiel.

IM : intramusculaire.

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique.

Kg : Kilogrammes.

LDL : Lipoprotéines dd basse densité.

LH: Luteinizing hormone.

L: light

LPO:Peroxides Lipidiques.

MI : Mobilité individuelle.

min : minutes.

Liste des abréviations

ml : millilitres.

mm : millimètres.

MM : Mobilité massale.

MOT : Motilité totale.

NaCl : chlorure de sodium.

NADPH : Nicotinamide Adénine di-nucléotide Phosphate.

N : nombre.

P : probabilité.

PBS : Tampon Phosphate Salin.

PC : phosphatidylcholine.

PE : phosphatidyléthanolamine.

PEG : polyéthylène glycol.

PMOT : Motilité progressive.

PMSG : pregnant mare serum gonadotrophine.

S : seconde

SEM : erreur standard de la moyenne.

SOD : Superoxyde dismutase.

Spz : spermatozoïdes.

TPGS : succinate de D- α -tocophérol polyéthylène glycol

TRIS : Tris buffer

Tris : Trisaminométhane 2-Amino-2-Hydroxyméthylpropane-1,3-Diol

v/v : volume / volume.

VAP : velocity pathway average.

VCL : curvilinear velocity.

VitC : vitamine C.

VitE : vitamine E.

VSL : straight-line velocity.

LIN : linearity

pH : potentiel hydrogène

h : heure

T0 : temps avant conservation

T1 : à 1 heure de conservation

T2 : à 2 heures de conservation

T3 : à 3 heures de conservation

Liste des abréviations

T4 : à 4 heures de conservation

T6 : à 6 heures de conservation

WOB : Wobble

% : pourcentage

μl : microlitre

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Appareil génital mâle du lapin	06
02	photographie d'un épидидyme collé au testicule d'un lapin adulte	07
03	Coupe longitudinale au niveau du testicule et de l'épididyme du Lapin	07
04	Pénis du lapin	08
05	Représentation schématique d'une coupe transversale de la gaine pérítubulaire du tube séminifère.	11
06	Structure d'un spermatozoïde.	14
07	Représentation schématique de la structure de la tête spermatique du lapin	14
08	Les composants du vagin artificiel	20
09	Matériel nécessaire au comptage des spermatozoïdes	24
10	Anomalies morphologiques de la tête	25
11	Anomalies morphologiques de la pièce intermédiaire	25
12	Anomalies morphologiques de la queue	26
13	Anomalies spermatiques mineures et majeures.	26
14	Résultats possibles du test hypo-osmotique.	27
15	Graphique de la motilité des spermatozoïdes	28
16	Structure du Polyéthylène glycol	36
17	Transport d'électrons à travers la chaîne de respiration mitochondriale et production des ERO	42
18	Les espèces oxygénées activées et les antioxydants régulateurs de leur production	43
19	Lieu d'insertion de l' α tocophérol au sein de la bicouche lipidique de la membrane plasmique	44
20	La vitamine E oxydée	45
21	Formule d'action antioxydante de la vitamine C	46
22	Insémination artificielle chez la lapine	48
23	Matériel utilisé pour l'insémination artificielle	49
24	Diagnostic de gestation par palpation trans-abdominale	50
25	Etapas du montage du vagin artificiel	52
26	Etapas de la collecte du contenu épидidytaire	53
27	Etapas de la préparation du complexe PEG/VitE	55
28	Le système CASA	57
29	Etapas de l'insémination artificielle	59
30	Effet des traitements sur la motilité totale (MOT) et la motilité progressive (PMOT) du sperme du lapin à T0, T1, T3 et T6 de conservation à 4°C dans le contrôle (TRIS) et les traitements (Polyéthylène glycol (PEG), Vitamine E (Vit E), Vitamine E associée au polyéthylène glycol (PEG/Vit E)).	62
31	Effet des traitements sur la vitesse curvilinéaire (VCL), vitesse de la progression linéaire (VSL), vitesse par rapport à la trajectoire moyenne (VAP),	64

Liste des figures

	amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH), linéarité (LIN) et fréquence des croisements des trajectoires (BCF) du sperme du lapin, à T0, T1, T3 et T6 de conservation à 4°C dans le contrôle (TRIS) et les traitements (Polyéthylène glycol (PEG), Vitamine E (Vit E), Vitamine E associée au polyéthylène glycol (PEG/Vit E)).	
32	Effet des traitements sur la motilité totale (MOT) et la motilité progressive (PMOT) du sperme du lapin à T0, T1, T2, T3 et T4 de conservation à température ambiante dans le contrôle (TRIS) et les traitements (Polyéthylène glycol (PEG), Vitamine E (Vit E), Vitamine E associée au polyéthylène glycol (PEG/Vit E), Vitamine C (TRIS/VitC), Vitamine E associée à la Vitamine C (Vit E/VitC), Complexe (PEG/VitE/VitC)).	66
33	Effet des traitements sur la vitesse curvilinéaire (VCL), vitesse de la progression linéaire (VSL), vitesse par rapport à la trajectoire moyenne (VAP), amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH), linéarité (LIN) et fréquence des croisements des trajectoires (BCF) du sperme du lapin à T0, T1, T2, T3 et T4 de conservation à température ambiante dans le contrôle (TRIS) et les traitements (Polyéthylène glycol (PEG), Vitamine E (Vit E), Vitamine E associée au polyéthylène glycol (PEG/Vit E), Vitamine C (TRIS/VitC), Vitamine E associée à la Vitamine C (Vit E/VitC), Complexe (PEG/VitE/VitC)).	69
34	Effet des traitements sur la motilité totale (MOT) et la motilité progressive (PMOT) du sperme du lapin avant (T0) et après congélation (Tdécongélation) à -196°C, dans le contrôle (TRIS) et les traitements (Polyéthylène glycol (PEG), Vitamine E (Vit E), Vitamine E associée au polyéthylène glycol (PEG/Vit E)).	71
35	Effet des traitements sur la vitesse curvilinéaire (VCL), vitesse de la progression linéaire (VSL), vitesse par rapport à la trajectoire moyenne (VAP), amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH), linéarité (LIN) et fréquence des croisements des trajectoires (BCF) du sperme du lapin, avant (T0) et après congélation (décongélation) dans le contrôle (TRIS) et les traitements (Polyéthylène glycol (PEG), Vitamine E (Vit E), Vitamine E associée au polyéthylène glycol (PEG/Vit E)).	72
36	Pourcentage d'inhibition de l'ABTS dans le sperme réfrigéré pendant 4h à 4°C.	73

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Notation de la mobilité massale du sperme d'après Petitjean (1965)	22
II	Notation de la mobilité massale du sperme d'après Roca et al. (2000)	23
III	Notation de la mobilité individuelle des spermatozoïdes d'après Andrieu(1974)	23
IV	Composition du TRIS utilisé chez le lapin	41
V	Caractéristiques des spermés analysés	61
VI	Caractéristiques des spermés utilisées dans la conservation à température ambiante.	65
VII	Caractéristiques du sperme destiné à la congélation	70
VIII	Caractéristiques des spermés analysés pour insémination artificielle	74
IX	Caractéristiques des deux semences choisies pour l'IA.	74
X	Taux de réussite de l'IA dans les deux groupes de femelles inséminées	75

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 01

I. Synthèse bibliographique

I.1. Appareil reproducteur mâle..... 05

I.1.1. Anatomie 05

I.1.1.1. Testicules et voies spermatiques06

I.1.1.2. Le pénis 08

I.1.1.3. Les glandes annexes 08

I.1.2. Physiologie de reproduction dumâle 09

I.1.2.1. Puberté et maturité sexuelle 09

I.1.2.2. La sécrétion hormonale du testicule 09

I.1.2.3. La spermatogenèse 09

I.2. Sperme du lapin 11

I.2.1. Caractéristiques générales du sperme chez le lapin 11

I.2.1.1. Composition du sperme du lapin 12

I.2.1.2. Facteurs affectant les caractéristiques de la semence 16

I.2.2. Récolte de la semence du lapin..... 19

I.2.2.1. La récolte par électroéjaculation19

I.2.2.2. Vagin artificiel 19

I.2.2.3. Ponction épидидymaire 20

I.2.3. Analyse du sperme du lapin 20

I.2.3.1. Evaluation macroscopique 21

I.2.3.2. Evaluation microscopique 21

I.2.4. Système CASA 27

Sommaire

I.3. Cryoconservation du sperme.....	29
I.3.1. Définition et historique	29
I.3.2. Objectifs de la cryoconservation.....	30
I.3.3. Effets de la cryoconservation sur le sperme... ..	30
I.3.3.1. Effets sur le métabolisme cellulaire	30
I.3.3.2. Effets sur les membranes cellulaires	30
I.3.3.3. Conséquences sur les mouvements des solutés et des fluides	31
I.3.3.4. Effets sur les spermatozoïdes	31
I.3.4. Protocoles de cryoconservation	32
I.3.4.1. La préparation de la semence et la congélation	32
I.3.4.2. La décongélation	32
I.3.5. Les dilueurs	32
I.3.5.1. Définition et rôles	32
I.3.5.2. Composition	33
I.3.6. Performance reproductrice du sperme congelé	38
I.3.7. Stockage à court terme (la réfrigération)	39
I.3.7.1. Effets du stockage à court terme sur la morphologie et la motilité des spermatozoïdes	39
I.3.7.2. Effets du stockage sur la fertilité et la taille de la portée	40
I.3.7.3. Dilueur	40
I.3.7.4. Protocole de la réfrigération	41
I.4. Stress oxydatif	42
I.4.1. Notions générales liées aux stress oxydatif	42
I.4.2. Protection antioxydante	43
I.4.2.1. Les antioxydants enzymatiques	43
I.4.2.2. Les antioxydants non enzymatiques	43
I.4.3. Stress oxydatif et sperme	46

Sommaire

I.5. Insémination artificielle	47
I.5.1. Etapes de l'insémination artificielle	48
I.5.1.1. Déclenchement de l'ovulation	48
I.5.1.2. Techniques d'insémination	48
I.5.2. Intérêts de l'insémination artificielle	49
I.5.2.1. Avantages génétiques	49
I.5.2.2. Avantages sanitaires	49
I.5.2.3. Avantages économiques	49
I.5.3. Le diagnostic de gestation	50
I.5.3.1. Palpation trans-abdominale.....	50
I.5.3.2. Radiographie	50
I.5.3.3. Test ELISA	50
I.5.3.4. Echographie	50
II. Matériel et méthodes	
II.1. La récolte du sperme	51
II.1.1. Les animaux	51
II.1.2. La technique de la collecte du sperme	51
II.1.2.1. La collecte au Vagin artificiel	51
II.1.2.2. La collecte du sperme épидидymaire.....	53
II.2. Analyse du sperme	54
II.3. Conservation du sperme	55
II.3.1. Préparation de la dispersion solide du PEG et du complexePEG/VitE.....	55
II.3.2. Préparation des milieux de conservation	55
II.3.3. Conservation à température ambiante	56
II.3.4. Conservation par réfrigération	56
II.3.5. Conservation par congélation	56
II.4. Evaluation de la mobilité spermatique	57

Sommaire

II.5. Mesure du statut antioxydant total (test de l'ABTS).....	58
II.6. Insémination artificielle	58
II.6.1. Animaux	58
II.6.2. Collecte du sperme	59
II.6.3. Dilution et conservation	95
II.6.4. Techniques de l'IA	59
II.6.5. Diagnostique de gestation	60
II.7. Analyse statistique	60
III. Résultats	
III.1. Sperme réfrigéré	61
III.1. 1. Analyse des spermés destinés à la réfrigération	61
III.1. 2. Impact des traitements sur les paramètres de mobilité du sperme réfrigéré (4°C)	62
III.1. 2.1. Impact du traitement à base du polyéthylène glycol (PEG) seul	62
III.1. 2. 2. Impact du traitement à base de l'α-tocophérol seul (Vit E)	62
III.1. 2. 3. Impact de l'association Vit-E et PEG (PEG/VitE)	65
III.2. Sperme conservé à température ambiante	65
III.2.1. Analyse des spermés destinés à la conservation à température ambiante	65
III.2.2. Impact des traitements sur les paramètres de mobilité du sperme conservé à température ambiante	65
III.2.2.1. Impact du traitement à base du polyéthylène glycol (PEG) seul	65
III.2.2.2. Impact du traitement à base de l'α-tocophérol seul (Vit E)	66
III.2.2.3. Impact de l'association Vit-E et PEG (PEG/VitE)	66
III.2.2.4. Impact du traitement à base de l'acide ascorbique seul (Vit C)	68
III.2.2.5. Impact de l'association Vit-E et Vit-C (VitE/VitC)	68
III.2.2.6. Impact de l'association Vit-C et PEG (PEG/VitC)	68
III.2.2.7. Impact du complexe PEG/VitE/VitC	68

Sommaire

III.3. Sperme congelé	70
III.3.1. Analyse du sperme destiné à la congélation	70
III.3.2. Impact des traitements sur les paramètres de mobilité du sperme congelé (-196°C)	70
III.3.2.1. Impact des traitements sur les paramètres spermatiques à T0	70
III.3.2.2. Impact des traitements sur les paramètres spermatiques après décongélation	71
III.4. Statut oxydatif	73
III.4.1. Capacité de piégeage des radicaux ABTS	73
III.5. Insémination artificielle	73
III.5.1. Analyse du sperme des lapins étudiés.....	73
III.5.2. Caractéristiques des semences utilisées pour l'insémination artificielle	75
III.5.3. Taux de réussite de l'insémination artificielle	75
IV. Discussion générale	76
Conclusion et perspectives	81
Références bibliographiques	84
Résumé en français	114
Résumé en anglais	116
Résumé en arabe	117

Introduction

Les biotechnologies de la reproduction visent à diffuser la génétique acquise par la sélection artificielle et à accroître le nombre des descendants des meilleurs reproducteurs ayant une bonne génétique, pour une meilleure productivité, en réponse aux demandes et aux exigences des filières d'élevage. La plus ancienne et la plus utilisée de ses techniques est l'insémination artificielle (IA) qui a connu un développement dès 1940 dans les élevages bovins laitiers (Hansen 2004) et généralisée dans les élevages cynicoles à partir des années 1990 (Theau-Clément 2005). C'est une technique qui a apporté des solutions d'organisation et une amélioration de la rentabilité dans les élevages d'animaux de rente par le biais de l'amélioration génétique et sanitaire. En effet l'application de la technique de l'insémination artificielle et de la conduite en bandes ainsi que leur développement chez le lapin, permettent de réduire les males impliqués dans la reproduction ainsi que les problèmes sanitaires liés aux saillies naturelles, ils permettent aussi d'améliorer la production de la viande de bonne qualité étant donné le seul producteur d'une quantité importante de viande en un temps moindre est le lapin (Djago et Kpodekon 2007) ce qui peut régler le problème de la viande des pays en voie de développement. L'insémination artificielle (IA) est pratiquée dans l'industrie de la viande du lapin depuis de nombreuses années (Sinkovicks et al. 1983), en particulier dans les grands élevages de lapins de plusieurs pays européens, contrairement à nos pays en voie de développement, où elle n'est pas une pratique courante.

Cependant, même si l'insémination artificielle est largement appliquée dans les élevages, son succès dépend en grande partie de la semence. La maîtrise de la conservation du sperme est, donc, un enjeu stratégique dans son développement. En effet, le facteur limitant son application commerciale plus étendue est lié à la mauvaise qualité du sperme et aux rendements de fertilité après le processus de congélation-décongélation (Mocé et Vicente 2009). Par conséquent, l'IA du lapin est généralement réalisée avec de la semence fraîche diluée et utilisée dans les 6 à 12 h suivant la collecte (Rigal 2008), ce qui entraîne des taux de conception aussi élevés que ceux obtenus avec l'accouplement naturel. Cependant, cette courte période de conservation de la semence limite la gestion optimale de l'insémination artificielle, en particulier dans les grands élevages. Ainsi, la semence réfrigérée stockée pendant des périodes plus longues (36 heures) peut faciliter la pratique de l'IA ainsi que les échanges des semences et donc de matériel génétique entre les fermes. Et la congélation permet de conserver la semence du mâle pendant plusieurs années (Rigal 2008), en particulier celle d'un mâle de haute valeur génétique ce qui conserve son patrimoine génétique ; et elle permet le transport international des semences.

Cependant, il a été démontré que la cryoconservation expose les spermatozoïdes à différents stress causés par la diminution de température, la formation de glace, l'ajout des cryoprotecteurs, et par l'exposition du milieu pendant la congélation à une osmolarité accrue (Watson 2000). La fertilité de la semence refroidie est inférieure à celle de la semence fraîche, ce qui est dû, essentiellement, aux altérations membranaires induites par les transitions de phase qui se produisent lors du refroidissement des membranes (Medeiros et al. 2002), et au stress oxydatif (Morris et al. 2007).

Le stress oxydatif correspond à un état de déséquilibre entre les moyens anti oxydants que possède l'organisme et le taux des réactifs dérivés de l'oxygène (ERO), en faveur de ces derniers (Haleng et al. 2007), que ce soit par leur surproduction ou par déficit en antioxydants. Le spermatozoïde est une cellule très sensible à la peroxydation à cause des niveaux élevés d'insaturation de sa membrane, riche en acides gras polyinsaturés (Henkel 2011), et de son contenu cytoplasmique réduit contenant une quantité limitée d'antioxydants enzymatiques (Vernet et al. 2004), dont la majorité se trouvent dans la fraction liquide du sperme (Kefer et al. 2009). Le stress oxydatif peut être extrêmement néfaste pour les spermatozoïdes (Simões et al. 2013). Puisque, l'excès d'ERO a été associé à plusieurs dommages cellulaires tels le fractionnement de l'ADN, la peroxydation des lipides, la baisse de la réaction acrosomique, la diminution de l'aptitude à fusionner avec l'ovocyte et donc à le féconder, ainsi que la baisse du taux de gestation après FIV (Chi et al. 2008). Il affecte aussi les spermatozoïdes, leur mobilité, leur morphologie ainsi que leur vitesse et peut conduire à l'apoptose (Angrimani et al. 2014).

En raison de la capacité antioxydante limitée des spermatozoïdes, surtout pendant leur conservation prolongée, l'ajout des antioxydants peut rendre la qualité du sperme meilleure (Tremellen et al. 2008, Agrawal et al. 2008 ; Chi et al. 2008). En effet, l'addition de la vitamines C et E (entre autres) dans les milieux de conservation protège les spermatozoïdes et leur motilité des dégâts pouvant être dus au stress oxydatif (Tremellen et al. 2008 ; Agrawal et al. 2008).

La vitamine E est l'un des principaux antioxydants liposolubles connus. Elle intervient dans la protection des membranes contre les ERO. En fait, la vitamine E, située principalement dans la bicouche phospholipidique, est capable de contrôler le taux de peroxydation lipidique et les propriétés physicochimiques des membranes biologiques (Burlakova et al. 1998). L'effet biologique majeur de la vitamine E est d'éviter l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) et les acides gras polyinsaturés (AGPI) par les radicaux libres (Kagan, 1998). Elle piège les radicaux peroxydes et limite, ainsi, les dommages

Introduction

résultant de l'oxydation des AGPI avant qu'ils ne puissent établir une réaction en chaîne. Elle est aussi considérée comme stabilisateur universel des membranes biologiques (Liebler 1993).

Cependant, après épuisement de la vitamine E, le spermatozoïde devient vulnérable au stress oxydatif surtout pendant le processus de la cryoconservation (Zhang et al. 2001). Le bien fait de l'ajout de la Vit E aux milieux de conservation, sur les paramètres spermatiques est confirmé (Silva et al. 2013) chez le bovin (Batoool et al. 2012 ; Beconi et Mora 1993), le bélier (Ollero et al. 1998), le sanglier (Jeong et al. 2009) et le chien (Michael et al. 2009). Mais puisqu'elle fait partie des antioxydants qui ne se régénèrent pas après oxydation, à des concentrations inadaptées, elle peut devenir à son tour une entité radicalaire qui augmente la peroxydation des lipides (Thomas et Stocker 2000).

L'acide ascorbique ou vitamine C (Vit C) est une vitamine antioxydante et hydrophile qui peut piéger les radicaux libres. Elle est connue pour être l'antioxydant le plus efficace dans la phase aqueuse (Hacisevki 2009). Il existe une synergie entre la vit E et la vit C, puisque ce dernier recycle le radical tocophéryle en tocophérol, ce qui augmente l'efficacité du système de défense antioxydant (Reed 1993). Il a été également montré que l'oxydation des tocophérols dans des substrats lipidiques est retardée en présence d'ascorbates (Leung et al. 1981). L'acide ascorbique améliore la qualité du sperme, il augmente le taux des spermatozoïdes vivants, mobiles et normaux (Akmal et al. 2006).

Cependant, l'effet puissant de la vit E est limité par sa solubilité faible qui limite son absorption et sa biodisponibilité. Divers polymères tels que le polyéthylène glycol (PEG) (Xie et al. 2010) et les cyclodextrines (CD) (Jiang et al. 2010) ont été testés efficacement pour solubiliser la vit E.

En particulier, le polyéthylène glycol (PEG) est utilisé pour améliorer la solubilité, par des dispersions solides, de différents médicaments peu solubles dans l'eau (Xie et al. 2010 ; Armin et al. 2012) et des stéroïdes (Lahiani-Skiba et al. 2006). Le PEG est un polymère biocompatible non antigénique autorisé par « Food and Drug Administration » pour son utilisation intraveineuse, orale et en application dermique chez les humains (Cheng et al. 2011). Le PEG 6000, en particulier, est efficace pour augmenter la solubilité et la biodisponibilité de différentes molécules actives (Verheyen et al. 2002 ; Tashtoush et al. 2004).

Les CD ont été utilisés avec succès pour améliorer les paramètres de motilité spermatique et protéger les spermatozoïdes contre les lésions du stress oxydatif chez différentes espèces animales, après cryoconservation, en améliorant la solubilité de la vitamine E. Cependant, dans la mesure de notre connaissance, il n'existe aucune étude

Introduction

rapporte l'impact positif potentiel que le PEG pourrait offrir pour protéger les spermatozoïdes conservés que ce soit à température ambiante, après réfrigération ou congélation, en augmentant la solubilité de la vitamine E.

Puisque la qualité de la semence est déterminante dans l'insémination artificielle, il est indispensable de mettre au point un milieu de dilution qui pourrait conserver au mieux les spermatozoïdes et préserver leur pouvoir fécondant. Ainsi, notre objectif dans ce travail est d'étudier l'interaction des deux molécules (Vitamine E, et PEG) sur les paramètres spermatiques et la fertilité du sperme réfrigéré (4°C) ou congelé (-196°C), et celle des trois molécules (Vitamine E, Vitamine C et PEG) sur le sperme conservé à température ambiante. Nous avons mené deux études avec le sperme du lapin ; la première étude avait pour objectif l'évaluation de l'effet protecteur des molécules précédentes sur le sperme du lapin conservé en déterminant si les diluants à base de vitamine E seule ou associée au PEG et/ou à la Vitamine C pouvaient offrir une meilleure préservation des paramètres de motilité des spermatozoïdes et une meilleure protection contre le stress oxydatif. Nous avons supposé que l'impact positif de la vitamine E pourrait être considérablement amélioré en augmentant sa solubilité grâce à sa complexation au PEG, et en permettant sa régénération pendant sa conservation, grâce à sa complexation à la Vitamine C. La deuxième étude avait pour objectif l'évaluation de la fertilité de la semence du lapin diluée dans les traitements testés à température ambiante en réalisant des inséminations artificielles.

I. Synthèse bibliographique

I.1. Appareil reproducteur mâle

Le sperme du lapin est constitué d'un liquide séminal dans lequel baignent des spermatozoïdes, produits par spermatogenèse dans les testicules et d'un gel produits par les glandes accessoires. Les spermatozoïdes sont considérés comme des cellules très spécialisées dont la fonction principale est de féconder l'ovocyte. Une grande quantité de spermatozoïdes est produite mais leur atteinte d'anomalies de structure peut diminuer la fertilité du sperme. L'analyse du sperme est donc indispensable pour évaluer sa qualité avant sa conservation mais également avant son utilisation dans l'insémination artificielle. En effet, la cryoconservation est à l'origine de nombreux dommages chez les spermatozoïdes surtout au niveau de leurs membranes plasmiques ; ces effets entraînent une baisse du taux des spermatozoïdes normaux et mobiles et donc une baisse de la fertilité de la semence.

Dans une première partie de la synthèse bibliographique, nous avons donné quelques rappels anatomiques et physiologiques de l'appareil génital mâle ; dans la deuxième, nous avons parlé du sperme du lapin, en s'intéressant à sa composition, à sa récolte et à son évaluation ; dans la troisième, nous nous sommes intéressés à la cryoconservation : les effets de ce processus sur les spermatozoïdes, les différents dilueurs, milieux protégeant les spermatozoïdes des effets néfastes de la cryoconservation ; puis nous avons parlé du stress oxydatif : sa définition, les différents antioxydants et sa relation avec le sperme ; et finalement nous avons traité l'insémination artificielle : sa méthode et son intérêt.

I.1. Appareil reproducteur mâle

I.1.1. Anatomie

Chez le lapin, le tractus génital comporte des testicules (portion glandulaire), épидидyme, canal déférent et urètre (portion tubulaire) ainsi que le pénis (portion copulatrice) (Barone 1990), auxquelles s'ajoutent les glandes accessoires (**figure 01**). Le lapin présente une particularité dans les organes génitaux externes, un scrotum bien développé est situé crâniellement au pénis et à l'ouverture urogénitale (Capello et Lennox 2006). Le scrotum a peu de poils (Donnelly 2004) et maintient les testicules à l'écart de l'abdomen, de sorte que la température testiculaire soit maintenue en dessous de la température du corps de 0,5 à 4 °C, ce qui est requis pour une spermatogenèse normale (Alvariño 1993).

I.1. Appareil reproducteur mâle

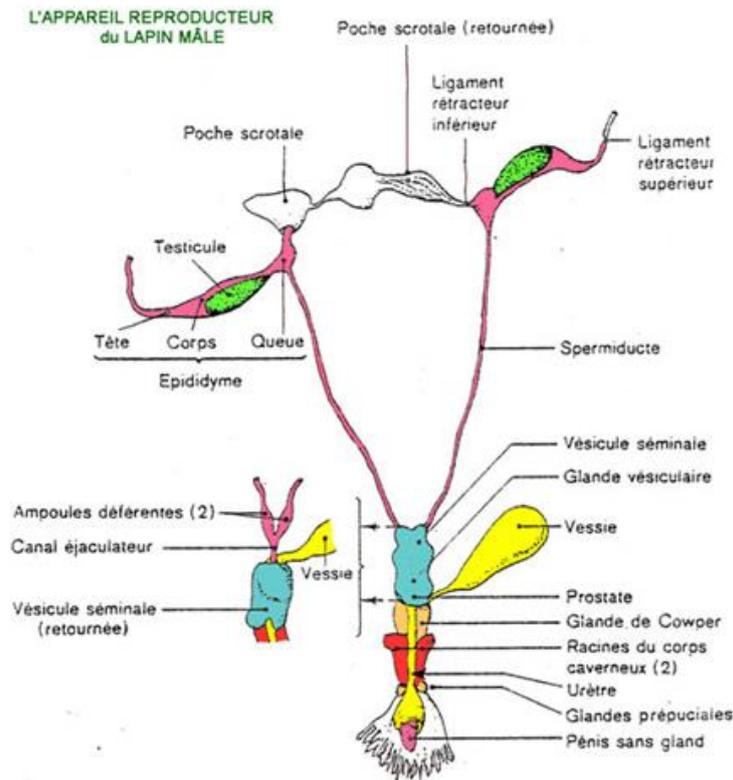


Figure 01 : Appareil génital mâle du lapin (Lebas1996)

I.1.1.1. Testicules et voies spermatiques

Chez le Lapin impubère, les testicules, sont dans l'abdomen. Ils migrent, à 5 mois, vers le scrotum. Cette migration en dehors de l'abdomen est nécessaire pour une spermatogenèse normale (VanPraag 2002). Pendant les périodes d'inactivité sexuelle ou de stress, les testicules reviennent en position abdominale par l'anneau inguinal et peuvent redescendre sous l'action du muscle crémaster (Alvariño 1993 ; Capello et Lennox 2006). Les testicules du lapin peuvent, donc, se déplacer librement du scrotum à l'abdomen par une ouverture dans le canal inguinal (Brewer 2006). De ce fait, le lapin est à la fois exorchide et énorchide (Barone 1990).

Les testicules du lapin sont pairs, rosés, pleins, fermes de consistance élastique, ovoïdes et allongées, présentent un amincissement aux extrémités (Figure 02). Leur dimension est en moyenne 35 x 15 mm (Barone 1990) et se situent en position crâniale par rapport au pénis (Brewer 2006 ; Capello et Lennox 2006). Ils se constituent d'un parenchyme testiculaire parcouru d'une albuginée et enveloppé d'une séreuse. Ce parenchyme se divise en 200 à 300 lobules contenant des tubes séminifères, où sont produits les gamètes mâles, et qui se raccordent au rete testis (Figure 03). Ce dernier, forme des canalicules efférents qui pénètrent dans le segment initial de la tête de l'épididyme.

I.1. Appareil reproducteur mâle

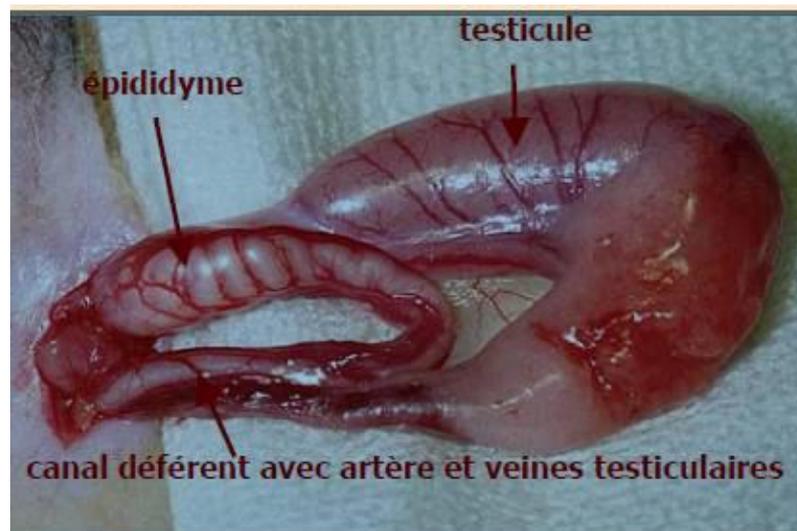


Figure 02 : photographie d'un épидидyme collé au testicule d'un lapin adulte
(Van Praag 2002)

L'épидидyme du lapin est de 1,5 à 3 cm de longueur, constitué (Figure 03) :

- d'une volumineuse tête, qui couvre la partie large du testicule ;
- d'un corps qui est large chez le lapin ;
- d'une queue en U, elle forme un appendice mobile et globuleux, (Campos et al. 2014). Le lapin est l'une des espèces dont la queue de l'épидидyme contient des spermatozoïdes de motilité vigoureuse même dans leur propre liquide (Turner et Reich 1985).

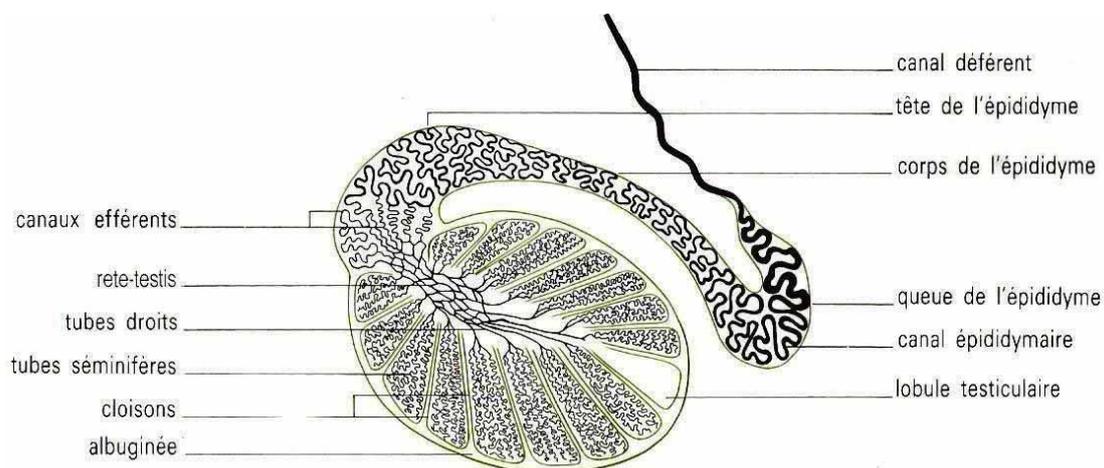


Figure 03 : Coupe longitudinale au niveau du testicule et de l'épидидyme du Lapin
(BONNES et al. 1988)

Après l'épидидyme vient le canal déférent qui rejoint l'urètre. Le canal déférent est relativement épais, de 12 à 15 cm de longueur. Sa partie finale forme une boucle, autour de l'urètre, dont le diamètre ne diffère pas du reste du canal déférent, appelé ampoule (Campos

I.1. Appareil reproducteur mâle

et al. 2014). Cette dernière est d'environ 2 cm de long et permet la communication du canal déférent avec l'urètre. L'urètre représente la partie extra-pelvienne de l'appareil génital, il est entouré d'un épais corps caverneux et constitue le pénis qui se termine par un ostium externe (Barone 1990).

I.1.1.2. Le pénis

Le pénis ou organe copulateur du lapin (**Figure 04**) est rétrofléchi et logé dans le prépuce qui se trouve en position ventrale par rapport à l'orifice anal. Le pénis ne s'extériorise qu'au moment de l'érection. C'est un organe court, cylindrique légèrement en pointe qui mesure environ de 4-5 cm (Campos et al. 2014) à 8 cm de long (Roger 2002). Il se caractérise par l'absence du gland (Brewer 2006), remplacé par des aréoles vasculaires (Abraham et Kierszenbaum 2002 ; Welsch 2002). Chez le lapin au repos, le pénis est dirigé caudalement, il est ramené vers l'avant pendant l'érection grâce aux muscles subischio-caverneux qui doublent le ligament suspenseur du pénis. Ces muscles n'existent dans aucune autre espèce domestique (Barone 1990).

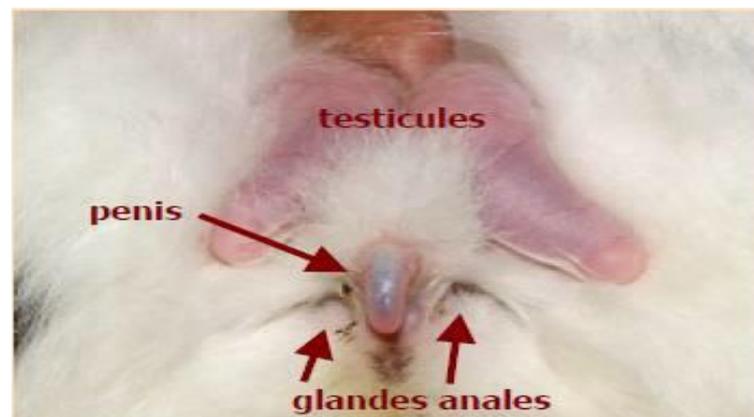


Figure 04 : Pénis du lapin (Shikichi et Akira 2004)

I.1.1.3. Les glandes annexes

Les glandes du système reproducteur du lapin sont : la **glande vésiculaire** à sécrétions qui varient d'une consistance légèrement visqueuse à une consistance de gel (Holtz et Foote 1978a), elle produit 45,6% de l'éjaculat du lapin (Del Niño et al. 1997), la **glande bulbo-urétrale** et un ensemble de glandes formant le complexe prostatique (la prostate, la proprostate, le paraprostate) (Vásquez et Del Sol 2009). Selon Hafez (1995), ils contribuent à la partie dominante de l'éjaculat. Ainsi que les **Glandes inguinales** qui sont spécifiques au lapin et qui produisent une odeur (Roger 2002). Selon Boussit (1989), ces glandes stimulent le réflexe ovulatoire chez la femelle.

I.1. Appareil reproducteur mâle

I.1.2. Physiologie de reproduction du mâle

I.1.2.1. Puberté et maturité sexuelle

La puberté diffère de la maturité sexuelle, en effet, Macari et Machado (1978) ont rapporté que chez les lapins, la puberté survient avant la détection des spermatozoïdes dans l'éjaculat. D'autre part, Fraser (1988) a rapporté que les testicules du lapin ne rejoignent le scrotum qu'à six mois malgré qu'il soit pubère à 4 mois. Selon Skinner (1967), les lapins sont pubères lorsqu'ils présentent des caractères masculins avec des testicules androgéniquement actifs et des glandes accessoires produisant du fructose et de l'acide citrique.

La puberté chez le lapin se produit entre 4 et 6 mois, elle survient plus tôt chez les races de petite taille que chez les plus grandes (Harcourt-Brown 2002). La maturité sexuelle des lapins varie selon l'âge (125-150 jours), la lignée, la race, l'alimentation, la photopériode, la température et la saisonnalité (Campos et al. 2014). Selon ce dernier, la maturité sexuelle survient lorsque la production quotidienne de spermatozoïdes est stable et les mâles sont capables de féconder les femelles. Elle est atteinte à 32 semaines chez la race Néozélandaise (Lebas et al. 1997), Ou même précocement, à l'âge de 18 semaines (Frame et al. 1994).

I.1.2.2. La sécrétion hormonale du testicule.

a- Cellules de Leydig

Elles se trouvent dans le tissu conjonctif du testicule. Elles produisent la testostérone en plus d'hormones androgéniques (Fontbonne et al. 2000). Chez les lapins, le testicule représente la source principale de la testostérone (Castro et al. 2002).

La testostérone contrôle la spermatogenèse, le développement structurel des glandes sexuelles accessoires et leur fonctionnement physiologique, le maintien de la libido ainsi que le développement des caractères sexuels secondaires (Johnston et al. 2001a).

b- Cellules de Sertoli

Elles se trouvent dans l'épaisseur des tubes séminifères. Elles élaborent entre autres l'œstradiol, l'inhibine et l'activine ainsi que plus de soixante protéines. Elles interviennent dans la protection des cellules souches et leur nutrition tout en leur servant de support (Johnston et al. 2001a). L'inhibine est une protéine qui contrôle la FSH et dont la sécrétion présente une corrélation négative avec la spermatogène (Berger et al. 1982).

I.1. Appareil reproducteur mâle

I.1.2.3. La spermatogenèse

Elle correspond à la production des spermatozoïdes. Elle commence dès l'âge de 42 à 63 jours, mais les spermatozoïdes n'apparaissent dans le sperme éjaculé qu'à partir du 119^{ème} jour (Skinner 1967). D'après Morton (1988), Les testicules se développent et produisent des quantités croissantes de sperme jusqu'à l'âge de six mois. Chubb et al. (1978) ont rapporté que les spermatozoïdes peuvent se retrouver dans la queue de l'épididyme vers l'âge de 15 semaines. D'autres auteurs ont également noté que la production spermatique quotidienne augmente de l'âge de 15 semaines jusqu'à l'âge de 52 semaines (Campos et al. 2014).

Le nombre de spermatozoïdes produits quotidiennement est d'environ $30 \text{ à } 40 \times 10^6 / \text{g}$ de testicules avec une moyenne d'environ $250 \times 10^6 / \text{jour}$ variant entre les différentes races (El-Habbato et al. 1984). Selon Fontbonne (1992), les spermatozoïdes comptés par éjaculats sont en nombre de deux cent millions à plus de deux milliards. Des quantités moindres sont citées par Campos et al. (2014) qui ont rapporté que dans des conditions normales, le rendement moyen est de $147,4 \times 10^6 / \text{jour}$ et que 1g de testicule produit $26,5 \times 10^6$ spermatozoïdes / jour. Cependant, la soumission de l'animal à un rythme de deux collectes hebdomadaires entraîne une libération quotidienne de spermatozoïdes dont le nombre est inférieure à celui produit par les testicules, ce qui indique qu'environ 50% des spermatozoïdes produits sont réabsorbés (Holtz et Foote 1972), sauf que la formation quotidienne de spermatozoïdes n'est jamais affectée par le rythme de la collecte du sperme (Amann 1966).

Il est important de signaler que chez le lapin, une perte considérable de cellules spermatiques survient pendant la spermatogenèse, les chercheurs ont observé moins de spermatides que le nombre prévu théoriquement (Morton 1988 ; Zhang et al. 2002). Campos et al. (2014) ont rapporté environ 20% de spermatides de moins et Swierstra et Foote (1963) ont signalé que la perte la plus importante se produit pendant et immédiatement après les deux divisions de maturation. Cependant, selon Zhang et al. (2002) des spermatides rondes sont présents dans l'épididyme (desquamation des spermatides).

La spermatogenèse se déroule en deux étapes successives : la spermatocytogenèse, passage de spermatogonies aux spermatides par méiose ainsi que la spermiogenèse correspondant au passage de spermatides en spermatozoïdes par différenciation (**Figure 05**). Les spermatozoïdes formés dans la paroi des tubes séminifères sont par la suite libérés dans leur lumière (la spermiation). Ces spermatozoïdes sont immatures, passent dans l'épididyme où ils acquièrent leur mobilité et leur pouvoir fécondant. Cette étape de maturation consiste en une réduction de l'acrosome, une perte de gouttelettes de cytoplasme (Alvarino 2000), une

I.2. Sperme du lapin

I.2. Sperme du lapin

Il contient une partie liquide et une partie gélatineuse (Mukherjee et al. 1951). Il contient des gamètes mâles (spermatozoïdes) et un liquide séminal correspondant à des sécrétions provenant du canal épидидymaire et des glandes accessoires, qui sont combinées au moment de l'éjaculation (El-Azim et El-kamash 2011).

I.2.1. Caractéristiques générales du sperme chez le lapin

Le sperme est un liquide blanc avec une intensité dépendante de sa concentration en spermatozoïdes (Alvarez et al. 2006 ; Bilbao 1996), homogène et opalescent (Guidelines 2005). Pour Bilbao (1996), le sperme gris est de mauvaise qualité. Pour Alvarez et al. (2006), le meilleur sperme, considéré normal et de bonne qualité est le sperme blanc laiteux par contre pour Matavelli (2008) c'est le sperme blanc crème. Finalement Arrebola et Fernandez (2011) ont rapporté que le sperme blanc nacré est de bonne qualité et que les autres couleurs sont classées comme pauvres. La couleur jaunâtre du sperme indique la présence d'urine qui est normalement obtenue lorsque la température est trop élevée dans le vagin artificiel (Chang 1959).

Le volume du sperme varie entre 0,3 et 6,0 ml selon la fraction de gélatineuse et sa concentration de 150 à 500 x 10⁶ spermatozoïdes / ml (Adams et Singh 1981 ; Lebas et al. 1997). Ces deux caractéristiques peuvent varier selon les races (Hassanien et Baiomy 2011), l'alimentation (Kamel et Attia 2011), la fréquence des collectes (Castellini et al. 2006c), l'âge (Theau-Clement et al. 2009) et la température ambiante (Finzi et al. 1994). D'après Garcia-Tomás et al. (2008), la température a plus d'effet sur le volume du sperme que sur sa concentration.

Le pH du sperme varie de 6,8 à 8,4. Il est mesuré immédiatement après la collecte du sperme et représente un bon indice pour estimer sa qualité (Alvarino 2000).

I.2.1.1. Composition du sperme du lapin

Le sperme éjaculé chez les lapins comprend des spermatozoïdes et du plasma séminal qui est important pour leur motilité et même leur survie (Hagen et al. 2002).

a. Le liquide séminal

Le liquide séminal comporte des sécrétions de l'épididyme et d'autres des glandes accessoires, importantes pour le métabolisme des spermatozoïdes. C'est un liquide contenant des concentrations élevées d'acide citrique (70 – 200 mg/ 100 ml) et de fructose (40 – 150 mg/

I.2. Sperme du lapin

100 ml), qui constitue avec le glucose (13,8 - 22 mg / dl) les principaux constituants énergétiques du sperme et substrats pour le métabolisme des spermatozoïdes (Arruda-Alencar 2011). D'ailleurs, le taux du fructose dans le liquide séminal reflète la qualité du sperme ainsi que l'activité de la testostérone (Okab 2007). Il comprend également l'inositol, le glycérol (215 – 370mg/100ml de Glycerylphosphorylcholine), l'ergothionine, l'acide glutamique, certaines enzymes, Sorbitol (80 mg/100ml), protéines (4 – 15 mg/ 100 ml), électrolytes [Sodium (80 – 140 mmoles/l), Potassium (23 – 120 mmoles/l), Phosphore (1 – 3 mmoles/l), Magnésium (2 – 4 mmoles/l), Calcium (2 – 8mmoles/l)] et de petites gouttelettes de lipides (Battaglini et al.1992 ; Castellini et al. 2006b).

On y trouve aussi Sélénium et Zinc (Castellini et al. 2007) ainsi que Cuivre, Fer, Manganèse, Cadmium, Plomb et Nickel (Lukáč et al. 2009). Ces composantes organiques semblent être les principaux constituants responsables de la maintenance de la pression osmotique du sperme (Holtz et Foote 1978b). Par ailleurs, l'inclusion du Zn dans le régime alimentaire peut affecter la quantité de spermatozoïdes (Oliveira et al. 2004) mais le lavage du sperme n'affecte pas significativement la motilité des spermatozoïdes chez les lapins (Blackshaw 1953).

Le plasma séminal du lapin contient également des granules prostatiques sécrétoires dont le rôle est partiellement méconnu (Castellini et al. 2006a). En effet, de gros granules sont notés en abondance entre les spermatozoïdes du lapin, autour de leur tête (Zaniboni et al. 2004). Elles sont présentes à raison de 450×10^6 granules / ml (Castellini et al. 2006b). Ces granules ne sont pas homogènes, leur diamètre varie de 0,5 à 6 µm et sont généralement entourés d'une membrane bilaminaire contenant un matériau dense aux électrons peu organisé (Metz et al. 1968). La forme prédominante observée sous microscopie électronique est la forme ronde montrant la présence de protubérances cytoplasmiques discordantes avec de petites vésicules désolantes (Castellini 2008). Mourvaki et al. (2010) ont suggéré que les granules de sécrétion prostatique pourraient protéger les spermatozoïdes du stress oxydatif in vitro en leur fournissant de l'alpha-tocophérol endogène, puisque ces granules sont riches en tocophérol (38,7 mmol / l), correspondant à plus de 50% du tocophérol séminal (Mourvaki et al. 2008). Ayant une activité antioxydante (Saez et al. 1998), le tocophérol de ces granules pourrait contribuer à réduire la réactivité des spermatozoïdes aux stimuli exogènes en abaissant les radicaux libres dans le sperme (De Lamirande et al. 1997).

Par ailleurs, Il a été évoqué que ces particules modulent la cinétique du sperme (Fabiani et al. 1995), la réponse immunitaire du tractus génital femelle (Johansson et al. 2004), le transit des spermatozoïdes dans ce dernier, ainsi que leur capacitation et la réaction

I.2. Sperme du lapin

de leur acrosome (Davis, 1974). En effet, la présence de granules séminales réduit significativement la réponse des spermatozoïdes aux inducteurs *in vitro* de la réaction de l'acrosome (Castellini 2008). Selon Cross et Mahasreshti (1997), l'activité inhibitrice du plasma séminal sur la réaction acrosomique est principalement contenue dans les granules et le cholestérol qui est l'inhibiteur principal. De ce fait, les granules et le plasma séminal agissent probablement comme des donneurs de stérols afin de protéger les spermatozoïdes contre le choc environnemental et la réaction acrosomique prématurée. (Castellini 2008).

b. Le gel

La masse gélatineuse du sperme du lapin provient de la glande vésiculaire (Holtz et Foote 1978a ; Del Niño et al. 1997) et sa production est contrôlée par les androgènes (Bell et Mitchell 1984). Elle est plus ou moins consistante, transparente et peu soluble (Boussit 1989) et contient une quantité importante d'acide citrique et de substances œstrogéniques, et contient aussi une petite quantité de fructose (Holtz et Foote 1978b). Elle aurait pour fonction de prévenir la perte de spermatozoïdes rétrogrades chez les rongeurs (Quesenberry et al. 2004), puisqu'après l'éjaculation, le gel remplit la lumière vaginale comme un tampon de coagulation (Mukherjee et al. 1951).

c. Le spermatozoïde

C'est une cellule mâle haploïde, spécialisée, permet la continuité de l'espèce. Il mesure environ entre 46 et 55 μm de long (Cummins et Woodall 1985 ; Eddy 2006), avec une tête de 7,8 à 8,6 μm (Gravance et Davis 1995), une pièce du milieu de 8,5 μm avec environ 41 tours de mitochondries (Eddy 2006) et une pièce principale mesurant environ 38 μm de long (Cummins et Woodall 1985).

Un spermatozoïde contient une tête et un flagelle (**Figure 06**).

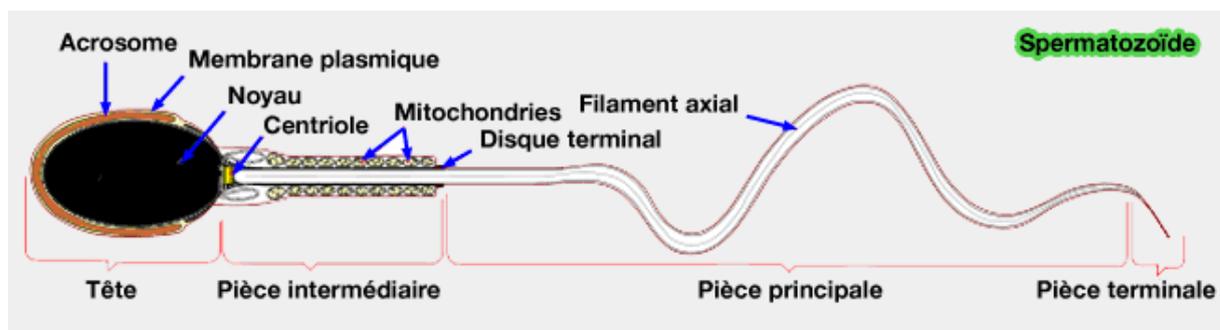


Figure 06 : Structure d'un spermatozoïde.

I.2. Sperme du lapin

- La tête

La tête, en forme de spatule, contient un noyau haploïde, un acrosome qui ne s'étend pas au-delà du noyau (Eddy 2006) et un petit volume de cytoplasme et d'organites cytosquelettiques (Knobil et Neill 1988).

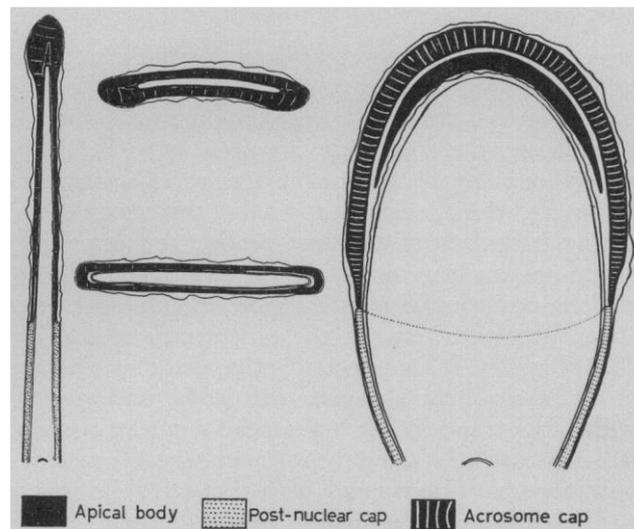


Figure 07 : Représentation schématique de la structure de la tête spermatique du lapin (Bedford 1964).

L'acrosome se trouve antérieurement dans la tête du spermatozoïde où il coiffe le pôle antérieur du noyau (**Figure 07**). Il provient de l'appareil de Golgi et renferme des enzymes de protéolyse indispensables pour la fécondation, notamment, l'enzyme hyaluronidase (glycosidase), l'acrosine et une faible concentration d'enzymes habituellement retrouvées dans les lysosomes primaires (Knobil et Neill 1988).

- Le flagelle

Grace au flagelle le spermatozoïde peut se mouvoir dans les voies génitales femelle et atteindre le lieu de fécondation, en utilisant de l'ATP. Il est constitué de quatre pièces connectives, située dans le col, intermédiaire, principale et terminale (Eddy et al. 2003) (**Figure 06**).

Dans le centre du flagelle se trouve un axonème qui s'allonge de la tête jusqu'à la pièce terminale, formé de neuf paires de microtubules placés autour d'une paire de microtubules centrale. Autour de ces derniers et au niveau des pièces intermédiaire et principale se trouvent des fibres denses (Eddy et al. 2003). L'axonème est enveloppé au niveau de la pièce intermédiaire, d'une spirale de mitochondries qui produisent l'ATP, source d'énergie permettant aux microtubules de glisser dans l'axonème. (Millette 1998).

I.2. Sperme du lapin

- La membrane plasmique

Différents domaines forment la membrane plasmique du spermatozoïde, leur composition et fonction varient entre la tête et les quatre parties du flagelle (Knobil et Neill 1988).

La membrane plasmique se compose de trois grands groupes de lipides (Murray et al.1999), les **lipides complexes** tel que les phosphoglycérides et les glycolipides ; les **lipides simples** ou **neutres** tel que les stérols, les acides gras (AG) et les acylglycérols ou glycérides. Ces derniers pouvant être sulfatés, estérifiés, libres ou liés à un sucre ; **les protéolipides** qui sont une association entre une protéine et une ancre lipidique qui permet la fixation de la protéine au sein de la bicouche lipidique de la membrane cellulaire.

Les proportions des différents lipides composants la membrane spermatique diffèrent entre les espèces. Généralement, elle contient un taux de phospholipides de 70%, un taux de lipides neutres comme le cholestérol de 25%, et un taux de glycolipides de 5% (Shannon et Curson 1983).

Une analyse sur le contenu des spermatozoïdes épидидymaires du lapin en plasmalogènes, réalisée par Touchstone et al, en 1985, a démontré que parmi les phospholipides retrouvés dans les spermatozoïdes du lapin, les principaux sont la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE). Les plasmalogènes sont particulièrement sensibles au stress oxydatif puisqu'ils possèdent en leur position sn-1 une liaison vinyléther. Ils ont un rôle dans le transport ionique, la fusion membranaire et le flux de cholestérol. Ils agissent aussi comme antioxydants (Agrawal et al. 1988 ; Rana et al.1991 ; Jones 1998) et procuraient, probablement, à la membrane du spermatozoïde, une stabilité non donnée par les diacyl-glycéro-phospholipides qui peuvent être dégradés et synthétisés plus rapidement (Selivonchick et al. 1980)

Par ailleurs, d'autres formes de stérols sont retrouvés dans le spermatozoïde du lapin tels que : les esters de stérols, les stérols sulfatés et le desmostérol (Awano et al. 1993).

Il est tout de même important de signaler que l'organisation de la membrane spermatique et sa composition changent durant le transit du spermatozoïde à travers l'épididyme et les voies génitales femelles, et pendant l'éjaculation.

I.2.1.2. Facteurs affectant les caractéristiques de la semence

a. Race

Des variations importantes sont notées entre les différentes races concernant le pourcentage de la fraction du sperme et celle du gel, la mobilité et la concentration des

I.2. Sperme du lapin

spermatozoïdes, les anomalies morphologiques ou la concentration en fructose (Dubiel et al. 1985). Une forte variabilité individuelle est également observée au sein de chaque race (Moce et al. 2005). Viudes et al. (2004) et Brun et al. (2004) ont observé des différences dans les caractéristiques du sperme chez les mâles de différentes lignées génétiques et chez les mâles croisés et de race pure.

b. Age

Miros et Mikhno 1982 rapportent que le volume, la concentration, ainsi que la fertilité du sperme deviennent meilleurs avec l'âge, par ailleurs les lapins âgés entre 5 et 24 mois présentent des valeurs plus élevées par rapport aux mâles plus âgés. Des modifications structurales de la chromatine, suggérant une stabilité relativement élevée de la chromatine du sperme chez les lapins âgés de 5 à 28 mois sont notés avec un pourcentage le plus faible de spermatozoïdes avec chromatine endommagée (1,7-2,4%), observés entre 6 et 16 mois. De plus, une diminution de la stabilité de la chromatine a été notée dans les spermatozoïdes des lapins dont l'âge est inférieur à 5 mois et supérieur à 20 mois (Gogol et al. 2002)

D'autres auteurs (Luzi et al. 1996 ; Minelli et al. 1999), ont noté que l'âge agit significativement sur la libido, sur la concentration et la mobilité des spermatozoïdes, ainsi que sur le pH et le volume de l'éjaculat. En effet, les spermatozoïdes provenant des lapins âgés présentent des membranes moins stables et sont probablement plus vulnérables aux carences alimentaires en acides gras polyinsaturés (Castellini et al. 2003).

c. Saison

La spermatogenèse du lapin, subit des variations saisonnières liées principalement à la photopériode et à la température. Une spermatogénèse active est notée chez des mâles pendant toute l'année mais avec une activité maximale au printemps (un pic de fécondité en avril, mai et juin) (Boyd et Myhill 1987). Ce paramètre peut être influencé par les changements de la photopériode (Boyd 1985 ; Boyd 1986), puisque la libération de GnRH est influencée par la photopériode (Lin et Ramirez 1988). Mais, des variations saisonnières de la libération de GnRH se sont produites même chez les mâles maintenus dans une photopériode fixe de 12L : 12D (Lin et Ramirez 1991).

Les changements dans le pH du sperme et les altérations morphologiques des spermatozoïdes augmentent pendant l'été (Amin et al., 1987). En effet, des températures élevées (supérieures à 27 °C) peuvent affecter la fertilité par une baisse de la libido, une

I.2. Sperme du lapin

altération de la morphologie et de la mobilité spermatique ainsi qu'une hausse dans les valeurs du pH du sperme (Bagliacci et al. 1987).

d. La gestion

López et al. (1996a) ont signalé une amélioration de la production de sperme lorsque les mâles ont été regroupés 3 heures avant la collecte de sperme. Cette technique augmente le volume des éjaculats et la mobilité spermatique. Le nombre de spermatozoïdes vivants le plus grand est observé chez des lapins stimulés avant la collecte de leur sperme (Holtz et Foote 1978b).

e. Fréquence de collecte

Selon Bencheikh (1995) et Moce et al. (2000), une meilleure qualité et quantité de sperme est obtenue lorsqu'il est récolté de deux éjaculats successifs prélevés une fois par semaine, à un intervalle de 15 min au minimum. Par contre une fréquence de collecte trop longue (tous les 14 jours) affecte négativement la production du sperme (Castellini et al. 2006a).

Par ailleurs, la collecte quotidienne, comparée à une collecte hebdomadaire, réduit la concentration de spermatozoïdes et de granules même si la production des granules est plus stable et plus élevée (Castellini et al. 2006a). En effet, un rythme d'accouplement intense provoque des altérations de la spermatogenèse avec une forte proportion de spermatozoïdes immatures suite à la réduction de la durée de transit épидидymaire (Bencheikh 1995) et donc, et de faibles résultats de fertilité. Par contre, une fréquence d'accouplement de 3 fois / semaine et un jour de repos après chaque accouplement a donné une bonne fertilité (Bunaciu et al. 1996). Par ailleurs, deux collectes par jour étalées sur deux jours consécutifs n'ont pas affecté les paramètres spermatiques, contrairement à quatre éjaculats prélevés le même jour où sont notés une diminution du volume et de la concentration spermatique, et donc d'un nombre des doses séminales (Lopez et al. 1996).

f. La photopériode

La durée de la lumière affecte l'axe hypothalamo-hypophysaire et par conséquent la libération hormonale et la production de spermatozoïdes, par contre l'intensité lumineuse n'a pas affecté significativement les caractéristiques du sperme (Besenfelder et al. 2004). En effet, Theau-Clément et Poujardieu (1994), ont rapporté qu'un programme quotidien de lumière constante de 16L : 8D augmente la production de spermatozoïdes qualitativement et

I.2. Sperme du lapin

quantitativement par rapport à une longueur de lumière plus courte (8L : 16D). Par ailleurs, Lin et Ramirez (1988), ont noté que la libération de la GnRH est influencée par la photopériode avec un niveau plus élevé de libération de GnRH le soir que dans l'après-midi

g. L'état de santé

En cas d'une inflammation de l'appareil reproducteur masculin, la concentration élevée de leucocytes, lors de la spermatogenèse ou l'éjaculation, peut augmenter la production de radicaux libres, et donc réduire profondément l'intégrité de l'acrosome (O'Bryan et al. 2000). Cette inflammation perturbe la biosynthèse des cytokines, leucotriène et prostaglandines et affecte donc le fonctionnement testiculaire et les caractéristiques du sperme (Knapp 1990).

h. L'alimentation

La qualité chimique de la ration alimentaire est le facteur le plus important malgré que Luzi et al. (1996) ont rapporté que le niveau alimentaire n'influence que la libido, le volume du sperme produit / éjaculat ainsi que le pH du sperme, mais la qualité du sperme semble ne pas être affectée. Ils ont noté aussi que les mâles nourris ad libitum ou avec des niveaux de protéines faibles ou élevés ne présentaient aucun défaut d'acrosome ni altération du rapport spermatozoïdes vivants : spermatozoïdes morts. En revanche, Nizza et al. (2000), affirment qu'une concentration de plus de 15% de protéines brutes, dans une ration, est recommandée pour assurer une bonne production de spermatozoïdes ainsi qu'une composition équilibrée d'acides gras (Wesley 1998).

Puisque l'animal ne peut pas produire les acides gras polyinsaturés essentiels, associés à la fluidité membranaire et à sa compétence, ces derniers doivent être fournis à des quantités suffisantes par l'alimentation sous forme de précurseurs (C18) ou acides gras allongés (C> 20) (Castellini 2008). En effet, l'ajout d'AGPI dans l'alimentation chez le lapin modifie la motilité et les caractéristiques cinétiques des spermatozoïdes (vitesse curviligne et déplacement latéral de la tête) (Castellini et al. 2003 ; Castellini et al. 2004), ce qui est probablement dues à l'élasticité membranaire plus élevée chez les spermatozoïdes du groupe supplémenté. Par contre, des taux élevés de cholestérol dans l'alimentation affectent la spermatogenèse et le métabolisme des cellules de Sertoli (Mann et Lutwak-Mann 1981).

En ce qui concerne les vitamines, Joly et Theau-Clément (2000) rapportent qu'une ration supplémentée en vitamines liposolubles (A, D3, E) n'améliore pas le comportement sexuel du jeune mâle et n'améliore pas aussi la quantité du sperme produit ni sa qualité. Par

I.2. Sperme du lapin

contre, l'ajout de l'acide ascorbique (1 g/litre de boisson) et de l'alpha tocophérol (200mg/kg) associées modifie les caractéristiques spermatiques ainsi que le statut oxydatif des mâles ce qui améliore la résistance du sperme aux stress aussi bien oxydatif qu'osmotique et améliore aussi son aptitude à la congélation.

I.2.2. Récolte de la semence du lapin

Le sperme est récolté pour différentes raisons, à savoir, l'évaluation de sa qualité, son utilisation dans l'une insémination artificielle, sa conservation ou même la recherche d'une éventuelle pathologie. Le sperme du lapin peut être récolté par plusieurs méthodes

I.2.2.1. La récolte par électroéjaculation

Consiste à stimuler électriquement les nerfs sympathiques éjaculatoires sous anesthésie et exercer une évagination du pénis par une pression manuelle pour récolter la semence dans un tube mis à son extrémité.

I.2.2.2. Vagin artificiel

Le vagin artificiel est le moyen de récolte qui mime parfaitement l'accouplement. En effet la collecte au vagin artificielle est la plus réussite. Elle se fait avec un vagin artificiel stérile pour recueillir de façon hygiénique l'échantillon de sperme puisque, des contaminants bactériens considérables proviennent de l'environnement (Mercier et Rideaud 1990). En outre, La collecte ne doit pas être stressante pour l'animal, c'est pourquoi la femelle est mise dans la cage qui contient le mâle (Boussit 1989). Selon certains auteurs une stimulation antérieure du mâle augmente la concentration des spermatozoïdes. Pour ce faire, une femelle peut être placée sur le dessus de la cage du mâle pendant quelques minutes (Castellini 2008) ou même présenter au mâle un mannequin de lapine ou seulement sa peau comme bote-en -train. Dans ce cas, l'avant- bras de l'opérateur est recouvert d'une peau de lapine sur laquelle le mâle saute. L'opérateur guide, par la suite, le vagin artificiel vers le pénis du lapin. (Boussit 1989).

Le vagin artificiel contient deux extrémités, une qui est large et l'autre moins large au niveau de laquelle un tube en plastique est fixé (**Figure 08**).

I.2.2.3. Ponction épидидymaire

La ponction épидидymaire permet de récolter une meilleure semence à conserver avec une motilité et une viabilité des spermatozoïdes meilleure que celles du sperme récolté par

I.2. Sperme du lapin

vagin artificiel ou électroéjaculation. Elle permet aussi de récolter du sperme chez des animaux difficilement ou non collectables.

La collecte est réalisée en rétro rinçant la lumière épидидymaire et du conduit déférent avec de l'air (Kikuchi et al., 1998) ou de l'eau physiologique (Dacheux 1980) ; puis en effectuant une incision transversale sur la partie la plus accessible du tube (la partie caudale). Le liquide épидидymaire est ensuite recueilli dans un tube gradué. Cette technique est utilisée dans différentes espèces, notamment chez la souris. (An et al. 1999).

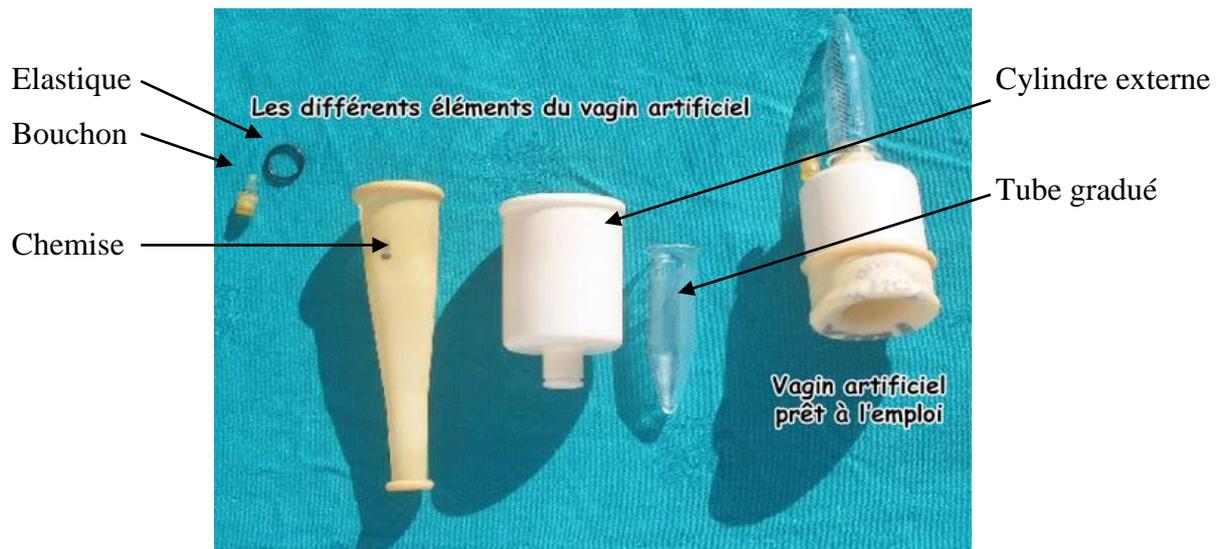


Figure 08 : Les composants du vagin artificiel
(Lebas 2009).

I.2.3. Analyse du sperme du lapin

L'analyse du sperme est une étape importante qui se base sur des examens simples effectués avant son utilisation dans l'insémination artificielle ou sa conservation. Elle permet d'évaluer le potentiel et l'aptitude de reproduction du mâle. Dans cette évaluation, l'aspect, le pH, le volume et l'odeur du sperme ainsi que le nombre, la morphologie, la vitalité et la mobilité des spermatozoïdes sont analysés. L'évaluation du volume, de l'aspect et de la couleur du sperme constituent l'analyse macroscopique qui est réalisée juste après la récolte. Néanmoins, Les paramètres de fertilité les plus importants sont le nombre et la mobilité des spermatozoïdes (Brun et al. 2002).

I.2. Sperme du lapin

I.2.3.1. Evaluation macroscopique

a. Volume

Il est détecté en lisant directement sur le tube de collecte qui est gradué après avoir éliminé le gel (Arriola et Foote 2001), ou par son aspiration avec une pipette dans un tube gradué (Suwanpugdee et al. 2009). Il peut varier de 0.25 à 1 ml avec une valeur moyenne de 0,6ml (Francisco et Luis 2003).

b. Aspect et couleur

La couleur est observée directement sur le tube de collecte. La couleur jaune signifie la présence d'urine, rouge du sang, marron des matières fécales et grisâtres un tissu génital mort (Boussit 1989).

c. pH

Il est évalué immédiatement après la récolte du sperme avec pH mètre (Najjar et Benmrad 2013), puisque le métabolisme le modifie (Boiti et al. 2005). Le pH du sperme varie entre 6.8 et 8.4 (Alvarino 2000), il indique parfaitement l'état sécrétoire des glandes annexes et l'état du métabolisme spermatique (Boussit 1989) et donc la qualité du sperme (Alvarino 2000). En effet une variation du pH du sperme conduit à la diminution de sa qualité (Boussit 1989).

I.2.3.2. Evaluation microscopique

a. Mobilité

La motilité est le pourcentage de spermatozoïdes se déplaçant régulièrement en ligne droite (Chrenek et al. 2007). La mobilité est indispensable pour la migration des spermatozoïdes dans l'appareil reproducteur et la pénétration des ovocytes (Holt et Van Look 2004). Elle reflète de façon subjective ou calculée la qualité du sperme du lapin (la vitalité, la morphologie, le potentiel métabolique et la fécondité de la semence) (Lavara et al. 2008b). Son évaluation représente un des deux tests subjectifs de laboratoire les plus fréquemment pratiqués pour estimer la qualité du sperme lors de l'insémination de la lapine, avec celui de la morphologie (Lavara et al. 2008a) et de la concentration (Verstegen et al. 2002).

Par ailleurs, L'estimations subjective des paramètres spermatiques sont influencés par le facteur évaluateur, notamment sa formation et son expérience c'est pourquoi l'analyse informatisée des spermatozoïdes (CASA), développée pour une évaluation objective est

I.2. Sperme du lapin

préférée. Il existe deux notions de motilité examinées sur le sperme immédiatement après son prélèvement : la mobilité massale et la mobilité individuelle.

- La mobilité massale

Consiste en l'estimation de la motilité de l'ensemble des spermatozoïdes par l'observation d'une goutte de sperme pur, mise entre lame et lamelle (Bencheikh 1995), sous un microscope optique au grossissement 10x10. Les impulsions en masse des spermatozoïdes en mouvement, exprimés par des vagues, sont recherchées. L'intensité de cette mobilité massale est notée suivant une échelle de 0 à 9, allant des spermatozoïdes immobiles aux spermatozoïdes à mobilité en tourbillon (Boussit 1989) (**Tableau I**) ; de 1 à 5 (Thomas et al. 2006) et de 0 à 5 (0, 1, 2, 3, 4 ou 5, De 0-10, 10-25, 25-50, 50-70, 70 - 90 ou 90-100%, respectivement, montrant une motilité progressive des spermatozoïdes) (Roca et al. 2000) (**Tableau II**). Cette analyse détecte d'une manière efficace les éjaculats aux spermatozoïdes très peu mobiles ou morts; mais elle ne différencie pas avec précision entre les éjaculats à différents pourcentages de mobilité spermatique.

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

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

I.2. Sperme du lapin

Tableau II : Notation de la mobilité massale du sperme d'après **Roca et al. (2000)**

Note	Aspects du mouvement
0	Tous les spermatozoïdes sont immobilisés
1	présence de mouvements individualisés
2	Les spermatozoïdes présentent un mouvement très lent
3	Mobilité massale de faible amplitude
4	Mobilité massale rapide, avec absence de l'aspect de tourbillon
5	Mobilité massale rapide, avec présence de l'aspect de tourbillon

- La mobilité individuelle

Elle permet d'évaluer en pourcentage le taux des spermatozoïdes mobiles. Elle est réalisée à 37°C au fort grossissement (10x40) après dilution de la semence fraîche dans une solution du TRIS (Tris - acide citrique - glucose) à raison de 1 :5; Ou dans du sérum physiologique une dilution de 10 à 40 fois (Hanzen 2012). Par contre, une forte dilution (plus de 1/100) affecte la mobilité, entraîne une dilution excessive du plasma séminal, dont le rôle est important (Minelliet al. 2001) et réduit les caractéristiques cinétiques des spermatozoïdes. La lecture des résultats se fait sur l'échelle d'Andrieu (1974), qui commence de 0 (absence de mouvements des spermatozoïdes) et arrive à 4 (spermatozoïdes fléchants dont le mouvement est rectiligne). L'appréciation de la mobilité tient compte des mouvements latéraux du déplacement des spermatozoïdes, de sa rectitude et de sa vitesse (**tableau III**).

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

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

I.2. Sperme du lapin

b. Concentration

Elle représente le nombre de spermatozoïdes par unité de volume. Elle peut être mesurée par des méthodes manuelles ou automatisées. La méthode manuelle, classique est rapide, simple et ne nécessite pas beaucoup de matériel (**Figure 09**). Elle consiste en comptage microscopique direct des spermatozoïdes du sperme dilué et étalé sur une lame de numération cellulaire : cellule de Thomas, de Malassez, de Neubauer, de Butker-Turk. Le sperme est donc dilué dans du formol concentré à 3,5% et préparé en mélangeant 10ml de formol et 1l de chlorure de sodium en solution concentrée à 0,9% (Boiti 2005) qui immobilise les spermatozoïdes. La dilution est au centième ou même au deux centième, dans le cas où le sperme est toujours concentré à l'observation sous microscope au plus faible grossissement. Selon Boussit (1989), la dilution de 1/200 donne une précision optimale. Après dilution, une goutte de la dilution préparée est mise sur la lame de numération cellulaire et les spermatozoïdes sont, par la suite, comptés selon des règles précises. Pour la cellule de Thomas qui comporte seize carrés, les spermatozoïdes sont comptés sur cinq carrés : les quatre se situant dans les coins et un du centre. Le calcul de la concentration des spermatozoïdes nécessite l'utilisation d'une formule dans laquelle la dilution est prise en compte.

Exemple de calcul pour une cellule de Thomas et une dilution au centième :

$$\text{Spermatozoïdes / mL} = [(N1+N2+N3+N4+N5) / 5] \times 100 \times 250 \times 1000$$

N : nombre de spermatozoïdes / carré.

$[(N1+N2+N3+N4+N5) / 5]$: la moyenne des spermatozoïdes / carré.

100 : facteur de dilution.

Pour obtenir le total des spermatozoïdes dans le sperme, le nombre obtenu par ml est multiplié par le volume en ml du sperme éjaculé. Selon Roca et al. (2005), le sperme du lapin se caractérise par une concentration en spermatozoïdes faible, qui varie entre 150 et 500×10^6 spz/ml.



Figure 09 : Matériel nécessaire au comptage des spermatozoïdes

I.2. Sperme du lapin

c. Vitalité

La vitalité correspond au taux de spermatozoïdes vivants ; elle détermine parfaitement la qualité du sperme. Cette analyse examine différents champs du même frotti, jusqu'à un nombre de 150 spermatozoïdes au minimum, de la semence colorée au préalable à l'éosine-nigrosine, qui est un colorant vital, permettant de mettre en évidence les spermatozoïdes morts, à membrane perméable, qui seront colorés, en totalité ou en partie, en rose des spermatozoïdes vivants, à membrane imperméable, incolores (Alvarino 2000). Pour réaliser le frotti, une goutte de la semence est mélangée à une goutte du colorant. En suite le tout est délicatement étalé sur la surface de la lame, et gardé un moment sur une plaque chauffée à la température de 37°C pour, finalement, réaliser une observation microscopique optique, grossissement (10X40) (Boussit 1989). Il est toutefois à noter que les résultats de cette coloration sont variables selon le temps de trempage dans le colorant ainsi que son origine (Fontbonne 1995).

d. Morphologie

Elle est déterminée à partir d'un frottis coloré avec de l'éosine-nigrosine et analysé au microscope optique, grossissement (10x100).

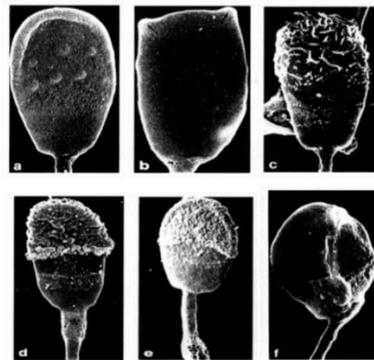
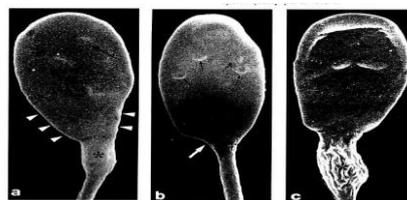


Figure 10: Anomalies morphologiques de la tête

(Kuzminsky et al. 1996)

Cet examen permet le classement des spermatozoïdes en anormaux et normaux (Johnston et al. 2001b) et la détection des spermatozoïdes ayant achevé leur réaction acrosomique, à acrosome coloré. Ces spermatozoïdes ne sont donc plus fertiles.



I.2. Sperme du lapin

Figure 11 : Anomalies morphologiques de la pièce intermédiaire
(Kuzminsky et al. 1996)

Selon leur origine, les anomalies sont primaires ou secondaires. Elles concernent la tête (**Figure 10**), la pièce intermédiaire (**Figure 11**) ou la queue (**Figure 12**) (Johnston et al. 2001b).

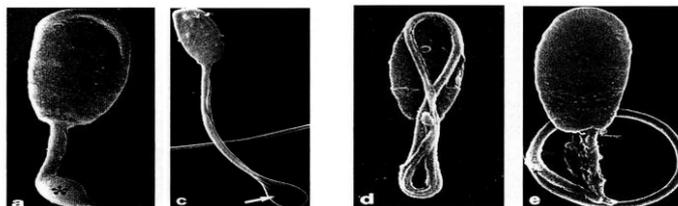


Figure 12 : Anomalies morphologiques de la queue
(Kuzminsky et al. 1996).

Les anomalies sont aussi dites majeures ou mineures selon qu'elles soient ou non associées à une baisse de fertilité (**Figure 13**) (Johnston et al. 2001b). Les gouttelettes proximales représentent une anomalie majeure qui réduit la fertilité, puisqu'elle est associée à une faible vitesse de déplacement des spermatozoïdes du lapin (Campos et al. 2014).

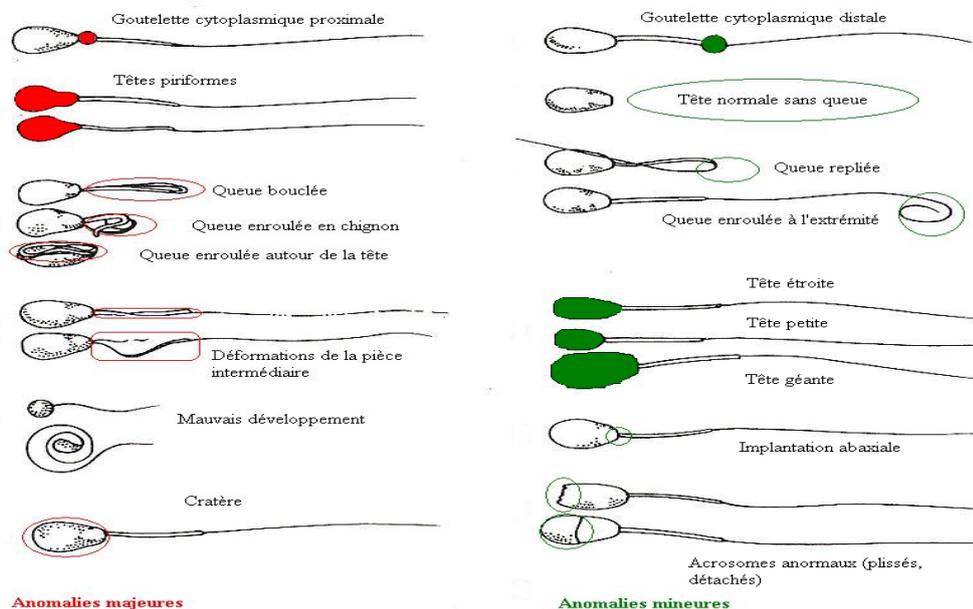


Figure 13 : Anomalies spermatisques mineures et majeures.
(D'après Ott et al. 1987)

I.2. Sperme du lapin

e. Intégrité membranaire (test hypo-osmotique)

L'intégrité de la membrane plasmique est évaluée par le test hypo-osmotique et indique l'état fonctionnel de cette membrane (Jeyendran et al. 1984), qui intervient dans des phénomènes indispensables à la fécondation comme la réaction acrosomique, la capacitation et la liaison entre les gamètes (Jeyendran et al. 1984). Les spermatozoïdes à membrane plasmique intacte sont capables de se déformer pour évacuer l'eau (Eilts 2005), lorsqu'ils sont exposés à des conditions hypo-osmotiques, particulièrement visible au niveau de leur queue. Ce test est également utilisé pour évaluer la viabilité des spermatozoïdes (Theau-Clément 2005).

Pour se faire une solution hypotonique est d'abord ajoutée au sperme qui est par la suite incubée à 37°C dans un bain-marie. L'observation des spermatozoïdes se fait sous microscope optique à contraste de phase (**Figure 14**).

Cependant, d'après Dufour (1998) le test hypo-osmotique est un test à réaliser en complément des autres tests puisque la corrélation entre ce dernier et les autres tests comme le test à l'éosine-nigrosine est faible.

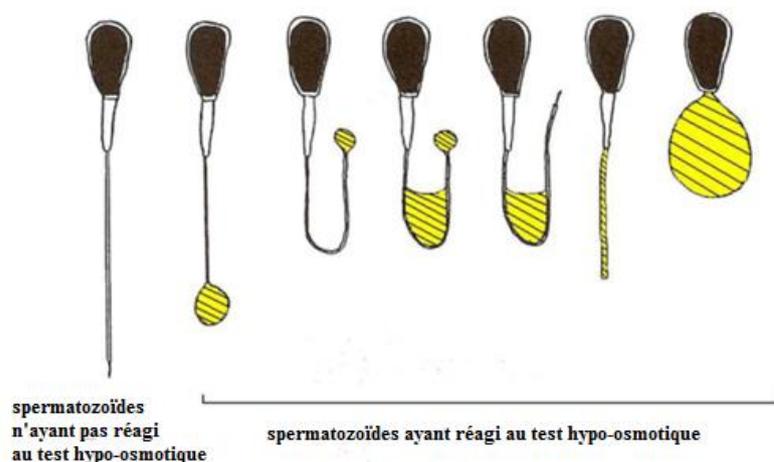


Figure 14 : Résultats possibles du test hypo-osmotique.
(Jeyendran et al. 1984)

I.2.4. Système CASA

Le CASA est un système d'analyse informatisée des spermatozoïdes, développé pour une évaluation précise, rapide et objective du pourcentage de spermatozoïdes mobiles et leur mouvement (Pena Martinez 2004). Il est composé d'un microscope à contraste de phase doté d'une plaque chauffante, relié à un ordinateur et à une caméra vidéo de haute résolution (Guidelines 2005). Les paramètres évalués sont : la mobilité individuelle et la

I.2. Sperme du lapin

mobilité massale, la fréquence des battements des flagelles et les mouvements lents, moyens et rapides. De ce fait, les spermatozoïdes qui ont réalisé leur capacitation sont détectés par leur déplacement hyperactif (Rijsselaere et al. 2005).

Le CASA analyse un nombre important de spermatozoïdes en peu de temps. Il utilise des logiciels lui permettant de visualiser et d'examiner des images successives de spermatozoïdes vivants afin de tirer des informations valides et précises à propos de la cinématique de chaque spermatozoïde. Cependant, une standardisation de l'appareil est indispensable avant son utilisation (Rijsselaere et al. 2005). Selon Schleh et Leoni (2013), dans le CASA tout changement dans les paramètres de l'instrument peut conduire à un changement profond des résultats. Il est donc absolument nécessaire d'ajuster les paramètres respectifs d'une manière scientifiquement valable et d'interpréter les résultats en tenant compte des conditions personnelles de l'expérience.

Les paramètres cinétiques suivants sont généralement évalués (**Figure 15**) :

- VAP : distance parcourue par la tête des spermatozoïdes par unité de temps ($\mu\text{m/s}$) ;
- VCL : distance parcourue au cours de la trajectoire curvilinéaire par la tête du spermatozoïde par unité de temps ($\mu\text{m/s}$)
- VSL : distance parcourue en ligne droite entre le commencement et la fin de la trajectoire curvilinéaire décrite par la tête du spermatozoïde par unité de temps ($\mu\text{m/s}$) ;
- LIN : indique la linéarité de la trajectoire curvilinéaire (%) ;
- STR : indique la rectitude de la trajectoire moyenne (%) ;
- WOB : indique le degré d'oscillation de la trajectoire curvilinéaire par rapport à la trajectoire moyenne (%) ;
- ALH : indique le déplacement observé par la tête du spermatozoïde par rapport à la trajectoire moyenne (μm).
- BCF : indique la fréquence par laquelle la tête du spermatozoïde traverse la trajectoire moyenne (Hertz) (Boiti et al, 2005)

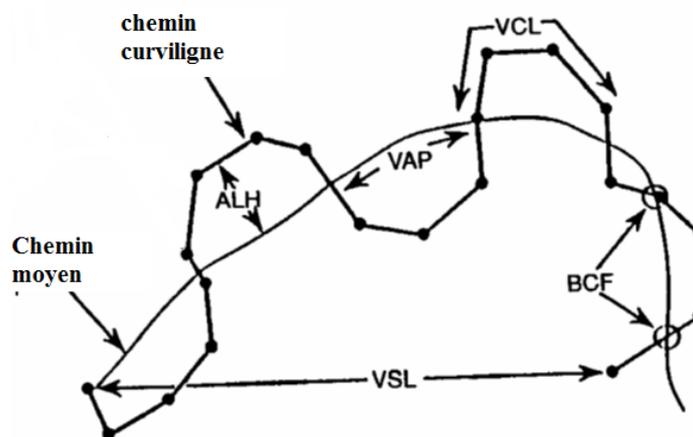


Figure15 ; Graphique de la motilité des spermatozoïdes.

(Boiti 2005)

I.3. Cryoconservation du sperme

I.3.Cryoconservation du sperme

La conservation du sperme du lapin est à ce jour l'un des principaux problèmes pour une large utilisation de l'insémination artificielle. En effet la sensibilité du sperme du lapin aux solutions hypertoniques (Castellini et al. 1992) et aux agents cryoprotecteurs contenant du glycérol (Arriola 1982) est plus importante que celle des spermatozoïdes d'autres espèces.

I.3.1. Définition et historique

La cryoconservation correspond en le stockage d'une suspension de cellules à une température inférieure à -80°C , afin de la conserver pendant longtemps, et l'utiliser une fois réchauffée à la température du corps. (Amann 1998).

Le premier qui a pensé à la conservation du sperme par congélation est Spallanzani en 1789, après avoir remarqué que le sperme de grenouille a conservé ses propriétés fécondantes après son stockage dans la neige. Néanmoins, la procédure de congélation des spermatozoïdes n'est mise au point qu'en 1949 lorsque Polge et al., ont découvert l'effet cryoprotecteur du glycérol sur le sperme de différentes espèces (Amann 1998 ; England 1993).

Concernant la cryoconservation des spermatozoïdes du lapin, Hoagland et Pincus ont observé dès 1942 que les spermatozoïdes du lapin pouvaient difficilement survivre après immersion dans l'azote liquide (Sawada et Chang 1964). Après la découverte de l'effet cryoprotecteur du glycérol, les chercheurs ont rapidement compris que les spermatozoïdes du lapin sont plus fragiles que ceux des autres espèces, puisque les spermatozoïdes du lapin congelés avec du glycérol ont montré une très faible survie ainsi qu'une altération de la fertilité. Ils ont même remarqué que le glycérol devient toxique lorsqu'il est utilisé à une concentration supérieure à 5% (Smith et Polge 1950). Parallèlement, Emmens et Blackshaw (1950) ont essayé différentes combinaisons d'alcools et de sucres mais ils ont observé que ces produits étaient plus toxiques pour le sperme du lapin que pour celui du taureau ou du bélier. Sauf que, 30% des spermatozoïdes ont récupéré la motilité après les avoir congelés dans un mélange d'éthylène glycol (7,5%) et de divers sucres (1,25%) (Emmens et Blackshaw 1950).

Chez le lapin, les premières expériences de conservation du sperme ont été réalisées avec des protocoles développés pour le taureau, mais la cryoconservation propre au lapin n'est améliorée que lorsque des CPAs (agents cryoprotecteurs) de perméabilité plus élevée (comme l'éthylène glycol ou le DMSO) étaient utilisés à la place du glycérol (Fox et Burdick 1963 ; Sawada et Chang 1964). Néanmoins, malgré que l'éthylène glycol était moins toxique sur le sperme du lapin que le glycérol, il ne protégeait pas suffisamment les spermatozoïdes

I.3. Cryoconservation du sperme

pendant la cryoconservation (Costantini 1989). D'autre part, Fox et Burdick (1963) ont signalé que l'ajout du glycérol ou d'éthylène-glycol aux spermatozoïdes à 37 C° est bénéfique par rapport à 5 C° puisqu'ils sont mieux perméables à une température élevée (Moce et Vicente 2009).

I.3.2. Objectifs de la cryoconservation

Le principal objectif de la cryoconservation est de conserver le matériel génétique d'espèces en danger ou de bons reproducteurs, puisque contrairement à la fertilité de la semence qui est altéré par la congélation, le génome des spermatozoïdes reste intact ce qui permet donc, de les conservés pendant des dizaines d'années (Amann, 1998). L'utilisation de la cryoconservation s'est donc limitée à la conservation du patrimoine génétique d'un animal dans un premier temps et au transfert de semence entre les pays (England, 1993).

I.3.3. Effets de la cryoconservation sur le sperme

La cryoconservation du sperme est un processus qui entraîne plusieurs stress oxydatifs, par la diminution de température, l'addition des cryoprotecteurs et l'exposition des spermatozoïdes à une grande osmolarité du milieu (Watson 2000). Il est connu que les spermatozoïdes du lapin sont capables de résister au choc thermique du fait que leur membrane plasmique est riche en cholestérol (Castellini et al 2006a ; Darin-Bennet et White 1977) et pauvre en acide gras polyinsaturé/saturé en phospholipides (Darin-Bennet et White 1977). Néanmoins, le processus de la cryoconservation a plusieurs conséquences sur le sperme. Le processus de son exposition au froid (congélation) et à la chaleur (décongélation) est à l'origine des dommages résultant de la cryocopréservation au niveau des cellules (Amann 1998).

I.3.3.1. Effets sur le métabolisme cellulaire

La congélation induit un ralentissement du métabolisme des cellules, dont l'intensité est fonction de la température. En effet, le métabolisme cellulaire est actif à la température corporelle (37°C) ; il diminue de 50% à 10°C, il ne reste que 5% à 2°C et à - 80°C la plupart des processus métaboliques sont stoppés (Amann 1998).

I.3. Cryoconservation du sperme

I.3.3.2. Effets sur les membranes cellulaires

Les lipides de la membrane plasmique sont de différentes espèces et chaque espèce possède une température de changement de phase (: température pour laquelle les lipides passent de l'état liquide cristallin à l'état de gel avec les chaînes d'acides gras qui deviennent rigides et parallèles). Quand la température devient moins que celle de changement d'état d'une espèce de lipides, tous les lipides de cette espèce se regroupent en micro-domaines. Ce qui entraîne donc une réorganisation de la membrane plasmique et un bouleversement des associations entre les lipides et les protéines. Par ailleurs, cette nouvelle organisation est à l'origine de trous entre les micro-domaines des lipides gélifiés et les portions fluides de la membrane ; ce qui la fragilise et peut entraîner des ruptures membranaires. A la remise de la cellule à la température corporelle, les lipides retrouvent leur forme liquide mais la membrane plasmique ne retrouve pas son organisation initiale (Amann 1998). Moggia et Perros (1999), ont noté une vacuolisation et même une disparition complète des deux membranes la membrane cellulaire et celle qui délimite la partie externe de l'acrosome après la congélation. Selon Amann (1998), un refroidissement lent et un réchauffement rapide ainsi que l'ajout de cryoprotecteurs peuvent minimiser les dommages causés par la cryoconservation.

I.3.3.3. Conséquences sur les mouvements des solutés et des fluides.

Lors de la congélation à une température inférieure à -40°C , l'eau du milieu extracellulaire se transforme en glace et la concentration en solutés dans ce milieu augmente. L'eau est donc, appelée depuis le milieu intracellulaire vers l'extérieur de la cellule qui se déshydrate. Cela conduit à moins de dommages cellulaires, puisqu'il y aura moins de cristaux de glace qui se formeront dans le milieu intracellulaire. Cependant, lorsque la quantité d'eau diminue la concentration en solutés augmente ; cela provoque d'irréversibles changements de la structure membranaire, une dénaturation des protéines et une désorganisation des structures internes de l'axonème.

Pendant la décongélation, les cellules peuvent être endommagées. Lorsque les cristaux de glace extracellulaires fondent et la cellule se réhydrate (Amann 1998). Pour diminuer la taille des cristaux extracellulaires qui se forment lors de la congélation, les spermatozoïdes doivent être refroidis assez rapidement mais suffisamment lentement pour leur permettre une certaine déshydratation. Le passage d'une température de 20°C à celle comprise entre 0°C et 5°C doit, donc, durer au moins deux heures.

I.3. Cryoconservation du sperme

I.3.3.4. Effets sur les spermatozoïdes.

Le processus de congélation-décongélation de la semence diminue sa fertilité par les dommages subis par un certain nombre de spermatozoïdes (Pena Martinez 2004). Cependant, une variabilité individuelle concernant le pouvoir des spermatozoïdes à résister à la congélation-décongélation est remarquée. Elle est peut-être dû à des caractéristiques différentes de la membrane cellulaire d'origine génétique (Eilts 2005). Il est donc, nécessaire d'évaluer la semence après décongélation en termes de mobilité et de fertilité. La mobilité est un critère qui est souvent associé à la fertilité de la semence. Elle est fréquemment prise en compte pour évaluer sa résistance à la congélation-décongélation ; malgré qu'elle ne reflète pas les dommages cellulaires. Elle est évaluée par le test de thermo-résistance accompagnée des tests qui évaluent les dommages subis par les cellules après décongélation tel que le test hypo-osmotique, la cytométrie de flux et la microscopie électronique (England 1993). La meilleure méthode objective pour évaluer la qualité du sperme congelé reste la fertilité après décongélation (Farstad 1996) ; Cependant, cette méthode dépend d'autres facteurs que de la qualité du sperme. Ce test de thermo-résistance, mime la longévité spermatique dans les voies génitales femelles en évaluant leur mobilité au cours de leur incubation à la température corporelle pendant plusieurs heures (England 1993).

I.3.4. Protocoles de cryoconservation

I.3.4.1. La préparation de la semence et la congélation

Le sperme doit être dilué (1 / 2-1 / 5) avec un milieu tampon à la même température, dans les 5 minutes suivant la collecte. La dilution varie entre 1: 5 et 1:10. Le sperme est emballé dans des paillettes, congelé et conservé à -196°C dans l'azote liquide. Lors de la manipulation de la semence, il est nécessaire de réduire, tout choc d'échantillon (température, produit chimique, oxygène) afin d'éviter une baisse de la fertilité (Boiti et al. 2005).

- Protocole :

Selon Andrieu (1974), la méthode générale de la congélation comprend les étapes suivantes :

- 1) Dilution à un taux 1 : 4.
- 2) Refroidissement progressif pendant 3 heures jusqu'à 5 °C.
- 3) Ajout du glycérol à 6% (cryoprotecteur) 30 minutes avant la congélation.
- 4) Conditionnement, dans des paillettes, du sperme dilué et refroidi.
- 5) Congélation à l'azote liquide à -196°C, pendant 6 à 10 minutes
- 6) Stockage dans l'azote liquide.

I.3. Cryoconservation du sperme

I.3.4.2. La décongélation

La décongélation est effectuée pendant 20 secondes en utilisant une solution de décongélation à 37 °C (Andrieu 1974). Néanmoins, il a été remarqué qu'après décongélation à la température de 45 °C il y a plus de membranes plasmiques intactes, malgré que la morphologie principale est la même après décongélation à 37 °C ou à 45 °C.

I.3.5. Les dilueurs

I.3.5.1. Définition et rôles

Un dilueur est un milieu dans lequel la semence est conservée. Ils ont l'avantage de pouvoir garder les propriétés de fécondation des spermatozoïdes et de permettre l'ajustement de la concentration en spermatozoïdes dans les paillettes (Adoue 1991). Ils contiennent des agents cryoprotecteurs qui protègent les cellules et augmentent leur survie au cours de la congélation. Il y a ceux qui pénètrent dans les cellules tel que le glycérol et ceux qui restent dans le milieu extracellulaire tels que les protéines ou les sucres (Amann 1998 ; England 1993).

Afin de mieux conserver la vie des spermatozoïdes, le dilueur doit être isotonique par rapport au sperme, ce qui évite le choc osmotique, il doit avoir un pH compatible à la survie des spermatozoïdes (pH entre 6,7–7,3) et une action stabilisatrice afin de protéger les membranes spermatozoïdes contre les chocs mécaniques et thermiques, il doit posséder un pouvoir tampon contre les produits métaboliques et un pouvoir antioxydant lui permettant de lutter contre les radicaux libres et antibactérien destiné à contrôler la flore microbienne, il doit également avoir un équilibre adéquat des minéraux essentiels à la vie des spermatozoïdes et contenir des substances nutritives, source d'énergie, telles que des sucres (glucose, fructose, glutamine) pour le métabolisme des spermatozoïdes et pour éviter leur épuisement (Adoue 1991).

I.3.5.2. Composition

Le dilueur de sperme doit contenir un agent cryoprotecteur tel que le DMSO (diméthylsulfoxyde), le glycérol, l'éthylène glycol, l'acétamide ou le lactamide. La plupart des dilueurs sont à base du TRIS associé au jaune d'œuf, qui agit comme agent protecteur (Sinkovicks et al. 1983 ; Mercier et Rideaud 1992). D'après Hanada et Nagase (1980) ; Chen et al. (1989b) le diméthylsulfoxyde, l'éthylène glycol ou l'acétamide présentent une faible toxicité et préservent mieux la motilité des spermatozoïdes à 20 °C (Hanada et Nagase 1980).

I.3. Cryoconservation du sperme

Vicente et Viudes de Castro (1996) ont proposé un allongeur congélateur simple du sperme du lapin, à base de saccharose 0,5M et DMSO 1,75M, obtenant une motilité post-décongélation de 42% et des taux d'acrosomes normaux de 66 %. Les amides ont aussi été utilisés comme agents cryoprotecteurs. Ils présentent une détérioration des spermatozoïdes inférieure pendant la congélation, et une motilité des spermatozoïdes plus élevée qu'avec le DMSO combiné au glycérol (Chen et al. 1989a ; Hanada et Nagase 1980).

a. Cryoprotecteur

Les cryoprotecteurs sont perméables, utilisés pour leur pouvoir de protéger la membrane spermatique des dommages provoqués par la cristallisation de l'eau. L'action des cryoprotecteurs consiste en la diminution du point de congélation des substances, en la réduction du taux de sels et de solutés de la phase liquide de l'échantillon et en la diminution de la formation de cristaux de glace au sein des spermatozoïdes (Harald et al 2016). Parmi tous les cryoprotecteurs existants, le glycérol est le meilleur pour la protection des spermatozoïdes pendant la cryoconservation (Vasquez et al. 2013 ; Elliott et al. 2017).

- Le glycérol

C'est grâce à Polge et al.(1949) qui ont démontré que le glycérol est un cryoprotecteur qui pouvait être associé au jaune d'œuf, que la congélation du sperme du taureau a connu un succès dès 1950. Le glycérol est un cryoprotecteur qui traverse les membranes plasmiques. Il agit sur les protéines qu'il protège contre la dénaturation au cours des changements de température. De plus, en se liant aux molécules d'eau, il diminue la formation des cristaux de glace et en les rendant sphériques, il les rend moins agressifs pour les cellules. Enfin, il permet de diminuer la température de congélation du milieu (Adoue 1991). Cependant, il possède une toxicité à concentration importante. Il peut provoquer des dommages membranaires sur les spermatozoïdes (rupture membranaire, perte de la stabilité et de la perméabilité membranaires), une altération de l'acrosome, une désorganisation et un changement de viscosité du cytoplasme (Martins-Bessa et al. 2006). Selon Tainturier et al. (2013), il présente, d'autre part, une toxicité pour les spermatozoïdes à 37°C, il est, donc, judicieux de l'ajouter lorsque le sperme arrive à la température de 4°C, à une concentration adéquate pour chaque espèce d'animaux domestiques. Néanmoins, il n'a pas d'effet toxique sur le sperme dilué à au moins de 5% de concentration (Castellini et al. 1992). Selon (Mocé et Vicent 2009) le glycérol n'est pas le meilleur choix pour le sperme de lapin puisque les résultats obtenus lorsque ce dernier est congelé dans un milieu contenant uniquement le

I.3. Cryoconservation du sperme

glycérol comme cryoprotecteur étaient inférieurs à ceux du sperme frais et du sperme congelé avec d'autres cryoprotecteurs tel que le DMSO, l'éthylène glycol ou les amides. Cependant, l'inclusion de glycérol dans les extendeurs n'a pas amélioré les résultats après la cryoconservation.

- L'éthylène glycol

L'éthylène glycol est un cryoprotecteur utilisés pour la congélation d'embryons de certaines espèces mammifères et dans la congélation du tissu ovarien. Sa structure chimique est identique à celle du glycérol mais son poids moléculaire est inférieur. Il possède donc une perméabilité supérieure au glycérol qui pourrait être à l'origine d'une toxicité inférieure. Après décongélation, La mobilité et l'intégrité membranaire sont meilleures lorsque le glycérol est remplacé par l'éthylène glycol à la concentration de 5%. Mais elles sont identiques pour tous les dilueurs après incubation (Rota et al. 2006 ; Martins-Bessa et al. 2006).

- Les amides

Les amides ont un poids moléculaire inférieur à celui du glycérol. Ils causent moins de dommages osmotiques au sperme. Ils ont été utilisés comme cryoconservateurs des spermatozoïdes du lapin depuis 1980 (Hanada et Nagase 1980). Ces auteurs ont rapporté que les composés à groupes amide ou méthyle semblaient être les meilleurs agents cryoprotecteurs pour les spermatozoïdes du lapin par rapport à ceux contenant des groupes hydroxyle. Dans une étude comparant plusieurs cryoprotecteurs (différents amides, alcools et DMSO), le lactamide, l'acétamide et le DMSO ont donné les meilleurs résultats à une concentration de 1M dans l'extenseur. Selon plusieurs auteurs l'acétamide demeure l'un des cryoprotecteurs de choix pour conserver les spermatozoïdes du lapin (Kashiwazaki et al. 2006).

- DMSO

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) fait partie des cryoprotecteurs les plus utilisés pour la congélation du sperme du lapin. Son effet protecteur est attribué à sa "capacité de tamponnement du sel" qui minimise les dommages électrolytiques lorsque l'eau gèle (Graham 1976). Selon Hanada et Nagase (1980) les spermatozoïdes maintiennent une bonne motilité à 20 °C dans une solution hypertonique de diméthylsulfoxyde, ils ont suggéré que le DMSO traverse librement la membrane cellulaire et est donc relativement non toxique. Selon Castellini et al. (1992) les meilleurs taux de récupération après décongélation (53,8 % de

I.3. Cryoconservation du sperme

motilité, 44,5 % de spermatozoïdes vivants et 70,4 % d'acrosomes normaux) sont obtenus lors de l'utilisation de DMSO, d'ailleurs, ELGaafary et al. (1993) ont noté que l'inclusion de 8 % de DMSO dans le diluant était plus efficace pour protéger les spermatozoïdes du lapin pendant la congélation que le glycérol. Par contre un milieu contenant 8% de DMSO plus 2% de glycérol était le meilleur pour la protection du sperme de lapin pendant la congélation et après la décongélation, car il maintenait les pourcentages les plus élevés de motilité, et d'acrosomes normaux.

- Cholestérol (CHL)

Il appartient à la famille des stérols, c'est le plus important lipide se trouvant dans les cellules eucaryotes. Il contrôle, entre autre, la perméabilité et la fluidité des membranes des cellules (Harper et Jacobson 1999). Le cholestérol entraîne une rigidité et une stabilité de la membrane des spermatozoïdes en réduisant leur perméabilité, ce qui maintient la structure des membranes cellulaires intact pendant que l'osmolarité subit des variations au cours de la cryoconservation (Glazar et al. 2009 ; Aksoy et al. 2010), qui créent un stress important sur les membranes cellulaires et qui sont à l'origine de leur dysfonctionnement. Par ailleurs, Maxfield et Tabas (2005) et Matsingou et al. (2007) ont rapporté que le cholestérol diminue la rigidité de la membrane lorsque la température est inférieure à celle de la transition de phase, alors que dans le cas contraire où la température est supérieure le cholestérol réduit le mouvement des phospholipides dans la bicouche.

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 (Moce et al. 2010).

- Polyéthylène glycol

C'est un produit de pétrole, habituellement utilisé dans les cosmétiques comme solvant, épaississant, adoucissant, et excipient d'humidité. C'est un polymère non toxique et hydrosoluble à une masse moléculaire qui varie de 200 à 300000. Il présente plusieurs variétés synthétisées de l'oxyde d'éthylène. L'application de chacune de ces variétés diffère selon la longueur de sa chaîne (Betajeri 2011). Ils sont non antigéniques et biocompatibles approuvés par « the Food and Drug Administration » pour les applications intraveineuses, orales et cutanées humaines. Il est utilisé pour améliorer la solubilité, par des dispersions solides, de différentes molécules peu solubles dans l'eau et des stéroïdes. Grâce à sa structure il est amphiphile et soluble dans des phases aqueuses et organiques. En phase liquide et à température ambiante, les chaînes du PEG sont très hydratées et chaque monomère est

I.3. Cryoconservation du sperme

capable de lier deux à trois molécules d'eau ce qui est responsable de ses propriétés osmotiques lorsqu'il est en solution, par contre lorsque la température augmente, sa solubilité diminue (Hin et al. 1998).

La forme la plus courante du PEG est celle d'un polyéther, ramifié ou linéaire qui se termine par des groupes hydroxyle (**Figure 16**). Il est représenté par une répétition de monomère d'éthylène glycol (Veronese et al. 1985).

La plus importante propriété du Polyéthylène glycol (PEG) est sa solubilité dans l'eau, qui permet son utilisation dans de multiples applications (Peerenboom et al. 1983).



Figure 16 : Structure du Polyéthylène glycol
(Roberts et al. 2002).

Dans le domaine pharmaceutique, les PEG sont appelés macrogols (Akio Tani et al. 2007). Ils sont utilisés tant que laxatifs osmotiques, dans la constipation, surtout le macrogol 3350 et le macrogol 4000. Ainsi que dans la fabrication des gels hydro alcooliques (Johansson 1992 ; Brooks et al. 1992). Dans l'industrie, le PEG est généralement utilisé comme base pour les crèmes de beauté à effet épaississant ou gélifiant. Il est dans les crèmes hydratantes, dans les shampoings et dans les savons liquides (Carpenter et al. 1971). Il est par ailleurs utilisé tant qu'additif alimentaire, ou solvant des encres d'imprimantes ou dans la fabrication des billes de paint-ball. En chimie, le PEG est utilisé dans le transport des réactifs liquides dans la phase organique il est donc un bon catalyseur de transfert de phase (PTC), (Biondi 2002).

Le PEG est capable de se solubiliser dans l'alcool, le dichlorométhane, l'eau, l'acétone et le toluène ; par contre il est non soluble dans les hydrocarbures aliphatiques (Akio Tani et al. 2007). La solubilité des matières organiques et leurs intermédiaires dans l'eau qui est faible, constitue l'obstacle majeur que rencontre la chimie en milieu liquide dans son développement. Le PEG vient résoudre ce problème en diminuant la polarité du milieu aqueux, ce qui améliore la solubilité des produits organiques. Le PEG serait, donc, un Co solvant de l'eau.

Le PEG 400 solubilise fortement les sels et peut être utilisé dans les réactions de substitution et d'oxydation (Heitzpfa 1969). Il est utilisé en microbiologie ou en biologie moléculaire pour transformer différents types de cellules par l'insertion de l'ADN plasmidique, tel que les protoplastes de plantes et les levures. Le PEG permet le transfert de l'ADN à travers la membrane plasmique et augmente la perméabilité cellulaire par le fait qu'il

I.3. Cryoconservation du sperme

déstabilise, réversiblement, les membranes et stabilise l'ADN à la surface des levures, cela favorise le phénomène de transformation. Le rôle du PEG est représenté par son pouvoir d'interagir avec les membranes cellulaires (Grant 1986).

b. Le jaune d'œuf

Il est utilisé pour éviter aux spermatozoïdes le choc thermique grâce à son pouvoir de restaurer les phospholipides altérés des membranes des spermatozoïdes, car il possède des phospholipides comme la lécithine qui protègent ces dernières (England 1993 ; Farstad 1996). Selon Tainturier et al. (2013), sa fraction cryoprotectrice est les LDL (lipoprotéines à basse densité) et les autres composants ont un effet néfaste sur la congélation, et il peut même contenir des agents pathogènes (Farstad 1996). Il est utilisé dans les dilueurs à la proportion allant de 10 à 20% avec une préférence de 20%.

c. Le lait

Le lait contient des protéines et du lactose. Il possède un pouvoir tampon et il aurait un rôle protecteur sur les membranes des spermatozoïdes. De plus, le lactose constitue un apport énergétique utilisable par les spermatozoïdes. D'après Rota et al. (2001), les meilleurs pourcentages de mobilité et de viabilité sont obtenus après deux heures d'incubation à 37°C après décongélation, avec le dilueur contenant du lait comme tampon, comparé au dilueur contenant le TRIS comme tampon et celui dont la moitié du tampon TRIS est remplacée par du lait, malgré que le taux des spermatozoïdes mobiles, leur vitalité et les anomalies de l'acrosome juste après décongélation ne sont pas significativement différents entre les trois types de dilueur.

d. Les substances tampon

La substance tampon la plus utilisée est le Tris-citrate qui est une substance soluble dans l'eau. Grâce à son statut de base faible, elle empêche l'acidité du milieu induite par l'augmentation des ions hydrogènes produits du métabolisme des spermatozoïdes. Sans cette substance, le pH acide peut diminuer la fertilité et la longévité des spermatozoïdes. (England 1993)

e. Les sucres

Les sucres utilisés dans la cryoconservation sont le glucose et le fructose.

I.3. Cryoconservation du sperme

Le lactose et la raffinose à poids moléculaire élevé (ne pénètrent pas dans les cellules) sont aussi utilisés. Ils jouent un rôle de cryoprotecteurs (England 1993 ; Yildiz et al. 2000).

Les sucres représentent la source d'énergie des spermatozoïdes et possèdent aussi un pouvoir osmotique. D'après Yildiz et al (2000), certains sucres, comme les disaccharides et quelques monosaccharides, améliorent les caractéristiques de la semence alors que d'autres comme le glucose n'entraînent pas d'améliorations des caractéristiques de la semence par rapport à un dilueur sans sucre.

f. Les antibiotiques

L'ajout d'antibiotiques lutte contre le développement des bactéries dans le milieu de congélation. Les plus fréquemment ajoutés sont la dihydrostreptomycine et la pénicilline.

g. Le sodium dodécyl sulfate (SDS)

Le SDS est contenu dans différentes préparations commerciales dont la composition de n'est pas clairement définie (Pena et al. 2003). C'est un détergent anionique, soluble dans l'eau. Malgré que son rôle n'est pas clairement établi, on sait qu'il dénature les protéines membranaires et solubilise entièrement les membranes plasmiques à forte concentration et il semblerait qu'il ait une action sur les lipoprotéines du jaune d'œuf (Pena et Linde-Forsberg 2000).

I.3.6. Performance reproductrice du sperme congelé

Fargeas(1995) note après comparaison entre un sperme frais et un autre congelé que la congélation affecte significativement la fertilité et la prolificité. Chen et al. (1990) compte à eux pensent le contraire. D'autre part, Theau-Clement et al. (1996) rapportent que la semence congelée conservée cinq ans dans l'azote liquide peut conduire à de bonnes performances de reproduction. Néanmoins, la congélation provoque des dommages cellulaires avant et pendant la congélation ou pendant la décongélation (Courtens et Theau-Clement 1996). Cela peut expliquer les échecs de la fécondation et les pertes importantes d'embryons avant l'implantation notés par Maurer et al. (1976) qui ont montré aussi que les embryons provenant du sperme congelé étaient plus petits que les autres après culture "in vitro". Par contre Vicente et Viudes de Castro (1996) ont constaté que les embryons normaux obtenus après insémination avec du sperme congelé étaient semblables à ceux obtenus avec du sperme frais.

I.3. Cryoconservation du sperme

I.3.7. Stockage à court terme (la réfrigération)

Un sperme réfrigéré est celui conservé avec un cryoprotecteur à 4°C pendant 48h. La réfrigération permet d'utiliser la semence sans déplacer les femelles afin de pouvoir bénéficier du progrès génétique de l'insémination artificielle, surtout dans les pays qui ne fabriquent pas d'azote liquide (Tainturier et al. 2013).

La réfrigération du sperme à 4°C permet de réduire la mobilité et le métabolisme des spermatozoïdes en les maintenant dans des températures basses. Ceci économise leurs réserves énergétiques et conserve leur mobilité restaurée après réchauffement (Decuadro-Hansen 2004). Néanmoins, cette méthode de conservation nécessite le contrôle rigoureux des différentes étapes suivantes : dilution, refroidissement, et conditionnement de la semence.

Les spermatozoïdes sont conservés dans un dilueur, qui augmente leur longévité et préserve leur pouvoir de fécondation, en maintenant plus longtemps leur mobilité (Tsutsui et al. 2003). La dilution doit être réalisée juste après la récolte de la semence, après moins de 15 min, puisque celle-ci ne peut survivre que peu de temps à la température de 34–37 °C (Decuadro-Hansen 2004).

I.3.7.1. Effets du stockage à court terme sur la motilité et morphologie des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes du lapin peuvent être conservés 24 heures à une large gamme de températures de refroidissement (6 à 25 °C), avec de meilleurs résultats de l'IA à 18 et 19 °C (López et al. (1996)). Cependant, une meilleure motilité et une meilleure intégrité de l'acrosome sont notées à 15 °C par Gottardi (1993) et Bergonzoni et Zambelli (1994). En effet, López et al. (1996) et Gottardi (1993) ont noté que les spermatozoïdes survivent mieux à la température comprise entre 15 et 19 °C. Il est à noter que la motilité des spermatozoïdes est fortement réduite après 24h de conservation comparant à l'observation faite immédiatement après la dilution du sperme. Et qu'elle est plus élevée à 25 °C qu'à des températures de refroidissement basses (6 et 11 °C). Néanmoins, aucune corrélation n'a été trouvée entre la motilité après 24 heures et la fertilité, ce qui laisse penser que les spermatozoïdes entrent dans un état de sommeil et ils sont par la suite réactivés une fois à l'intérieur du tractus génital féminin (López et al. (1996)). D'ailleurs, Des résultats satisfaisants sont obtenus, en terme de prolificité et de fertilité, en utilisant un sperme conservé 24 à 72 h (Alvarino et al. 1996 ; Perrier 1998).

I.3. Cryoconservation du sperme

Par ailleurs, Viudes de Castro et al. (1999) n'ont pas observé une différence de paramètres séminales entre le sperme frais et celui réfrigéré à 16-18 °C pendant 26-30 heures. Plus la température de conservation est basse, plus la mobilité spermatique est conservée grâce à l'activité métabolique des spermatozoïdes et leur mobilité qui diminue. La diminution de la mobilité observée à 4°C/5°C est réversible après réchauffement. Cela prolonge la vie fonctionnelle des spermatozoïdes et par conséquent leur survie. Une baisse de température entraîne, donc, le prolongement de la durée de conservation tout en préservant le pouvoir des spermatozoïdes à féconder (Viudes de Castro et al. 1999).

D'autre part, comme pour toutes les cellules refroidies, lorsque la diminution de la température est trop rapide, des transformations causées par le choc thermique apparaissent sur les spermatozoïdes. Ces transformations sont parfois irréversibles et ont comme conséquences l'augmentation de la perméabilité membranaire, la perte de mobilité, l'apparition de spermatozoïdes à mouvements circulaires et la chute de la production d'énergie (Decuardo-Hansen 2004).

I.3.7.2. Effets du stockage à court terme sur la fertilité

D'après Gottardi (1993), il n'est pas intéressant de préserver les spermatozoïdes du lapin à des températures inférieures à 17 °C puisque les dommages acrosomiaux augmentent ; ni à des températures supérieures à 19°C, en raison d'une intégrité inférieure de l'acrosome associée, éventuellement à une altération partielle de l'aptitude à utiliser des ressources énergétiques exogènes. En effet selon Lôpez et al. (1996), les valeurs les plus élevées de la fertilité sont notées à des températures comprises entre 17 et 19 °C. Elles diminuent à 15, 11 et 6°C ou à 21 et 25 °C. Cela serait, probablement, dû à l'effet de la température sur la motilité, aux dommages acrosomiaux et à l'épuisement des réserves énergétiques endogènes.

I.3.7.3. Dilueur

Les dilueurs les plus fréquemment utilisés pour la conservation du sperme de lapin sont ceux du TRIS, composé de Tris, d'acide citrique, de glucose ou de fructose (**Tableau IV**), qui donnent de meilleurs résultats par rapport aux autres (Rohloff et Laiblin 1976; Cortell et Viudes de Castro 2008). D'autres dilueurs sont mis au point par des chercheurs, selon Feldman et Nelson (2004) les protéines du jaune d'œuf et du lait peuvent protéger et stabiliser les membranes des spermatozoïdes. En effet Iguer-Ouada et Verstegen (2001) ont démontré que la mobilité des spermatozoïdes et l'intégrité de leurs acrosomes sont maintenus

I.3. Cryoconservation du sperme

pendant la réfrigération grâce au jaune d'œuf, d'autre part, Bouchard et al. (1990) et Bue (1992) ont observé de bons résultats de vitalité et de motilité des spermatozoïdes réfrigérés dans un dilueur contenant du lait écrémé.

Par ailleurs, le fructose ou le glucose ajouté au dilueur maintient la mobilité à plus de 70 % à 5°C, jusqu'à 8 jours (Ponglowhapan et al. 2004). Et la caféine ajoutée, augmente la mobilité spermatique à 18°C de 0 à 48 h, sans améliorer les paramètres reproducteurs femelles (El-Gaafary 1994).

a. Taux de dilution

La dilution doit être suffisante pour profiter de l'effet du dilueur mais pas trop forte pour éviter la dégradation de la mobilité et de la fécondité spermatique (Sauveur et Revières 1988). Le taux de dilution est généralement entre 1/3 et 1/5 (Fuertes 2008). Il varie en fonction de la durée de conservation du sperme et de sa concentration (Seed et al. 1996).

On appelle taux de dilution le rapport : $T = \frac{\text{volume du sperme pur}}{\text{volume du sperme diluer}}$

I.3.7.4. Protocole de la réfrigération

Pendant sa réfrigération, la vitesse de refroidissement de la semence ne doit être ni trop lente ni trop rapide. Les chercheurs ont proposé divers protocoles :

- mettre le sperme dilué d'emblée au réfrigérateur (Bue 1992).
- mettre le d'abord dans un verre d'eau à la température du laboratoire avant de mettre le tout dans le réfrigérateur (Linde-Forsberg 1995).
- ou bien il est placé dans un appareil qui diminue température de façon constante et programmée (Verstegen et al. 2005).

En fonction du protocole adopté, le sperme atteint 4°C en 30 minutes à quelques heures. À la réfrigération du sperme, il est indispensable de s'assurer que sa température ne descend pas en dessous de 4 °C. Et que son réchauffement se fait lentement à l'aide d'un bain-marie avant de l'utiliser (Linde-Forsberg 1995).

Tableau IV: Composition du TRIS utilisé chez le lapin (Boiti et al. 2005)

Tris	3,029 g	G-pénicilline	166.200 UI
L'acide citrique	1,676 g	L'eau distillée	100 ml
D-Glucose déshydraté	1.250 g	pH	7,14
Streptomycine	75.000 UI	Osmolarité	299 mOsm / kg

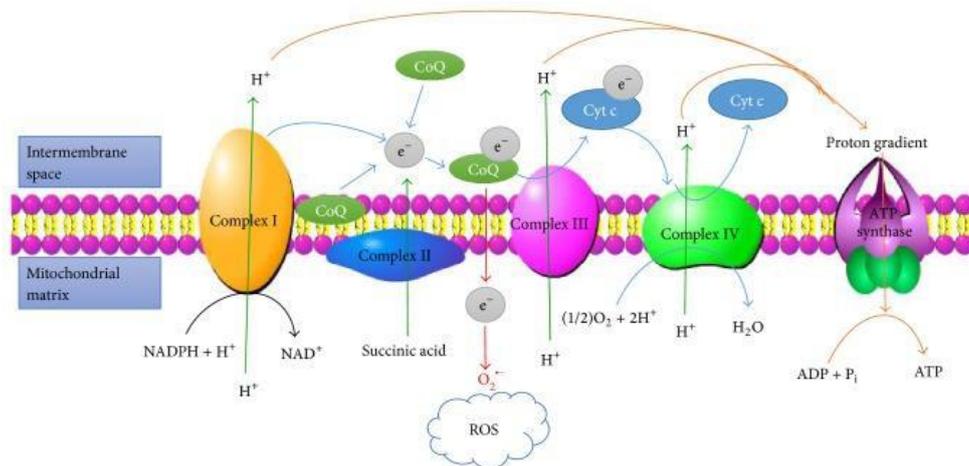
I.4.Stress oxydatif

I.4.Stress oxydatif

I.4.1. Notions générales liées aux stress oxydatif.

L'expression « stress oxydatif » désigne l'état de déséquilibre entre les défenses anti oxydantes de l'organisme et le taux des réactifs dérivés de l'oxygène (ERO), en faveur de ces derniers.(Haleng et al, 2007), que ce soit par leur surproduction ou par déficit en antioxydants. Cela peut engendrer des dégâts considérables dans l'organisme, se traduisant par d'importantes altérations biochimiques intracellulaires, puisque les ERO oxydent les protéines, et donc les enzymes et l'ADN ; ainsi que les lipides (Cook et al. 2003).

Toute cellule aérobie est constamment confrontée à ce problème, puisque l'oxygène est utilisé dans tous les processus aérobie, et les ERO sont produits naturellement de la respiration cellulaire,dans les mitochondries (Del piero et al. 2006) (**Figure 17**).



Complexe I : NADH déshydrogénase, **Complexe II** : succinate déshydrogénase,

Complexe III : Coenzyme Q-cytochrome c réductase, **Complexe IV** : Cytochrome c oxydase,

CoQ10 : Coenzyme Q10.

Figure 17 : Transport d'électrons à travers la chaîne de respiration mitochondriale et production des ERO (Li et al. 2017)

Les ERO représentent la classe la plus abondante des radicaux libres, ce sont des espèces chimiques réactives instables, contenant sur l'orbite externe, un ou des électrons non appariés, ce qui leur procure de l'énergie leur permettant, ainsi, d'entrer en interaction avec, entre autres, l'acide nucléique, les lipides et les protéines (Haleng et al. 2007), en leur donnant ou en leur détachant des électrons, afin de générer des espèces plus stables. Par conséquent, ces molécules sont dénaturées. Ces mêmes radicaux libres, y compris les ERO, à des concentrations raisonnables, sont utiles pour l'organisme et sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques, tel que la phosphorylation des protéines, l'apoptose, la

I.4.Stress oxydatif

différenciation cellulaire, l'activation des facteurs de transcription, la maturation des ovocytes, la stéroïdogénèse, l'immunité cellulaire et la défense cellulaire contre les microorganismes (Celi et Gabai 2015)

I.4.2.Protection antioxydante

L'organisme dispose d'un système antioxydant lui offrant une protection en vers les effets délétères des ERO. Ce système consiste en un ensemble de défenses antioxydantes endogènes (enzymes antioxydantes) ou exogènes, tel que les vitamines C et E qui proviennent des fruits et légumes et apportés par l'alimentation, responsables de la protection cellulaire des radicaux libres (Surai 2002) (Figure 18).

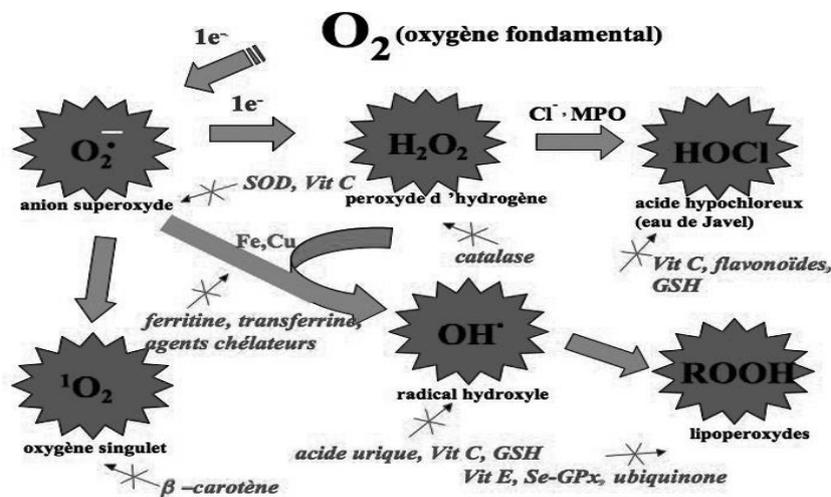


Figure 18 : Les espèces oxygénées activées et les antioxydants régulateurs de leur production (Haleng et al. 2007)

I.4.2.1. Les antioxydants enzymatiques

- Enzymes antioxydantes: superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) et glutathion peroxydase (GSH-Px).
- Système redox thiol constitué du système glutathion (glutathion / glutathion réductase / glutaredoxine / glutathion peroxydase et un système thiorédoxine (thiorédoxine / thiorédoxine peroxydase / thiorédoxine réductase) (Surai 2002).
- Systèmes réparateur des dommages oxydatifs tel que les endonucléases.

I.4.2.2. Les antioxydants non enzymatiques

- Les antioxydants naturels liposolubles (vitamines A, E, caroténoïdes, ubiquinones, etc.)
- Les antioxydants hydrosolubles (acide ascorbique, acide urique, taurine, etc.) (Surai, 2002)

I.4.Stress oxydatif

- Les protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine)
- Les oligoéléments qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (sélénium, cuivre et zinc)

a. Vitamine E

Elle est organique, découverte en 1922 dans la laitue et dans le germe de blé, par des chercheurs californiens qui ont noté qu'elle était indispensable pour la reproduction des rats (Burton 1994).

La vitamine E est un ensemble d'antioxydants, liposolubles, se trouvant dans les membranes de toutes les cellules (Grimm et al. 2016) surtout les membranes mitochondriales ; ayant le pouvoir d'éviter la peroxydation des lipides (Duncan et Suzuki 2017). Elle est représentée par un groupe d'isomères dits les tocophérols (α -tocophérol, le β -tocophérol, le γ -tocophérol, et le δ -tocophérol) (Cook-Mills et McCary 2010). Étant hydrophobe, elle est capable de s'insérer en profondeur des membranes riches en acides gras polyinsaturés où elle se fixe grâce à sa longue chaîne lipidique (**Figure 19**). Elle est orientée d'une manière où le noyau chromanol soit à la surface cellulaire. Et son activité antioxydante est due à sa fonction phénolique. L' α -tocophérol est l'isomère qui prédomine dans le plasma et les tissus, et c'est l'antioxydant le plus efficace (Sánchez-Sevilla et al. 2016).

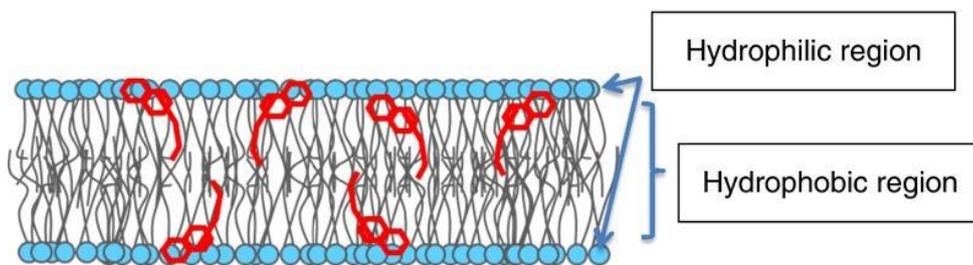


Figure 19 : Lieu d'insertion de l' α tocophérol au sein de la bicouche lipidique de la membrane plasmique (Raederstorff et al. 2015).

- Rôle et mécanismes d'action de la vitamine E

Selon le Comité Européen D'experts de la Sécurité (CEDs), la vitamine E protège les cellules vis-à-vis des dégâts oxydatifs *in vitro* et *in vivo* (Raederstorff et al. 2015). Étant donné, elle est capable de s'insérer au sein des membranes riches en AGPI, et de les protéger en empêchant la peroxydation des lipides causée par les ERO. (Landrier 2011). Elle arrête l'oxydation des acides gras en s'oxydant, elle-même, à leur place puis cède un de ses propres atomes d'hydrogène au radical peroxyde lui permettant de se stabiliser et de ne plus être réactif, ce qui entraîne donc l'arrêt des réactions en chaîne. De ce fait l' α -tocophérol se

I.4. Stress oxydatif

transforme en α -tocophéryl, entité radicalaire moins toxique (Thomas et Stocker 2000) (Figure 20).

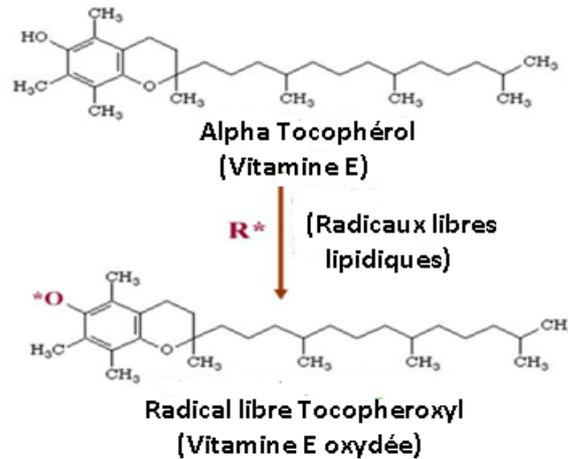


Figure 20 : La vitamine E oxydée (Biswas 2016).

Lorsque le radical peroxyde ($\text{LOO}\bullet$) est produit de la peroxydation des lipides, la vitamine E intervient pour le piéger avant qu'il s'attaque au lipide (LH) afin de produire l'hydroperoxyde (LOOH). Les tocophérols perdent l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (OH) de leur partie non hydrophobe qui est facilement amovible (Dhingra 2014), il est donné au peroxyde pour former un radical tocophéroxyde (Szarka et al. 2012). Ce dernier est plus ou moins stable, n'est pas capable d'initier la peroxydation des lipides, ceci est un indice d'un bon antioxydant.

Le radical peroxyde se combine à l'acide gras de la queue de la vitamine E, pour arrêter le retrait de l'électron de l'acide gras membranaires. Ce qui interrompt la chaîne de la peroxydation lipidique (Miguel et al. 2017).

b. Vitamine C

L'acide ascorbique est organique et soluble dans l'eau, isolé des agrumes à la fin de l'année 1920 par Albert Szent-Gyorgyi. Puis il a été démontré que quel que soit le dosage, la vitamine C n'est pas toxique. Elle était utilisée pour prévenir le scorbut, puisque au milieu du VIII^e siècle, James Lind a démontré que le jus d'agrumes frais guérit le scorbut. La vitamine C fait partie du groupe des sucres à six atomes dérivant du D-Glucose.

L'acide ascorbique est un puissant réducteur possédant un pouvoir antioxydant (Munnich et al. 1987). C'est un antioxydant primaire qui stoppe les espèces radicalaires mais peu réactif avec les oxydants cellulaires habituels comme le peroxyde d'hydrogène. Il interagit

I.4.Stress oxydatif

probablement, avec les produits qui résultent de la dégradation du peroxyde d'hydrogène (Frei et al. 1988). La vitamine C fait partie des principaux antioxydants hydrosolubles intra et extracellulaire dans la phase aqueuse (Hu et al. 2010). Elle protège contre la peroxydation des lipides en piégeant des ERO et en réduisant l'électron du radical hydroperoxyde des lipides à travers la réaction d'oxydoréduction de la vitamine E (Guilland 2011) (**Figure 21**). Elle transforme aussi le produit de peroxydation des lipides en celui de peroxydation lipidique de vitamine C non réactif, ce qui prévient les dommages pouvant être causés par l'interaction entre les radicaux LPO et les macromolécules (protéines, ADN et ARN).

La vitamine C agit aussi indirectement en donnant des électrons pour recycler la forme radicalaire d'autres antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, en effet elle intervient dans le processus de régénération de la vitamine E et transforme le radical tocophéryle en tocophérol, en lui donnant un électron. Elle travaille donc, en synergie avec la vitamine E pour prévenir la peroxydation lipidique (Chan 1993 ; Waters et al. 1997). L'ascorbate oxydé est lui aussi régénéré par des enzymes comme la thiorédoxine réductase et la glutathion réductase dépendante du NADPH.

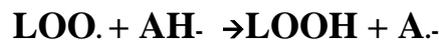


Figure 21 : Formule d'action antioxydante de la vitamine C.

La vitamine C est essentielle dans de nombreuses fonctions du corps, elle est, in vivo, un cofacteur pour plusieurs enzymes (Halliwell et Gutteridge 1998) et a un rôle précis dans la fertilité masculine. De nombreuses études montrent son effet positif dans l'amélioration de la qualité spermatique, de la concentration en spermatozoïdes ainsi que leur morphologie et mobilité (Akmal et al. 2006). Sa supplémentation aux milieux de congélation, améliore de manière significative les fonctions des spermatozoïdes après décongélation chez différentes espèces animales (Jenkins et al. 2011 ; Hu et al. 2010 ; Amini et al. 2015).

I.4.3. Stress oxydatif et sperme

Le spermatozoïde est une cellule très sensible à la peroxydation à cause des niveaux élevés d'insaturation de sa membrane, riche en acide gras polyinsaturé (double liaison) (Henkel 2011), et de son contenu cytoplasmique réduit contenant une quantité limitée d'antioxydants enzymatiques (Vernet et al. 2004). En effet la plupart des antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase) et non enzymatiques à savoir, la

I.4.Stress oxydatif

vitamine C, la vitamine A, la vitamine E, l'albumine et l'urate (Agarwal et al. 2008) se trouvent dans le liquide séminal (Kefer et al. 2009). De ce fait, il est exposé à la dégradation de sa structure membranaire, de son métabolisme et de l'intégrité de son ADN (Jones et al. 1979)

Le spermatozoïde, aurait besoin des ERO produits à des niveaux faibles, dans différents processus physiologiques, dans sa capacitation, son déplacement hyperactif, sa réaction

acrosomique et sa fusion à l'ovocyte (De Lamirande et O'Flaherty 2012 ; Agarwal et al. 2014) où ils agissent comme régulateurs de la phosphorylation protéique et des voies de signalisation qui interviennent dans ces processus (O'Flaherty et al. 2006). Les spermatozoïdes, génèrent des ERO d'une manière spontanée, à leur sortie de l'épididyme, en produisant l'anion superoxyde (O_2^-) et l'hydroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; ce qui laisse penser que ces ERO sont impliquées dans les fonctions spermatiques (Aitken 2000).

Par contre le stress oxydatif peut être extrêmement néfaste pour les spermatozoïdes (Simões et al. 2013). En effet, l'excès d'ERO a été associé à plusieurs dommages cellulaires tels que la peroxydation de lipides, la diminution des réactions acrosomiques, la fragmentation d'ADN, la réduction de la capacité de fusionner à l'ovocyte et de la féconder ainsi que la baisse du taux de gestation après FIV (Chi et al. 2008). Il affecte aussi la vitesse, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes et peut tuer les cellules qui mourront par apoptose (Angrimani et al. 2014).

En raison du pouvoir antioxydant limité des spermatozoïdes, surtout lors de leur stockage pendant longtemps à une température inférieure à $0^\circ C$, une supplémentation en antioxydants améliore la qualité du sperme (Tremellen et al. 2008 ; Agarwal et al. 2008 ; Chi et al. 2008), que ce soit un apport de vitamines E, vitamine C ou minéraux (folate, zinc, sélénium) dans l'alimentation (Agarwal et al. 2008 ; Greco et al. 2005), ou l'ajout d'antioxydants (vitamines E, vitamine C, hypotaurine, glutathion, N-acétylcystéine ou albumine) dans le milieu de conservation (Tremellen et al. 2008 ; Agarwal et al. 2008).

I.5. Insémination artificielle

I.5. Insémination artificielle

L'insémination artificielle (IA) est un processus par lequel le sperme est introduit dans l'appareil reproducteur de la femelle sans contact entre le mâle et la femelle. Le pourcentage de femelles gestantes après insémination artificielle diffère selon l'opérateur (entre 70% et 85 %) et peut être amélioré par l'injection de PMSG, 48 heures avant de les inséminer (Fromont 2011).

La technique de l'IA s'est développée rapidement au cours des années 1980, chez le lapin, suite aux premiers travaux des chercheurs allemands qui ont découvert la possibilité d'induire la réceptivité des femelles de cette espèce, par la GnRH (DalBosco et al. 2011). L'application de l'IA est généralisée en Europe, dans les différents élevages, au cours des années 1990, suite à l'adoption de la reproduction en système de bande unique et l'apparition des centres d'insémination artificielle, surtout en Espagne et en France (Lebas et al. 1996).

Chez la lapine, l'insémination artificielle peut se faire en deux façons :

- Dans la première la lapine est maintenue en position verticale par l'opérateur qui l'insémine (**Figure 22a**) (Fromont et Tanguy 2001).
- Dans la deuxième, l'insémination nécessite deux opérateurs, un tient la lapine en position dorsale en présentant la vulve à l'autre pour l'inséminer (**Figure 22b**) (Fromont et Tanguy 2001).



Figure 22 : Insémination artificielle chez la lapine : a : avec un opérateur, b : avec deux opérateurs (Davaoust 2010).

I.5. Insémination artificielle

I.5.1. Etapes de l'insémination artificielle

I.5.1.1. Déclenchement de l'ovulation

Dans l'IA, l'ovulation est induite en injectant en intramusculaire 0,2 ml de GnRH ou de son analogue, juste avant l'insémination, ceci conduit à un taux d'ovulation supérieure à celui obtenu dans les conditions naturelles, en particulier lorsque les lapines ne sont pas réceptives. La GnRH est une molécule de petite taille, non exogène et donc peu immunogène (Fortun Lamothe et al. 2015).

I.5.1.2. Techniques d'insémination

Elle est pratiquée avec un pistolet propre à l'insémination protégé d'une gaine à usage unique (**Figure 23**), sur une femelle dont la partie inférieure du corps est soulevée afin d'obtenir une vue complète du vagin. Une fois la lapine est préparée, l'inséminateur introduit le pistolet (8-14 cm.) puis appui sur le piston pour déposer la dose d'insémination dans la partie antérieure du vagin de la lapine, une fois le pistolet est retiré, l'inséminateur doit contrôler la présence ou non de pus ou de sang.

I.5.2. Intérêts de l'insémination artificielle

L'IA offre à l'éleveur de très importants avantages génétiques, sanitaires et économiques :

I.5.2.1. Avantages génétiques

L'IA représente un puissant outil permettant d'améliorer la génétique des animaux, de sélectionner des reproducteurs et de diffuser rapidement le progrès génétique. Avec l'IA, le nombre de mâles nécessaire est diminué et les ressources génétiques en danger sont conservées grâce à la Cryoconservation du sperme.

I.5.2.2. Avantages sanitaires

En absence du contact direct entre le mâle et la femelle dans l'insémination artificielle, celle-ci est considérée comme un outil d'éradication de maladies sexuellement transmissibles et celles liées à la circulation des animaux. Elle permet aussi un meilleur contrôle sanitaire de l'élevage, en effet, la conduite en bandes uniques améliore les conditions sanitaires dans l'élevage et offre une meilleure organisation du travail.

I.5. Insémination artificielle

I.5.2.3. Avantages économiques

Grâce à l'IA l'éleveur peut utiliser des géniteurs améliorés à un prix moindre, sans supporter les contraintes de leur entretien. Il peut aussi synchroniser les mises-bas et toutes les autres opérations de l'élevage, en inséminant plusieurs lapines le même jour, en utilisant un nombre réduit de mâles. De plus, il peut planifier sa production en fonction de la disponibilité alimentaire ou des variations saisonnières, ce qui lui permet de diminuer les dépenses sur les lapereaux produits, souvent d'une qualité meilleure (Kabli 1993). Par ailleurs, grâce à l'insémination artificielle, on peut éliminer les animaux les moins productifs et même induire une grossesse chez les femelles qui refuse l'accouplement.



Figure 23 : Matériel utilisé pour l'insémination artificielle
(Fortun-Lamothe et al. 2015)

I.5.3. Le diagnostic de gestation

I.5.3.1. Palpation trans abdominale

La gestation est diagnostiquée par la recherche des embryons, éventuellement formés au sein de l'utérus, par palpation abdominale des lapines (Arsene 2004), ce qui demande une technicité de la part de l'éleveur. Cependant, une palpation brutale peut conduire à l'avortement des lapines (Djago et Kpodekon 2007). La palpation se fait entre le 10^{ème} et 14^{ème} jours après la saillie (Arsene 2004) et elle consiste à saisir avec une main la peau de la région supérieure aux reins pour soulever la lapine de son arrière train, et l'autre main passe sous l'abdomen et palpe doucement le ventre avec des mouvements allant de l'avant en arrière (**Figure 24**) (Fromont et Tanguy 2001).

I.5. Insémination artificielle



Figure 24 : Diagnostic de gestation par palpation trans-abdominale
(Fromont et Tanguy 2001).

I.5.3.2. Radiographie

C'est une technique qui n'est pas satisfaisante chez la lapine car elle ne peut être utilisée que tardivement, vers le 17^{ème} jour de gestation (Rinck et al. 1993).

I.5.3.3. Test ELISA

Il est réalisé 17 ou 18 jours post-coïtal, il mesure la concentration de la progestérone sérique de la lapine afin de faire la différence entre une femelle gestante de celle qui est pseudo-gestante.

I.5.3.4. Echographie

Grâce à l'échographie la gestation peut être diagnostiquée le 9^{ème} ou le 10^{ème} jour (Ypsilantis et Saratsis 1999). Elle permet aussi d'évaluer la taille de la portée, et de suivre le bon déroulement de la gestation, (Chavatte Palmer et al. 2008).

II. Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

Notre objectif est d'étudier l'interaction des deux molécules (Vitamine E, et PEG) sur les paramètres spermatiques du sperme réfrigéré (4°C) ou congelé ((-196°C), et celle des trois molécules (Vitamine E, Vitamine C et PEG) sur le sperme conservé à température ambiante. Nous avons mené deux études avec le sperme du lapin ; la première avait comme objectif l'évaluation de l'effet protecteur des molécules précédentes sur le sperme du lapin conservé en déterminant si les diluants à base de vitamine E seule ou associée au PEG et/ou à la Vitamine C pouvaient offrir une meilleure préservation des paramètres de motilité des spermatozoïdes et une meilleure protection contre le stress oxydatif. La deuxième avait comme objectif l'évaluation de la fertilité du sperme du lapin dilué dans les traitements testés à température ambiante en réalisant des inséminations artificielles.

II.1. La récolte du sperme :

II.1.1. Les animaux :

Nous avons collecté le sperme de quinze (15) lapins adultes, âgés entre 1 et 2 ans, de races mixtes et présentant un bon état de santé avec un poids allant de 2 Kg à 4 Kg. Ces lapins sont maintenus dans des cages individuelles, nourris avec un aliment concentré en granulés (composé de céréales et leurs sous produits, tourteaux de soja, luzerne, minéraux et vitamines, capteurs des mycotoxines, huiles de soja, enzymes et levures), distribué deux fois par jour matin et soir et disposent d'une eau fraîche à volonté.

Afin de collecter les mâles, nous avons utilisé trois (3) lapines adultes, âgées entre 7 mois et 1 an, maintenues dans les mêmes conditions sus-citées.

Dans un premier temps, nous avons collecté et analysé le sperme de 10 mâles, puis nous avons choisi ceux à conserver.

II.1.2. La technique de la collecte du sperme

Tout le sperme analysé et conservé, à température ambiante ou réfrigéré, est collecté avec un vagin artificiel en sollicitant le mâle deux fois à environ 15 min d'intervalle, sauf celui congelé qui est prélevé après dissection de l'épididyme récupéré immédiatement après l'abattage de l'animal (sperme épидидymaire).

II. Matériel et méthodes

II.1.2.1. La collecte au Vagin artificiel

a. Montage du vagin artificiel (Figure 25)

Avant de collecter le sperme nous avons d'abord préparé le vagin artificiel afin de reproduire les conditions du vagin de la femelle en terme de pression et de température, en utilisant un gant introduit dans le cylindre externe du vagin artificiel (**1 et 2**) et fixé à ses deux extrémités (**3 et 4**) pour former une cavité entre le cylindre externe et le gant. Dans cette cavité on injecte de l'eau chaude (40° à 45°) à l'aide d'une seringue, à travers un bouchon en caoutchouc placé à proximité de la petite extrémité. Au niveau de cette dernière, un tube de collecte est placé (**7**).

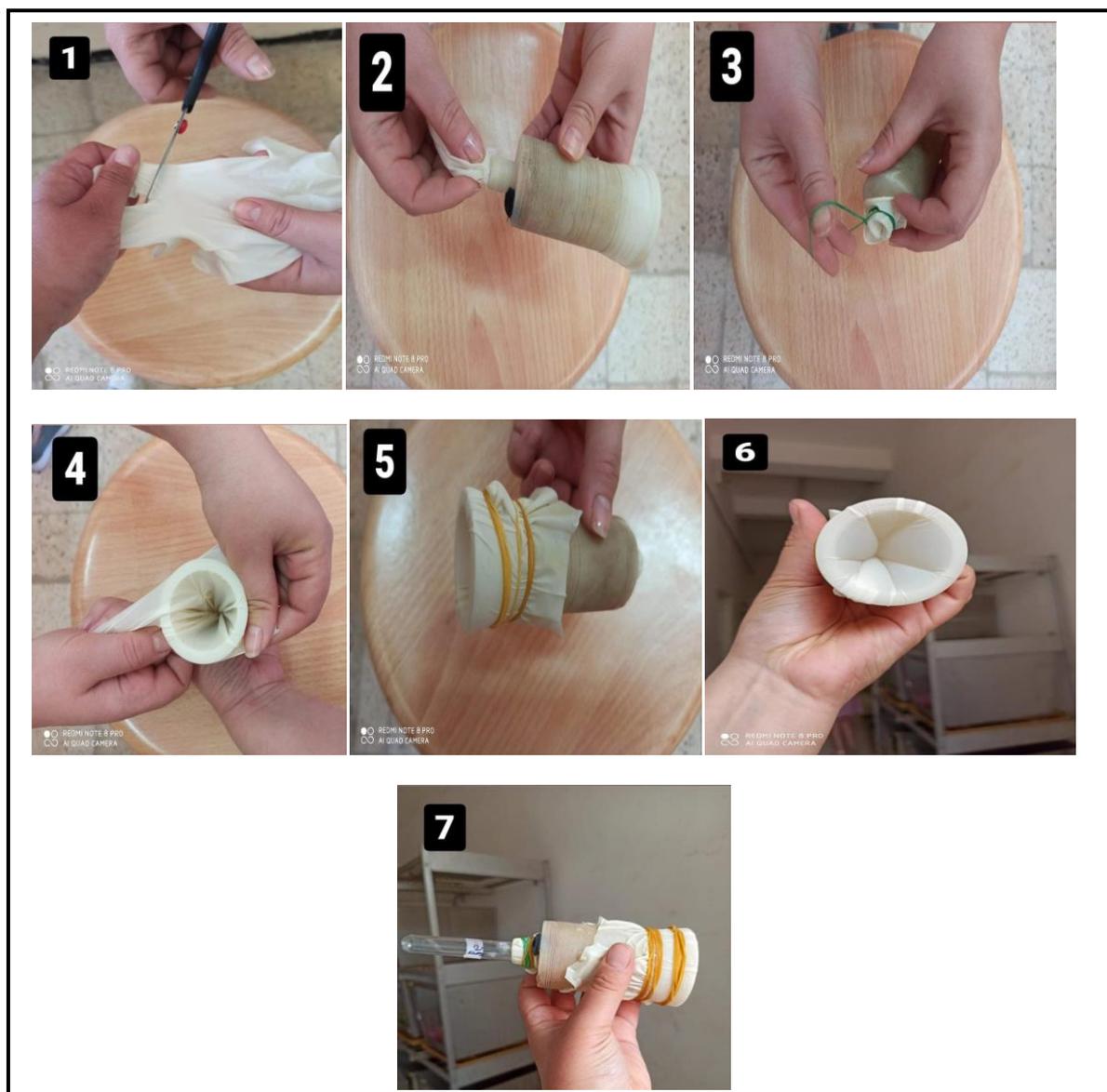


Figure 25 : Etapes du montage du vagin artificiel.

II. Matériel et méthodes

b. Collecte du sperme par vagin artificiel

Afin de collecter le sperme, nous avons d'abord mis une lapine sur la cage du mâle, afin de l'exciter, avant de la mettre à l'intérieur. Dès que ce dernier essaye de l'accoupler, un vagin artificiel est rapidement inséré et le pénis en érection est dirigé vers l'extrémité large du vagin artificiel. Une fois dedans, le mâle éjacule ; ainsi, le sperme se retrouve dans le tube de collecte.

II.1.2.2. La collecte du sperme épидидymaire :

Le sperme destiné à la congélation est prélevé après dissection de l'épididyme du lapin juste après son abattage (**Figure 26**). Afin de collecter la semence de l'épididyme, nous avons utilisé la méthode « retrograde-flushing » (Martinez-Pastor et al. 2006). L'épididyme et le canal déférent sont d'abord isolés du testicule après avoir enlevé la séreuse qui entoure le testicule et l'épididyme (2). Ils sont par la suite nettoyés avec une solution saline (NaCl à 0,9%) et essuyés à l'aide du papier absorbant.

Pour récupérer la semence, nous avons commencé par l'incision de la queue de l'épididyme avec le bistouri, au niveau de laquelle un tube à ependorff gradué est placé (4), puis nous avons vidé une seringue remplie d'air à l'intérieur du canal déférent (3) afin de provoquer l'écoulement du sperme dans le tube de collecte par pression.



Figure26 : Etapes de la collecte du contenu épидидymaire.

II. Matériel et méthodes

II.2. Analyse du sperme

Le sperme est d'abord analysé immédiatement après sa récolte puis dans un second temps, après sa conservation (à température ambiante, réfrigération ou décongélation).

Le sperme collecté est maintenu à 37°C jusqu'à son utilisation.

Sitôt après la collecte, On repère macroscopiquement d'éventuels signes d'une contamination urinaire, sanguine ou autre, en observant la **couleur** du sperme. Puisque selon Boussit (1989), la couleur jaune signifie la présence d'urine, rouge du sang, marron des matières fécales et grisâtres un tissu génital mort.

Le **volume** est estimé après élimination du gel, grâce à un tube de collecte gradué.

La **concentration** est mesurée avec une cellule hématométrique après avoir dilué le sperme à 1 : 200 avec une solution de chlorure de sodium (3%). Le principe est de dénombrer les spermatozoïdes d'un volume de solution dont la dilution est connue, à l'aide d'un quadrillage gravé sur la cellule de Malassez. Ce quadrillage est composé de 10 bandes horizontales de 0,2 mm de largeur et 10 bandes verticales de 0,25 mm de largeur, ce qui forme 100 rectangles dont la longueur est 0,25 mm, la largeur 0,2 mm et la profondeur 0,2 mm. Nous avons calculé la concentration en utilisant la formule suivante :

Concentration = N des spermatozoïdes / N de carreaux x 100 x 10³ x le taux de dilution

La **mobilité massale (MM)** est estimée juste après la collecte, avec un microscope tri oculaire à contraste de phase (Eclipse E400, Nikon, Tokyo, Japon) équipé de platine chauffante (37° C) et d'un appareil photo numérique connecté à un moniteur. Elle est classée de 0 à 9 (Petitjean 1965), correspondant aux pourcentages de mobilité suivants : **0** : 0 à 5 %, **1** : 10 %, **2** : 20 %, **3** : 30 %, **4** : 40 %, **5** : 50 %, **6** : 60 %, **7** : 70 %, **8** : 80 %, **9** : 90 à 100 % (Brun et al. 2002).

Pour la **mobilité individuelle (MI)**, nous avons observé au microscope optique réglé au grossissement 10x40, une goutte du sperme dilué par 40µl de TRIS tampon (1/5^{ème}), après l'avoir déposée sur une lame et recouverte d'une lamelle ; nous avons noté les mouvements des spermatozoïdes de 0 à 4 en se basant sur l'échelle d'Andrieu (1974). Ce qui correspond aux pourcentages suivants : **0** : 0 à 15 %, **1** : 15 à 30 %, **2** : 30 à 55 %, **3** : 55 à 75 %, **4** : 75 à 100 %.

Le **taux de viabilité des spermatozoïdes** est évalué grâce à l'observation au microscope optique, d'un frottis colorié à l'éosine-nigrosine. Leur **morphologie** est également évaluée sur le même frottis, comme décrit par Bloom (1973).

II. Matériel et méthodes

II.3. Conservation du sperme

II.3.1. Préparation de la dispersion solide du PEG et du complexe PEG/VitE

La dispersion solide du PEG est préparée selon le procédé décrit par Armin Minhaz et al. (2012). Le complexe PEG/VitE est préparé en utilisant la méthode de Co-évaporation comme suit : Un mélange de vitamine E (3) / PEG 6000 (1) (10%/90%) est dissous dans 100ml de l'éthanol (2) par agitation pendant 2 heures loin de la lumière. Après séchage à 45 ° C pendant 1 heure dans l'évaporateur rotatif (rotavapeure) (4), la poudre (5) est conservée dans un dessiccateur jusqu'à son utilisation (**Figure 27**).

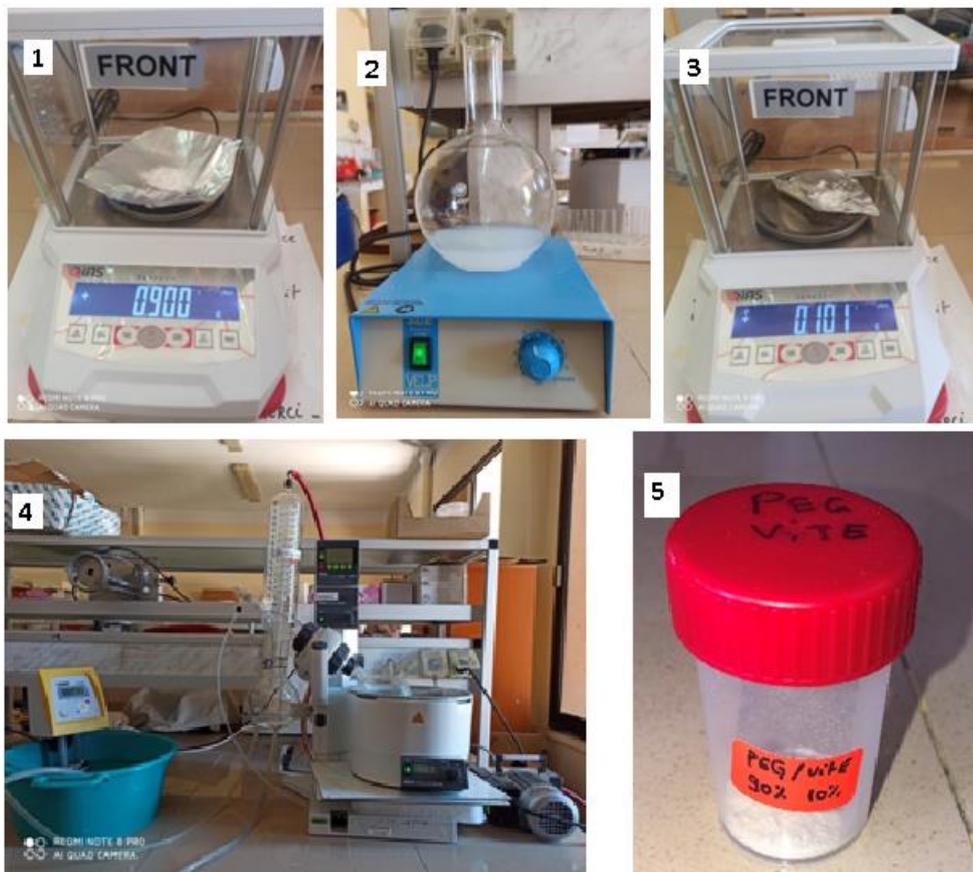


Figure 27 : Etapes de la préparation du complexe PEG/VitE

II.3.2. Préparation des milieux de conservation :

Tous les diluants ou traitements sont composés d'un diluant basique (TRIS) préparé par le mélange de Tris : 3,028g, de l'acide citrique : 1,675g, du D-glucose : 1,25g avec l'eau distillée (quantité suffisante pour 100 ml) (milieu de Strazinger 1971) et utilisé comme milieu de contrôle.

II. Matériel et méthodes

Ensuite, ce dernier est complété avec :

- 1) du polyéthylène glycol (PEG, 36 mg / ml de TRIS) (PEG 6000 obtenu auprès de BASF, Allemagne) ;
- 2) Vitamine E (Vit E, 0,12 mg / ml de TRIS) (α -tocophérol, sigma) ;
- 3) un complexe de PEG / VitE (90% / 10%) (PEG / VitE, 1,2 mg / ml de TRIS).

Toutes les solutions sont filtrées et stockées à 4 ° C jusqu'à leur utilisation.

Une autre série de traitements sont préparés en ajoutant à chacun des traitements précédents 1mg de VitC, pour obtenir les traitements (PEG/VitC, VitE/VitC, PEG / VitE/VitC et VitC seule).

II.3.3. Conservation à température ambiante :

Immédiatement après la collecte, nous avons d'abord mesuré le volume de l'éjaculat puis l'avons dilué dans du TRIS, une dilution de (1 : 5). La solution du sperme est, ensuite, divisée en 8 échantillons que nous avons mélangé chacun à l'un des treize traitements suivants (PEG, VitE, PEG/VitE, PEG/VitC, VitE/VitC, PEG/VitE/VitC, et TRIS/VitC ou le témoin TRIS) dans un ordre de dilution de v/v. Les traitements sont maintenus à la température ambiante pendant 6 heures et analysés avec l'analyseur de sperme assisté par ordinateur (CASA).

II.3.4. Conservation par réfrigération

Immédiatement après la collecte, nous avons d'abord mesuré le volume de l'éjaculat collecté puis l'avons dilué dans le TRIS, une dilution de (1 : 5). La solution du sperme est, ensuite, divisée en quatre (4) échantillons et mélangé à l'un des quatre traitements (PEG, VitE, PEG / VitE, ou témoin (TRIS)) dans un ordre de dilution de v / v. Les traitements sont maintenus dans un réfrigérateur réglé à 4 ° C pendant 6 heures et analysés à l'aide du CASA.

II.3.5. Conservation par congélation

Immédiatement après sa récolte, le sperme destiné à la congélation est mis à 5°C pour équilibration. Au bout de 90 minutes, le sperme est dilué (1 : 5^{ème}) avec (TRIS +10% DMSO +antibiotique) qui étaient aussi à 5°C. Ensuite ce sperme dilué est divisé en quatre (4) échantillons, mélangés aux différents dilueurs à raison de v/v, et mit, par aspiration, dans des paillettes dont le volume est de 0,25 ml. Ces paillettes sont par la suite bouchées avec une poudre polyvinylique et gardées, pendant 45min, à 5°C, afin de bien stabiliser la température à 5°C. Puis placées horizontalement sur un support dans la vapeur de l'azote, à 5cm de l'azote

II. Matériel et méthodes

liquide, pendant 10 min, et finalement, immergées dedans à -196°C , où elles sont entreposées durant une heure.

Après décongélation rapide des paillettes immergées 10-12 secondes, dans un bain marie dont la température est réglée à 50°C , le sperme décongelé est analysé à l'aide de l'analyseur informatique CASA.

II.4. Evaluation de la mobilité spermatique

Pour chaque traitement réfrigéré, la mobilité spermatique est évaluée à quatre reprises ; avant le refroidissement (T0) et après 1 heure (T1), 3h (T3) et 6h (T6) de conservation à 4°C . Les temps retenus pour les traitements conservés à la température ambiante sont (T0), après 1 heures (T1), 2 heures (T2), 3 heures (T3) et 4 heures (T4). Concernant l'échantillon congelé, sa mobilité spermatique est évaluée avant congélation (T0) et après décongélation (Tdécongélation).

Cette évaluation est réalisée grâce au CASA qui est un analyseur du sperme informatisé, assisté par un ordinateur (Sperm class analyzer, SCA Microptic, S.L., Version 3.2.0, Barcelona, Spain), capable de donner des valeurs objectives (Verstegen et al. 2002). Cet analyseur comprend un microscope trinoculaire à contraste de phase négatif (Nikon E200®-LED microscope, Tokyo, Japan) muni d'une platine chauffante de minitherm (OK 51-512, Osaka, Digifred SL, Barcelone, Espagne), une caméra numérique à grande vitesse (A312fc, Basler TM AG, Allemagne), et un ordinateur (Intel inside®, Pentium® 4) (**Figure 28**).



Figure 28 : Le système CASA

II. Matériel et méthodes

A l'aide de cet analyseur informatique, huit (8) paramètres sont évalués : la motilité totale (MOT %), la motilité progressive (PROG %), l'amplitude de déplacement latéral de la tête (ALH en μm), la fréquence de croisement de la trajectoire (BCF en Hz), la linéarité ($\text{LIN} = \text{VSL} / \text{VCL}$ en %), la vitesse curvilinéaire (VCL en $\mu\text{m}/\text{sec}$), la vitesse de progression linéaire (VSL en $\mu\text{m}/\text{sec}$) et la vitesse selon la trajectoire moyenne (VAP en $\mu\text{m} / \text{sec}$).

Pour chaque analyse, 5 μl du traitement est placé dans la chambre de Makler® de 10mm de profondeur (Sefi Medical Instruments Ltd., Haïfa), préalablement chauffée à 37°C, recouvert avec une lame spéciale et observé, par la suite, au microscope à contraste de phase relié à l'ordinateur, avec l'objectif x 10. Trois séquences correspondant à trois champs de chaque échantillon sont capturées et analysées. Dans chaque séquence, au moins 200 spermatozoïdes sont analysés.

II.5. Mesure du statut antioxydant total (test de l'ABTS)

Le pouvoir antioxydant total des spermatozoïdes est mesuré grâce au test de décoloration du radical libre (Re et al. 1999) au bout de 4h de réfrigération à 4°C. Il consiste en l'inhibition des radicaux libres par l'ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) diammonium salt).

L'ABTS^{°+} est produit en mélangeant une solution mère ABTS avec de persulfate de potassium L-1, à la concentration finale de 2,45 mmol. Le mélange est ensuite laissé reposer à température ambiante et loin de la lumière pendant 12 à 16 h puis utilisé. La solution d'ABTS^{°+} est diluée avec du PBS (pH 7.4) jusqu'à l'atteinte de l'absorbance de (0.7 ± 0.02) à 734 nm.

1 ml de solution d'ABTS^{°+} est ajouté à 10 μl de chaque traitement (PEG, VitE, PEG/VitE ou TRIS). Pour chaque essai, un blanc du traitement (1ml de PBS + 10 μl du traitement), un contrôle (1ml de la solution d'ABTS^{°+} + 10 μl de PBS) et un blanc de PBS (1ml de PBS + 10 μl de PBS) sont utilisés. La lecture de l'absorbance est prise 6 min après la préparation des mélanges. Le pouvoir de piégeage des radicaux libres est exprimé par le taux d'inhibition de l'ABTS^{°+}, c'est un pourcentage calculé selon la formule :

$$\text{AT (l'absorbance témoin)} - \text{AE (l'absorbance de l'échantillon)} / \text{AT} \times 100$$

Chaque échantillon est analysé six (6) fois (6 répétitions).

II. Matériel et méthodes

II.6. Insémination artificielle

II.6.1. Animaux :

Nous avons collecté la semence de 7 lapins adultes, âgés entre 1 et 2 ans, de races mixtes et présentant un bon état de santé avec un poids allant de 2 Kg à 4 Kg. Ils sont maintenus dans des cages individuelles, nourris avec un aliment concentré en granulés et disposent d'une eau fraîche à volonté.

Après l'analyse des paramètres spermatiques des 7 semences, nous avons choisi d'inséminer avec les meilleurs. Nous avons inséminé deux groupes de femelles ; un composé de 3 lapines inséminées avec une semence fraîche diluée dans du TRIS et un autre composé de 4 femelles inséminées chacune avec la semence diluée dans l'un des 4 milieux utilisés pour la conserver pendant 2 heures à température ambiante.

II.6.2. Collecte du sperme :

Nous avons collecté le sperme en utilisant un vagin artificiel préalablement préparé comme a été déjà décrit ci-dessus.

II.6.3. Dilution et conservation

Les semences sont réparties comme suit :

- La semence fraîche sur 3 tubes à hémolyse aux quels nous avons ajouté du TRIS à raison de v/v.
- La semence conservée sur 4 tubes à hémolyse aux quels nous avons ajouté les milieux de conservation choisis, à raison de v/v (un volume du sperme pur et un volume du milieu choisi (TRIS, VitE, PEG/VitE ou PEG/VitE/VitC)).

Les 3 dilutions dans le TRIS sont immédiatement utilisées pour l'insémination de 3 lapines. Les 4 autres dilutions sont conservées pendant 2 heures à température ambiante.

II. Matériel et méthodes

II.6.4. Techniques de l'IA :



Figure 29: Etapes de l'insémination artificielle .

Avant d'inséminer, la région vulvaire est d'abord nettoyée (1) et essuyée avec du papier. La lapine est tenue en position dorsale pour introduire à travers sa vulve, la gaine contenant la solution de semence (2), aspirée à l'aide d'une seringue placée au niveau d'une des extrémités de la gaine. Avec la même seringue, la solution de semence est déposée, par injection dans le vagin de la lapine (3).

immédiatement après l'insémination, nous avons injecté enintramusculaire (IM) 0.2ml de GnRH (Cystoreline, CEVA) afin de stimuler l'ovulation (4) (**Figure 29**).

II.6.5. Diagnostic de gestation :

Afin de diagnostiquer les femelles éventuellement gestantes nous avons réalisé une palpation abdominale 14 jours après l'insémination.

II. Matériel et méthodes

II.7. Analyse statistique :

Les résultats sont analysés avec un logiciel de traitements des données « statview 5.0. Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA » pour la réalisation de statistiques descriptives. Sont calculées les moyennes et les erreurs standards des moyennes (SEM). Les variables utilisées dans la comparaison sont les traitements étudiés. Les différences entre les traitements sont évaluées en utilisant ANOVA, suivi du test de Fisher, avec une signification statistique fixée à la valeur de $p < 0,05$

III. Résultats

III. Résultats

La réussite de la conservation est conditionnée en partie de sa qualité avant sa conservation, ce qui exige le choix des meilleurs spermatozoïdes à meilleures caractéristiques spermatiques. En effet, nous avons d'abord analysé les caractéristiques du sperme fraîchement collecté avant de procéder à la conservation. Ce qui nous a permis, par la suite, d'estimer le degré des modifications causés par la conservation.

Concernant le rythme de collecte que nous avons adopté est celui de deux collectes par semaine à 15 min d'intervalle ; un rythme qui, selon Bencheikh (1995) et Mocé et al (2000), permet de produire un sperme de meilleure quantité et qualité,

Après avoir ajouté les différents traitements utilisés au sperme dilué, nous avons évalué les paramètres de la mobilité des spermatozoïdes au CASA. Ce moment de la première évaluation (T0) correspond à un temps de conservation à T ambiante de 5 min.

III.1. Sperme réfrigéré

III.1.1. Analyse des spermatozoïdes destinés à la réfrigération

Le tableau V : regroupe les caractéristiques des spermatozoïdes analysés pour choisir ceux à réfrigérer.

Tableau V : caractéristiques des spermatozoïdes analysés

Mâle	Volume (ml)	MM (Note)	MI (Note)	Concentration (x10⁶ spz/ml)	Spz vivants (%)	Spz normaux (%)
1	0.4	6	3.5	400.9	47	86
2	0.35	9	3,5	856	23.5	86
3	0.24	9	3.5	656,24	92	91.5
4	0.4	7	2.5	808	13.5	90.5
5	0.5	8	3.5	256,27	40	90
6	0.56	8.5	3.5	117	61.5	88
7	0.47	7	3	734,32	63	84.5

III. Résultats

Parmi les spermatozoïdes récoltés et analysés, nous avons choisi pour la réfrigération ceux qui ont présenté une bonne mobilité massale (≥ 6), une bonne mobilité individuelle ($\geq 3,5$), un taux de spermatozoïdes vivants supérieur à 40% et un taux de spermatozoïdes normaux supérieur à 70%.

III.1.2. Impact des traitements sur les paramètres de mobilité du sperme réfrigéré (4°C)

III.1.2.1. Impact du traitement à base du polyéthylène glycol (PEG) seul

En Comparant au contrôle, le Polyéthylène glycol (PEG) seul a présenté une amélioration significative des MOT et PMOT à partir de T0 jusqu'à la fin de la conservation (6h). La même chose a été observée concernant les autres paramètres cinétiques où le PEG a montré des valeurs significativement plus élevées par rapport au contrôle (**Figure 30 et 31**).

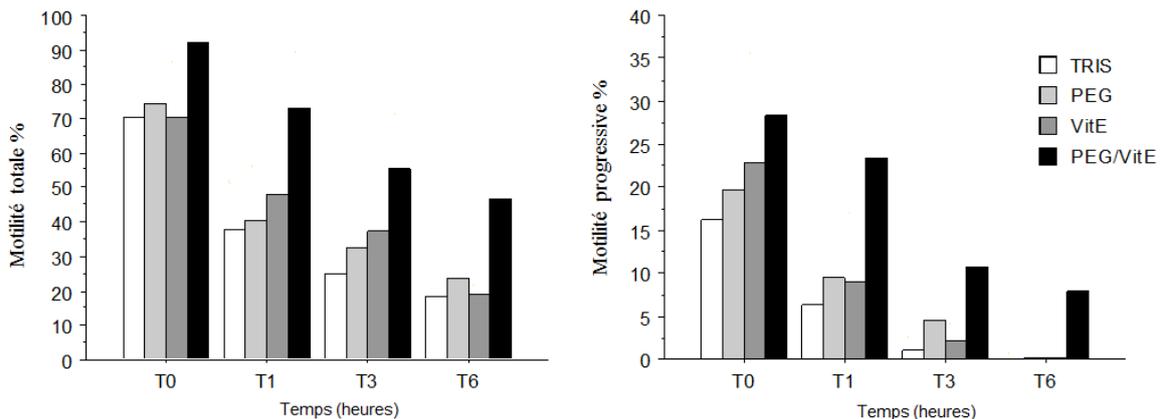


Figure 30: Effet des traitements sur la motilité totale (MOT) et la motilité progressive (PMOT) du sperme du lapin à T0, T1, T3 et T6 de conservation à 4°C dans le contrôle (TRIS) et les traitements (Polyéthylène glycol (PEG), Vitamine E (Vit E), Vitamine E associée au polyéthylène glycol (PEG/Vit E)).

III.1.2.2. Impact du traitement à base de l' α -tocophérol seul (Vit E)

Nous avons constaté que la semence traitée avec la Vit E seule présentait à t=0 heure, des valeurs de motilité totale (MOT : 73,31% contre 71,87%) et de motilité progressive (PMOT : 19,63% contre 16,09%) significativement ($p < 0,05$) supérieures à celles du contrôle (**figure 30**). De plus, tous les paramètres cinétiques étaient plus élevés dans le traitement Vit E par rapport au contrôle ($p < 0,05$) pour VCL, VSL, VAP, ALH et LIN ($56,68 \pm 0,74$ contre $55,09 \pm 0,81$ $\mu\text{m}/\text{sec}$; $20,23 \pm 0,41$ contre $17,07 \pm 0,35$ $\mu\text{m}/\text{s}$; $29,84 \pm 0,45$ contre $26,15 \pm 0,42$ $\mu\text{m}/\text{s}$; $2,73 \pm 0,03$ contre $2,69 \pm 0,03$ μm ; $31,35 \pm 0,4$ contre $27,36 \pm 0,33$ %) (**Figure 31**).

III. Résultats

Comparant au contrôle, le traitement VitE a protégé de manière significative ($p < 0,05$) la MOT et la PMOT jusqu'à 3h (34,55 % contre 23,3 % ; 1,61 % contre 0,75 %, respectivement). A 6h, les traitements contrôle et Vit E ont montré presque les mêmes valeurs pour MOT (18,69% contre 18,62%). Cependant, les valeurs de PMOT, VSL, VCL, VAP, ALH, LIN et BCF sont significativement ($p < 0,05$) plus élevées dans le traitement Vit E (**Figures 30 et 31**).

III.1.2.3. Impact de l'association VitE et PEG (PEG/VitE)

Par rapport au contrôle, le traitement simultané par PEG et VitE (PEG/Vit E) a montré une protection puissante de tous les paramètres de motilité pendant la période de conservation. En particulier, à 6h de réfrigération, les résultats sont significativement plus élevés ($p < 0,05$) pour la MOT : (44,35 % contre 18,62 %) ; PMOT : (6,81 % contre 0,04 %) ; VCL : ($38,99 \pm 0,99$ contre $17,74 \pm 0,5$ $\mu\text{m/s}$) ; VSL : ($13,1 \pm 0,4$ contre $2,48 \pm 0,17$ $\mu\text{m/s}$) ; VAP : ($19,44 \pm 0,49$ contre $6,38 \pm 0,28$ $\mu\text{m/s}$) ; ALH : ($1,94 \pm 0,04$ contre $1,21 \pm 0,03$ μm) ; FBC : ($5,63 \pm 0,16$ contre $1,04 \pm 0,06$ Hz) et LIN : ($32,64 \pm 0,65$ % contre $13,38 \pm 0,74$) (**Figure 31**).

En comparant à la VitE seule, le complexe PEG/VitE a montré une protection significative ($p < 0,05$) de MOT, PMOT et de tous les autres paramètres de motilité, en particulier à 6h avec des valeurs nettement plus élevées pour MOT : (44,35 % contre 18,69 %) ; PMOT : (6,81 % contre 0,15 %) ; VCL : ($38,99 \pm 0,99$ contre $20,95 \pm 0,7$ $\mu\text{m/s}$) ; VSL : ($13,1 \pm 0,4$ contre $3,73 \pm 0,26$ $\mu\text{m/s}$) ; VAP : ($19,44 \pm 0,49$ contre $7,97 \pm 0,35$ $\mu\text{m/s}$) ; ALH : ($1,94 \pm 0,04$ contre $1,28 \pm 0,03$ μm) ; FBC : ($5,63 \pm 0,16$ contre $1,87 \pm 0,12$ Hz) ; LIN : ($32,64 \pm 0,65$ % contre $15,9 \pm 0,91$ %) (**Figures 30 et 31**).

III. Résultats

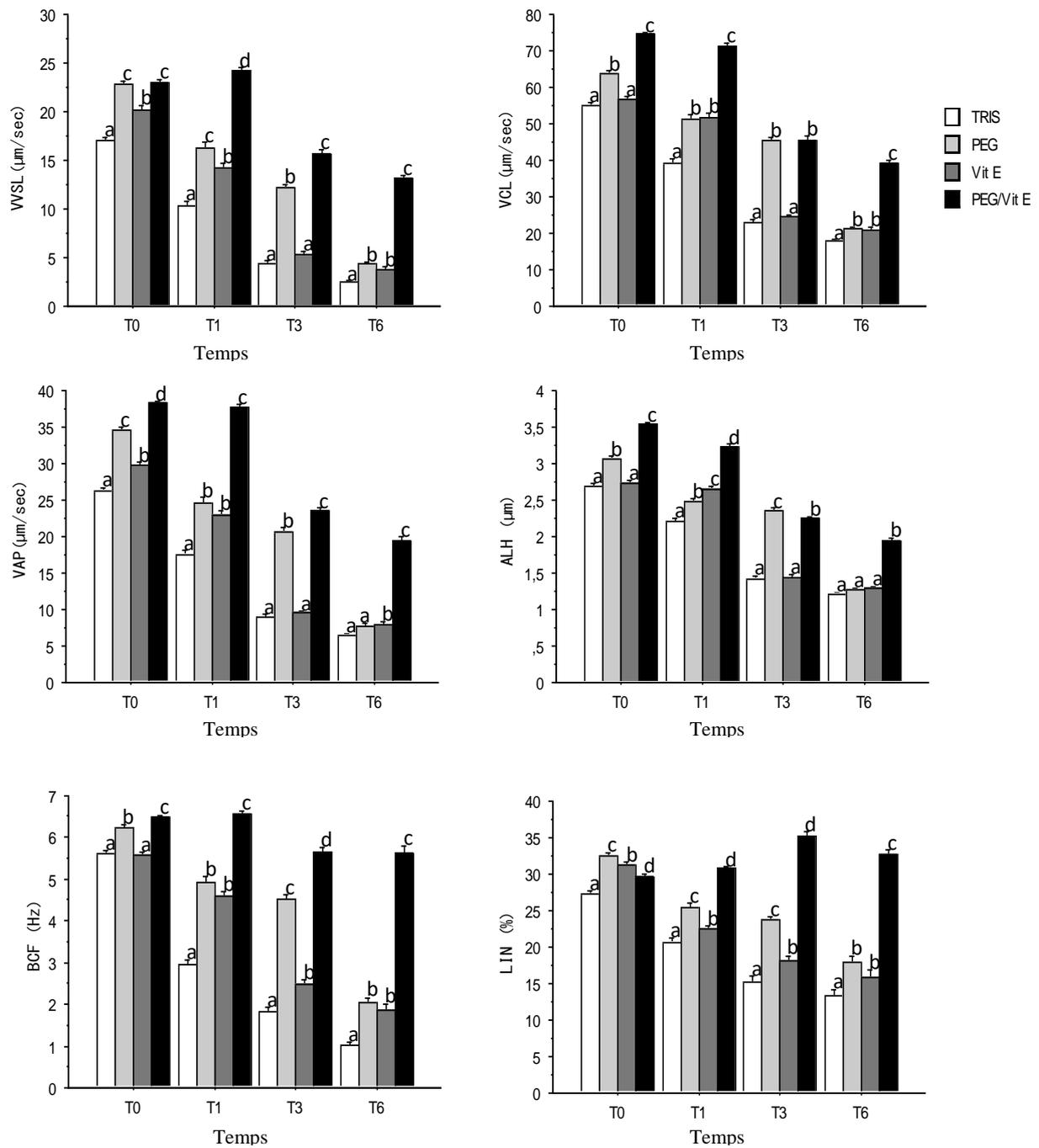


Figure 31: Effet des traitements sur la vitesse curvilinéaire (VCL), vitesse de la progression linéaire (VSL), vitesse par rapport à la trajectoire moyenne (VAP), amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH), linéarité (LIN) et fréquence des croisements des trajectoires (BCF) du sperme du lapin, à T0, T1, T3 et T6 de conservation à 4°C dans le contrôle (TRIS) et les traitements (Polyéthylène glycol (PEG), Vitamine E (Vit E), Vitamine E associée au polyéthylène glycol (PEG/Vit E)).

III.2. Sperme conservé à température ambiante

III.2.1. Analyse des spermatozoïdes destinés à la conservation à température ambiante

Les caractéristiques du sperme frais utilisé pour la conservation à température ambiante sont regroupées dans le **tableau VI**

Tableau VI : Caractéristiques des spermatozoïdes utilisées dans la conservation à température ambiante.

Mâle	Volume (ml)	MM (Note)	MI (Note)	Concentration ($\times 10^6$ spz/ml)	Spz Normaux (%)	Spz Vivants (%)
1	0,8	8	4	165,4	54,5	62
2	0,6	7	3	72,1	52,5	35
3	0,2	5	2	26,6	37	42,5

Nous avons remarqué que les lapins récoltés qui ont donné un volume de sperme considérable (0,6 et 0,8 ml) ont présenté une bonne mobilité notée respectivement 7 et 8 pour MM et 3 et 4 pour MI. Malgré cela, leur concentration sont insuffisantes ($72,1 \times 10^6$ et $165,4 \times 10^6$ spz/ml) et le taux des spermatozoïdes normaux est légèrement supérieur à 50%. Par ailleurs nous avons noté un pourcentage de spermatozoïdes vivants inférieur à 50% dans les spermatozoïdes des mâles 2 et 3.

III.2.2. Impact des traitements sur les paramètres de mobilité du sperme conservé à température ambiante

III.2.2.1. Impact du traitement à base du polyéthylène glycol (PEG) seul

Nous avons remarqué que le Polyéthylène glycol (PEG) seul a présenté des valeurs de MOT et PMOT inférieures à celles du contrôle pendant les 4 heures de conservation.

Concernant les paramètres spermatiques, à T0, seule la LIN du traitement PEG était significativement supérieure à celle du contrôle ($< 0,05$) ($38,57 \pm 0,64\%$ contre $35,34 \pm 0,47\%$). Cependant tous les paramètres spermatiques sont améliorés à partir de 3 heures jusqu'à 4 heures de conservation. L'amélioration de la VSL, VAP, BCF et LIN a déjà commencé dès la première heure de conservation (**Figure 33**).

III. Résultats

III.2.2.2. Impact du traitement à base de l' α -tocophérol seul (Vit E)

Nous avons constaté que la semence traitée avec la Vit E seule a présenté des valeurs de motilité totale (MOT) et de motilité progressive (PMOT) inférieures à celles du contrôle durant les 4 heures de conservation (**figure 32**).

Concernant les paramètres spermatiques, à T0seules VSL, VAP et LIN étaient plus élevés dans le traitement Vit E par rapport au contrôle ($p < 0,05$) ($23,53 \pm 0,48$ contre $20,73 \pm 0,38$ $\mu\text{m/s}$; $32,24 \pm 0,52$ contre $30,29 \pm 0,41$ $\mu\text{m/s}$; $41,30 \pm 0,63$ contre $35,34 \pm 0,47$ % respectivement) (**Figure 33**).

Comparant au contrôle, l'effet protecteur du traitement VitE est remarqué à T 3h où les paramètres spermatiques étaient significativement ($p < 0,05$) plus élevés (VCL : $37,15 \pm 1,03$ contre $35,94 \pm 0,61$ $\mu\text{m/s}$; VSL : $15,95 \pm 0,71$ contre $14,53 \pm 0,35$ $\mu\text{m/s}$; VAP : $21,73 \pm 0,81$ contre $20,86 \pm 0,41$ $\mu\text{m/s}$; BCF : $1,74 \pm 0,04$ contre $1,73 \pm 0,02$ Hz), sauf pour ALH et LIN (**Figures 33**). Ce dernier paramètre est amélioré à T4h ($33,27 \pm 0,88$ contre $30,89 \pm 0,41$ % dans le contrôle et contre $27,37 \pm 0,72$ % ; $30,91 \pm 0,49$ % et $30,49 \pm 0,88$ dans le traitement VitE à T1, T2, T3 respectivement).

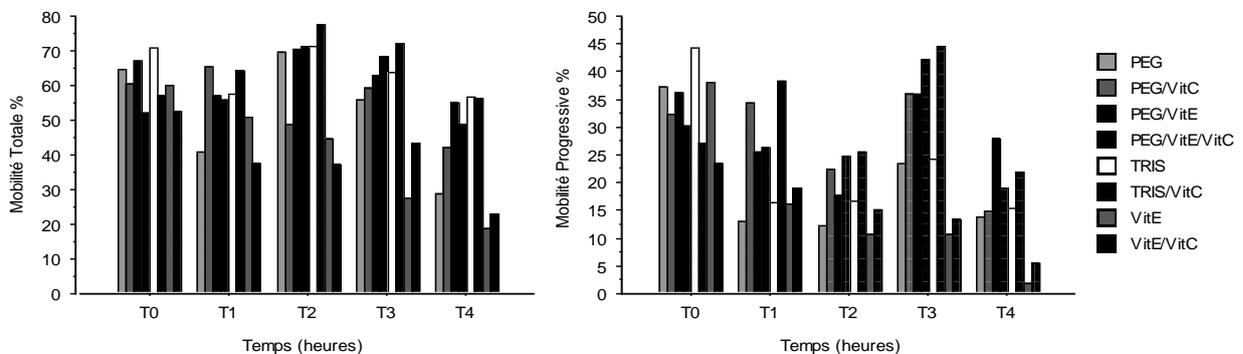


Figure 32: Effet des traitements sur la motilité totale (MOT) et la motilité progressive (PMOT) du sperme de lapin à T0, T1, T2, T3 et T4 de conservation à température ambiante dans le contrôle (TRIS) et les traitements (Polyéthylène glycol (PEG), Vitamine E (Vit E), Vitamine E associée au polyéthylène glycol (PEG/Vit E), Vitamine C (TRIS/VitC), Vitamine E associée à la Vitamine C (Vit E/VitC), Complexe (PEG/VitE/VitC)).

III.2.2.3. Impact de l'association VitE et PEG (PEG/VitE)

Par rapport au contrôle, le traitement contenant l'association entre PEG et VitE (PEG/Vit E) a montré une protection remarquable de tous les paramètres de motilité à partir de la troisième heure de conservation. VSL et BCF sont améliorés pendant toute la période de conservation. A 4h de conservation à température ambiante, les valeurs étaient

III. Résultats

significativement plus élevées ($p < 0,05$) pour VCL : ($50,82 \pm 0,54$ contre $40,01 \pm 0,48 \mu\text{m/s}$) ; VSL : ($20,84 \pm 0,31$ contre $14,19 \pm 0,27 \mu\text{m/s}$) ; VAP : ($30,6 \pm 0,38$ contre $21,67 \pm 0,32 \mu\text{m/s}$) ; ALH : ($2,36 \pm 0,02$ contre $2,00 \pm 0,02 \mu\text{m}$) ; BCF : ($6,19 \pm 0,08$ contre $4,55 \pm 0,08 \text{ Hz}$) et LIN : ($37,42 \pm 0,41\%$ contre $30,89 \pm 0,41\%$) (**Figure 33**).

Concernant la motilité progressive, nous avons constaté que son pourcentage est meilleur dans l'association PEG/VitE, durant les 4 heures de conservation à température ambiante, par rapport au contrôle (T1 : $25,62\%$ contre $16,53\%$; T2 : $17,60\%$ contre $16,63\%$; T3 : $35,88\%$ contre $24,12\%$; T4 : $27,98\%$ contre $15,35\%$), sans différence statistique significative. Ce pourcentage est même meilleur par rapport à tous les autres traitements à T4. Nous remarquons aussi qu'à T3, le pourcentage des spermatozoïdes progressifs est meilleur que ceux des autres temps que ce soit dans le PEG/VitE ou dans le contrôle (**Figure 32**).

En comparant à la VitE seule, le complexe PEG/VitE a montré une protection de MOT, PMOT pendant les 4 heures de conservation à température ambiante, ainsi qu'une protection significative ($p < 0,05$) de tous les autres paramètres de motilité à T4 avec des valeurs nettement plus élevées pour MOT : ($54,86\%$ contre $18,69\%$) ; PMOT : ($27,98\%$ contre $1,91\%$) ; VCL : ($50,82 \pm 0,54$ contre $25,74 \pm 0,63 \mu\text{m/s}$) ; VSL : ($20,84 \pm 0,33$ contre $9,09 \pm 0,35 \mu\text{m/s}$) ; VAP : ($30,64 \pm 0,38$ contre $13,42 \pm 0,42 \mu\text{m/s}$) ; ALH : ($2,36 \pm 0,02$ contre $1,49 \pm 0,03 \mu\text{m}$) ; BCF : ($6,19 \pm 0,08$ contre $2,50 \pm 0,11 \text{ Hz}$) ; LIN : ($37,42 \pm 0,41\%$ contre $33,27 \pm 0,88\%$) (**Figures 32 et 33**).

III.2.2.4. Impact du traitement à base de l'acide ascorbique seul (Vit C)

A T0 la mobilité des spermatozoïdes conservés dans le milieu enrichi par la Vit C seule, ainsi que tous leurs paramètres spermatiques sont inférieurs à ceux notés dans le contrôle. Cependant une augmentation remarquable de ces paramètres est notée à partir de la première heure de conservation à température ambiante (T1) jusqu'à T4 où les valeurs enregistrées sont significativement ($p < 0,05$) supérieurs à ceux notés dans le contrôle (à T4, VCL : $44,05 \pm 0,58$ contre $40,01 \pm 0,48 \mu\text{m/s}$; VSL : $16,36 \pm 0,31$ contre $14,19 \pm 0,27 \mu\text{m/s}$; VAP : $24,05 \pm 0,36$ contre $21,67 \pm 0,32 \mu\text{m/s}$; ALH : $2,10 \pm 0,02$ contre $2,00 \pm 0,02 \mu\text{m}$; BCF : $5,89 \pm 0,10$ contre $4,55 \pm 0,08 \text{ Hz}$; LIN : $36,25 \pm 0,33$ contre $30,06 \pm 0,39\%$) et une différence statistiquement non significative pour PMOT : $21,83\%$ contre $15,35\%$ (**Figure 33**).

III. Résultats

III.2.2.5. Impact de l'association VitE et VitC (VitE/VitC)

Nous avons remarqué que l'association Vit E/Vit C a montré dans les 2 premières heures de conservation à température ambiante des paramètres spermatiques meilleurs que ceux du contrôle et l'association PEG/Vit E. on a remarqué aussi qu'elle protège les spermatozoïdes mieux que la Vit E seule jusqu'à T4. Toutefois, à T3 heures, les paramètres spermatiques sont significativement ($<0,05$) supérieurs dans le traitement Vit E seule par rapport à l'association Vit E/Vit C (VCL : $37,15 \pm 1,03$ contre $32,35 \pm 0,64 \mu\text{m/s}$; VSL : $15,95 \pm 0,71$ contre $12,03 \pm 0,50 \mu\text{m/s}$; VAP : $21,73 \pm 0,81$ contre $17,05 \pm 0,54 \mu\text{m/s}$; ALH : $1,74 \pm 0,04$ contre $1,67 \pm 0,03 \mu\text{m}$; BCF : $4,38 \pm 0,16$ contre $4,11 \pm 0,15 \text{Hz}$; LIN : $30,49 \pm 0,88$ contre $28,92 \pm 0,81\%$), à partir de ce temps, l'effet bénéfique de l'association entre la vit E et la vit C sur la mobilité total des spermatozoïdes a commencé à apparaitre. En effet la MOT dans ce traitement est supérieur à celle notée dans la Vit E seule à T3 (43,42% contre 27,64%) et à T4 (22,94% contre 18,69%). Alors que la PMOT est meilleure pendant les 4 heures de conservation à température ambiante par rapport à la Vit E seule (**Figure 32**).

III.2.2.6. Impact de l'association Vit-C et PEG (PEG/VitC)

Nous remarquons qu'à T0 la mobilité et ses paramètres sont meilleurs dans l'association PEG/VitC que dans la VitC seule (MOT : 60,40% contre 56,9%, PMOT : 32,33% contre 27,02% respectivement), mais pas mieux que le contrôle ni le PEG seule, dans le quel seules la VCL, ALH et BCF sont supérieurs (**Figure 33**).

Dans l'association PEG/VitC la motilité progressive est meilleure jusqu'à T3 par rapport au contrôle et à l'association PEG/VitE et jusqu'à T4 par rapport à la PEG seule, mais pas mieux que la VitC seule qui a généralement mieux conservé les spermatozoïdes.

Concernant les paramètres spermatiques, l'association PEG/VitC les a protégés le long de la conservation à température ambiante mieux que le contrôle (**Figure 33**).

III.2.2.7. Impact du complexe PEG/VitE/VitC :

Comparant au contrôle, le complexe PEG/VitE/VitC commence à améliorer les paramètres spermatiques à partir de T2 jusqu'à T4.

Comparant aux autres traitements, nous avons remarqué que ce complexe améliore les paramètres spermatiques pendant les 4 heures de conservation à température ambiante, mieux que la Vit E seule, jusqu'à T3 mieux que la PEG seule et l'association PEG/VitE. Par ailleurs, nous avons remarqué que les valeurs de ces paramètres qui étaient déjà supérieures dans le complexe à T0, par rapport à ceux notés dans les traitements VitC seule, PEG/VitC et

III. Résultats

VitE/VitC, sont redevenu meilleurs à partir de T2 après une diminution remarquable à T1 heure de conservation à température ambiante (**Figure 33**).

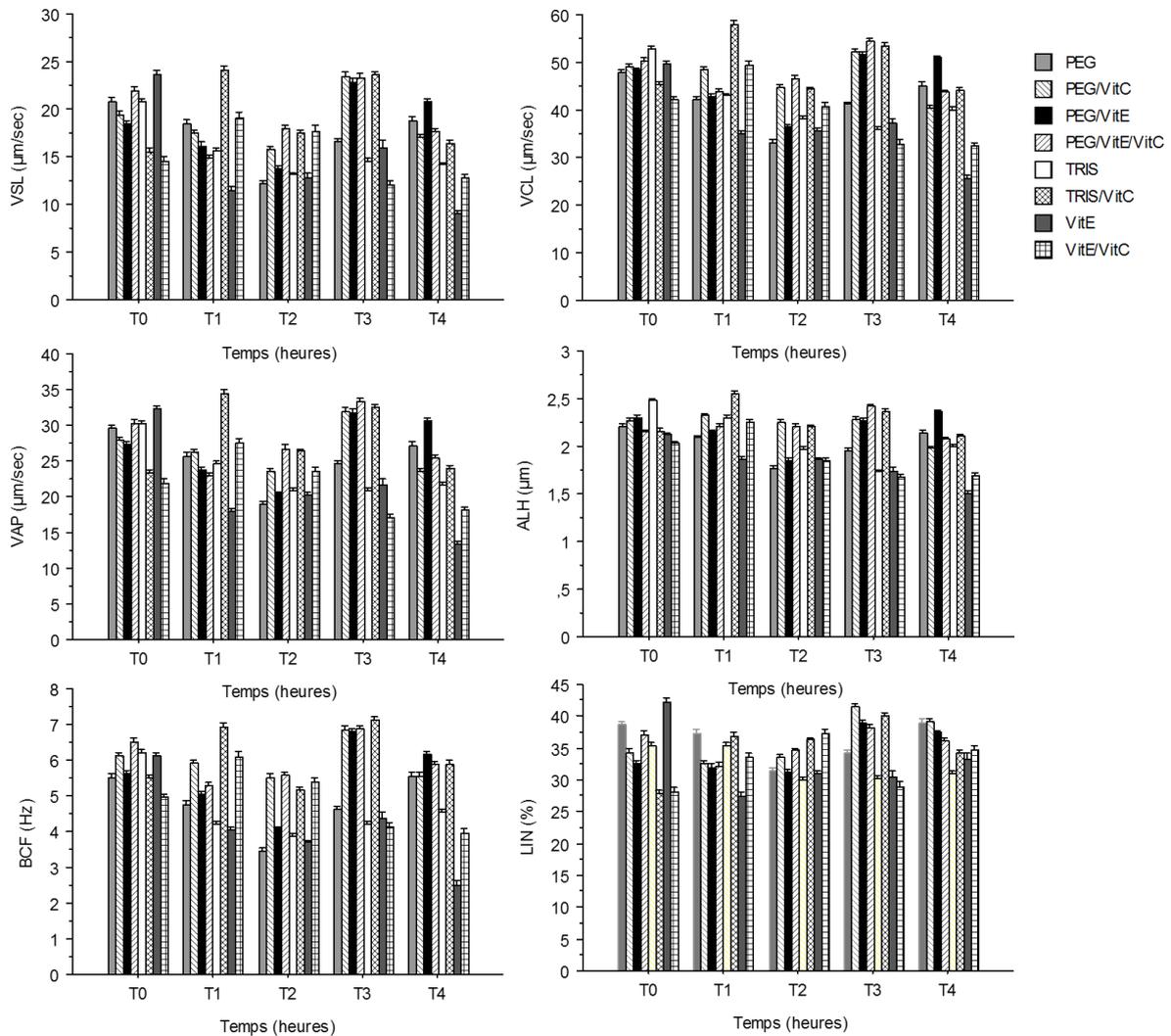


Figure 33: Effet des traitements sur la vitesse curvilinéaire (VCL), vitesse de la progression linéaire (VSL), vitesse par rapport à la trajectoire moyenne (VAP), amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH), linéarité (LIN) et fréquence des croisements des trajectoires (BCF) du sperme du lapin à T0, T1, T2, T3 et T4 de conservation à température ambiante dans le contrôle (TRIS) et les traitements (Polyéthylène glycol (PEG), Vitamine E (Vit E), Vitamine E associée au polyéthylène glycol (PEG/Vit E), Vitamine C (TRIS/VitC), Vitamine E associée à la Vitamine C (Vit E/VitC), Complexe (PEG/VitE/VitC)).

Concernant la mobilité totale, le complexe PEG/VitE/VitC l'a conservé pendant les 4 heures à température ambiante mieux que la PEG seule et la VitE seule et jusqu'à T3 mieux que l'association PEG/VitE (à T3, MOT : 68,50% contre 62,87%) et le contrôle. Par ailleurs, le pourcentage des spermatozoïdes progressifs noté dans ce complexe est supérieur à celui

III. Résultats

noté dans le contrôle et les traitements PEG seule et vitE seule jusqu'à T4, ainsi que dans l'association PEG/VitE jusqu'à T3 (à T3, PMOT : 42,18% contre 35,88%) (**Figure 32**).

III.3. Sperme congelé

III.3.1. Analyse du sperme destiné à la congélation

Les caractéristiques du sperme choisi pour être congelé sont présentées dans le **tableau VII**

Tableau VII : Caractéristiques du sperme destiné à la congélation.

Volume (ml)	MM (Note)	MI (Note)	Mobilité (%)	Concentration (x10⁶spz/ml)	Spz Normaux (%)	Spz Vivants (%)
0,56	8	3	87,5	117	88	61,5

Le sperme que nous avons choisi pour la cryoconservation est de concentration moyenne mais de mobilité massale très intéressante. Son taux de viabilité est plus de 60% et le taux des spermatozoïdes normaux est de 88%.

III.3.2. Impact des traitements sur les paramètres de mobilité du sperme congelé (-196°C)

III.3.2.1. Impact des traitements sur les paramètres spermatiques à T0

Nous avons constaté qu'à T0 (**Figure 35**), juste avant de procéder aux étapes de la congélation du sperme mélangé aux différents traitements, l'analyse au CASA de la mobilité des spermatozoïdes, a montré que tous les paramètres spermatiques, VCL, VSL, VAP, ALH et LIN, ainsi que la mobilité totale et la mobilité progressive sont plus élevés dans le contrôle ($p < 0,05$), sauf pour la BCF qui est plus élevée dans le sperme traité au complexe PEG/Vit E. Par ailleurs, les paramètres spermatiques dans le complexe PEG/Vit E, VCL, VSL, VAP, LIN et BCF, sont plus élevés que dans les traitements Vit E et PEG seules. Par contre le pourcentage des mobiles et des mobiles progressifs sont les plus faibles (MOT : 69,48% contre 92,71% dans le contrôle ; PMOT : 43,42% contre 75,21% dans le contrôle) (**Figure 34**).

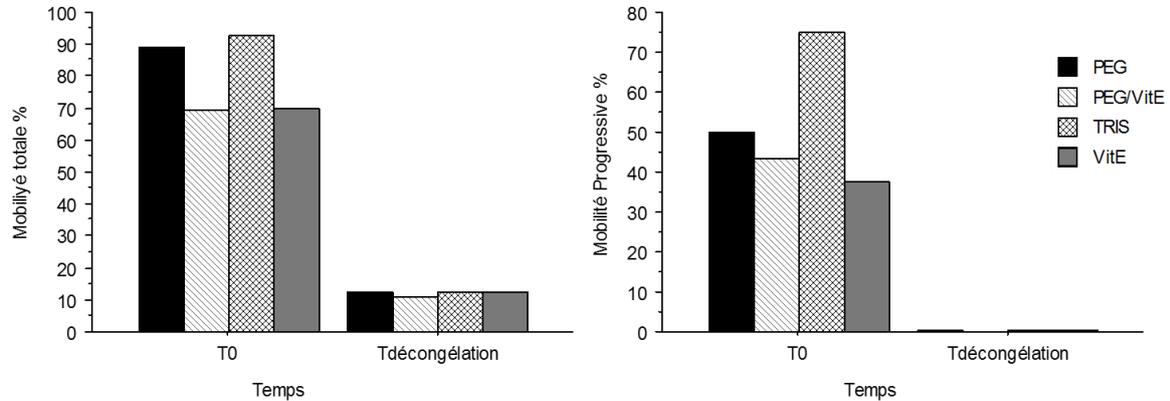


Figure 34: Effet des traitements sur la motilité totale (MOT) et la motilité progressive (PMOT) du sperme du lapin avant (T0) et après congélation (Tdécongélation) à -196°C, dans le contrôle (TRIS) et les traitements (Polyéthylène glycol (PEG), Vitamine E (Vit E), Vitamine E associée au polyéthylène glycol (PEG/Vit E)).

III.3.2.2. Impact des traitements sur les paramètres spermatiques après décongélation

Après décongélation, les pourcentages de MOT et de PMOT ont remarquablement baissé avec les plus bas pourcentages dans le complexe PEG/VitE (MOT : 10,81% ; PMOT : 0,19%). Concernant les paramètres spermatiques, seules la VSL et une LIN du complexe PEG/Vit E qui sont significativement meilleures que celles du contrôle ($p < 0,05$). (Figures 35). Par ailleurs, nous avons constaté que la MOT et la PMOT ainsi que les paramètres spermatiques dans les traitements Vit E et PEG seules sont similaires à ceux notés dans le contrôle (TRIS).

III. Résultats

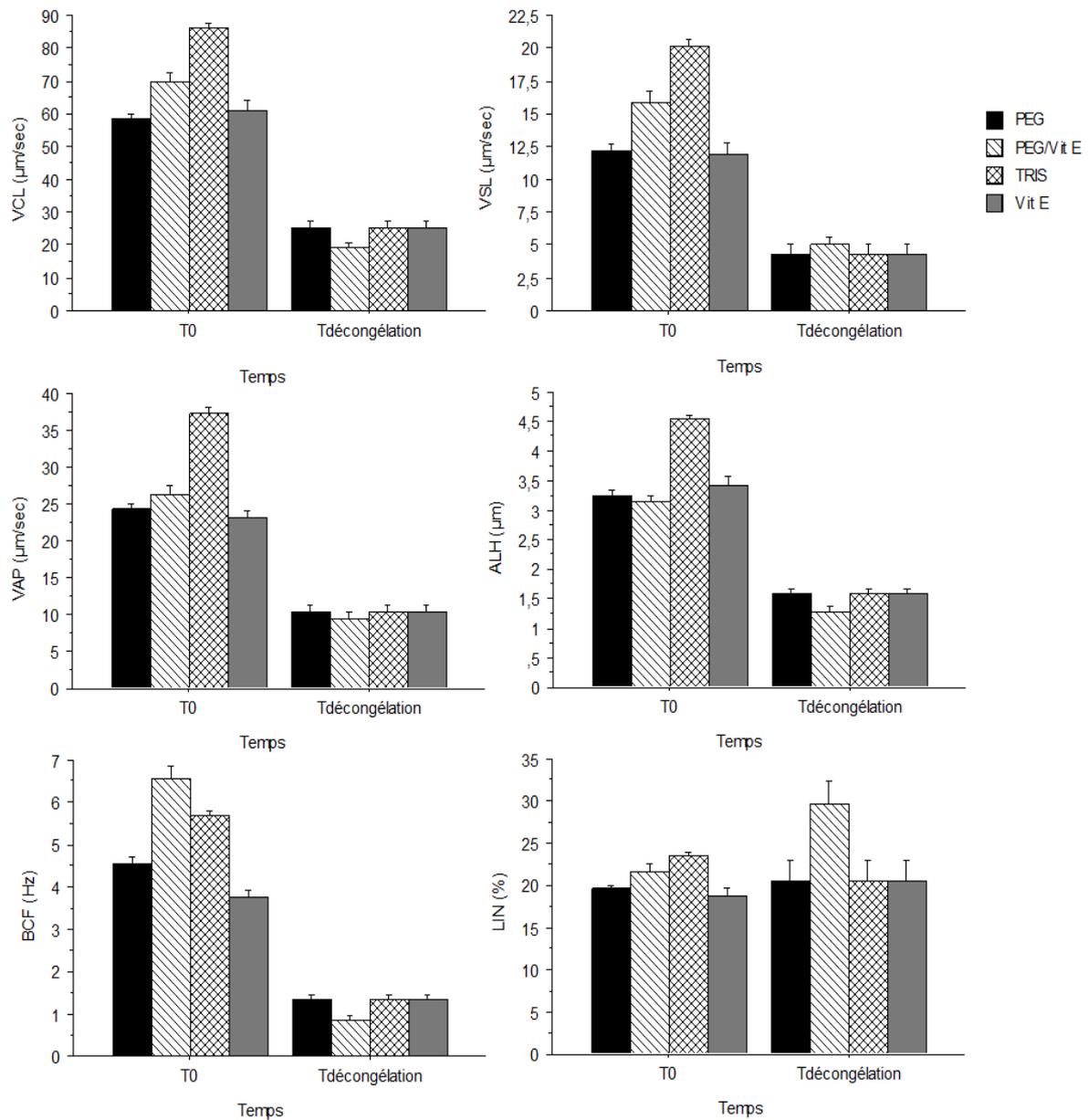


Figure 35: Effet des traitements sur la vitesse curvilinéaire (VCL), vitesse de la progression linéaire (VSL), vitesse par rapport à la trajectoire moyenne (VAP), amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH), linéarité (LIN) et fréquences des croisements des trajectoires (BCF) du sperme du lapin, avant (T0) et après congélation (décongélation) dans le contrôle (TRIS) et les traitements (Polyéthylène glycol (PEG), Vitamine E (Vit E), Vitamine E associée au polyéthylène glycol (PEG/Vit E)).

III.4. Statut oxydatif

III.4.1. Capacité de piégeage des radicaux ABTS

La **figure 36** illustre les résultats de l'activité anti-radicalaire à 4h de réfrigération du sperme à 4°C, dans les quatre (4) traitements testés, PEG seul, Vit E seul, association PEG/Vit E et le contrôle (TRIS), exprimés en pourcentage d'inhibition de l'ABTS. De ces résultats, nous avons constaté que lorsque la vitamine E est utilisée, le pourcentage d'inhibition de l'ABTS est nettement plus élevé par rapport au traitement à base de PEG et au contrôle. Cependant, l'activité antioxydante totale est significativement plus élevée dans le complexe PEG/VitE comparant à la vitamine E utilisée seule (11,595 % contre 7,095 %).

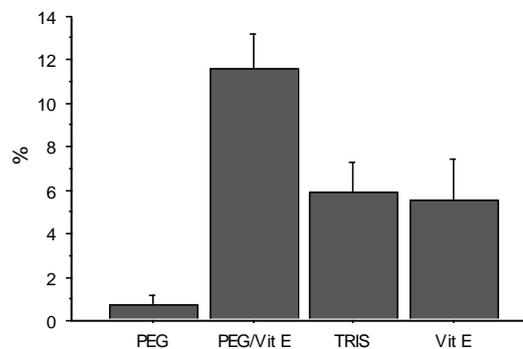


Figure 36 : Pourcentage d'inhibition de l'ABTS dans le sperme réfrigéré pendant 4h à 4°C.

III.5. Insémination artificielle

III.5.1. Analyse du sperme des lapins étudiés

Le **tableau VIII** regroupe les caractéristiques des spermésanalysés pour choisir ceux à utiliser dans l'insémination artificielle.

Tous les spermés récoltés sont de couleur blanchâtre à blanc nacré, inodore, à un volume allant de 0,4 à 0,8 ml. Le volume d'un seul (sperme du mâle 5) est égal à 0,2ml.

Nous remarquons que la majorité des spermés analysés sont concentrés, contiennent plus de 50% de spermatozoïdes vivants et normaux. Concernant la mobilité massale et individuelle, les spermés des mâles 6 et 7 ont eu les meilleures notes (MM :7 et8, MI : 3 et 4 respectivement) mais ne sont pas suffisamment concentrés (72,1 x 10⁶ spz/ml et 165,4 x 10⁶ spz/ml respectivement). En plus le sperme du mâle 6 ne contient que 35% spermatozoïdes vivants.

III. Résultats

Tableau VIII : Caractéristiques des spermés analysés pour insémination artificielle.

Mâle	Volume (ml)	MM (Note)	MI (Note)	Concentration ($\times 10^6$ Spz /ml)	Spz vivants (%)	Spz normaux (%)
1	0,5	5	2	409	60	68,5
2	0,4	5	2	270	56.5	59.5
3	0,5	5	2	331	50.5	58
4	0,7	5	3	350	73.5	70
5	0,2	5	2	26,6	42,5	37
6	0,6	7	3	72,1	35	52,5
7	0,8	8	4	165,4	62	54 ,5
8	0,65	5	3	355	70	70

III.5.2. Caractéristiques des semences utilisées pour l'insémination artificielle :

Les résultats de l'analyse macroscopique et microscopiques des semences que nous avons choisies et utilisées dans l'insémination artificielles, sont indiqués dans le **tableau IX**

Tableau IX:Caractéristiques des deux semences choisies pour l'IA.

Caractéristiques	Volume (ml)	MM (Note)	MI (Note)	Vitalité (%)	Concentration ($\times 10^6$ spz /ml).	Spz normaux (%)
Semence fraîche	0,65	6	2,5	70	355	70
Semence conservée à température ambiante	0,8	7	4	62	165,4	54,5

Les deux spermés utilisés pour l'insémination artificielle sont de bonne mobilité massale, plus de 50% de spermatozoïdes mobiles, vivants et normaux.

III.5.3. Taux de réussite de l'insémination artificielle :

Le **tableau X** présente le taux de réussite de l'IA chez les deux groupes de lapines inséminées.

Nous avons noté que deux sur les trois lapines inséminées avec du sperme frais conservé dans le TRIS sont diagnostiquées gestantes, ce qui donne un pourcentage de réussite de l'insémination artificielle chez le premier groupe de 66,67%. Dans le deuxième groupe, le

III. Résultats

diagnostic de gestation était positif pour les 3 femelles inséminées avec le sperme conservé dans le contrôle (TRIS), dans la Vit E, et dans le complexe PEG/VitE, par contre il était négatif pour la femelle inséminée avec le sperme conservé dans le complexe PEG/VitE/VitC.

Tableau X:Taux de réussite de l'IA dans les deux groupes de femelles inséminées

Groupe	Moyen d'induction de l'ovulation	Numéro de la femelle	Résultats	Taux de réussite	Milieu de dilution
1^{er} groupe « IA avec sperme frais »	Injection de la GnRH (0,2ml)	1	négatif	66,67%	TRIS
		2	positif		TRIS
		3	positif		TRIS
2^{ème} groupes « IA avec sperme conservé 2h à température ambiante »		1	positif	75%	TRIS
		2	positif		Vit E
		3	positif		PEG/VitE
		4	négatif		PEG/VitE/VitC

IV. Discussion générale

IV. Discussion générale

Notre objectif dans cette étude était d'améliorer la conservation du sperme du lapin, ainsi s'impose la nécessité de développer des traitements conservateurs qui permettent de protéger les paramètres spermatiques et d'induire des résultats satisfaisants de la fertilité après IA. Nous avons donc, rechercher l'intérêt du complexe (PEG/VitE) dans la protection de la semence du lapin lors de sa réfrigération à 4°C et pendant sa congélation ainsi qu'à sa conservation à température ambiante après l'ajout de la Vitamine C. Nous avons émis l'hypothèse que le polyéthylène glycol et la vitamine C pourraient considérablement améliorer les effets de la Vitamine E, le premier en augmentant sa solubilité et la deuxième en la régénérant. L'impact positif s'exprimerait en terme de motilité des spermatozoïdes et de protection contre le stress oxydatif.

Dans la littérature, le succinate de D- α -tocophéryl polyéthylène glycol 1000 (TPGS) est cité comme un dérivé hydrosoluble de la vitamine E (Srinivas et Prabhakar 2013). De même, Mogal S. et al. (2012) ont rapporté que le PEG 6000 a un immense potentiel pour améliorer les caractères de solubilité de tout médicament moins soluble ou peu soluble. Selon Verheyen et al. (2002) le PEG 6000 augmente la solubilité des molécules actives, par la formation de structure solide amorphe, maintenant le système stable par des liaisons hydrogène et un effet plastifiant (De Lima 2011). Le PEG est significativement utilisé pour améliorer la solubilité de différentes molécules actives (Afifi 2015, Fatmi et al. 2015, Lahiani-Skiba et al. 2006) dont la vitamine E (Xie et al. 2010). Le PEG 6000 peut également être utile pour résoudre divers problèmes tels que la stabilité et la biodisponibilité (Tashtoush et al 2004).

La vitamine E, une molécule lipophile présente dans la membrane cellulaire, est considérée comme un stabilisateur de la membrane et une puissante molécule antioxydante protégeant la membrane cellulaire contre la peroxydation lipidique et les attaques des ERO (Niki et Noguchi 2004). La vitamine E est connue pour rompre la chaîne antioxydante en piégeant les intermédiaires du radical peroxy lors de la réaction en chaîne de peroxydation lipidique (Srinivas et Prabhakar 2013).

La vitamine C, qui est organique et hydrosoluble, est considéré comme un réducteur très puissant possédant des propriétés chimiques et biologiques lui permettant d'avoir le pouvoir antioxydant (Levine et al. 1993 ; Munnich et al. 1987). C'est un antioxydant primaire qui neutralise directement les espèces radicalaires. Elle ne réagit probablement pas avec les oxydants des cellules comme les peroxydes d'hydrogène mais avec leurs produits de dégradation (Frei et al. 1988). La vitamine C protège contre la peroxydation lipidique en

IV. Discussion générale

piégeant les ERO et en réduisant un électron du radical hydroperoxyde du lipide à travers le cycle de l'oxydoréduction de la vitamine E (Guilland 2011).

Le présent travail a démontré qu'une supplémentation du milieu de conservation du sperme par la vitamine E seule (Vit E) augmente de manière significative la motilité et la qualité spermatique des spermatozoïdes jusqu'à 3h de refroidissement par rapport au contrôle. En effet, des travaux antérieurs ont indiqué que la vitamine E protégeait la mobilité spermatique et l'intégrité de la membrane chez différentes espèces animales, notamment le sanglier (Jeong et al. 2009, Silva et al. 2013) ; le chien (Belala et al. 2016), le taureau (Khellouf et al. 2018), le bélier (Benhenia et al. 2016) et le lapin (Nabi et al. 2017). Cependant, leurs résultats ont montré qu'une diminution significative de tous les paramètres de motilité a été observée lorsque la vitamine E était utilisée sans améliorer sa solubilité. Cela suggère que les molécules de VitE ne sont pas entièrement disponibles pour protéger les spermatozoïdes. Dans la membrane cellulaire, la VitE est présente avec un rapport d'une molécule pour 2000 molécules de phospholipides (Kagan 1998), et une fois la vitamine E est épuisée, la cellule devient vulnérable aux attaques de ERO (Peris et al. 2007), en particulier pendant le processus de cryoconservation.

Plusieurs travaux sont menés ces dernières années pour améliorer le pouvoir antioxydant des milieux de dilution de la semence animale par la substitution de la vitamine E par des antioxydants végétaux (Motlagh et al. 2014), l'utilisation d'enzymes antioxydantes telles que le glutathion (Salmani et al. 2013), ou par une combinaison entre la vitamine E et d'autres molécules antioxydantes (Da Silva Maia et al. 2009). Néanmoins, il a été rapporté récemment que les effets de la vitamine E sont significativement renforcés en présence de la cyclodextrine (Belala et al. 2016, Benhenia et al. 2016). Dans notre travail, nous avons supposé que les impacts positifs de la vitamine E pourraient être améliorés en augmentant sa solubilité par le polyéthylène glycol.

Dans la présente étude, lorsque le PEG a été ajouté seul dans le milieu de conservation du sperme du lapin, la motilité des spermatozoïdes et tous les paramètres spermatiques ont été améliorés tout au long de la période de refroidissement et à partir de 3 heures jusqu'à 4 heures de conservation à température ambiante. Les mécanismes sous-jacents à l'effet du PEG sur le sperme ne sont pas clairement identifiés et d'autres études sont justifiées. Cependant, nous pourrions émettre l'hypothèse que le PEG a, probablement, amélioré l'effet de la vitamine E et du cholestérol naturellement présents dans le liquide séminal en augmentant leur solubilité. Le PEG-6000 provoque une diminution de la tension inter-faciale entre les molécules peu hydrosolubles et le milieu de dissolution en leur conférant plus d'hydrophilie (Afifi 2015).

IV. Discussion générale

Par rapport aux traitements testés, le complexe PEG/VitE a démontré l'effet le plus puissant sur tous les paramètres de motilité post-refroidissement et a maintenu des valeurs significativement plus élevées toute la période de refroidissement. Auparavant, Orhan et al. (2004) ont noté que l'effet protecteur de la vitamine E sur la rétine lors d'une lésion d'ischémie-reperfusion est plus important avec le succinate de D- α -tocophérol polyéthylène glycol 1000 (TPGS) qu'avec la vitamine E seule. De même, Traber et al. (1988) ont noté une augmentation des teneurs totales en tocophérol dans les cellules fibroblastes en présence de TPGS.

Le mécanisme sous-jacent à l'effet protecteur de la vitamine E est lié à son activité antioxydante. En effet, nos résultats ont montré que le statut antioxydant total, exprimé par l'inhibition de l'ABTS, est significativement important lorsque la vitamine E est utilisée par rapport au PEG et au contrôle. Cette activité antioxydante est meilleure lorsque la Vitamine E est complexée au PEG (PEG/Vit E).

Pendant la conservation à température ambiante, les traitements PEG/VitE/VitC et PEG/VitC ont présentés les meilleures valeurs de mobilité progressive et de paramètres spermatiques par rapport au contrôle pendant les 4 heures de conservation, ce qui signifie que ces traitements ont significativement protégés les spermatozoïdes conservés. Par ailleurs, la mobilité totale, la mobilité progressive ainsi que la VSL, VCL et VAP des spermatozoïdes étaient significativement plus élevées dans les échantillons traités avec la VitE associée qu'avec la VitE seule. Effectivement, la protection offerte par l'association PEG-VitE aux spermatozoïdes est meilleur que celle de la vitamine E seule, et l'ajout de la Vit C améliore l'effet des deux molécules PEG et Vit E. le résultat est donc une combinaison entre l'effet protecteur et énergétique de la VitC sur les spermatozoïdes et réparateur du PEG sur la membrane plasmique (Togo et al. 1999) ainsi que l'amélioration de la proportion de spermatozoïdes avec membrane conservée induite par la Vit E (Silva et al. 2013).

Les résultats positifs de notre étude sont probablement dus à l'augmentation de la solubilité de la vitamine E en présence de PEG-6000 (Watanab et al. 2009) qui est en accord avec plusieurs études antérieures sur différents médicaments peu solubles (Afifi 2015 ; Aihui et al. 2007). Ainsi qu'à l'amélioration de la morphologie et de la mobilité des spermatozoïdes induite par l'acide ascorbique (Akmal et al. 2006). En effet ce dernier transforme les produits de peroxydation lipidiques en produits LPO de vitamine C qui ne sont pas réactifs, Ce qui prévoit l'installation d'une interaction entre les macromolécules, tel que les protéines, l'ARN et l'ADN, et les radicaux de la peroxydation lipidique. Par ailleurs, la vitamine C intervient

IV. Discussion générale

dans le processus qui régénère la vitamine E (Kaliora et al. 2006) en cédant un électron au radical tocophéryle (vitamine E-O⁻) pour le réduire en tocophérol.

Après avoir analysé le sperme décongelé, nous avons constaté une diminution considérable de la mobilité et de ses paramètres, par rapport à T0, à l'exception de la LIN qui est améliorée par le complexe PEG/Vit E, par rapport au contrôle. La diminution de la mobilité dans les différents traitements, après décongélation, est probablement due au fait que les spermatozoïdes du lapin sont hautement sensibles aux processus de congélation-décongélation (Castellini et al. 1992), ainsi qu'aux cryoprotecteurs, en effet, les fortes concentrations de ces derniers induisent une toxicité du milieu même avant la congélation, le DMSO à la concentration de 4%, pourrait affaiblir le pouvoir fécondant des spermatozoïdes, avant qu'ils soient congelés (Sauveur et de Revières 1988).

Malgré la baisse des paramètres spermatiques notée après décongélation, nous avons remarqué que le PEG et la Vit E ont légèrement protégé les spermatozoïdes, probablement par la protection des membranes cellulaires par le PEG contre les agressions physiques et chimiques (Corpet et al. 2003) ; et par le pouvoir antioxydant de la Vit E exercé en particulier lors de la cryoconservation.

Par ailleurs, la baisse remarquable des paramètres spermatiques dans le complexe PEG/Vit E est probablement due à l'effet solubilisant du PEG sur la Vit E exercé à T0 qui correspond à un temps de conservation à température ambiante de 5 min, le temps nécessaire pour mélanger le sperme aux différents traitements et les analyser au CASA. A T0 et dans le complexe PEG/Vit E, le PEG a solubilisé la Vit E, ce qui l'a rendu disponible aux spermatozoïdes qui ont profité de son effet antioxydant mais qui par conséquent, a probablement épuisé rapidement le contenu en Vit E de ce milieu, avant même sa congélation.

Dans notre étude, le choix des semences à utiliser dans l'insémination artificielle est basé sur les résultats de leurs paramètres spermatiques mais surtout sur le taux de viabilité de leurs spermatozoïdes. En effet, selon Parez et Duplan (1987), pour retenir un lapin pour IA, son sperme doit avoir plus de 60% de spermatozoïdes vivants. Par ailleurs, Arencibia et Rosario (2009) et Boiti et al. (2005), ont classé la semence de moins de 60% de spermatozoïdes vivants en semence de mauvaise qualité.

Les femelles que nous avons inséminées artificiellement ont été stimulées pour ovuler avec une injection de GnRH (: hormone de libération des gonadotrophines) qui selon Adams et Singh (1981) peut être injectée de manière répétée par voie intramusculaire induit l'ovulation, sans qu'il y ait un risque de provoquer la formation d'anticorps contrairement à l'injection de LH (: hormone lutéinisante) et d'hCG (: gonadotrophine chorionique humaine)

IV. Discussion générale

qui peuvent entraîner une incapacité de la lapine à ovuler suite à la formation d'anticorps (Adams 1972).

Après la réalisation de l'insémination artificielle, nous avons attendu 14 jours pour procéder au diagnostic de gestation par palpation abdominale. Nous avons choisi ce moment de diagnostic de gestation conformément à ce qui est rapporté par Arsene (2004).

Dans le premier groupe l'IA a atteint un taux de réussite intéressant (66,67%) ; deux sur les trois lapines inséminées avec le sperme frais conservé dans le TRIS sont diagnostiquées gestantes. Ce résultat est supérieur à celui obtenu par Rebollar et al (1994) qui ont obtenu un pourcentage de 58,5%. Dans le deuxième groupe, le diagnostic de gestation était positif pour les 3 femelles inséminées avec le sperme conservé dans le contrôle(TRIS), dans la Vit E, et dans le complexe PEG/VitE, par contre il était négatif pour la femelle inséminée avec le sperme conservé dans le complexe PEG/VitE/VitC, malgré qu'à T2 heures, la mobilité dans ce traitement était meilleure que celle notée dans le contrôle et dans le traitement VitE seule.

Nous supposons que l'effet du PEG, VitC et VitE continue à être exercé dans les voies génitales femelles ainsi que l'effet combiné du PEG et de la VitC sur l'action de la VitE, ce qui a conduit, probablement, à l'épuisement des deux vitamines et donc à l'absence de protection des spermatozoïdes.

Le taux de réussite de l'IA que nous avons obtenu est satisfaisant (75%) et meilleure que celui obtenus par Rebollar et al (1994) (58,5%). Toutefois, il est nécessaire de réaliser des inséminations sur un nombre plus important de femelles pour mieux discuter les résultats.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

En conclusion, notre étude a révélé que le traitement de la semence du lapin avec de la vitamine E complexée avec du PEG 6000 est efficace dans la protection des spermatozoïdes au cours de leur conservation pendant quelques heures (4 heures) à T° ambiante ainsi que pendant leur réfrigération à 4°C. mais pas pendant leur congélation.

Pendant la réfrigération du sperme du lapin et pendant sa conservation à température ambiante, le PEG semble améliorer de manière significative les propriétés antioxydantes de la vitamine E, ce qui a accentué son effet protecteur sur les spermatozoïdes. Par contre lors de la congélation du sperme du lapin l'effet solubilisant du PEG sur la Vit E exercé avant la congélation à T0 (5 min de conservation à température ambiante) a permis aux spermatozoïdes de profiter de son effet antioxydant. Ce qui a probablement épuisé rapidement le contenu en Vit E de ce milieu, avant même sa congélation.

Pendant le maintien de la semence du lapin à température ambiante, en plus du complexe PEG/VitE, les traitements PEG/VitE/VitC, et PEG/VitC ont protégé significativement les spermatozoïdes pendant 4 heures. Dans ces traitements, la VitC a probablement protégé les spermatozoïdes par son effet protecteur et antioxydant et a amélioré l'effet de la VitE par son effet régénérateur de celle-ci.

Nos résultats de l'IA sont satisfaisants et encourageants. En effet le diagnostic de gestation était positif pour 66,66% des femelles inséminées avec du sperme frais dilué par du TRIS ainsi que chez les lapines inséminées avec du sperme conservé pendant deux heures à température ambiante dans le TRIS et dans les traitements PEG/VitE et VitE seule.

Ces études visent à améliorer les techniques de conservation et d'utilisation du sperme de lapin et les résultats pourraient avoir des conséquences sur l'élevage et la reproduction du lapin.

Les perspectives futures par rapport à notre travail pourraient inclure les éléments suivants :

- Étude approfondie de la fertilité : Il serait nécessaire de réaliser des expérimentations supplémentaires pour estimer la fertilité du sperme conservé dans les différents traitements, en particulier après une insémination artificielle à grande échelle. Cela permettrait de déterminer l'efficacité réelle de ces traitements dans la préservation de la fertilité du sperme sur le long terme.
- Étude approfondie du stress oxydatif: Le suivi du statut oxydatif des spermatozoïdes pendant leur conservation à des temps différents et dans les différents traitements permettrait de mettre en évidence l'efficacité antioxydante des molécules utilisées et le degré de leur effet protecteur sur le spermatozoïde, en particulier celles complexées au PEG. Il est aussi intéressant

Conclusion et perspectives

d'étudier le stress oxydatif chez le lapin, aussi bien le male et la femelle, et ceci en relation avec les changements physiologiques et les variations de l'environnement.

- Impact du cholestérol : Une étude spécifique sur le rôle du cholestérol dans la protection des spermatozoïdes pendant leur conservation pourrait être entreprise. Il serait intéressant d'explorer comment les différentes molécules utilisées dans l'étude, en particulier le PEG, pourraient améliorer l'effet protecteur du cholestérol. Cela pourrait faire émerger de nouvelles stratégies pour renforcer la stabilité et la qualité du sperme conservé.

- Optimisation des traitements : Des recherches supplémentaires pourraient être entreprises afin d'optimiser les concentrations et les combinaisons des différentes substances utilisées (la vitamine E, le PEG, la vitamine C). Cela pourrait permettre d'améliorer davantage l'efficacité des traitements et d'identifier les dosages les plus efficaces pour la préservation du sperme.

- Étude de la durée de conservation : Il serait intéressant d'étudier la durée maximale pendant laquelle le sperme peut être conservé efficacement dans les différents traitements proposés. Cela permettrait de déterminer les limites de conservation du sperme et d'identifier les traitements les plus adaptés pour des périodes de conservation prolongées.

- Étude de l'application pratique : Pour rendre ces résultats applicables sur le terrain, des études pratiques sur les méthodes de conservation du sperme pourraient être réalisées. Cela impliquerait d'étudier l'efficacité des différents traitements dans des conditions réelles du terrain dans des élevages de lapins, en tenant compte des contraintes logistiques et des variations environnementales.

- Application des techniques de biotechnologie dans les élevages : Il serait intéressant de développer et d'appliquer les techniques de biotechnologie dans les élevages Algériens du lapin, en particulier l'insémination artificielle des lapines avec du sperme conservé à courte durée dans les milieux qui ont montré leur efficacité dans la protection des spermatozoïdes. Cela nécessite la formation des éleveurs dans le sens d'inséminer leurs lapines avec du sperme conservé à courte durée au lieu de faire recours à la semence congelée/décongelée. Cette application permettrait d'améliorer les différentes souches existantes en Algérie, avec l'objectif de développer une génétique mariant rusticité et productivité. Ce qui pourrait améliorer la filière viande du lapin en Algérie.

- Essayer d'autres milieux de conservation : Afin de bien cerner les contraintes de la conservation du sperme du lapin et de l'améliorer, l'essai de nouveaux milieux de conservation serait intéressant, en utilisant des molécules qui ont déjà prouvé leur efficacité dans la protection des spermatozoïdes conservés, chez d'autres espèces, comme les huiles essentielles et l'alginate.

Conclusion et perspectives

En somme, les perspectives futures liées à cette étude incluent l'approfondissement des connaissances sur la fertilité, l'exploration du rôle du cholestérol, l'optimisation des traitements, l'étude de la durée de conservation, l'essai d'autres milieux de conservation et l'application pratique des résultats obtenus. Ces recherches supplémentaires contribueraient à mieux comprendre les mécanismes de conservation du sperme chez le lapin et à améliorer les souches de la race locale Algérienne et pourraient avoir des implications positives pour l'industrie de l'élevage du lapin.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abraham L. et Kierszenba UM., 2002. Histologie et biologie cellulaire : Une introduction à l'anatomie pathologique, Paris : éd médicales internationales. -619 p.

Adams C.E. 1972. Induction of ovulation and A.I. in the rabbit. Vet. Rec. 91: 194-197.

Adams CE, Singh MM (1981). Semen characteristics and fertility of rabbits subjected to exhaustive use. Laboratory Animals. 15: 157-161.

Andrieu R. 1974. Conservation du sperme de lapin sous forme liquide. E.N.S.A., Montpellier, pp. 10.

Adoue C. (1991) Contribution à l'étude de la congélation du sperme canin : influence de la durée d'équilibration et de la température de décongélation. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Créteil, Créteil, 194 pp.

Afifi S (2015) Iranian Journal of Pharmaceutical Research 14 (4), 1001-1014.

Agrawal P, Magargee SF, Hammerstedt RH (1988) Isolation and characterization of the plasma membrane of rat cauda epididymal spermatozoa. J Androl 9:178–189

Agrawal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. Am J Reprod Immunol, 59(1):2-11 (2008).

Agrawal A., Virk G., Ong C., Du Plessis SS. 2014. Effect of oxydative stress on male reproduction. World J. Mens. Health 32:1-17.

Aihui Y, Von Dem Bussche A, Kane AB & Hurt RH (2007)Carbon N Y 45(13), 2463–2470.

Aitken RJ. 2000. Possible redox regulation of sperm motility activation. J. Androl. 21:491-496.

Akio Tani, Jittima Charoenpanich, Terumi Mori, Mayuko Takeichi, Kazuhide Kimbara et Fusako Kawai.; Structure and conservation of a polyethylene glycol-degradative operon in sphingomonads., Institute for Bioresources, Okayama University, 2-20-1 Chuo, Kurashiki 710-0046, Okayama, Japan.; 153, 338–346., 2007.

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

Références bibliographiques

Aksoy M., Akman O., Lehimcioglu N. C & Erdem H. 2010. Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 120, 166-72.

Alvarez CA, Moraes GV, Scapinello C, Martins EN, Cardozo RM, Mataveli M, Kioshima RS (2006). Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre as características quantitativas e qualitativas do sêmen de coelho. *Acta Scientiarum: Animal Sciences*. 28: 177-185.

Alvarino M.R. 1993. Control de la reproduction en el conejo. 1 ere éd., IRYDA, Mundi-Prensa, 137p.

Alvarino J.M.R., Lopez J., Del Arco J.A., Delgado F. 1996. Artificial insemination of rabbits with diluted semen stored for 24 hours. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, 2: 37-40.

Alvariño J.M.R. 2000. Reproductive performance of male rabbits. In Proc. 7th World Rabbit Congress, July 2000, Valencia, Spain, Vol. A, 13-35.

Amann RP (1966). Effect of ejaculation frequency and breed on semen characteristics and sperm output of rabbits. *J. Reproduction and Fertility*. 11: 291-293.

Amann R.P. (1998) Cryopreservation of sperm. In: Knobil E., Neill J.D. (eds.). *Encyclopedia of reproduction*. Volume 1. Academic press, San Diego, 773-783.

Amin S.O., EL-Foyly M.A., EL-Shobhy H.E., EL-Sherbiny A.H. 1987. Effect of season, breed and sequence of ejaculation on some physical characteristics of rabbit semen. *Proc. 1st Conf. Agric. Develop. Res. Sham University, Anim Prod.*, 1: 54-67.

Amini Mahmoud R. et al. 2015. The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on Rooster post thawed sperm quality. *Cell and tissue Banding*. <http://link.springer.com/10.1007/s10561-015-9506-9>.

An TZ, Wada S, Edashige K, Sakurai Tand Kasai M 1999, viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death. *Cryobiology* 38, 27-34. *IRCS Medical Science* 8, 137.

Angrimani DSR., Lucio CF., Veiga GAL., Silva LCG., Regazzi FM., Nichi M., Vannucchi CL. 2014. Sperm maturation in dogs: sperm profile and enzymatic antioxidant status in ejaculates and epididymal spermatozoa. *Andrologia* 46;814-819.

Références bibliographiques

- Arencibia Arrebola D.F., et Rsario Fernandez L.A.2009.Consideraciones practicas acerca de la calidad del semen de Conejos en estudios de toxicología de la fertilidad. Redvet Revista Electronica veterinaria , 8(10) :1-18.
- Armin M, Mofizur R, Qamrul A, Habibur R & Raihan C (2012) Int J of Pharm and Life Sci (IJPLS) 3, 1510-1518.
- Arrebola DFA, Fernández LAR (2011). Analysis of seminal quality, a tool in fertility experimental toxicology study. Revista de Toxicología en Linea. 39-50.
- Arriola J. 1982. Interaction of formaldehyde and of sodium and triethanolamine lauryl sulphate on the motility and fertilizing ability of rabbit and bull spermatozoa frozen in egg-yolk and milk extenders. Ph. D. Thesis, Cornell University, Ithaca New York.
- Arriola J. et Foote RH. 2001 Accessory sperm as an indication of fertilizing ability of rabbit spermatozoa frozen in Egg Yolk-Acetamide with detergent. J. of Andrology, 22(3):458-463.
- Arruda-Alencar JM (2011). Parâmetros seminais e composição bioquímica do plasma seminal de coelhos criados no nordeste do Brasil. (Unpublished Master These, Federal University Ceara).
- Arsene R. 2004. Conseils pratiques pour mieux maîtriser la conduite du troupeau en maternité. Afrique agriculture agri économies. juillet –Aout. 2004.
- Awano M, Kawaguchi A, Mohri H (1993) Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. J Reprod Fertil 99 :375–383
- Bagliacci M., Camilo F., Paci P. 1987. The effect of temperature on the reproductive performance of male rabbits. Rev. di Coniglicolture, 10: 61-65.
- Barone R., 1990. Anatomie comparée des Mammifères domestiques : Tome 4 : Splanchnologie II. Edi. Vigot. Paris: 896p
- Batool A., Mehboob K., Qadeer S., Ansari M.S., Rakha B.A., SYED N.U., Andrabi M.H., Akhter S.: Effect of α -Tocopherol Acetate and Ascorbic Acid in Extender on Quality of Zebu Bull Spermatozoa. Pakistan J. Zool., 2012, 44, 1487-1491.
- Battaglini M., Castellini C. et Lattalioli P. (1992) Variability of the main characteristics of rabbit semen. J. App. Rabbit Res., 15: 439-446.

Références bibliographiques

Beconi M.T., Mora C.R.F.N.G., Affranchino M.A.: Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, 1993, 40, 841-51.

Betford J.M. 1975. Passage of spermatozoa through the epididymis. In: *Handbook of Physiology*. Hamilton, D.W., Greep, R.O. Edit. Sect.7 Vol.5 pp.303-305. American Physiological Soc., Washington D.C.

Bedford JM. 1964 Fine structure of the sperm head in ejaculate and uterine spermatozoa of the rabbit. *J. Reprod. Fertil.* 7:221-228.

Belala R, Fatmi S, Kaidi R & Iguer-Ouada M (2016) Benefits of cholesterol and alpha-tocopherol loaded cyclodextrins in dog semen cryopreservation. *Revue Méd Vét* 167, 1-2, 22-27.

Bell DJ, Mitchell S (1984). Effects of female urine on growth and sexual maturation in male rabbits. *J. Reproduction and Fertility*. 71: 155 – 160.

Bencheikh N. 1995. Effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme. *Ann. Zoot.*, 44, 263-279.

Benhenia K, Lamara A, Fatmi S & Iguer-Ouada M (2016) *Small Ruminant Research* 141, 29-35.

Berger M., Jean-Faucher C., Turckheim M., De Veysiere G., Blauc M.R., Poirer J.C. et Jean C. 1982. Testosterone, LH and FSH in plasma of rabbit from birth to adulthood. Correlations with sexual and behavioural development. *Acta Endocrinol.*, 99 (3): 459-465.

Bergonzoni M.L. et Zambelli D. 1994. Influenza del diluitoro, della temperaturae del periodo di conservazione del semen nella F.A. cunicola. *Rivista di Coniglicoltura*, 31: 37-40.

Besenfelder U., Theau-Clément M., Sabbioni E., Castellini C., Renieri T., Havlicek V., Huber T., Wetscher F., Mösslacher G., Brem G. 2004. Effects of different light intensities on quality of spermatozoa in rabbits. *World Rabbit Science*, 12, 227-23

Bilbao MM (1996). Manejo en inseminación artificial: factores que afectan a la calidad seminal y al índice de fertilidad. *Boletin de Cunicultura*. 45-56.

Betajeri V. water soluble polymers for pharmaceutical applications, 2011, 3, 1972-2009 ; doi : 10.3390/polym3041972

Références bibliographiques

- Biondi O., S. Motta et P. Mosesso, «Low molecular weight polyethylene glycol induces chromosome aberrations in Chinese hamster cells cultured in vitro», *Mutagenics* 17, no. 3 : 261-4. 2002.
- Biswas P. 2016 Vitamin, Slideshare.
- Blackshaw AW (1953). The effects of potassium and calcium salts on the motility of ram, rabbit and bull spermatozoa. *The J. Physiology*. 120: 465-470.
- Bloom E (1973) the ultrastructure of some characteristic sperm defects. *Nord Veterinary Medicine* 25, 283.
- Boiti C., Castellini C., Besenfelder U., Theau-Clément M., Liguori L., Renieri T., Pizzi F. 2005. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Science*, 13, 71-91.
- Bonnes G., Desclaude J., Drogoul C., Gadoud R., Jussiau R., Leloc'h A., Montmeas L. et Robin G., 1988. *Reproduction des mammifères d'élevage*. Paris : Ed. FOUCHER 237p. (collection INRAP)
- Bouchard GF, Morris JK., Sikes JD., Youngquist RS. 1990 Effect of storage temperature, cooling rate and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology* 34 (1):147-157.
- Boussit D, 1989. *Reproduction et insemination artificielle en cyniculture assoc Frcuniculture, Lempdes France*, 234p.
- Boyd I. 1985. Effect of photoperiod and melatonin on testis development and regression in wild European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Biol. Reprod.* 33: 21-29.
- Boyd I. 1986. Photoperiodic regulation of seasonal testicular regression in the wild European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Reprod. Fertil.*, 77: 463-470.
- Boyd I., MYHILL, D. 1987. Seasonal changes in condition, reproduction and fecundity in the wild European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Zool.* 221: 223-233.
- Brewer NR (2006). Historical special topic overview on rabbit comparative biology: Biology of the Rabbit. *J. American Assoc. Lab. Animal Sci.* 45: 8-24.

Références bibliographiques

- Brooks D.E., Van Alstine J.M., Sharp K.A., Stocks S.J., in: M. Harris (Ed.), Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum Press, New York, 1992 Chapter 4.
- Brun J.M., Theau-Clément M., Bolet G. 2002. The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 70, 139-149.
- Brun J.M., Theau-Clement M., Larzul C., Falieres J., Saleil G. 2004. Semen production in two rabbit lines divergently selected for 63-d body weight. In Proc. 8th World Rabbit Congress, September 2004, Puebla, Mexico, 238-244.
- Bue P. (1992) Contribution à l'étude de la conservation d'une semence de chien pendant 48h à +4°C : choix d'un milieu et influence du glycérol. Thèse Méd. Vét., Nantes, n°127, 81 p.
- Bunaciu, P., Cimpeanu, I., Bunaciu, M. 1996. Mating frequency effect on spermatogenesis and performance of breeding rabbits. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, 2: 51-54.
- Burlakova E B, Krashakov S A&Khrapova N G (1998) *Membr Cell Biol* 12(2), 173-211.
- Burton Graham W. 1994. " Vitamin E: Molecular and biological function ». *Proceeding of the Nutrition Society* 53:251-62
- Campos CAN., Gadelha CRF., GuerreiroMEF., Pereira ES., Lima ICS. et al. 2014. Male rabbit reproductive physiology. *Stand. Res. Jour. of Agri. Sci.* Vol 2(8):120-128.
- Capello V, Lennox AM (2006). Gross and surgical anatomy of the reproductive tract of selected exotic pet mammals. *Association of Avian Veterinarians*. 19-28.
- Carpenter C. P. Response of Dogs to Repeated Intravenous Injection of Polyethylene Glycol 4000, *Tox. appl. Pharmac.* 18 p 35-40. 1971.
- Schleh C. et Leoni AL. (2013) How to optimize the benefits of computer assisted sperm analysis in experimental toxicology. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. 8:6.
- Castellini C., Battaglini M., Lattaioli P. 1992. Effects of cryoprotectants and freezing on rabbit semen quality. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15: 431-438.

Références bibliographiques

- Castellini C., Lattaioli P., Dal Bosco A., Minelli A., Mugnai C. 2003. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acids. *Repr. Nutr. Dev.*, 43, 91-103.
- Castellini C., Dal Bosco A., Cardinali R., Mugnai C. 2004. Effect of dietary α -linolenic acid on semen characteristics of rabbit bucks. In *Proc. 8th World Rabbit Congress*, September 2004, Puebla, Mexico, 245-250.
- Castellini C, Besenfelder U, Pizzi F, Theau-Clément M, Vicente JS, Renieri T (2006a). Developments in the investigation of rabbit semen and buck management. In: L. Maertens and P. Coudert (eds). *Recent Advances in Rabbit Sciences*. Institute for Agricultural and Fisheries Research. 53-68.
- Castellini C, Cardinali R, Dal Bosco A (2006b). Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology*. 703-712.
- Castellini C, Lattaioli P, Cardinali R, Dal Bosco A (2006c). Effect of collection rhythm on spermatozoa and droplet Concentration of rabbit semen. *World Rabbit Science*. 14: 101 – 106.
- Castellini C, Mourvaki E, Dal Bosco A, Galli F (2007). Vitamin E biochemistry and function: A case study in male rabbit. *Reproduction in Domestic Animals J*. 42: 248–256.
- Castellini C. 2008. Semen production and management of rabbit bucks. Dept. of Applied Biology, University of Perugia, Italy, 9thWorld Rabbit Congress-June 10-13.
- Castro ACS, Berndtson WE, Cardoso FM (2002). Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Br. J. Med. Biol. Res*. 35: 493-498.
- Celi P. et Gabai G. 2015. Oxidant/Antioxidant balance in animal nutrition and health: the role of protein oxidation front. *Vet Sci*. 2:48.
- Chang MC (1959). Fertilizing capacity of spermatozoa. *Recent Progress in the Endocrinology of Reproduction*. Pp. 131. Academic Press, New York.
- Chan, Alvin C 1993. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 71(9):725-731.

Références bibliographiques

- Chavatte-Palmer P., Jacques M., Renard J.P. 2008. In utero characterization of fetal growth by ultrasound scanning in the rabbit. *Theriogenology*, 69, 859-869).
- Chen Y.Q., Yang X., Foote R.H. 1989, (a). Timed breeding of rabbits with fresh and frozen-thawed semen and evidence of acrosome alteration following freezing and thawing. *Anim.Rep. Sci.*, 18: 35-41.
- Chen Y.Q., Blanpain-Tobback LI, J., Simkin M.E., Yang X., Foote R.H. 1989, (b). Fertility of fresh and frozen rabbit semen inseminated at different times is indicative of male differences in capacitation time. *Biol. Reprod.*, 41 (5): 848-853.
- Chen, Y.Q., Blanpain-Tobback LI J.M., Yang X., Foote R.H. 1990. Improvements in freezing rabbits spermatozoa for biotechnology studies. *J. Reprod. Fertil.*, 41: 217-222.
- Cheng T L, Chuang K H, Chen B M & Roffler S R (2011) *Bioconjugate Chem* 23, 881.
- Chi HU., Kim JH., Ryu CS., Lee JY., Park JS., Chung DY., Choi SY., Kim MH., Chun EK., Roh SI. 2008. Protective effect of antioxidant supplementation in sperme-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 23:1023-1028.
- Chrenek P, Trandzik J, Massanyi P, Makarevich A, Lukac N, Peskovicova D, Paleyanda R (2007). Effect of transgenesis on reproductive traits of rabbit males. *Animal Reproduction Science.* 99: 127–134.
- Chubb C, Ewing L, Irby D, Desjardins C (1978). Testicular maturation in the rabbit: secretion of testosterone, dihydrotestosterone, 5α -androstan-3 α ,17 β -diol and 5α -androstan- β ,17 β -diol by perfused rabbit testes-epididymides and spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 18, 212-218.
- Cook MS., Evans MD., Dizdaroglu M., Lunec J. 2003 Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *Farsed J.* 17: 1195-1214.
- Cook-Mills JM. et McCary CA. 2010 Isoforms of vitamin E differentially regulate inflammation, *Endocr Metab Immune Discord Drug Targets.* 10(4):348-366.
- Corpet DE., Pernaud G., Tache S., Pierre F. 2003 Le polyéthylène glycol, un puissant suppresseur du cancer colorectal chimio-induit, découvert en étudiant l'effet promoteur des viandes. *Bul de l'Acad. Vét. De France.* 156(3):53-59.

Références bibliographiques

- Cortell C, Viudes De Castro M P., 2008. Effect of gelatin addition to freezing extender on rabbit semen parameters and reproductive performance. 9th World Rabbit Congress – June 10-13 – Verona – Italy. P 327-329.
- Costantini F. 1989. Fecondazione Artificiale nel coniglio, sistemi di conservazione dello sperma. Riv. Coniglicolt. 26 :14-18.
- Courtesns J.L, Theau-Clement, M. 1996. Ultrastructural modifications of rabbit spermatozoa induced by two freezing and thawing techniques. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, 2: 59-63.
- Cross NL. Et Mahasreshti P. 1997 Prostate fraction of human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist progesterone. J. of Reprod. Sys. 39(1).
- Cummins JM, Woodall PF (1985). On mammalian sperm dimensions. J. Reproduction and Fertility. 75: 153-175.
- Dacheux JL 1980. An 'in vitro' luminal perfusion technique to study epididymal secretion. Dal Bosco A, Rebollar PG, Boite C, Zerani M, Castellini C. Ovulation induction in rabbit does: current knowledge and perspectives. Anim Reprod Sci 2011; 129:106–17.
- Darin-Bennett A., White I.G. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to coldshock. Cryobiology, 14, 466-470.
- Da Silva Maia M, Bicudo SD, Azevedo HC, Sicherle CC, de Sousa, DB & Rodello L 2009. Small Rumin Res 85, 85–90.
- Davaoust C. 2010. Quelles sont les phases critiques d'un cycle de production ? Association Scientifique Française de Cuniculture.
- Decuadro-Hansen G. 2004. La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal. Gynécologie Obstétrique & Fertilité 32 : 887–893.
- De Lamirande E., Jiang H., Zini A., Kodama H., Gagnon C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. Rev. Reproduction, 2, 48-54.

Références bibliographiques

De Lamirande E. et O'Flaherty C. 2012. Sperm capacitation as an oxidative event. In: Agrawal A., Aitken RJ., Alvarez JG. Editeurs. Studies on men's health and fertility. Totowa, NJ: Humana Press. 257-273.

De Lima ÁAN, dos Santos PBS, de Lyra MAM, dos Santos FLA & Rolim-Neto PJ 2011. Rev Bras Farm 92(4), 269-278.

Del Niño Jesus A, Muñoz L, Josa A, Espinosa E, Gracia M, Martinez G, Leuza MP 1997. Modifications of some parameters of the rabbit ejaculate after ablation of the vesicular gland. World Rabbit Science. 5: 3 – 5.

Del Piero S., Melchior A., Polese P., Portanova R., Tollazi M. 2006 N-Methylation effects on the coordination chemistry of cyclic triamines with Divalent transition metals and their Co-Dioxygen Carriers. European Journal of Inorganic Chemistry. (2) :304-314.

Dhingra S. 2014 Oxydants et antioxydants en medecine complémentaire et alternative.

Djago A Yaou., Kpodekon Marc. 2007. Méthodes et technique d'élevage du lapin. Elevage en milieu tropical. 2ème édition révisée du guide pratique de l'éleveur de lapins en Afrique de l'ouest édition : Association cuniculture 31450. Corransac France document en libre accès sur le web à: <http://www.cuniculture.info/Doc/Elevage/tropic01.htmpp/36-41>.

Donnelly TM (2004). Section 2: Rabbit. Basic anatomy, physiology and husbandry. In: K.E. Quesenberry and J.W. Carpenter (eds), Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery. Philadelphia, AP: Elsevier. 136 – 146.

Dubiel A., Krolinski J. et Karpiak C. 1985. Semen quality in different breeds of rabbits in different seasons. Med. Weterynaryja, 41 (11): 680-684.

DUFOUR H. (1998) Validation du test hypo-osmotique dans l'espèce canine. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude-Bernard, Lyon, 70 pp.

Duncan KR. Suzuki YJ. 2017 Vitamin E Nicitinate, Antioxydant. 6(1):20.

Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. Microsc Res Tech 2003; 61: 103-115.

Eddy EM (2006). The Spermatozoon. In: JD Neill (Ed). Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Philadelphia, AP: Elsevier. p. 3-54.

Références bibliographiques

- Eilts BE. 2005 Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*; 64:685–697.
- El-Azim AA, El-kamash EM (2011). Evaluation of semen quality and its relation to mating system for some breeds of rabbits under environmental conditions in the middle of Egypt. *Egyptian Poultry Sci. J.* 31: 467-480.
- El-Gaafary M. N., Rashwan A. A. et Ibrahim Z. A. (1993). Investigations on the deep freezing of rabbit semen in straws. *Proceedings of the Egyptian American Conference on Physiology of Animal Production, El-Fayoum, Egypt*: 17-25.
- El-Gaafary M.N. 1994. Quality and fertility of cooled rabbit semen supplemented with Cyclic-AMP stimulators. *Anim.Rep. Sci.*, 34: 307-313.
- El-Habbato H.H.E., Radwan A.A., El-Menoufy A.A. 1984. Testicular and epididymal sperm reserves in three breeds of rabbits under subtropical conditions. *Egyptian Poultry Sci.*, 4: 63-80.
- Elliott, Gloria D., Shangping Wang, Barry J. Fuller, 2017. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology* 76:74-91.
- Emmens et Blackshaw 1950 Emmens, C.W., Blackshaw, A.W., 1950. The low temperature storage of ram, bull and rabbit spermatozoa. *Austral. Vet. J.* 26, 226–228.
- England G.C.W. (1993) Cryopreservation of dog semen : a review. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 47, 243-255.
- Fabiani R., Johansson L., Lundkvist O., Ronquist G. 1995. Prolongation and improvement of prostasome promotive effect on sperm forward motility. *European J. of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 58, 191-198.
- Fargeas, E. 1995. Quelques résultats obtenus en insémination artificielle avec de la semence congelée. *Cuniculture*, 22(3): 103-106.
- Farstad W.: Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Repod. Sci.*, 1996, 42, 251-260.
- Fatmi S, Bournine L, Iguer-Ouada M, Lahiani-skiba M, BOUCHAL F & Skiba M (2015) *Acta Poloniae Pharmaceutica and Drug Research* 72 (1), 179-192.

Références bibliographiques

Feldman E. C. et Nelson R. W. (2004) Artificial insemination, fresh extended semen, and frozen semen. In : Canine and feline endocrinology and reproduction. 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders, 1005-1013.

Finzi A, Morera P, Macchioni P (1994). Modifications of some rabbit spermatoc parameters in relationship to high ambient temperatures. Cahiers Options Méditerranéennes. 8: 333 -336.

Finzi A, Morera P, Kuzminsky G (1995). Sperm abnormalities as possible indicators of rabbit chronic heat stress. World Rabbit Science. 3: 157-161.

Fontbonne A. (1992) Physiologie sexuelle du chien mâle. In : Pages J.P. (eds.). Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat. PMCAC Edition, Paris, 19-26.

Fontbonne A. (1995) Infécondité du chien mâle. In : Encyclopédie vétérinaire. Pathologie de la reproduction. Elsevier, Paris, Volume 5, 1-13.

Fontbonne A., BUFF S., GARNIER F. (2000) Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine. Le point vétérinaire, 31, 209, 27-32.

Fortun-Lamothe L., Theau-Clément M., Combes S., Allain D., Lebas F., Le Normand B., Gidenne T. 2015. Le lapin de la biologie à l'élevage. Physiologie générale. pp47-142 .

Fox et Burdick 1963 Fox, R.R., Burdick, J.F., 1963. Preservation of rabbit spermatozoa: ethylene glycol vs. glycerol for frozen semen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113, 853-856.

Frame SR, Hurtt ME, Green JW (1994). Testicular maturation in prepubertal New Zealand white rabbits. Veterinary Pathology. 31: 541- 545.

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

Fraser KW. 1988 Reproductive biology of rabbit. *Oryctolagus cuniculus* (L), in central Otago, New Zeland J. Ecology 11:79-88.

Fromont A. 2011. L'élevage de lapins. Tome 1. Edition 2011. page 48-50.

Fromont A. et Tanuguy M. 2001. L'élevage de lapin tome 1, Educagri édition, 2001, Dijon. ISBN978-2-84444-128-7. p49-50.

Références bibliographiques

Frei B., Stocker R., Ames BN. 1988. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85:9748-9752.

Fuertes Pamela, Virginie 2008 congélation de la semence de chien préalablement réfrigérée : étude expérimentale. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine de Créteil.

García-Tomás M, Tusell LI, López-Béjar M, Ramon OJ Rafel, M. Piles (2008). Influence of environmental temperature and relative humidity on quantitative and qualitative semen traits of rabbits In: G. Xiccato, A. Trocino and S.D. Lukefahr (eds), *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona. 2008: 359 – 363.*

Glazar A. I., Mullen S. F., Liu J., Benson J. D., Critser J. K., Squires E. L & Graham J. K. 2009. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology* 59 201-6.

Gogol P., Bochenek M., Smora Z. 2002. Effect of rabbit age on sperm chromatin structure. *Reprod. Dom. Anim.*, 37, 92-95.

Gottardi L. 1993. Conservazione a medio-lungo periodo del materiale seminale di coniglio. *Rivista di Conigliculture*, 5: 31-38.

Graham EF., Vasquez IA., Schmehl MKL. Evensen BK. 1976. An essay of semen quality by use of sephadex filtration, VIIIth Int. Cong. Anim.Reprod. Artif. Insem. (Kracow).

Grant W.M, *Toxicology of the Eye*, Charles C. Thomas, 3 rd ed. Springfield, IL, 1986.

Gravance CG, Davis RO (1995). Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. *Journal of Andrology*. 16: 88-93.

Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005; 26:349–53.

Grimm MO, Mett J., Hartmann T. 2016 The impact of vitamin E and other Fat-Soluble vitamins on Alzheimer's disease, *Int J Mol Sci*. 17(11).

Guilland J.C. 2011. Les interactions entre les vitamines A, D, E et k : synergie et /ou compétition. *OCL Oilseeds and fats, Crops and lipids*.

Guidelines IRRG. (2005). International Rabbit Reproduction Group. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Science*. 13: 71 – 91.

Références bibliographiques

Hacisevki A. 2009. An overview of ascorbic acid biochemistry. Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi 38 (3): 133-55

Hafez ESE (1995). Reprodução animal, 6a ed. Manole, São Paulo.

Hagen DR, Gilkey AL, Foote RH (2002). Spermatozoal velocity and motility and relationship to fertility in the rabbit inseminated with low sperm numbers. *World Rabbit Science*.10: 135–140.

Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Chrlie C et Chapelle JP. (2007): le stress oxydant, *Rev Med Liège*; 62:10 :628-638.

Halliwell B. et Gutteridge JM. 1998. Free radicals in biology and medicine: 976.

Hanada A. et Nagase H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J Reprod Fertil* (1980); 60:247-252.

Hanzen Ch. 2012. La propédeutique de l'appareil reproducteur et l'examen du sperme des ruminants. Université de Liège Faculté de Médecine Vétérinaire Service de Thériogenologie des animaux de production. p12-25.

Harald Sieme Harriëtte Oldenhof Willem F. Wolkers. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science* ,169:2-5(2016).

Harper CR. et Jacobson TA. New Perspectives on the Management of Low Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Arch Intern Med*,10:1049-1057(1999).

Harcourt-Brown F (2002). Biological characteristics of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculi*). In: *Textbook of Rabbit Medicine*. 410p.

Hassanien HHM, Baiomy AA (2011). Effect of breed and parity on growth performance, litter size, litter weight, conception rate and semen characteristics of medium size rabbits in hot climates. *Egyptian Poultry Science Journal*. 31: 90-113.

Henkel RR. 2011. Leucocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian journal of andrology*. 12(1):43.

Heitzpfal W, *Die Makromol. Chem.* 121, 102. 1969

Références bibliographiques

Hin S., Oh L, Lee Y, Choi H., Enhanced dissolution of furosemide by coprecipitating or cogrinding with crospovidone. /nt. J Pharm., 175 : 17-24 (1998).

Holt WV. et Van Look KJW. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*. 127: 527–535.

Holtz W, Foote H (1972). Sperm production, output and urinary loss in the rabbit. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 141: 958-962.

Holtz W, Foote H (1978a). The anatomy of the reproduction system in male Dutch rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with special emphasis on the accessory sex glands. *J. Morphology*. 158: 1 – 20.

Holtz W, Foote H (1978b). Composition of rabbit semen and the origin of several constituents. *Biology of Reproduction*. 18: 286 -292.

Hu, Jian Hong et al. 2010. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Animal Reproduction Science* 121(1-2):72-77.

Iguer-Ouada M. et Verstegen JP. 2001 Long term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55:671-84.

Jeong Y, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA & Rho GJ (2009): Effect of α -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*, 2009, 58, 181-189.

Jenkins, Timothy G., Kenneth I., Aston, Douglas T., Carrell. 2011. Supplementation of Cryomedium with ascorbic acid-2-glucoside (AA2G) Improves Human Sperm Post-Thaw Motility. *Fertility and Sterility* 95(6):2001-2004.

Jeyendran R.S., Van Der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G., Zaneveld L.J.D. (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Repro Fert.*, 70, 219-225.

Jiang L., Liu X., Xuan G. 2010; Preparation of pH-sensitive β -Cyclodextrin derivatives and evaluation of their Drug-Loading properties. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 774

Références bibliographiques

Johansson G., in: M. Harris (Ed.), Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum Press, New York, 1992 Chapter 5.

Johnston S.D., Root Kustritz M.V., Olson P.N.S. (2001a) Sexual differentiation and normal anatomy of the dog. In: Johnston S.D. (eds.). Canine and feline theriogenology. W.B. Saunders compagny, Philadelphia, 275-286.

Johnston S.D., Root Kustritz M.V., Olson P.N.S. (2001b) Semen Collection, Evaluation, and Preservation. In: Johnston S.D. (eds.). Canine and feline theriogenology. W.B. Saunders compagny, Philadelphia, 287- 306.

Johansson M., Bromfield J.J., Jasper M.J., Robertson S.A. 2004. Semen activates the female immune response during early pregnancy in mice. *Immunology*, 112, 290-300.

Joly T et Theau-Clémant M., 2000 : Reproduction et physiologie de la reproduction au 7^{ème} Congrès Mondial de cuniculture, ISRA-FESIA ,31 place Bellecour -69288 Lyon.

Jones R., Mann T., Sherins R. 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal, properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil. Steril.*, 31, 531-537.

Jones R (1998) Plasma membrane structure and remodeling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 53:73–84

Kagan VE (1998) *Ann NY Acad Sci.* 854, 425-434.

Kaliora A, Dedoussis G, Schmidt H. (2006) Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Pub Med*; 187(1):1-17.

Kamel IK, Attia YA (2011). Effect of dietary lecithin supplementation on improvement semen quality, reproductive performance plasma biochemical traits and antioxidant changes in rabbit bucks. *Egyptian Poultry Science Journal.* 31: 667-680.

Kashiwazaki N., Okuda Y., Seita Y., Hisamatsu S., Sonoki S., Shino M., Masaoka T., Inomata T. 2006. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Develop.*, 52: 511-516. doi: 10.1262/jrd.18008

Références bibliographiques

Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International journal of Urology*,16(5):449-57 (2009).

Khellouf A, Benhenia K, Fatmi S & Iguer-Ouada M (2018) *CryoLetters* 39 (2), 113-120.

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

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

Knobil E, Neill JD. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press; 1988.

Kuzminsky G, Fausto AM, Morera P (1996). Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope. *Reproduction Nutrition Development*. 36: 565-75.

Lahiani-Skiba M, Barbot C, Bounoure F, Joudieh S &Skiba M (2006) *Drug Development and Industrial Pharmacy* 32, 1043-1058.

Landrier JF. 2011 Vitamine E et physiologie du Tissu adipeux, *Nutrition et Santé*, 18(2):83-87.

Lavara R, García ML, Torres C, Vicente JS, Baselga M (2008a). Genetic parameters for semen traits of rabbit males: II. Motility. In: G. Xiccato, A. Trocino and S.D. Lukefahr (eds), *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona*. (2008). 159- 162

Lavara, R., Vicente, J.S., Marco-Jiménez, F. and Baselga, M (2008b). Correlation between casa and asma parameters in Rabbit semen. In: G. Xiccato, A. Trocino and S.D. Lukefahr (eds), *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona*, 2008, 381- 385.

Lebas F., Coudert P., H de Rochambeau et Thébault R.G. 1996. *Le lapin : Elevage et pathologie* (Collection FAO: Production et sauté animales, N° 19, ISBN 92-5-203441-2. p54-55.

Lebas F, Coudert P, Rochambeau H, Thébault RG, Rouvier R (1997). *Reproduction*, 45-10, In: *The Rabbit: Husbandry, Health and Production*, FAO.

Références bibliographiques

Lebas F. (2009). Biologie du lapin. Sous-chapitre 7.2. reproduction du mâle.

Leung Hon-Wing, Vang Michael J. et Mavis Richard D. *Biochimica et Biophysica Acta*, 664 (1981) 266-272

Levine, M., Dhariwal, K. R. & Cantilena, C. C.) *World Rev. Nutr. Diet.* 72, 114-127 (1993).

(Li C., Mialo X., Li F., Wang S., Liu Q., et al. 2017 Oxidative stress-related mechanisms and antioxidant therapy in diabetic retinopathy, *Oxid. Med. Cel.*

Liebler DC. 1993 The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Critical Reviews in Toxicology*, 23:147-169.

Lin W.W., Ramirez V.D. 1988. Effect of pulsatile infusion of progesterone on the in vivo activity of the luteinizing hormone-releasing hormone neural apparatus of awake unrestrained female and male rabbits. *Endocrinol.*, 122: 868-876.

Lin, W.W., Ramirez V.D. 1991. Seasonal changes in the in vivo activity of the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neural apparatus of male rabbits monitored with push-pull cannulae. *J. Reprod. Fertil.* 91: 531-542.

Linde-Forsberg C. (1995) Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, 10, 48-58.

Lopez J., Alvarino J.M.R., Del Arco J.A., Bueno A., Sanz C. 1996, Effect of male rabbit management on semen production. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, 2: 83-85.

Lukáč N, Massányi P, Kročková J, Nad' P, Slamečka J, Ondruška L, Formicki G, Trandžík J (2009). Relationship between trace element concentrations and spermatozoa quality in rabbit semen. *Slovak Journal of Animal Science.* 42: 46-50.

Luzi F., Maertens L., Mijen P., Pizzi F. 1996. Effect of feeding level and dietary protein on libido and semen characteristics of bucks. In *Proc. 6th World Rabbit Congress, July 1996, Toulouse, France*, vol. 2, 87-92.

Macari M, Machado CR (1978). Sexual maturity in rabbits defined by the physical and chemical characteristics of the semen. *Laboratory Animals.* 12: 37-39.

Références bibliographiques

- Mann T., Lutwak-Mann C. 1981. Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids; application to andrological problems. In: Mann T., Lutwak-Mann C. (Eds.), *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 269-326.
- Martinez-Pastor, Felipe, Vanesa Garcia-macias, Paulino De Paz, Luis Anel. 2006. Comparison of two methods for obtaining Spermatozoa from the cauda epididymis of iberian red deer. 65:471-485.*
- Martins-Bessa, Ana, Antonio Rocha, Mayenco-Aguirre A. 2006 . Comparing Ethylene Glycol with Glycerol for Cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology* 66 (9):2047-2055.
- Mataveli M (2008). Níveis de selênio na dieta de coelhos e a influência na qualidade e nos métodos de conservação do sêmen, (unpublished Thesis of Master, State University of Maringá).
- Matsingou et al. (2007 Matsingou C, Demetsoz C. The perturbing effect of cholesterol on the interaction between labdanes and DPPC bilayers. *Thermochimica Acta*, 452:116-123 (2007).
- Maurer R.R., Strazinger G.F., Paufler S.K. 1976. Embryonic development in rabbits after insemination with spermatozoa stored at 37.5 or 196 °C for various periods. *J. Reprod. Fertil.*, 48: 43-49.
- Maxfield FR, Tabas I. Review, Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438, 612-621 (2005).
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD & Rodrigues JL (2002) *Theriogenology* 57, 327–344.
- Mercier P., Rideaud P. 1990. Bactériologie du sperme frais de lapin. *Prod. Anim.*, 3, 215-221.
- Mercier P., Rideaud, P. 1992. Bacteriological study of rabbit sperm and the effects of antibiotic supplements in the conservation medium. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15: 520-529.
- Metz C.B., Hinsch G.W., Anika J.L. 1968. Ultrastructure and antigens of particles from rabbit semen. *J. Reprod. Fertil.*, 17, 195-198.
- Michael A., Alexopoulos C., Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D., Saratsis P., Ververidis H., Boscos C.: Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and

Références bibliographiques

reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 2009, 112, 119-135.

Miguel FM, Schemitt EG, Colares JR., Hartmann RM., Morgan-Martins ML. et al. 2017 Action of Vitamin E on experimental severe acute liver Failure, *Arq. Gastroenterol.* 54(2):123-129.

Millette C.F. (1998) Spermatozoa. In : Knobil E., Neill J.D. (eds.). *Encyclopedia of reproduction*. Volume 4. Academic press, San Diego, 586-596.

Minelli A., Moroni M., Castellini C., Lattaioli P., Mezzasoma I., Ronquist G. 1999. Rabbit spermatozoa: a model system for studying ATP homeostasis and motility. *J. Androl.*, 20 (2): 259-266.

Minelli A., Moroni M., Castellini C. 2001. Isolation of the IGF-I protein complex from rabbit seminal plasma: effects on sperm mobility and viability. *J. Experimental Zoology*, 290, 279-290.

Miros VV. et Mikhno VI. 1982. Semen quality of male rabbits in relation to age and season. *Inst. Zhivotnovodstva Lesotepi i Polesya*, 34: 45-48.

Mocé E., Lavara R., Lavara F., Vicente J.S. 2000 .Effect of reproductive rhythm on seminal parameters from a rabbit line selected with high growth rate. In *Proc. 7th World Rabbit Congress*, July 2000, Valencia, Spain, Vol. A, 197-201.

Mocé E., Vicente J.s, Lavara R., Viudes De Castro M.P., Lopez M, Bolet G. 2005. Characteristics of fresh semen from eight rabbit breeds. *Reprod. Domest. Anim.*, 40, 388-398.

Mocé E et Vicente JS (2009) Rabbit sperm cryopreservation : a review. *Anim Reprod Sci* 110, 1-24.

Mocé E., Purdy P.H et Grahama J.K. 2010. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. Published by Elsevier B.V.

Mogal S, Gurjar P, Yamgar D & Kamod AC (2012) *Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre* 4 (5), 1574-1586.

Références bibliographiques

Moggia S., Perros D. (1999) Contribution à la mise en évidence des altérations de l'acrosome et de la membrane des spermatozoïdes du chien lors de la congélation et de la décongélation. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Créteil, Créteil, 131 pp.

KUZMINSKY, G., FAUSTO, A.M., MORERA, P. 1996. Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope. *Reprod. Nut. Develop.*, 36 (5): 565-575.

Morris GJ, Faszer K, Green JE, Draper D, Grout BW & Fonseca F (2007) *Theriogenology* 68, 804–812.

Morton D (1988). The use of rabbits in male reproductive toxicology. *Environmental Health Perspectives*. 77: 5-9.

Motlagh MK, Sharafi M, Zhandi M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Soleimani M & Zeinoaldini S (2014) *Cryobiology* 69, 217–222.

Mourvaki E., Collodel G., Moretti E., Cosci I., Castellini C. 2008. Distribution of alpha-, gamma (+beta)- and deltatocopherol in the seminal plasma, spermatozoa and seminal vesicles of rabbit. *Andrologia* (In press).

Mourvaki E, Cardinali R, Dal Bosco A, Castellini C (2010). In vitro antioxidant activity of the prostatic secretory granules in rabbit semen after exposure to organic peroxides. *Reproductive Biology and Endocrinolog.* 8: 1-7.

Mukherjee DP, Johari MP, Bhattacharya P (1951). The gelatinous mass in rabbit semen. *Nature*. 168: 422 – 423.

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

Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell WR (eds) (1999) *Harper's Biochemistry*. 24th ed, London.

Nabi I, Fatmi S, ZERROUKI-DAOUDI N & IGUER-OUADA M (2017) revue de médecine vétérinaire 168, 4, 87-92

Najjar A. et Benmrad M. 2013 Variations in the quality of sperm in rabbits. *Livestock Research for Rural Development* 25(8):137.

Références bibliographiques

Nieto Vazquez, A. (1984). Evaluation of fertility in New Zealand White rabbits using three methods of inducing ovulation. *Veterinaria, Mexico*, 15: 75-80.

Niki E & Noguchi N (2004) *Acc Chem Res.* 37, 45-51.

Nizza A., Di Meo C., Taranto S. 2000. Influence of dietary protein content on libido and semen characteristics bucks. In Proc. 7th World Rabbit Congress, July 2000, Valencia, Spain, Vol. A, 217-224.

O'Bryan M.K., Schlatt S., Phillips D.J., De Kretser D.M., Hedger M.P. 2000. Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinol.*, 141, 238-246.

O'Flaherty C. de Lamirande E., Gagnon C. 2006. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic. Bio. Med.* 41:528-540.

Okab AB (2007). Semen characteristics and plasma testosterone of New-Zealand male rabbits as affected by environmental temperatures. *Slovak Journal of Animal Science.* 40: 161 – 167.

Oliveira CEA, Badú CA, Ferreira WM, Kamwa EB, Lana AMQ (2004). Effects of dietary zinc supplementation on spermatoc characteristics of rabbit breeders. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, Puebla.* 315-321.

OLLERO M., PEREZ-PE R., MUINO-BLANCO T., CEBRIAN-PEREZ J.A.: Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*, 1998, 37, 1-12.

Ott R.S., Goffaux M., Thibier M. (1987) Examen morphologique des spermatozoïdes. *El. et Ins.*, 221, 15-20.

Orhan A, Serdal C, Turgut Y, Hayrettin Y & Sahap K (2004) *International Ophthalmology* 01-01.

Parez V. et Duplan J. M. 1987 *L'insémination artificielle bovine.* Paris : ITEB/UNCEIA.- 256p.

Références bibliographiques

- Peerenboom H., Mann K., Knirknecht A., Kiene K., Wienbeck M. 1983 Prograde colonic irrigation without disturbance of the water-electrolyte balance. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 108(51-52):1959-1964.
- Pena A. et Linde-Forsberg C. 2000 Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54(5):703-718.
- Pena A.I., Lugilde L.L., Barrio M., Herradon P.G., Quintela L.A. (2003) Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 59, 1725-1739.
- Pena Martinez A.I. (2004) Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83, 209-224.
- Pérez-Sanchez F., Tablado L., Soler C. 1997. Sperm morphological abnormalities appearing in the male rabbit reproductive tract. *Theriogenology*, 47 (4): 893-901.
- Pérez-Sanchez F., Tablado L., Soler C. 1998. Quantitative changes in sperm head morphology during passage through the male excurrent duct system of the rabbit. *Molec. Reprod. Devel.*, 51 (2) 203-209.
- Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M & Bailey JL (2007) *Mol Reprod Dev* 74, 878-892.
- PERRIER, D.G., THEAU-CLEMENT, M., POUJARDIEU, B., DELHOMME, G. 1998. The preservation of rabbit semen for 72 h. *Cuniculture*, 142: 165-166.
- Perrier G, Theau-Clement M, Jouanno M, Drouet JP. Reduction of the GnRH dose and inseminated rabbit doe reproductive performance. In: *Proceedings of the seventh world rabbit science*, Valencia-Spain, 2000;A:225–30.
- Petitjean M (1965) Recherche sur l'estimation du pouvoir fécondant des coqs. Mémoire Ingénieur Centre National des Arts et Métiers, Paris 79p.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature* 1949;164:666.
- Ponglowhapan, Suppawiwat, Birgitta Essen-Gustavsson, Catharina Linde Forsberg. 2004. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 62(8):1498-1517.

Références bibliographiques

- Quesenberry KE, Donnelly TM, Hillyer EV (2004). *Biology, Husbandry, and Clinical Techniques of Guinea Pigs and Chinchillas*. In: K.E. Quesenberry, J.W. Carpenter (eds). *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*, 2nd ed. 232 – 244, Philadelphia, PA: Elsevier.
- Raederstorff D., Wyss A., Calder PC., Weber P., Eggersdorfer M. 2015 Vitamin E function and requirements in relation to PUFA, *Br. J. Nutr.* 114(8):1113-1122.
- Rana AP, Majumder GC, Misra S, Ghosh A (1991) Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta* 1061:185–196
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M & Rice-Evans C (1999) Free Radic *Biol Med* (9-10), 1231.
- Reece W.O. (1997) Male reproduction. In: Reece W.O. (eds.). *Physiology of domestic animals*. Second edition. Williams andWilkins Compagny, Baltimore, 344-365.
- Reed DJ. 1993 Interaction of vitamin E, ascorbic Acid, and glutathione in protection against oxydative damage. In: Packer L., Fuch J. (eds) *Vitamin E in health and disease*. Marcell Dekker, New York, pp 264-282.
- Rebollar P., Alvarino J., Ubilla E. 1994 Grouping of rabbit reproduction management by means of artificial insemination. *Wld. Rabbit. Sci.* 2(3) :222.
- Rigal G.B.F. 2008. Comparaison de la qualité de la semence de taureaux collectes à l'électroéjaculateur ou au vagin artificiel. Thèse du doctorat. Université Paul-Sabatier. Toulouse.
- Rijsselaere T., Van Soom A., Tanghe S., Coryn M., Maes D., De Kruif A. (2005) New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*, 64, 706-709.
- Rinck I., Sehic M., Butkovic V., Stanin D., Kadunc I. 1993. Ultrasonographic diagnosis of pregnancy in the rabbit. *Veterinarski archiv*, 63(2), 61-65).
- Roberts M. J., Bentley MD., Harris IM. 2002 Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54(4):459-476.

Références bibliographiques

- Roca J, Martínez S, Vazquez JM, Lucas X, Parrilla I, Martinez EA (2000). Viability and fertility of rabbits spermatozoa diluted in tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Animal Reproduction Science*. 64: 103-112.
- Roca J, Martínez S, Orengo J, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA (2005). Influence of constant long days on ejaculate parameters of rabbits reared under natural environment conditions of Mediterranean area. *Livest. Production Science*. 94 : 169-177.
- Roger T., 2002. *Anatomie comparée des Animaux de Laboratoire*. Lyon:ENV. - 20 p.
- Rohloff D. et Laiblin C 1976 Deep-freezing of rabbit spermatozoa. *Berl. Munch., Tierarztl. Wochenschr.* 89 :181-183.
- Rota A., Frishling A., Vannozzi I., Camillo F., Romagnoli S. (2001) Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 57, 383-386.
- Rota A. Chiara Milani, Giorgia Cabianca, Marco Martini, 2006. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology* 65(9):1848-1858.
- Saez F., Motta C., Boucher D., Grizard D. 1998. Antioxidant capacity of prostasomes in human semen. *Mol. Hum. Reprod.*, 4, 667-672.
- Salmani H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Towhidi A, Shahneh, AZ & Zhandi M (2013) *Small Rumin Res* 112, 123–127.
- Sánchez-Sevilla L., Mendieta-Condado E., Hernandez-Munoz R. 2016 Treatment reverses – tocopherol-induced desynchronization of polyamine and retinoid metabolism during rat liver regeneration lourdes, *Journal of Translational Medicine*. 14:307.
- Sauveur B. et Revièrs M. 1988 *Reproduction and egg production in poultry*. Institut Nationale de la Recherche Agronomique, Paris, pp 449.
- Sawada Y. et Chang MC. Motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa after freezing in a medium containing dimethyl sulfoxide 1964; *Fertil Steril*; 15:222-229.
- Seed J., Chapin R.E., Clegg E.D., Dostal L.A., Foote R.H., Hurtt M.E., Klinefelter G.R., Makris S.L., Perreaultys S.D., Schrader S., Seyler D., Sparando R., Treine K.A.,

Références bibliographiques

- Veeramacheneni D.N.R., Wise L.D. 1996. Method for the assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod. Toxicol.*, 10, 237-244.
- Selivonchick DP, Schmid PC, Natarajan V, Schmid HH (1980) Structure and metabolism of phospholipids in bovine epididymal spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 618:242–254
- SETCHELL, B.P.1989. Male reproductive organs and semen. In: *Reproduction in domestic animals*. Fifth edition (Edit. Cole, H.H., Cupps, P.T) Academic Press Inc., pp. 229-256.
- Shannon P., Curson B., Effect of egg yolk levels on the fertility of diluted bovine sperm stored at ambient temperatures, *N. Z. J. Agric. Res.* 26 (1983) 187-189.
- Shinkichi T. et Akira Y., 2004. VEIN (Vétérinary Exotic Information Network System), appareil uro-génital du lapin.
- Silva A.R., Cardoso R.C.S., Uchoa D.C., Silva L.D.M. (2003) Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 59, 821-829.
- Simões R., Feitosa WB., Siqueira AFP., Nichi M., Paula-Lopes FF., Marques MG., Peres MA., Barnabe VH., Visintin JA., Assumpcao MEO. 2013. Influence of bovine sperme DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. *Reproduction*. 146:433-441.
- Sinkovicks G., Medgyes I., Paljak J. 1983. Some results of A.I. in rabbits. *J. Appl. Rabbit Res.*, 6: 43-47.
- Skinner JD (1967). Puberty in the male rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*. 14: 151-154.
- Smith A.U., Polge C. 1950. Survival of spermatozoa at low temperature. *Nature*, 166: 668-669.
- Srinivas RD & Prabhakar RV (2013) *Toxicological and Environmental Chemistry* 95(3), 364.
- Strazinger G.F., Maurer R.R., Paufler S.K. 1971. Fertility of frozen rabbit semen. *J. Reprod. Fertil.*, 24: 111-117.

Références bibliographiques

Stranzinger GF., Maurer RR. Et Paufler SK. (1971) Fertility of frozen rabbit semen. *J. Reprod. Fert.*, 24:111-113.

Surai PF. 2002 Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction, Nottingham University Press Nottingham, UK.

Suwanpugdee A., Komkeawrat K., Saikhun K., Siritroonrat B., Tipkantha W., Doungsa-ard K., Sa-ardrit M., Suthunmapinatha P., Pinyopummin A. 2009 Semen characteristics and sperm morphology of serow (*Capricornis sumatraensis*). *Theriogenology* 71(4):576-585.

Swierstra EE, Foote RH (1963). Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*. 5: 309-322.

Szarka A., Tomasskovic B., Banhegyi G. 2012 The ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response, *Int. J. Mol. Sci.* 13(4):4458-4483.

Tainturier D., Bencharif D., Briand L. Topie E., Kamga-Waladjo AR. 2013 Production et conservation de la semence animale. Article de synthèse. *Revue Africaine de Santé et de Production Animale*. E.I.S.M.V. de Dakar.

Tashtoush BM, Al-Qashi ZS & Najib NM (2004) *Drug Dev Ind Pharm* 30, 601-607.

Theau-Clément M., Poujardieu B. 1994. Influence du mode de reproduction, de la réceptivité et du stade physiologique sur les composantes de la taille de portée des lapines. In Proc.: 6èmes Journées de la Recherche Cunicole, 6-7 Décembre, La Rochelle, France, 1, 187-194.

Theau-Clement M., Bencheikh N., Mercier P., Belleraud J. 1996, Reproductive performance of does under artificial insemination: use of deep

frozen rabbit semen. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, 2: 127-132.

Theau-Clement M. 2005. Reproduction et physiologie de la reproduction. 8ème congrès mondial de cuniculture. *Cuniculture magazine* .vol 32, p 38-48.

Theau-Clément M, Sanchez A, Duzert R , Brun M J.,2009 .Etude de facteur de variation de la production spermatique chez le lapin ,13^{ème} journée de la recherche cunicule ,17-18 ,le Mans ,France .

Thomas S.R. et Stocker R. 2000. Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: Implications for Atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine* 28 (12): 1795-1805

Références bibliographiques

- Thomas AD., Meyers SA. Ball Ba. 2006 Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* 65(8):1531-1550.
- Togo T., Alderton J.M., Bi G.Q et Steinhardt R.A. 1999. The mechanism of facilitated cell membrane resealing. *J. Cell Sci.*, 112, p 719-731.
- Touchstone JC, Alvarez JG, Levin SS, Storey BT (1985) Evidence for diplasmalogen as the major component of rabbit sperm phosphatidylethanolamine. *Lipids* 20:869–875
- Traber MG, Thellman CA, Rindler MJ&Kayden HJ (1988) *Am J Clin Nutr* 48(3), 605-611.
- Tremellen K. Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008;14:243–58.
- Tsutsui T., Tezuka T., Mikasa Y., Sugisawa H., Kirihara N., Hori T. et Kawakami E. (2003) Artificial insemination with canine semen stored at low temperature. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 65, 307-312.
- Turner TT, Reich GW (1985). Cauda epididymidal sperm motility: a comparison among five species. *Biology of Reproduction*. 32: 120-128
- Van Praag E, 2002. Appareil reproducteur mâle du lapin et Orchidectomie (castration chirurgicale) ; [En ligne] Accès internet:
http://www.medirabbit.com/FR/Skin.../Fusobacterium_fr.pdf
- Vásquez B, Del Sol M (2009). Estereología comparativa entre as glandulas del complejo prostático del conejo *Oryctolagus cuniculus*. *International Journal Morphology*. 27: 205 – 210.
- Vasquez JH. et al. 2013 Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing. *Livestock Science* 152:94-99.
- Verheyen S, Blaton N, Kinget R&Van den Mooter G (2002) *Int J Pharm* 249(1-2), 45-58.
- Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. 2004. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 216:31-39. Doi:10.1016/j. mce.2003.10.069.
- Veronese FM., Largajolli R., Boccu E. 1985. Surface modification of proteins activation of monomethoxy-polyethylene glycols by phenylchloroformates and modification of

Références bibliographiques

ribonuclease and superoxide dismutase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 11:141-152.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57: 149-179.

Verstegen JP., Onclin K., Iguer-ouada M. 2005. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg-yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. *Theriogenology* 64:720-733.

Vicente JS. et Viudes de Castro MP. (1996) A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. *Reprod Nutr Dev* ;36:485-492.

Viudes de Castro MP., Vicente JS., 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.

Viudes de Castro M.P., Marco-Jiménez F., Vicente J.S., Navarro E., Lavara R., Mocé E. 2004. Sperm kinetic parameters and differences in seminal plasma composition among two rabbit lines. In Proc. 8th Annual Conf. European Society of Domestic Animal Reproduction. *Reproduction in Domestic Animals* 394. 266 Abstract (P13). Warsaw Agricultural University, Poland.

Watanab Y., Yamashita T., Yamashita M.I et Adachi S. 2009. Suppressive Effect of α Tocopherol Complexed with B-Cyclodextrin on the oxidatio of Methyl Linoleate. *Food Sci.Technol. Res.*, 15, 479-482.

Waters RE., White LL., May JM. 1997. Liposomes containing alpha-tocopherol and ascorbate are protected from an external oxidant stress. *Free radical research* 26(4):373-379.

Watson P F., 2000.The causes of reduced fertility with cryopreserved. *Animal Reproduction Science* 60–6. P 481–492.

Welsch U. 2002. Précis D'histologie. Cytologie, Histologie, Anatomie Microscopique. Tournai (Belgique) : éd Médicales internationales.- 260 p.

Wesley A.J. (1998). Immunonutrition: the role of ω -3 fatty acids. *Nutrition*, 14, 627-633.

Who (1999). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. In: 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Références bibliographiques

Xie C, Li X, Luo X, Yang Y, Cui W, Zou J & Zhou S (2010) *Int J Pharm* 391, 55.

Yildiz C., Kaya A., Aksoy M., Tekeli T. 2000 Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54:579-585.

Henkel RR, Schill Ypsilantis P., Saratsis P. 1999. Early pregnancy diagnosis in the rabbit by real time ultrasonography. *World Rabbit Science*, 7, 2, 95-99.

Zaniboni L, Gliozzi T, Maldjia A, Luzi F, Cerolini S (2004). Fatty acid and tocopherol composition of semen components in the rabbit. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, Puebla*. 365-370.

Zhang JG., Nicholls-Grzemeski FA., Tirmenstein MA., Fariss MW. 2001. Vitamin ESuccinate Protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. *Chemico-Biological Interaction* 138:267-284.

Zhang RD, Wen XH, Kong LS, Deng XZ, Peng B, Huang AP, Wan Y, Yang ZW (2002). A quantitative (stereological) study of the effects of experimental unilateral cryptorchidism and subsequent orchiopey on spermatogenesis in adult rabbit testis. *Reproduction*. 124: 95–105.

L'objectif de notre étude était d'explorer l'efficacité du complexe PEG/Vit E pour protéger le sperme du lapin pendant sa conservation que ce soit à température ambiante, à 4°C ou pendant sa congélation. Nous avons émis l'hypothèse que le polyéthylène glycol pourrait améliorer les effets de la Vit E en augmentant sa solubilité et que son impact positif s'exprimerait en termes de motilité des spermatozoïdes et de protection contre le stress oxydatif.

Notre étude est réalisée en 5 parties, nous avons conservé le sperme du lapin à température ambiante pendant 4 heures, dilué dans 7 traitements (PEG, Vit E, PEG/Vit E, PEG/Vit C, Vit E /Vit C, PEG/Vit E/Vit C, et TRIS/Vit C) en plus du contrôle (TRIS). Nous avons aussi réfrigéré le sperme du lapin à 4°C, pendant 6 heures, dilué dans 3 traitements (PEG, VitE, PEG / VitE) en plus du contrôle (TRIS) et nous avons congelé le sperme du lapin une heure, dilué dans la PEG, Vit E, PEG / Vit E et TRIS. Les paramètres spermatiques des différentes dilutions sont analysés à l'aide du CASA, à T0 puis chaque une heure pour le sperme conservé à T ambiante, chaque 3 heures pour le sperme réfrigéré et juste après décongélation du sperme congelé.

Par ailleurs, nous avons mesuré le statut antioxydant total des spermatozoïdes avec le test de décoloration du radical libre au bout de 4h de réfrigération à 4°C. Dans cette partie, chaque échantillon est analysé six (6) fois.

En fin, nous avons inséminé deux groupes de femelles ; un composé de 3 lapines inséminées avec une semence fraîche diluée dans du TRIS et un autre composé de 4 femelles inséminées chacune avec la semence diluée dans l'un des 4 milieux (TRIS, VitE, PEG/VitE ou PEG/VitE/VitC) et conservées pendant 2heures à température ambiante.

Les résultats de notre étude ont montré que La motilité des spermatozoïdes réfrigérés et leur statut oxydatif étaient significativement protégés lors de l'utilisation individuelle de PEG et de Vit E, mais les effets les plus puissants ont été observés dans le traitement PEG/Vit E. A la température ambiante, ce sont les traitements PEG/VitE/VitC et PEG/VitC qui ont montré une protection des spermatozoïdes puisqu'ils ont donné des résultats de mobilité supérieurs à ceux du contrôle de T0 à T4 de conservation. Par contre l'analyse du sperme congelé/décongelé, a montré une baisse importante des paramètres spermatiques, par rapport aux résultats de T0, à l'exception de la LIN qui est améliorée par le complexe PEG/Vit E, par rapport au contrôle et par rapport à T0.

Après la réalisation de l'IA, deux sur les trois lapines inséminées avec le sperme frais mélangé au TRIS, sont diagnostiquées gestantes. Ainsi que les 3 femelles inséminées avec le sperme conservé dans le TRIS, dans la Vit E, et dans le complexe PEG/VitE, par contre il était négatif pour la femelle inséminée avec le PEG/VitE/VitC.

En conclusion, la présente étude a démontré que le traitement de la semence du lapin avec de la vitamine E complexée au PEG 6000 (PEG/Vit E) est efficace pour protéger les spermatozoïdes lors du refroidissement à 4°C et lors de leur conservation à température ambiante surtout si le traitement est supplémenté de Vit C.

Abstract

The present study aimed to investigate whether polyethylene glycol 6000 (PEG) can enhance Vitamin E solubility and help protect sperm motility, whether at room temperature, at 4°C or during freezing, and against oxidative status. We hypothesized that polyethylene glycol could improve the effects of VitE by increasing its solubility.

Our study is carried out in 5 parts, we kept rabbit sperm at room temperature for 4 hours, in TRIS alone or supplemented with PEG, VitE, PEG/VitE, PEG/VitC, VitE/VitC, PEG/VitE/VitC or VitC. We also cooled the rabbit sperm at 4°C for 6 hours, in TRIS alone or with PEG, VitE or PEG / VitE and we froze the rabbit sperm for one hour, in TRIS alone or with PEG, VitE or PEG / VitE. Sperm motility was measured using a Computer Aided Semen Analysis at T0 then every one hour for the sperm stored at room T, at 0, 1, 3, 6 h of cooling at 4°C and just after thawing of the frozen sperm. We also measured the total antioxidant status of spermatozoa using the free radical discoloration test at 4 h of cooling at 4°C. In this part, each sample is analysed six (6) times. Finally, we inseminated two groups of females; one with fresh semen diluted in TRIS and another with the semen diluted in TRIS, VitE, PEG/VitE or in the PEG/VitE/VitC complex and kept for 2 hours at room temperature.

Sperm motility and oxidative status were significantly protected when using PEG and VitE individually; however, the most potent effects were observed in PEG/VitE treatment. At room temperature, it was the PEG/VitE/VitC and PEG/VitC treatments that showed sperm protection. The analysis of frozen/thawed sperm showed a significant drop in sperm parameters, compared to the results of T0, with the exception of LIN which is improved by the PEG/VitE complex, compared to the control and compared to T0. After artificial insemination, two of the three does inseminated with fresh sperm mixed with TRIS was pregnant. As well as the 3 females inseminated with the semen preserved in the TRIS, in the VitE, and in the PEG/VitE complex, but the female inseminated with the sperm preserved in PEG/VitE/VitC was not pregnant.

The present study demonstrated that treating rabbit semen with vitamin E complexed to PEG 6000 (PEG/Vi E) is effective in protecting sperm cells during chilling at 4°C and during their storage at room temperature, especially if the treatment is supplemented with VitC.

كان الهدف من دراستنا هو استكشاف فعالية المركب PEG/VitE في حماية الحيوانات المنوية للأرنب أثناء التخزين، سواءً في درجة حرارة الغرفة، عند 4°م أو أثناء التجميد. افترضنا أن البولي إيثيلينجليكول يمكن أن يُحسن تأثير فيتامين E من خلال زيادة قابليته للذوبان وأن تأثيره الإيجابي سيتم التعبير عنه من حيث حركة الحيوانات المنوية وحمايتها من الإجهاد التأكسدي.

تمتقسيم دراستنا على خمسة (05) أجزاء، احتفظنا بالحيوانات المنوية للأرنب في درجة حرارة الغرفة لمدة أربع (04) ساعات، مخففة في 7 علاجات :

(TRIS، PEG، VitE، PEG/VitE، PEG/VitC، VitE/VitC، PEG/VitE/VitC و TRIS/VitC) بالإضافة إلى TRIS. قمنا أيضاً بتبريد الحيوانات المنوية للأرنب عند 4°م لمدة ست (06) ساعات، مخففة في ثلاث (03) علاجات (PEG، VitE/VitE/PEG، TRIS) بالإضافة إلى TRIS وقمنا بتجميد الحيوانات المنوية للأرنب لمدة ساعة واحدة، مخففة في PEG، VitE، PEG/VitE وTRIS. تم تحليل الخصائص الحركية للحيوانات المنوية المخففة في العلاجات المختلفة باستخدام المحلل الآلي CASA، عند T0 ثم كل ساعة للحيوانات المنوية المخزنة في درجة حرارة الغرفة، كل 3 ساعات للحيوانات المنوية المبردة ومباشرة بعد إعادة حرارة الحيوانات المنوية المجمدة سابقاً إلى درجة حرارة الغرفة.

بالإضافة إلى ذلك، قمنا بقياس حالة مضادات الأكسدة الإجمالية للحيوانات المنوية مع اختبار تغير لون الجذور الحرة بعد 4 ساعات من التبريد عند 4°م. في هذا الجزء، يتم تحليل كل عينة ست (06) مرات.

أخيراً، قمنا بتلقيح مجموعتين من إناث الأرنب؛ الأولى مكونة من 3 إناث تم تلقيحها بسائل منوي طازج مخفف في TRIS ومجموعة أخرى مكونة من 4 إناث تم تلقيح كل منها بالسائل المنوي المخفف في إحدى الوسائط الأربعة (TRIS، VitE، PEG/VitE أو PEG/VitE/VitC) والمخزنة لمدة ساعتين في درجة حرارة الغرفة.

أظهرت نتائج دراستنا أن حركة الحيوانات المنوية المبردة وحالة الأكسدة الخاصة بها كانت محمية بشكل كبير عند الاستخدام المستقل لـ PEG و VitE، ولكن لوحظت التأثيرات الأكثر فعالية في علاج PEG/VitE. في درجة حرارة الغرفة، كانت الوسائط، PEG/VitC و PEG/VitE/VitC هي التي أظهرت حماية للحيوانات المنوية لأنها أعطت نتائج أحسن بالنسبة لحركية الحيوانات المنوية من تلك التي تم حفظها في TRIS من T0 إلى T4. من ناحية أخرى، أظهر تحليل الحيوانات المنوية المجمدة/المذابة انخفاضاً كبيراً في خصائص الحيوانات المنوية، مقارنة بنتائج T0، باستثناء خاصية LIN التي تم تحسينها بواسطة مركب PEG/VitE، مقارنةً بـ TRIS ومقارنةً مع T0.

بعد إجراء التلقيح الاصطناعي، تم تشخيص اثنين من أصل ثلاث من إناث الأرنب التي يتم تلقيحها بالحيوانات المنوية الطازجة الممزوجة بـ TRIS على أنها حامل. بالإضافة إلى 3 إناث تم تلقيحها بالحيوانات المنوية المحفوظة في TRIS، في VitE، وفي مركب PEG/VitE، من ناحية أخرى كان التشخيص سلبياً لأنثى الأرنب التي تم تلقيحها بالمركب PEG/VitE/VitC.

في الختام، أوضحت هذه الدراسة أن علاج السائل المنوي للأرنب بفيتامين E المركب بـ PEG 6000 (PEG/VitqWE) فعال في حماية الحيوانات المنوية أثناء التبريد عند 4°م وأثناء تخزينها في درجة حرارة الغرفة، خاصةً إذا تم تعزيز العلاج بفيتامين C.