



République Algérienne Démocratique et Populaire

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique**

Centre Universitaire El-wancharissi de Tissemsilt

Institut de Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme

de Master académique en

Filière : sciences agronomiques

Spécialité : production animale

Présentée par :

Mr Chelik Abderrahmane

Thème

**L'effet du miel d'euphorbe sur la dilution de la
semence des lapins.**

Soutenu, Novembre 2020

Devant le Jury :

Mr. Benzohra Nadjib

Président

MAA

C-U- Tissemsilt

Mr. Aichouni Ahmed

Encadreur

Professeur

C-U-Tissemsilt

Mr. Ayad Mohamed Amin

Co-encadreur

MCB

ISV, Tiaret

Mr. Bousta Omar

Examineur

Doctorant vétérinaire

C-U- Tissemsilt

Année universitaire : 2019-2020

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

Remerciement

Remerciement

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à Mes tuteurs de projet de fin d'étude , Mr. Aichouni Ahmed et Mr. Ayad Mohammad Amin

Ceux qui ont accepté d'encadrer mon travail.

Mes remerciements à M. Berrouaguia Karim et Mr. Khalil Sofiane qui m'ont aidé pour réaliser ce travail

Ainsi que les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail

J'adresse également mes sincères remerciements à tout le personnel enseignant et administratif de l'institut de Sciences et de la Technologie Centre Universitaire El-wancharissi de Tissemsilt.

Merci à mes chers parents qui ont rendu tout possible, je n'oublierai jamais leur dévouement et leur sacrifice. J'espère qu'un jour je pourrai les remercier pour ce qu'ils m'ont donné.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement au développement de cette thèse.

Dédicace

Dédicace

*En témoignage d'amour et d'affection, je dédie ce travail avec une
grande fierté*

A mes chers parents qui ont été d'un réconfort inestimable

*A mes frères et sœurs et toute notre famille en
reconnaisances de leur encouragement*

*A tout mes amis pour leur sympathie, leur humeur et leur
solidarité envers nous*

*Veillez tous accepter nos hautes salutations et
considérations*

Que dieux puisse vous protéger et vous gardé a mes cotés.

Remerciements

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

I.1.GENERALITES SUR LE LAPIN	7
I.1.1. Introduction.....	7
I.2. Classification et identification de l'espèce	7
I.2.1. Taxonomie	7
I.2.2. Origine	7
I.2.3. Domestication	7
I.3La physiologie de reproduction mâle.....	8
I.3.1. L'anatomie de l'appareil reproducteur mâle	8
I.3.1.1.Les testicules	8
I.3.2.Voies génitales	9
I.1.2.1.L'épididyme.....	9
I.3.2.2.Le conduit déférent.....	9
I.3.2.3.La glande séminale.....	9
I.3.3.Glandes annexes	10
I.4.Le développement de la gonade mâle.....	11
I.4.1.Le testicule	11
I.4.2.Les cellules de Sertoli	12
I.4.3.Formation des cordons testiculaires et vascularisation.....	13
I.4.4.Les cellules de Leydig	14
I.5.Puberté chez le lapin.....	14
I.6.La fonctions testiculaire et spermatogénèse	15
I.7.Le cycle spermato génique.....	15
I.8.La maturation des spermatozoïdes.....	15
II.1. RECOLTE DU SPERM	16
II.2. Méthodes d'analyse du sperme	16
II.3. la semence.....	17

II.4. Composition de la semence	17
II.4.1. Les spermatozoïdes.....	19
II.4.2. Le plasma séminal	19
II.4.3. Le gel.....	19
II.5. Les caractères du sperme.....	19
II.5.1. La couleur	19
II.5.2. Le volume	20
II.5.3. Le pH.....	20
II.5.4. La motilité massale.....	20
II.5.5. La motilité individuelle	20
II.5.6. La concentration.....	21
II.5.7. La viabilité.....	21
II.5.8. La morphologie.....	21
II.6 :les facteurs d'influence de la composition de la semence	23
II.6.1. Le type génétique et l'âge	23
II.6.2. L'environnement physique.....	23
II.6.3. L'alimentation	24
III.1 La conservation de sperme du lapin	27
III.1.1 Polyéthylène-glycol (PEG)	27
A : Définition.....	27
B : Propriétés	27
C : Le rôle de PEG	28
III.1.2 La vitamine E	28
A : Définition.....	28
B : Rôle de la vitamine E	29
1. Rôle antioxydant	29
2. Stimulation des défenses immunitaires	29
3. Synthèse de l'hème	29
4. Respiration cellulaire.....	29
III.1.3. Cholestérol	30
A. Définition et rôle	30
B. Le cholestérol et la membrane	30
III.2. Conservation du sperme	31
III.2.1. A l'état frais " réfrigération ".....	31
III.2.2. La congélation	31
III.3. Historique.....	31
III.4. Principes généraux	31

III.4.1. Utilisation des dilueurs.....	31
III.4.2. Les caractéristiques du milieu de dilution.....	31
III.4.3.La composition des dilueurs.....	32
a. Le jaune d'œuf	32
b. Les antibiotiques	33
c. le diméthyl sulfoxyde (DMSO).....	33
d. Ethylène-glycol (EG)	33
e. Glycérol.....	33
f. Le miel	33
f.2. Les différents types des miels	34
f.3. Composition chimiques du miel.....	34
f.3.1. Les sucres	34
f.3.2. L'eau	34
f.3.3. Les acides	34
f.3.4. Les oligo-éléments	35
f.3.5. Les protéines	35
f.3.6. Les enzymes	35
f.3.7. Les vitamines.....	36
f.3.8. Divers	36
f.4. Propriété antibactérienne.....	36
f.5. Propriété anti-oxydante	36
III.5. Les étapes de la congélation	37
III.5.1. Equilibration	37
III.5.2. Conditionnement	37
III.5.3. Congélation	37
a. La vitesse de refroidissement.....	37
b. La position des paillettes.....	38
III.5.4. Décongélation	38
III.5.4.1. Les conditions de la congélation-décongélation.....	38
a. La nature du sperme	38
b. La température.....	38
c. Dilution	38
d. Incubation	38
III.5.5. Protocole de la congélation chez le lapin.....	39
III.5.6. Les différents protocoles de la congélation du sperme de lapin	39
IV.1.Objectif.....	43
IV.2.Lieu et période de travail	43

IV.3. Les lapins utilisés et les conditions d'élevage	43
IV.3.1. Alimentation et abreuvement	43
IV.4. Préparation des vagins artificiels et des tubes de collecte	44
IV.4.1. Matériel :	44
IV.4.2. Préparation du vagin artificiel	45
IV.4.2.3. Technique de collecte	45
IV.5. L'analyse du sperme	46
IV.5.1. Analyse macroscopique	46
IV.5.1.1. Couleur	46
IV.5.1.2. Volume	47
IV.5.1.3. PH	48
IV.5.2. L'analyse microscopique	48
a. Matériel	48
b. Les solutions	49
IV.5.3. La préparation des concentrations de miel	49
Motilité massale	50
Motilité individuelle	50
Viabilité	51
V.1. Analyse macroscopique	54
V.2. Analyse microscopique	55
V.2.1. La Mobilité	55
V.2.2. La viabilité	60
Pourquoi utiliser le miel dans la conservation du sperme :	62
Conclusion	66
Perspectives et recommandations	68
Références bibliographiques	70

Liste des figures

FIGURE 1: STRUCTURE INTERNE DU TESTICULE ET DE L'EPIDIDYME DES LAPINS (BONNES ET AL., 1988).	8
FIGURE 2 : SCHEMA DE L'APPAREIL GENITAL DU MALE (D'APRES LEBAS ET AL. 1996).	11
FIGURE 3 : ÉVOLUTION DU POIDS DES TESTICULES CHEZ LE JEUNE MALE ENTRE 20 ET 180 JOURS, D'APRES (PRUD'HON 1973). (SOUCHE MOYENNE PESANT 4 KG ADULTE)	12
FIGURE 4: SPERMATOZOÏDE DU LAPIN (LEBAS, 2010)	21
FIGURE 5: LES ANOMALIES DE LA TETE : A-ACROSOME CONTIENT PLUSIEURS GONFLEMENT, B-DOUBLE	22
FIGURE 6 : LES ANOMALIES DE LA PIECE INTERMEDIAIRE : A-B PI DEFORME, C- PI REDUIT, D-GONFLEMENT DE LA PI. (MORERA ET AL., 1996).	22
FIGURE 7: LES ANOMALIES DE LA QUEUE : A, B- LA QUEUE CONTIENT DES GOUTTELETTES, C- L'EXTREMITÉ DE LA QUEUE RESSEMBLE A UNE SPATULE, D- LA QUEUE CONTIENT DOUBLE CORDES, E- LA QUEUE PARTICULIEREMENT ENROULEE, F- DOUBLE QUEUE (MORERA ET AL., 1996).	23
FIGURE 8 : MECANISMES DE LA PROTECTION DU SPERMATOZOÏDE AVEC LE JAUNE D'ŒUF (MANJUATH ET AL., 2002).	32
FIGURE 9: ALIMENT GRANULE POUR LAPIN	44
FIGURE 10: SYSTEME D'ABREUVEMENT DU LAPIN	44
FIGURE 11 : DIFFERENTS CONSTITUANTS DU VAGIN ARTIFICIEL	45
FIGURE 12 : LES ETAPES DE PREPARATION DU VAGIN ARTIFICIEL	45
FIGURE 13 : TECHNIQUE DE RECOLTE DU SPERME CHEZ LE LAPIN	46
FIGURE 14 : LES COULEURS DE LA SEMENCE	47
FIGURE 15 : MESURE DE VOLUME D'ÉJACULAT PAR UN TUBE GRADUE	47
FIGURE 16 : BANDELETTE A PH	48
FIGURE 17 : MATERIEL D'ANALYSE MICROSCOPIQUE	48
FIGURE 18 : PREPARATION DU DILUEUR TRIS BUFFER	49
FIGURE 19 : PREPARATION DES DILUEURS DU MIEL	49
FIGURE 20: OBSERVATION SOUS MICROSCOPE D'UN FROTTIS REALISE APRES COLORATION A L'EOSINE-NIGROSINE	51
FIGURE 21: HISTOGRAMME DES MOYENNES DE LA MOTILITE MASSALE ET INDIVIDUELLE DE LA SEMENCE TEMOIN	56
FIGURE 22 : HISTOGRAMME DES MOYENNES DE LA MOTILITE MASSALE ET INDIVIDUELLE DE LA SEMENCE A LA CONCENTRATION 1% DU MIEL.	57
FIGURE 23 : HISTOGRAMME DU MOYENNE DE LA MOTILITE MASSALE ET INDIVIDUELLE DE LA SEMENCE A CONCENTRATION 3% DU MIEL.	58
FIGURE 24 : HISTOGRAMME DES MOYENNES DE LA MOTILITE MASSALE ET INDIVIDUELLE DE LA SEMENCE A CONCENTRATION 5% DU MIEL.	59
FIGURE 25 : HISTOGRAMME DES MOYENNES DE VIABILITE DES SEMENCES ANALYSE	60

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : COMPOSITION DE LA SEMENCE DU LAPIN (HOLTZ ET FOOTE,1978 ; STECHELL,1989 ;BATTAGLINI ET AL,1992).	18
TABLEAU 2 : VARIATION DE COLORATION SUR SPERME EN FONCTION DES DIFFERENTS CAUSE (BERCCHIA ,2009)	20
TABLEAU 3 : LES PROPRIETES DE PEG A DIFFERENTS MASSE MOLAIRE (ANONYME, 2006).	27
TABLEAU 4:ECHELLE UTILISE POUR DETERMINER LA MM D'APRES PETITJEAN H, 1965.	50
TABLEAU 5 : ECHELLE UTILISE POUR DETERMINER LA MI D'APRES ADRIEU., 1974.	51
TABLEAU 6 :CARACTERES MACROSCOPIQUES DU SPERME DES LAPINS ETUDIES	54
TABLEAU 7: LES VALEURS ET LES MOYENNES D'ANALYSE MICRO ET MACROSCOPIQUE DE LA SEMENCE	54
TABLEAU 8 : VALEURS ET MOYENNES DE MOTILITE MASSALE ET INDIVIDUELLE DE LA SEMENCE TEMOIN	55
TABLEAU 9 : VALEUR ET MOYENNE DE LA MOTILITE MASSALE ET INDIVIDUELLE DE LA SEMENCE A CONCENTRATION 1 % DU MIEL.....	56
TABLEAU 10 : VALEUR ET MOYENNE DE LA MOTILITE MASSALE ET INDIVIDUELLE DE LA SEMENCE A CONCENTRATION 3 % DU MIEL.....	57
TABLEAU 11 :VALEUR ET MOYENNE DE LA MOTILITE MASSALE ET INDIVIDUELLE DE LA SEMENCE A CONCENTRATION 5 % DU MIEL.....	58
TABLEAU 12 : VALEUR ET MOYENNE DE VIABILITE DES 3 PRELEVEMENTS DE DIFFERENT CONCENTRATION.	59

Liste d'abréviation

Spz : spermatozoides

DMSO : diméthyle sulfoxide

PEG : polyéthylène-glucol

ADN : Acide désoxyribonucléique

CMV :complément minéralo- vitaminique

VIT E : vitamine E

PGF2A : prostaglandine f2alpha

MM : motilité massale

MI : motilité individuelle

PVC : polychlorure de vinyle

C: concentration

C° : Degré Celsius

Résumé :

Le but de notre travail est de tester l'effet de la supplémentation d'un dilueur (Tris Buffer) de la semence des lapins par un miel d'euphorbe Algérien à différentes concentrations sur la conservation du sperme à température ambiante, en observant la motilité massale, la motilité individuelle ainsi que la viabilité des spermatozoïdes après 24 et 48 heures de conservation.

Des échantillons de sperme ont été prélevés sur 5 lapins dilués dans le tris buffer supplémenté par différentes concentrations 1%, 3%, 5% du miel d'euphorbe . Après dilution, les échantillons ont été conservés à température ambiante pendant 48 heures. La motilité des spermatozoïdes a été enregistrée à 0, 24 et 48 heures, les résultats ont montrés une net différence de motilité et viabilité dans les échantillons dilués à une concentration 3% que celle diluée dans les autres dilueurs (témoin, 1% et 5%).

En conclusion, nos résultats montrent que la dilution du sperme de lapin avec le dilueur Tris buffer supplémenté par le miel d'euphorbe a amélioré les paramètres spermatiques du sperme après conservation par rapport à ceux diluée dans du tris buffer. Nos résultats indiquent également que le miel est un milieu prometteur qui peut être utilisé efficacement pour maintenir la viabilité du sperme chez les lapins à une concentration de 3%.

Mots clés : sperme, lapins, paramètres spermatiques, miel d'euphorbe, conservation

abstract

The aim of our work is to test the effect of supplementing a rabbit semen diluent (Tris Buffer) with an Algerian spurge honey at different concentrations on the preservation of the sperm at room temperature, by observing the motility massale, individual motility as well as sperm viability after 24 and 48 hours storage.

Semen samples were taken from 5 rabbits diluted in the tris buffer supplemented with different concentrations of 1%, 3%, 5% of the spurge honey. After dilution, the samples were stored at room temperature for 48 hours. Sperm motility was recorded at 0, 24 and 48 hours, the results showed a clear difference in motility and viability in samples diluted at a 3% concentration than that diluted in the other diluents (control, 1% and 5%).

Coincidentally, our results show that the dilution of rabbit sperm with the Tris buffer diluter supplemented with spurge honey improved the sperm parameters of the sperm after storage compared to those diluted in Tris buffer. Our results also indicate that honey is a promising medium that can be used effectively to maintain sperm viability in rabbits at a concentration of 3%.

Key words: semen, rabbits, sperm parameters, spurge honey, storage .

ملخص

الهدف من عملنا هو اختبار تأثير تكميل مخفف السائل المنوي للأرانب التريس بافر بعسل اللبينة الجزائري بتركيزات مختلفة على حفظ الحيوانات المنوية في درجة حرارة الغرفة، من خلال مراقبة الحركة. الكتلة الحركية الفردية وكذلك حيوية الحيوانات المنوية بعد التخزين لمدة 24 و 48 ساعة.

تم أخذ عينات السائل المنوي من 5 أرناب مخففة في محلول التريس مع إضافة تراكيز مختلفة 1% ، 3% ، 5% من عسل النحل. بعد التخفيف، تم تخزين العينات في درجة حرارة الغرفة لمدة 48 ساعة. تم تسجيل حركة الحيوانات المنوية عند 0 و 24 و 48 ساعة، وأظهرت النتائج اختلافًا واضحًا في الحركة والحيوية في العينات المخففة إلى تركيز 3% عن تلك المخففة في المواد المخففة الأخرى (التحكم، 1% و 5%).

في الختام، أوضحت نتائجنا أن تخفيف السائل المنوي للأرانب بمخفف التريس بافر المضاف إلى عسل النحل يؤدي إلى تحسن في معاملات الحيوية المنوية للحيوانات المنوية بعد التخزين مقارنة بتلك المخففة في التريس .

كما تشير نتائجنا إلى أن العسل طريقة واعدة يمكن استخدامها بشكل فعال للحفاظ على حيوية الحيوانات المنوية في الأرناب بتركيز 3%.

الكلمات المفتاحية: السائل المنوي، الأرناب، معاملات السائل المنوي، نحل العسل، التخزين .

Introduction

Introduction

Introduction

La biotechnologie animale est un ensemble de techniques mises au point à partir des connaissances acquises sur le génome, la reproduction et le développement embryonnaire. Les biotechnologies de la reproduction incluent des techniques comme, la fécondation in vitro, le clonage ou la transgénèse, l'insémination artificielle, le transfert d'embryons, le sexage et la conservation d'embryons et de gamètes (**Bidanel et al., 2003**).

Au cours des 50 dernières années, la réfrigération et la conservation des spermatozoïdes ont donné lieu à un nombre important de travaux permettant d'améliorer nos connaissances en matière de conservation in vitro du sperme. Les méthodes de réfrigération et de conservation vont encore évoluer : nouvelles techniques, nouveaux dilueurs, nouveaux conditionnement de la semence, etc (**Decuadro- Hansen, 2004**).

La conservation du sperme de lapin est une méthode très intéressante car elle a des bénéfices. Elle permet, tout d'abord, la conservation du matériel génétique des reproducteurs, ainsi que des échanges internationaux des espèces, car dans certains pays, il est difficile d'introduire des animaux à cause des règles sanitaires et du coût. cette méthode permet d'éviter le contact physique entre deux partenaires ce qui limite la transmission de maladies telles que l'herpès (**Boiti et al., 2005**).

Les effets bénéfiques du miel d'abeille sur la protection de la santé de la reproduction ont été fortement mis en évidence par de nombreux auteurs, ils sont principalement attribués à sa teneur en éléments nutritifs, tels que des sucres, des minéraux, l'acide caféique, les aglycones Flavonoïdes ainsi que les vitamines. (**Olayemi et al. 2011**), ont conclu que l'ajout de miel au dilueur de tris buffer améliorerait la motilité et le taux de mortalité, ainsi que la viabilité du sperme de bouc. (**Fakhrildin et Alsaadi. 2014**) , ont conclu que la supplémentassions du miel d'abeilles domestiques (10%) à la solution de cryoprotection montre une amélioration des paramètres spermatiques après décongélation chez l'homme. (**Jerez-Ebensperger et al. 2015**) , ont signalés des valeurs de qualité du sperme élevées chez les béliers lorsque le dilueur contenait du miel pasteurisé.

Dans ce contexte, l'objectif de ce présent travail est donc d'étudier les effets de miel additionné au dilueur de conservation à des différentes concentrations sur la mobilité et la viabilité du spermatozoïdes chez les lapins conservé a 0, 24, et 48heurs a température ambiante.

Introduction

Le mémoire comporte une partie bibliographique composée de trois chapitres et une partie expérimentale divisée en 3 parties : la première présente la méthodologie de travail, la deuxième la présentation et la discussion des résultats obtenus et la troisième la conclusion, ainsi que les perspectives.

Partie bibliographique

Chapitre I: : La physiologie de reproduction mâle

I.1.GENERALITES SUR LE LAPIN

I.1.1. Introduction

Le lapin est d'un grand intérêt zootechnique, sélectionné pour sa productivité numérique et pondérale. Il peut ainsi participer à résoudre le problème de déficit protéique, ainsi qu'à diversifier l'origine des protéines animales (**Chaou, 2006**).

I.2. Classification et identification de l'espèce

I.2.1. Taxonomie

Le lapin, dont le nom spécifique est *Oryctolagus cuniculus*, appartient au groupe des mammifères, à l'ordre des Lagomorphes. Il s'insère à la famille des Leporidae par l'intermédiaire de la sous-famille des Leporinae qui englobe également le genre *Oryctolagus* (espèce *O. cuniculus*). Cet ordre se distingue de celui des Rongeurs en particulier par l'existence d'une deuxième paire d'incisives à la mâchoire supérieure (**Lebas, 2011**).

I.2.2. Origine

Oryctolagus cuniculus est le seul mammifère domestiqué dont l'origine paléontologique se situe en Europe de l'Ouest. Les restes fossiles les plus anciens du genre sont datés d'environ 6 millions d'années et ont été retrouvés en Andalousie (**Lebas, 2011**).

Au plan historique, le lapin fut "découvert" en Espagne vers 1000 ans avant JC, par les phéniciens. Lorsque ces grands navigateurs de la partie Est de la Méditerranée abordèrent les côtes de la péninsule Ibérique, ils furent frappés par la pullulation de petits mammifères fouisseurs appelés aujourd'hui lapins.

Les pays méditerranéens auraient connu l'élevage du lapin un demi siècle avant J.C, il semblerait que le lapin originaire d'Afrique du Nord fut introduit par les romains à travers la péninsule Ibérique vers cette époque (**Barkok, 1992**).

I.2.3. Domestication

La domestication des lapins remonte tout en plus, au début de l'actuel millénaire. En effet, l'élevage de lapin est d'introduction relativement récente. Les origines de la domestication sont reportées au moyen âge. L'expansion réelle du lapin, comme animal de basse-cour, ne débutera qu'à la fin du siècle dernier avec la mise au point des clapiers.

L'élevage du lapin en clapier se développe dans toute l'Europe occidentale, sa dissémination par les Européens a atteint le monde entier (**Rouvier, 1990**).

L'élevage du lapin a connu un développement considérable dans le monde, particulièrement dans les pays : France, Italie, Ukraine, Chine, Espagne, Russie ; ces pays méditerranéens sont considérés comme le berceau de l'élevage cunicole (**Colin et Lebas, 1996**). La domestication des lapins est

relativement recèsplupart des races et des populations actuelles ont été sélectionnées et améliorées par l'homme dans les 200 à 300 dernières années (**Lebas, 2011**).

I.3 La physiologie de reproduction mâle

I.3.1. L'anatomie de l'appareil reproducteur mâle

L'appareil génital mâle est constitué :

- de deux gonades, les testicules ;
- d'un ensemble de voies excrétrices ;
- des voies génitales mâles : l'épididyme, le canal déférent et l'uro-spermiducte
- des glandes annexes : les glandes vésiculaires, la prostate et les glandes bulbourétrales (**barone, 1984**).

Le lapin est alternativement exorchide . La descente des testicules est temporaire, le testicules peuvent facilement réintégrer la cavité abdominale.

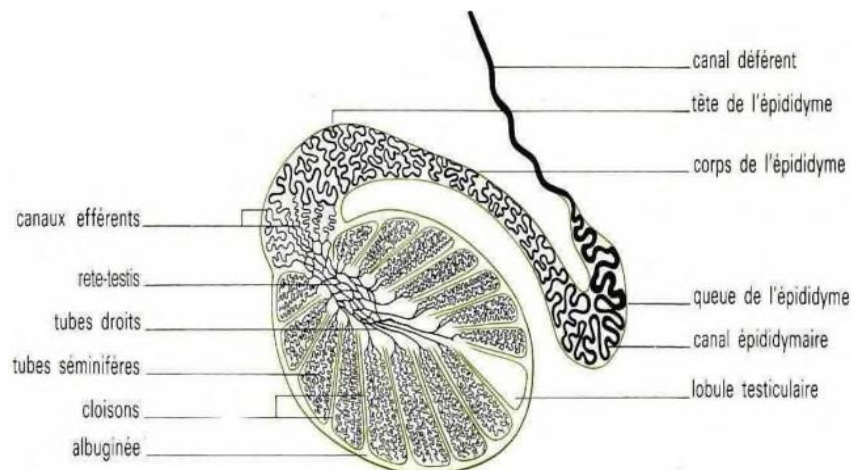


Figure 1: Structure interne du testicule et de l'épididyme des Lapins (Bonnes et al., 1988).

I.3.1.1. Les testicules (Figure 1)

Les testicules de lapin sont ovoïde, sont placés dans des sacs scrotaux qui sont restés en communication avec la cavité abdominale, ou il est resté à la naissance. Ainsi, le lapin peut rentrer ses testicules sous l'effet de la frayeur ou lors de combat avec d'autre mâle. (**Lebas et al., 1996**).

Ces testicules restent à l'intérieur de la cavité abdominale jusqu'à l'âge de trois mois, avant de descendre dans le scrotum par une ouverture de la paroi abdominale appelée anneau inguinal. Contrairement à ce que l'on observe chez de nombreux mammifères, les anneaux inguinaux du lapin restent toujours ouverts et les testicules peuvent facilement rentrer dans l'abdomen (**Boussit, 1989**).

Ces dernières se localisent sur les côtés de pénis plutôt qu'à l'arrière.

Chez le lapin les testicules sont logées par le scrotum qui n'est pas bien visible que lors des périodes d'activités sexuelle, ce scrotum est alors double et forme de chaque côté un sac volumineux très allongés dirigés caudalement sous le bassin. Jusque au voisinage du prépuce dont ils restent indépendants.

I.3.2. Voies génitales :

Les voies génitales sont constituées de l'épididyme, du canal déférent et de l'urospérmiducte.

I.1.2.1. L'épididyme :

Possède une tête volumineuse, qui coiffe largement l'extrémité capitée du testicule. Le corps est épais et la queue, bien détachée, forme un appendice globuleux et mobile. (Hegelen et Thiriet, 2012).

À la base de celui-ci, prennent attache le ligament propre du testicule et le ligament de la base de la queue de l'épididyme ; ils sont relativement longs et épais, mêlés de fibres musculaires lisses et évoquant le gubernaculum testis incomplètement rétracté.

I.3.2.2. Le conduit déférent

Long de 12 à 15 centimètres, est relativement épais. Très fluctueux en regard du testicule, il se localise dans le cordon attaché par son méso propre.

Parvenu dans l'abdomen, il continue d'abord son trajet en direction crâniale puis forme un crochet brusque pour contourner l'uretère et se porter caudalement au-dessus du col de la vessie. Il présente une ampoule assez nette, longue de deux centimètres environ, qui s'engage sous la vésicule séminale et s'ouvre dans la partie caudale de celle-ci par un orifice impair porté sur le colliculus séminal. (Hegelen et Thiriet, 2012).

I.3.2.3. La glande séminale

Elle est impaire, volumineuse et bilobée. Située dorsalement au col de la vessie et aux ampoules des conduits déférents, elle est longue d'environ 2,5 centimètres et aplatie dorsalement et ventralement.

Couverte dans ces deux tiers caudaux par la glande vésiculaire et la prostate, elle est libre et un peu rétrécie à sa partie crâniale caudalement en une sorte de col qui reçoit les conduits qui est bilobée par un sillon large et peu profond. Sa paroi épaisse et musculuse ce niveau, devient mince à sa face ventrale.

La cavité large et anfractueuse, s'étire à la jonction des conduits déférents tout près de son abouchement à l'urètre. En raison de cette disposition, cette glande a été parfois assimilée à un volumineux utricule prostatique.

L'urètre est long de 12 à 13 centimètres, dont seulement 8 à 9 pour la partie spongieuse. La partie pelvienne a une paroi mince et dilatable.

I.3.3. Glandes annexes (figure 2)

Parmi les glandes annexes on distingue des glandes vésiculaires, la prostate et les glandes bulbo-urétrales , **(Hegelen et Thiriet, 2012)** :

La prostate est remplacée par un complexe de plusieurs glandes.

On y reconnaît trois parties : une glande vésiculaire qui est en réalité une prostate crâniale, une prostate caudale ou prostate proprement dite et une paire de glandes para prostatiques.

- La glande vésiculaire :

Est ovale, relativement volumineuse et de teinte gris sombre.

- La prostate :

Proprement dite, est un peu plus petite, étirée d'un côté à l'autre, de couleur jaune-rosée.

- Les glandes para prostatiques sont nettement plus petites et arrondies.
- La glande bulbo-urétrale est unie à celle du côté opposé en une volumineuse masse bilobée par un sillon médian et de teinte brun rosée. **(Hegelen et Thiriet, 2012)**.

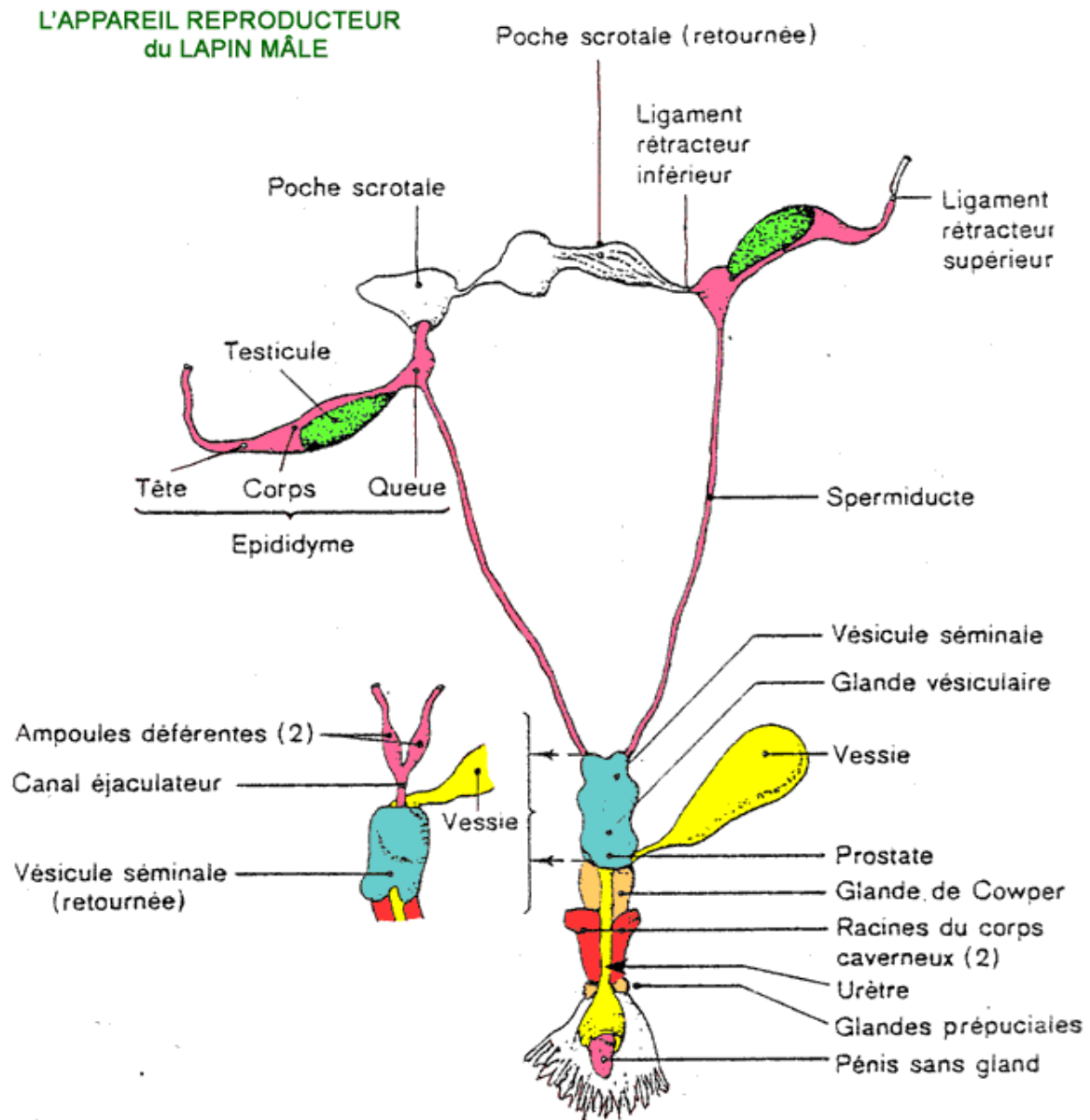


Figure 2: Schéma de l'appareil génital du mâle (d'après Lebas et al. 1996).

I.4. Le développement de la gonade mâle

I.4.1. Le testicule

De nombreux travaux, essentiellement réalisés chez le lapin, ont permis de mettre en évidence les événements morphogénétiques impliqués dans la formation d'un testicule. Chez cette espèce, la gonade mâle est la première à présenter un processus de différenciation et à dévoiler son orientation sexuelle d'un point de vue morphologique.

Deux événements majeurs sont observés : la formation des cordons testiculaires (futurs tubes séminifères) et l'apparition d'une vascularisation typique du testicule (développement de l'artère testiculaire à la surface de la gonade).

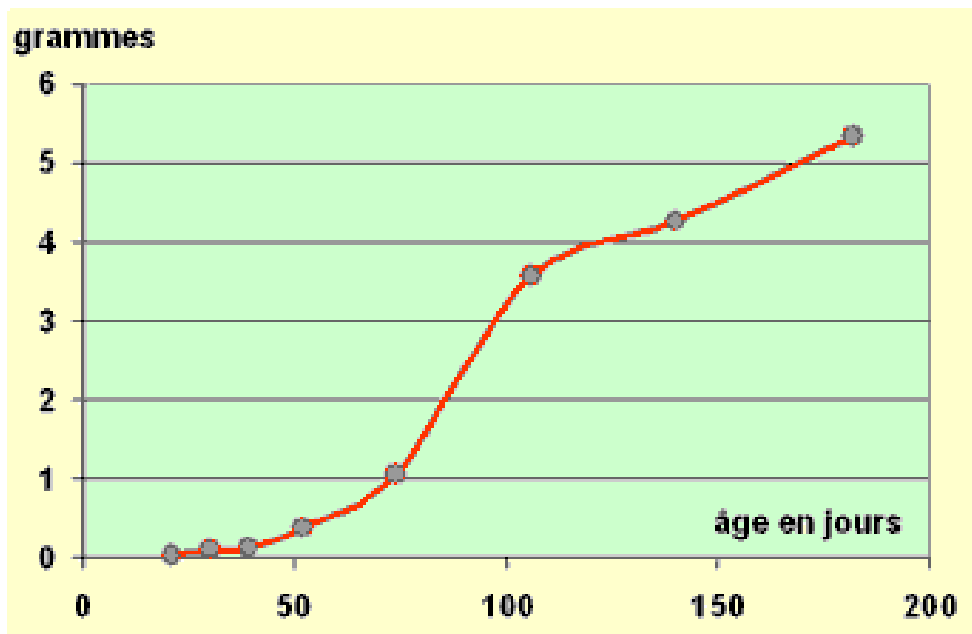


Figure 3 : Évolution du poids des testicules chez le jeune mâle entre 20 et 180 jours, d'après (Prud'hon 1973). (souche moyenne pesant 4 kg adulte)

I.4.2. Les cellules de Sertoli

Parmi les cellules somatiques de la gonade indifférenciée, les cellules de soutien sont les premières à adopter un destin selon le sexe de l'individu. Chez le mâle, les Cellules de Sertoli sont les cellules de soutien du testicule car elles constituent le Support de croissance et de maturation des cellules germinales.

La première étape de la différenciation testiculaire consiste en la spécification des Précurseurs des cellules de Sertoli (pré-Sertoli), qui se fait sous l'effet de l'expression du gène SRY, qui n'a lieu que dans ce type cellulaire chez tous les mammifères. En partenariat Avec SF1 (Steroidogenic factor 1 ou NR5a1), SRY active l'expression de SOX9 (SRYrelatedHMGbox gène 9) induisant la différenciation des cellules de Sertoli (**Sekido et Lovell-Badge, 2008**).

Celles-ci agissent ensuite comme un maître d'œuvre, orchestrant la différenciation des autres types cellulaires du testicule tels que les cellules de Leydig, les cellules myoïdespéri tubulaires, les cellules germinales et les cellules endothéliales, grâce aux facteurs paracrines qu'elles sécrètent. En particulier, les cellules de Sertoli sont responsables de la migration des cellules endothéliales depuis le mésonéphros vers la gonade XY. Ces cellules vont s'associer juste en dessous de l'épithélium cœlomique pour former le vaisseau cœlomiques (future artère testiculaire) et le réseau d'artérioles (**Martineau et al., 1997 ; Brennan et al., 2002 ; Combes et al., 2009**). Le nombre de cellules de Sertoli est important pour la différenciation testiculaire.

Dès les premiers stades, la gonade XY présente une taille plus importante que la gonade XX, suite à une augmentation de la prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium cœlomique chez les mâles.

I.4.3. Formation des cordons testiculaires et vascularisation

La formation des cordons testiculaires est le premier événement morphologique, qui permet de distinguer un testicule d'un ovaire.

Les cordons testiculaires se composent de trois lignées cellulaires :

les cellules germinales enfermées par une couche de cellules de Sertoli, dont l'ensemble est entouré par les cellules myoïdes péri-tubulaires. Les cordons testiculaires peuvent se former en l'absence de cellules germinales, comme il a été démontré dans des gonades dépourvues de cellules germinales. Par contre, une contribution de cellules provenant du mésonéphros est nécessaire à l'édification des cordons testiculaires. En effet, chez la souris, les tubes séminifères ne peuvent se former dans une gonade XY isolée (sans mésonéphros) ou lorsque celle-ci est séparée du mésonéphros par une membrane imperméable aux cellules (**Buehret et al., 1993**).

Ce sont en fait les cellules endothéliales qui migrent depuis le mésonéphros vers l'épithélium cœlomique de la gonade XY qui sont impliquées dans l'édification des cordons.

L'utilisation d'un anticorps bloquant la VE-cadhérine inhibe la migration de ces cellules et le développement de la vascularisation testiculaire, mais perturbe également la formation des cordons (**Combes et al., 2009**). La mise en place des cordons sexuels débute lorsque les cellules de Sertoli nouvellement différenciées entourent des faisceaux de cellules germinales.

Par la suite, les interactions cellulaires entre les cellules de Sertoli et les cellules endothéliales migrant depuis le mésonéphros induisent l'édification des cordons proprement dite.

Enfin, les cellules de Sertoli vont contrôler la maturation des cordons testiculaires en régulant leur forme et leur taille. Elles développent entre elles des jonctions cellulaires spécifiques et produisent des protéines de la matrice extracellulaire, conjointement avec les cellules myoïdes péri-tubulaires, pour former une membrane basale qui définit la structure des cordons (**Combes et al., 2009**). Si la migration des cellules endothéliales est indispensable à la formation des cordons testiculaires, elle est aussi nécessaire à la mise en place d'une vascularisation typique de la gonade mâle.

Dans les premiers stades de développement, la vascularisation primitive à partir du mésonéphros est similaire dans les gonades XX et XY (jusqu'à 11,5 jpc chez la souris). Une vascularisation spécifique du mâle se développe ensuite,

après l'expression de SRY. Le développement du système artériel dans le testicule permet la mise en place d'un flux sanguin depuis le mésonéphros vers le vaisseau cœlomique. Ce système induit

une augmentation du flux sanguin au niveau du testicule, permettant une bonne exportation des hormones testiculaires **(Combes et al., 2009)**.

I.4.4. Les cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont les cellules stéroïdiennes qui se différencient dans le deuxième compartiment du testicule, l'espace interstitiel. Ces cellules produisent des androgènes qui sont essentiels pour la masculinisation et l'apparition des caractères sexuels primaires et secondaires. Chez les mammifères, il existe deux populations différentes de cellules de Leydig : fœtales et adultes. La fonction première de ces cellules est de synthétiser la testostérone, dès leur différenciation, qui induit la masculinisation du tractus génital interne et externe. Les cellules de Leydig fœtales produisent également l'Insuline-like factor 3 (INSL3), impliqué dans la descente testiculaire de la cavité abdominale au scrotum.

Les cellules de Leydig adultes se différencient après la naissance et maintiennent la production d'androgènes pendant la puberté et la vie adulte. La production de testostérone par ces cellules de Leydig est responsable du développement et du maintien de la spermatogenèse, du développement et de l'activité de l'appareil génital, et de la mise en place et du maintien des caractères sexuels secondaires. **(Combes et al., 2009)**.

Les cellules de Leydig adultes ont une origine différente de leurs homologues fœtaux. Elles se forment à partir de cellules précurseurs fusiformes indifférenciées de l'espace interstitiel du testicule, alors que les cellules de Leydig fœtales se forment à partir de cellules du mésenchyme des crêtes génitales. **(ARAUDI et AIT SAÏD thèse 2018)**.

I.5. Puberté chez le lapin

La puberté chez le lapin mâle est le moment où les organes reproducteurs sont capables de produire de façon constante des spermatozoïdes féconds. La puberté chez le lapin est atteinte vers 4 à 5 mois peu après la descente des testicules dans le scrotum. En effet, l'âge de la puberté dépend de plusieurs facteurs dont la race ; les conditions d'élevage, notamment l'alimentation. Chez le lapin mâle ; les premières manifestations de comportement sexuel peuvent apparaître vers 60-70 jours. Généralement les jeunes mâles commencent à se reproduire à l'âge de 5 mois, et atteignent leur maturité sexuelle où la production journalière de sperme n'augmente plus et reste stable. **(ARAUDI et AIT SAÏD thèse 2018)**.

I.6. La fonction testiculaire et spermatogénèse

La spermatogénèse est définie comme l'ensemble des divisions successives et différenciation cellulaire qui permet le passage d'une cellule souche sexuelle spermatogonie à la production des spermatozoïdes gamètes mâles.

La spermatogénèse se déroule dans le testicule à l'intérieur du tube séminifère, de la périphérie du tube séminifère vers la lumière en suivant une courbe hélicoïdale ; elle dure de 42 à 48 jours et est continue à partir de la puberté.

La spermatogénèse se compose de deux phases : une phase d'élaboration ou le cycle spermatogénique, qui se déroule dans les tubes séminifères, et la phase de maturation au niveau de l'épididyme (ARAUDI et AIT SAÏD thèse 2018).

I.7. Le cycle spermatogénique

Est un processus complexe qui conduit à la réduction chromosomique chez le lapin $2n=44$ chromosomes et implique la réorganisation des composants nucléaires et cytoplasmiques. Les spermatogonies = cellules germinales sont transformées en spermatocytes I $2n$ chromosomes, puis après méiose en spermatocytes II donne deux spermatozoïdes. Au cours d'une métamorphose complexe, la spermatogénèse, chaque spermatozoïde se transforme en spermatozoïde.

En effet, la spermatozoïde, de forme encore arrondie, s'allonge, le cytoplasme glisse le long du noyau vers la zone des centrosomes et s'étire le long du flagelle naissant pour former la gouttelette cytoplasmique.

Le spermatozoïde compte essentiellement trois parties : une tête ovale contenant le noyau, la pièce intermédiaire au niveau de laquelle les mitochondries se condensent autour du filament flagellaire, le flagelle assurant le déplacement du spermatozoïde (ARAUDI et AIT SAÏD thèse 2018).

I.8. La maturation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères sont ensuite acheminés au travers du rete-testis vers l'épididyme qui recouvre le testicule. Les spermatozoïdes prélevés directement au niveau des tubes séminifères sont pratiquement immobiles. Leur motilité ne se manifeste qu'à la fin du transit épидидymaire dans la queue de l'épididyme. Ainsi, prélevés au niveau des tubes séminifères et même au début de l'épididyme, les spermatozoïdes ne sont pas encore féconds. En effet, des travaux anciens montrent que seuls les spermatozoïdes présents dans la queue de l'épididyme sont susceptibles d'être féconds.

En résumé, le transit épидидymaire permet le transport (contractions), le stockage (queue de l'épididyme) et l'acquisition de la motilité des spermatozoïdes .chez le lapin , la durée de la maturation épидидymaire varie de 8 à 11 jours (**ARAUDIIOU et AIT SAÏD thèse 2018**).

CHAPITRE II : RECOLTE ET ANALYSE DU SPERME

II.1. RECOLTE DU SPERM

On utilise un vagin artificiel de taille adaptée. Cet appareil comprend de l'eau chaude de 40 à 45°C entre 2 membranes (pour être proche de 39°C au moment de la récolte, la température normale du vagin). Un tube collecteur gradué à fond conique est fixé à une extrémité. La lapine boute-en-train est introduite dans la cage du mâle, le vagin artificiel placé sous son ventre en arrière. Lorsque le mâle s'appuie sur la lapine, on dirige son pénis vers le vagin artificiel (**Morin, 1976 ; Lebas, 1996**). Pour certains mâles, une peau de lapin fixée au bras de l'opérateur peut servir de leurre (**Vaissaire, 1977**).

Le lapin peut être collecté 1 à 7 fois par semaine (**Montaillé, 1992**). Lorsqu'on compare un rythme de collecte intensif (lundi, mercredi et vendredi), un rythme intermédiaire (mardi et vendredi) et un rythme extensif (1 jour par semaine, le jeudi), la meilleure combinaison entre les caractéristiques du sperme, la production de spermatozoïdes par semaine et la fertilité est obtenue avec le rythme extensif, serait une fois par semaine (**Bencheich et de Rochambeau, 1993**). Pour d'autres auteurs, le meilleur rythme serait de 3 fois par semaine avec 2 sauts à 15 minutes d'intervalle chaque fois. L'utilisation d'un électro-éjaculateur fournit un volume de sperme inférieur: 0,33 ml contre 0,72 ml avec un vagin artificiel (**Montaillé, 1992**).

II.2. Méthodes d'analyse du sperme

Les méthodes d'analyse du sperme sont les suivantes : Une fois le sperme récolté, le volume total de l'éjaculat recueilli est mesuré par lecture directe sur le tube gradué servant à la collecte. Si le sperme recueilli contient du gel, ce dernier est retiré à l'aide d'une pipette Pasteur pour déterminer le volume sans gel. Le pH du sperme est mesuré à l'aide d'un pH-mètre. La couleur est déterminée par observation du sperme dans le tube de collecte transparent (**Boussit 1989**). Une notation a été appliquée à la couleur du sperme selon la grille de (**Roca et al 1993**), variant de 0 (sperme contaminé avec l'urine (jaunâtre) ou le sang (rosâtre ou rougeâtre)) à 3 (sperme blanc nacré ou blanc ivoire).

Ensuite les motilités massale et individuelle des spz ont été déterminées sous microscope. La motilité massale a été appréciée en plaçant une goutte de sperme pure entre lame et lamelle observée au grossissement (x10). Une note a été attribuée au mouvement de la masse des spz observés selon la grille de (**Petitjean 1965**) (**Boussit 1989**) allant de 0 à 9.

La motilité individuelle a été appréciée après dilution du sperme dans 1cc de sérum physiologique. Une goutte de semence (sperme dilué) a été observée entre lame et lamelle avec un grossissement (x 40). Le type des mouvements individuel des spz est noté en utilisant l'échelle d'Andrieu (1974) (**Boussit 1989**) allant de 0 à 4.

Le pourcentage de spz morts a été déterminé par la préparation d'un frottis utilisant la coloration vitale éosine-nigrosine : une goutte de sperme diluée dans du sérum physiologique a été mélangée avec une goutte de colorant, ensuite le mélange a été étalé délicatement sur une lame à l'aide d'une lamelle et séché à l'air libre (**Baril et al 1993**). Puis il a été observé au microscope au grossissement (x 40) ; 100 spz sont comptés, à partir desquels sont estimés le pourcentage de spz colorés correspondant aux spz morts dont la membrane endommagée est perméable à la coloration rose, alors que les spz vivants avec leurs membranes fonctionnelles ne lissent pas diffuser le colorant et restent par conséquent incolores (**Boussit 1989**).

Le pourcentage de spz anormaux a été étudié sur la même lame ayant servi au dénombrement des spz vivants. 100 spz ont été comptés au hasard parmi lesquels on a distingué les spz anormaux (**Boussit 1989**) .

La concentration en spz (en millions/ml) a été déterminée en utilisant un hématimètre de type cellule de Thomas à partir d'une goutte de sperme diluée. Le comptage a été effectué sous le microscope au grossissement $\times 40$ (**Boussit 1989**).

II.3. la semence :

Quelle que soit l'espèce, la semence est un liquide clair, plus ou moins visqueux, de couleur blanchâtre à jaunâtre. Elle est homogène mais trouble. Elle peut être de couleur anormale, signe d'une contamination par de l'urine (jaune), du sang (rouge ou brun) , ou encore de pus (vert), (**Johonstob et al., 2001**). La semence constituée des spermatozoïdes, produit ou cours des spermatogènes par les glandes males, et du liquides ou plasma séminal ; produit par les glandes sexuelles. Les spermatozoïdes sont des cellules hautement spécialisés dont la fonction première est la fécondation de l'ovocyte dans le tractus génitale femelle. Les spermatozoïdes peuvent présenter des anomalies structurelles à l'origine d'une diminution de la fertilité de la semence .

II.4. Composition de la semence

La semence du lapin est constituée de spermatozoïdes suspendus dans le plasma séminal. le plasma séminal contient un nombre de substances sécrétées par l'épididyme et les glandes accessoires. Ce liquide contient une concentration élevée de fructose, d'acide citrique, et inclut aussi l'inositol , le glycérol l'érgothionéine et l'acide glutamique , certains enzymes, protéines , électrolytes et petit gouttes lipidiques . Le volume varie entre 0.3et 0.6 ml en fonction des sécrétion des glandes accessoire (gel). La concertation du sperme et comprise entre 50 à 500 $\times 10^6$ /ml . Le ph est mesuré juste après la collecte , il compris entre 6.8 et 8.4 et c' est un bon index pour estimer la qualité de la semence (**Alvarino , 2000**).

Tableau 1 : composition de la semence du lapin (holtz et foote,1978 ; stechell,1989 ;battaglini et al,1992).

Paramètre	1 ^{er} Ejaculat	2 ^{ème} Ejaculat
Volume(sans gel) (ml)	0.1-1.1	0.2-0.4
Volume du gel (ml)	0.32-0.50	0.1-0.18
Ejaculat avec gel (%)	54	15
Spermatozoïdes /ml semence (x106)	280-1,050	420-800
Motilité (%)	58-90	57-87
Score de motilité (0-5)	2.3-3.3	2.0-4.8
Goutte cytoplasmique distale (0-5)	0.6-1.0	0.4-0.8
Aglutination du sperme (0-5)	1.2-2.0	0.8-1.6
pH	7.7-8.4	

Plasma séminal	
Fructose (mg/100ml)	40-150
Sorbitol (mg/100ml)	80
Acide citrique (mg/100ml)	70-200
Protéine (mg/100ml)	4-15
Glycerylphosphorylcholine (mg /100ml)	215-370*
Sodium (mmoles/l)	80-140
Potassium (mmoles/l)	32-120
Phosphore (mmoles/	1-3
Magnésium(mmoles/l)	2-4
Calcium (mmoles/l)	2-8

II.4.1. Les spermatozoïdes

La forme du spermatozoïde du lapin est similaire à celui d'autres mammifères. La tête est ovoïde ces dimensions sont environ $7 \times 4 \times 0,5 \mu\text{m}$. La longueur de la queue est de $45 \mu\text{m}$.

Le plafond de l'acrosome est situé sur le dessus de la tête pour les trois quarts de sa mesure et présente une augmentation le long de son bord.

La section longitudinale de la tête du spermatozoïde du lapin montre une chromatine nucléaire très compacte entourée par le complexe de l'acrosome. Le complexe anoxémie composé de deux microtubules centraux et 9 doublets périphérique de microtubules entourés de 9 fibres accessoires (**Castellini et al., 2005**).

Les spz matures se divisent en deux parties :

1- La tête, contient l'acrosome qui est aplatie et couvre ses deux tiers antérieurs. L'acrosome est constitué essentiellement de glycoprotéines et d'enzymes intervenant lors de la fécondation.

2-la queue, divise le en deux, la pièce intermédiaire qui renferme la majorité des mitochondries de la cellule, ces constituants sont le siège de la production énergétique nécessaire au mouvement. Et le flagelle qui est l'organe moteur responsable du déplacement du spz (**Boussit, 1989**).

II.4.2. Le plasma séminal

Le plasma séminal est constitué d'un mélange des sécrétions de l'épididyme et des glandes annexes. Il est composé d'une partie fluide et l'autre gélatineuse. Il assure le transport des gamètes lors de l'éjaculation et assure aussi d'autres rôles biologiques. Son pH varie entre 6,8 et 7,3 alors que la pression osmotique semble proche de 308 milli osmose ∞ .

Le plasma par sa composition peut radicalement modifier les caractéristiques de la semence (**Boussit, 1989**).

II.4.3. Le gel

Ce gel est micro-gélatineux sécrété par les glandes annexes, il est plus ou moins consistant, transparent et peu soluble. Ce gel pose un problème lors de la dilution c'est pour cela il faut l'enlèvement de l'autre fraction spermatique par le glissement le long de la paroi du tube soit par une pipette pasteur, soit par une paille. La présence ou l'absence de gel doit être notée pour caractériser l'éjaculat et le mâle (**Boussit, 1989**).

II.5. Les caractères du sperme

II.5.1. La couleur

La couleur du sperme du lapin est généralement blanchâtre, son opacité dépend principalement de la concentration spermatique. Cette couleur peut être modifiée par la présence

d'autres éléments anormaux comme la couleur jaune liée à la présence d'urine, la couleur grise liée à la précipitation au fond du tube ou bien

la couleur rougeâtre ou rose liée à la présence du sang (**Boussit, 1989**).

Tableau 2 : variation de coloration sur sperme en fonction des différents cause (bercchia ,2009)

Coloration	Origine
jaune	Présence d'urine
grisâtre	Présence des cristaux et des cellules mortes provenant des tissus génitaux.
rouge	la présence de sang

II.5.2. Le volume

La mesure du volume du sperme s'effectue par plusieurs méthodes, certains auteurs utilisent un tube de collecte calibré ou gradué après l'enlèvement du gel (**Boussit, 1989**), Le volume de la semence varie entre 0.3 et 6.0 ml (**Alvarino, 2000**).

II.5.3. Le pH

Le pH est mesuré directement après la collecte de la semence en utilisant un pH mètre(**Najjar et ben mrad, 2013**).Le pH de la semence varie entre 6.8 et 8.4 ; il est considéré comme un bon index pour estimation de la qualité du sperme (**Alvarino, 2000**).

II.5.4. La motilité massale

Représente les mouvements de la masse des spz, elle s'évalue par observation microscopique d'une goutte de sperme brute sur une lame (**Bencheikh, 1995**), l'observation se fait au grossissement (x10) (**Najjar et Ben Mrad, 2013**). Une note de 0 à 9 est attribuée selon l'échelle de (**Petitjean ,Boussit D., 1989**).

II.5.5. La motilité individuelle

La motilité individuelle est le mouvement de chaque spz. Pour mesurer la motilité, la semence fraîche sera diluée par la solution Tris-buffer (Tris- acide citrique –glucose).Ladilution est de (1:5), La motilité est mesurée à 37°C sous microscope à grossissement (x40)(**Najjar et Ben Mrad, 2013**). Une note est de 0 à 4 attribuée selon l'échelle d'Adrieu de 0-4(**Boussit, 1989**).

II.5.6. La concentration

La concentration du sperme est le nombre de spz dans un ml de sperme. La dilution se fait par une solution de fixation contenant 10 ml de formol à 35% v/v dans 1 L de NaCl à 0,9% (**Ariola J. et al., 2001**). (**Boussit D., 1989**) a montré que la précision est optimale pour une dilution de 1/200. La concentration varie entre 300 et 700 x 10⁶ spz/ml. Le comptage se fait par une cellule hématométrique, exemple cellule de Thoma (**Raphaël et al., 2004**).

II.5.7. La viabilité :

Une coloration vitale à l'éosine-nigrosine permet de classer les spermatozoïdes qui sont morts ou vivants après de dénombrement de 200 spz. Les spermatozoïdes morts ont leur membrane perméable et prennent une coloration rosée. Les spermatozoïdes vivants ont une membrane imperméable et apparaissent incolores (**Alvarino, 2000**). Le colorant le plus utilisé est l'éosine-nigrosine car il présente l'avantage de permettre l'évaluation de la morphologie et la viabilité des spz. La viabilité peut être testée par la méthode de HOST qui concerne principalement la membrane de la queue du spermatozoïde.

C'est un test de gonflement hypo-osmotique, il mesure la réponse de la membrane des spermatozoïdes à un milieu hypo- osmotique (**Theau-Clément, 2005**).

II.5.8. La morphologie

La morphologie du spermatozoïde du lapin est déterminée par la réalisation d'un frottis après coloration à l'éosine-nigrosine qui permet de classer les spermatozoïdes normaux (figure 4) et anormaux. La morphologie des spermatozoïdes sera détectée par l'analyse microscopique (100x),

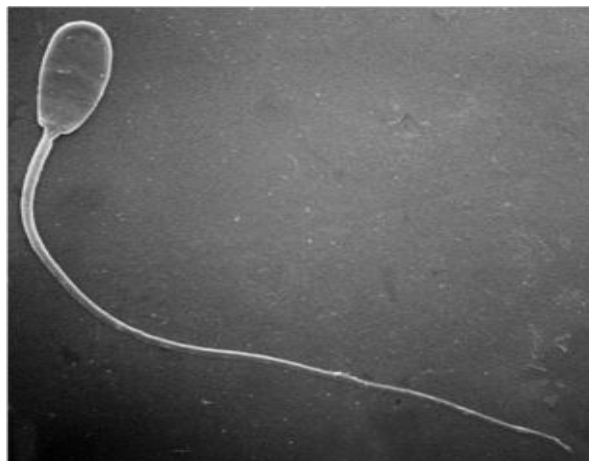


Figure 4: Spermatozoïde du lapin (LEBAS, 2010)

Les anomalies morphologiques sont classées comme primaire et secondaire (Johnston et al., 2001) comme il est cité dans les figures suivantes :

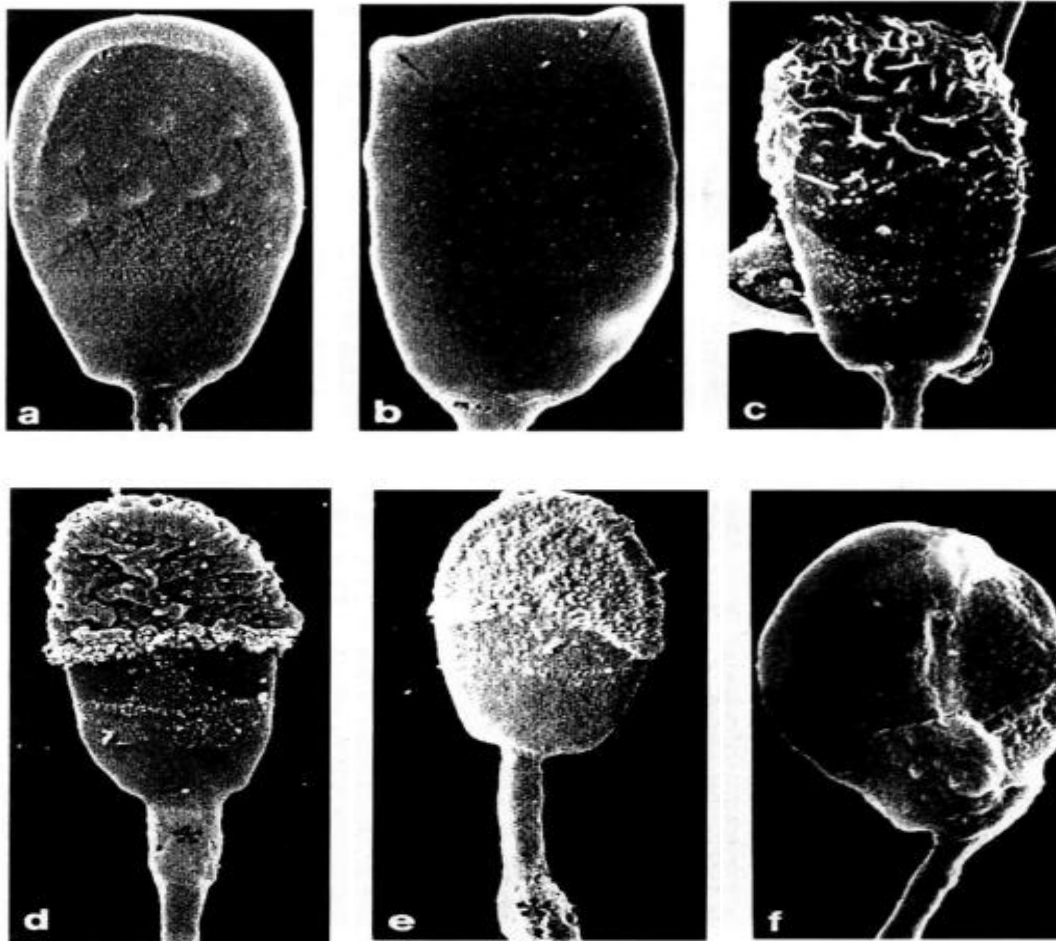


Figure 5: les anomalies de la tête: **a**-acrosome contient plusieurs gonflement, **b**-double acrosome, **c**-acrosome déformé, **d**-acrosome rétracté avec des cordes gonflé, **e**-acrosome vésiculaire contient des gouttelettes, **f**-double têtes. (Morera et al., 1996).

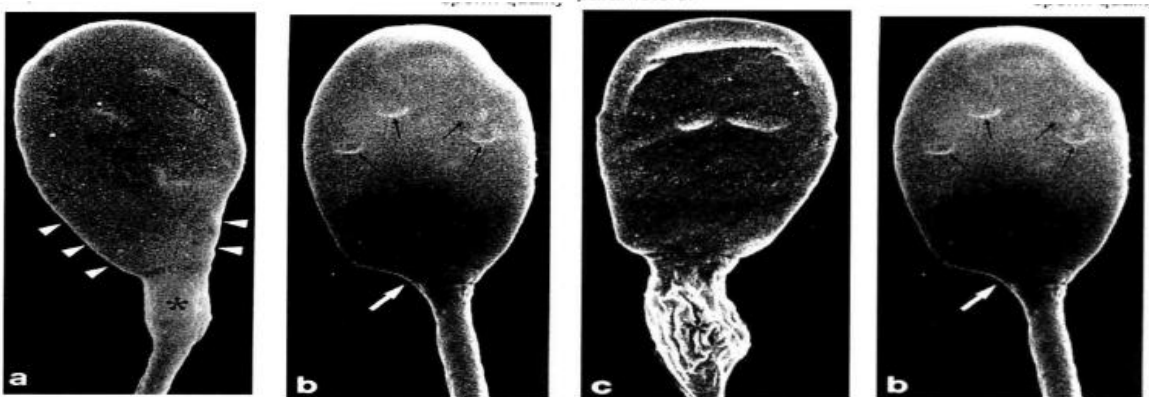


Figure 6: Les anomalies de la pièce intermédiaire : **a-b** PI déformé, **c**- PI réduit, **d**-gonflement de la PI. (Morera et al., 1996)

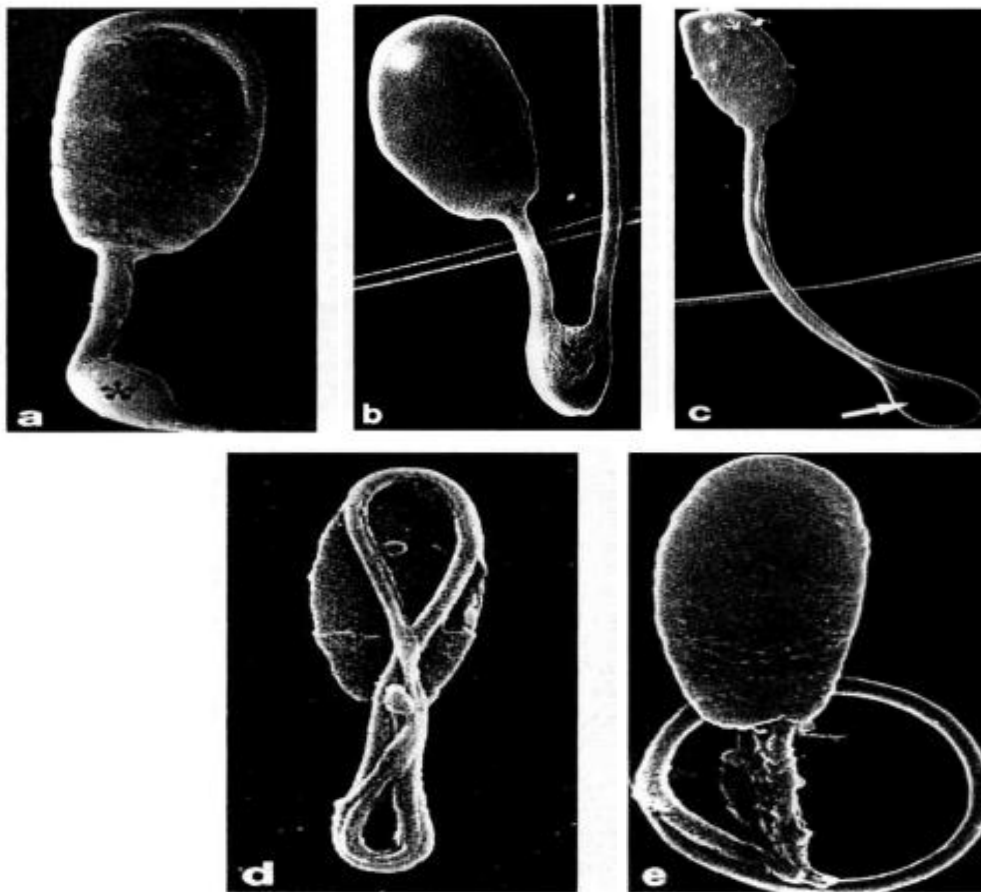


Figure 7: les anomalies de la queue : a, b- la queue contient des gouttelettes, c- l'extrémité de la queue ressemble à une spatule, d- la queue contient double cordes, e- la queue particulièrement enroulée, f- double queue (Morera et *al.*, 1996).

II.6 :les facteurs d'influence de la composition de la semence

II.6.1. Le type génétique et l'âge

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

II.6.2. L'environnement physique

La spermatogenèse du lapin montre une variation saisonnière liée à la photopériode et à la température externe, l'activité étant maximale au printemps et minimale à l'automne. Pour des températures comprises entre 13°C et 26°C, peu de variations sont observées sur les

caractéristiques de la semence d'après **Nizza A.** Par contre, pour des températures élevées supérieures à 30°C, température fréquente en été pour des élevages en semi plein air, la supplémentation en zinc dans la ration alimentaire (245 mg ZnSO₄, soit 100 mg Zn/kg) permet de limiter la baisse de production de spermatozoïdes observée en automne (+ 31 106 spermatozoïdes par rapport au témoin) d'après (**Mocé E.**). Le zinc est un oligo-élément qui influence directement la synthèse des hormones gonadotropes de l'axe hypothalamo-hypophysaire et stéroïdiennes (androgène et testostérone). Cependant, bien que les mâles semblent capables de s'adapter en quelques semaines à un stress thermique (tous les jours : 22 heures à 32°C et 2 heures à 25°C), la quantité et la qualité de la semence produite sont extrêmement sensibles à de fortes chaleurs couplées à une forte hygrométrie (85 % pendant 6 semaines, d'après (**Finzi A.**). En effet, les caractéristiques de la semence ne retrouvent jamais leurs valeurs initiales.

II.6.3. L'alimentation

L'alimentation des mâles est un facteur important à maîtriser car les caractéristiques de la semence et la libido sont affectées lorsque le niveau des apports nutritionnels est insuffisant. En effet, un régime alimentaire ne contenant que 13% de protéines brutes entraîne une diminution du volume de l'éjaculat, de la concentration en spermatozoïdes ainsi qu'un abaissement des performances de reproduction des femelles inséminées (**d'après Nizza A.**).

La supplémentation en vitamines liposolubles de type A, D3, E d'un aliment standard couvrant les besoins des mâles ne permet pas d'améliorer la quantité et la qualité de la semence produite (nombre de spermatozoïdes, volume, concentration, anomalies morphologiques) (**d'après Mocé E.**), ni le comportement sexuel du jeune mâle (**d'après Lavara R.**). Par contre, l'association des 2 vitamines C et E modifie le statut oxydatif des mâles et les caractéristiques de la semence. La supplémentation en alpha tocophérol (200 mg/kg) et en acide ascorbique (1 g/litre de boisson) devrait permettre une meilleure résistance aux stress osmotiques et oxydatifs et en conséquence, une meilleure aptitude à la congélation de la semence (**d'après Castellini C.**).**Thierry JOLY , Michèle THEAU-CLÉMENT .**

CHAPITRE III : DILUTION ET CONSERVATION DE LA SEMENCE

III.1 La conservation de sperme du lapin

III.1.1 Polyéthylène-glycol (PEG)

A : Définition

C'est un polymère biocompatible, non ionique et non toxique utilisé dans les domaines biomédical, biotechnologique et pharmaceutique (**Anziata et al., 2002**). Il est appelé également macrogol dans le domaine médical (**Tani et al., 2002**).

B : Propriétés

Le PEG a plusieurs propriétés

-Il n'est ni absorbé, ni fermenté.

-Il est soluble dans l'eau et dans beaucoup de solvants organiques comme:

le toluène, le chlorure de méthylène, l'éthanol et dans l'acétone (**Tani et al., 2002**). Bien que la solubilité dans l'eau diminue légèrement avec l'augmentation de la masse molaire (**Neumann et Nadeau, 1963**) (Tableau III).

- la plus importante propriété est qu'il résiste à la reconnaissance du système immunitaire (**Britton Keys, 1998**).

-Il est hydrophile (**Kadjjai, 2011**).

Tableau 3 : les propriétés de PEG à différents masse molaire (Anonyme, 2006).

	La description à 20°C	La viscosité à 20°C	La viscosité à 98.8°C	Le pH	La densité à 20°C (g/cm)	La solubilité dans l'eau à 20°C (%m/m)
200usp	Clair, visqueux	60-67	3,9-4,8	5-7	1,124	∞
300	hygroscopique	88-96	5,4-6,4	5-7	1,125	∞
400	liquide	112-124	6,8-8,0	5-7	1,126	∞
600	Liquide et cireux	17-18	9,9-11,3	5-7	1,126	∞
800	Doux	21-23	12,5-14,5	5-7	Masse solidifié 1.126	80
1000	Cireux	24-28	16-19	5-7	Masse solidifié 1.126	75
1500	Cireux blanc	36-42	26-32	5-7	Masse solidifié 1.20	62
2000	Flocon	50-58	38-49	5-7	Masse solidifié 1.20	58
3000	/	75-95	67-93	5-7	Masse solidifié 1.20	56

3350	Cireux blanc	85-115	76-11	5-7	Masse solidifié1.20	56
4000	Flocon	114-142	110-158	5-7	Masse solidifié1.20	55
6000	Poudre	210-262	250-390	5-7	Masse solidifié1.20	54
8000	/	290-450	470-900	5-7	Masse solidifié1.20	54
10000	Pale, dur	550-750	/	5-7	Masse solidifié1.20	53
12000	flocon Cireu	1100-1400	/	5-7	Masse solidifié1.20	53
20000	Poudre	2700- 3500	/	4,5-7,5	Masse solidifié1.20	25
35000	Pale, dur, flocon cireux	110-14000	/	5-7	Masse solidifié1.20	50

C : Le rôle de PEG

-Il augmente l'activité enzymatique en raison des favorables interactions entre la coenzyme NADP et PEG.

-Le PEG 400 permet une haute solubilité des sels et peut être utilisé dans des réactions d'oxydation et de substitution (**Pancera, 2002**).

-Le PEG augmente le volume et l'hydratation du contenu intestinal,

- Il tapisse et lubrifie la muqueuse,

- Il attire l'eau hors de la muqueuse

-Le PEG enlève les cellules précancéreuses de la muqueuse et agit pratiquement comme les anticancéreux cytotoxiques classiques, à ceci près qu'il n'est ni absorbé, ni toxique, ni nocif (**Corpet et al., 2003**).

-Le PEG protège les épithéliums contre les agressions physiques et chimiques du flux fécal, un effet joué de façon physiologique par les mucines endogènes.

-De plus le PEG par ses propriétés de polymère amphiphile favorise la restauration des membranes cellulaires lésées (**Togo et al., 1999**).

-Le PEG augmente la pression osmotique des milieux où il est dissous. *In vitro*, le PEG inhibe la prolifération et bloque des cellules cancéreuses humaines HT29 en phase G0/G1 (**Pernaudet et al., 2001a**).

III.1.2 La vitamine E

A : Définition

Elle a été découverte en 1922 par Evans et Bishop. Il existe au moins 8 tocophérols à action vitaminique E (**Kakuk et Darnas, 1973**).

B : Rôle de la vitamine E**1. Rôle antioxydant**

La vitamine E se trouve au niveau des membranes cellulaires et intracellulaires. Elle a plusieurs rôles:

-Elle protège les acides gras insaturés des membranes contre l'oxydation.

-Elle garde la stabilité des membranes cellulaires riches en acides gras insaturés des hématies, et l'intégrité des capillaires sanguins (**Kakuk et Darnas, 1973**).

-Elle protège également la membrane des spermatozoïdes pendant la dilution et la conservation du sperme par le froid. En augmentant l'apport alimentaire de vitamine E chez le dindon, le coq, le jars, on augmente la quantité de vitamine E dans le sperme, et par conséquent la stabilité des membranes des spermatozoïdes (**Surai, 1992**).

-Elle protège aussi de l'oxydation d'autres vitamines (dont la vitamine A), des hormones et des enzymes. Un manque de sélénium et de vitamine E affecte la conversion de la méthionine encystéine (**Combs et al., 1981**).

En cas d'une carence en vitamine E, on note la formation et l'accumulation anormale de peroxydes qui provoquent l'oxydation des acides gras et des phospholipides membranaires ce qui conduit à la désorganisation des feuilletts lipidiques, c'est-à-dire la lyse des membranes (**Larbier et Leclercq, 1992**).

2. Stimulation des défenses immunitaires

La vitamine E agit sur la thyroïde et les glandes surrénales en synergie avec le sélénium (**Larbier et Leclercq, 1992**).

3. Synthèse de l'hème

La vitamine E participe à l'absorption intestinale et au transport du fer, lequel entre dans la structure de l'hème (**Mikulets, 1996**): la concentration plasmatique de transferrine, et donc la capacité de transport de fer par le sang, augmente avec la quantité de vitamine E dans la ration (**Larbier et Leclercq, 1992**).

4. Respiration cellulaire

La vitamine E intervient dans la synthèse des protéines humiques, dont les cytochromes et l'hémoglobine (**Larbier et Leclercq, 1992**).

III.1.3. Cholestérol

A. Définition et rôle

Il a été découvert en 1969, par **Pouletier**, Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques, il est présent dans tous les tissus des animaux et il est indispensable pour ses multiples fonctions :

- Un rôle structurel dans l'architecture cellulaire;
- Un rôle dans le transport des graisses hépatiques et sanguines;
- Un rôle métabolique capital en tant que précurseur des hormones stéroïdes (hormones sexuelles du mâle et de la femelle, des hormones corticosurrénales et des acides biliaires);
- Un rôle antitoxique (**Pacheco, 1969**).

B. Le cholestérol et la membrane

Le cholestérol a plusieurs effets sur la membrane, il stabilise la membrane et réduit sa perméabilité. Le rapport du cholestérol au phospholipide est une cause déterminante et importante de la fluidité et de la stabilité de la membrane à basse température.

Le cholestérol module la fluidité des membranes par l'interaction avec des chaînes grasses d'acyle des phospholipides et maintient les phospholipides dans un arrangement aléatoire et lamellaire pendant que la température diminue.

Dans des membranes modèles, l'augmentation du rapport du cholestérol au phospholipide élargit la phase de transition, réduit la fuite de membrane et les séparations des phases. Par conséquent, le traitement du sperme avec le cholestérol avant la cryopreservation pourrait réduire la sensibilité des membranes du sperme aux dommages de refroidissement, en éliminant ou en réduisant la séparation de phase latérale des lipides (**Mocé et al., 2010b**).

III.2. Conservation du sperme

III.2.1. A l'état frais " réfrigération "

La conservation de la semence animale à l'état frais passe par sa dilution immédiate après le prélèvement du sperme. La conservation de la semence fraîche à 4° C réduit le métabolisme des spermatozoïdes ce qui permet une économie de leurs réserves énergétiques et une bonne conservation de leur mobilité qui est restaurée après réchauffement (**Decuadro-Hansen, 2004**).

III.2.2. La congélation

La cryoconservation correspond à la préparation d'une suspension de cellules en vue de son stockage à une température inférieure à -80°C. Cette action permet la conservation de cette suspension pendant de nombreuses années et son utilisation après décongélation à une température corporelle (**Amann, 1998**).

III.3. Historique

En 1789, **Spallanzani** a remarqué, au cours de ses expériences, que le sperme de la grenouille stocké dans la neige gardait ses propriétés fécondantes (**Amann, 1998**). Mais ce n'est qu'en 1942, quand **Hoagland** et **Pincus** ont observé que le sperme de lapin ne pouvait guère survivre après immersion dans l'azote liquide contrairement au sperme de l'homme qui est très actif après décongélation (**Mocé et Vicente, 2009**). Après la découverte des cryoprotecteurs, l'effet du glycérol sur le sperme par **Polge etson** équipe en **1943**, des recherches ont été menées sur la conservation du sperme en utilisant des cryoprotecteurs (**England, 1993 ; Amann, 1998**).

III.4. Principes généraux

III.4.1. Utilisation des dilueurs

Les spermatozoïdes conservés par réfrigération ou par congélation doivent être dilués dans des bons dilueurs (**England, 1993**), parce que ces derniers jouent un rôle important: protègent les spermatozoïdes de l'effet négatif de la baisse des températures et permet l'obtention d'une concentration finale, précédemment établie, de spermatozoïdes (**Peña et al., 2000 ; Stănescu et Alin, 2010**).

III.4.2. Les caractéristiques du milieu de dilution

Un milieu permettant la survie des spermatozoïdes et répondant à un certain nombre de critères:
-Avoir un pH entre 6,7 et 7,3 chez les mammifères domestiques;

- Contenir des éléments nutritifs pour éviter l'épuisement des spermatozoïdes (glucose, fructose, glutamine, etc.);
- Avoir des solutions tampons (Tes, Pipes, Hepes, Tris, etc.) et des ions minéraux permettant de maintenir le pH;
- Contenir des lipoprotéines animales ou végétales qui ont un rôle protecteur des membranes durant le processus de congélation- décongélation;
- Avoir des antibiotiques destinés à contrôler la flore microbienne banale et les pathogènes opportunistes (**Decuadro- Hansen, 2004**).

III.4.3. La composition des dilueurs

Parmi les constituants des dilueurs les plus utilisés il ya :

a. Le jaune d'œuf

Son utilisation a montré une augmentation de pouvoir fécondant. Il est généralement utilisé à la des concentrations de 20% V/V (**Foulkes, 1977**).

Le jaune d'œuf contient des phospholipides et des lipoprotéines (LDL) qui assurent une protection efficace de la membrane des spz et qui constituent un soutien nutritionnel pour elle (**Manjunath et al., 2002**).

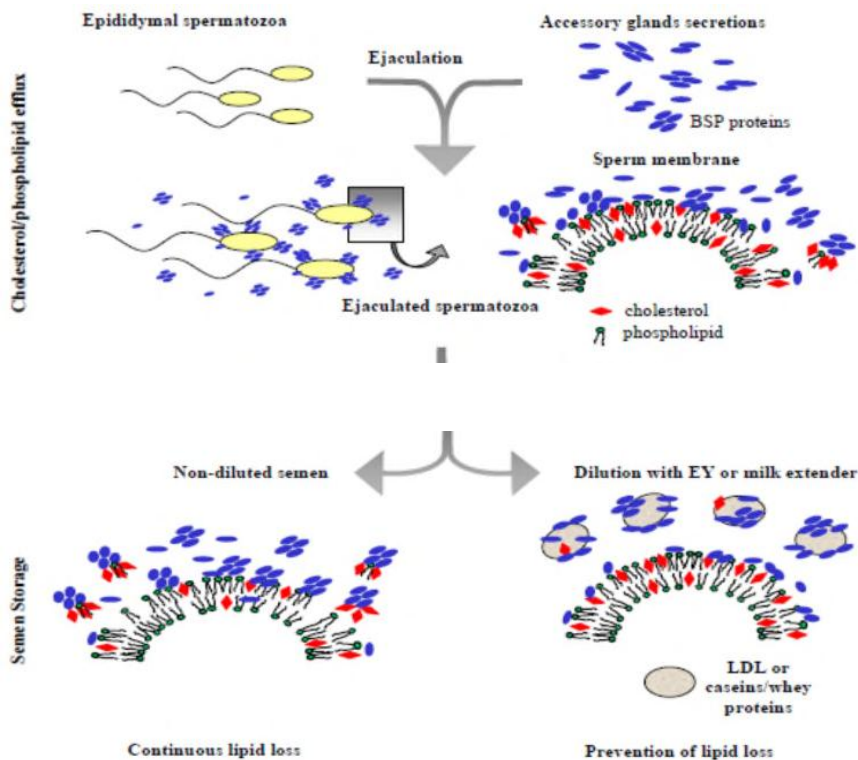


Figure 8: Mécanismes de la protection du spermatozoïde avec le jaune d'œuf (**Manjunath et al., 2002**).

b. Les antibiotiques

Ont un effet néfaste sur les spz, ils freinent la propagation de bactéries car la plupart des éjaculats sont contaminés par des bactéries(Althouse, 2000).

c. le diméthyl sulfoxyde (DMSO)

Il a été découvert en 1959 par **Loverlok** et **Bishop M.** C'est un cryoprotecteur intracellulaire, à pénétration rapide, ce qui permet de limiter la durée de l'équilibration (**Billard et Legendre,1980**).

d. Ethylène-glycol (EG)

Les chercheurs ont montrés que l'EG est un cryoprotecteur (**Ana et al., 2006**). En2011, **Swelum** et ses collaborateurs ont trouvés que l'éthylène glycol améliore la qualité des spermatozoïdes (la viabilité, l'intégrité de l'acrosome, et de la membrane et une faible anomalie à l'expression de la mobilité).

e. Glycérol

C'est le plus utilisé des cryoprotecteurs dans le monde. Il possède une action à la fois intra- et extracellulaire, Il pénètre à l'intérieur des spermatozoïdes et modifie la configuration des cristaux de glace qui s'y forment en les rendant plus arrondis, ce qui diminue le risque de perforation des membranes (**Stănescu et Alin, 2012**).

f. Le miel .f.1.Définition

Les organisations internationales (*Codex Alimentarius*, 1981; Pharmacopée européenne, 2008)sont d'accord pour définir le miel comme une substance sucrée, naturelle, produite par les abeilles. Les matières premières sont le nectar des plantes ou le miellat, une substance sucrée et collante excrétée par les pucerons et autres insectes suceurs et souvent déposé sur les feuilles et les tiges. Les abeilles recueillent ces matériaux, et vont les transformer en miel, en les combinant avec des matières spécifiques qui leurs sont propres. Enfin, le miel est déshydraté et stocké dans les rayons de cire pour l'affinage et la maturation.

Les miels produits par des espèces proches de l'abeille domestique telles qu'*Apis cerana* et *Apis dorsata*, ou encore par les abeilles mélipones ou par les bourdons, seront obligatoirement identifiés autrement, leur composition en sucres étant très différente (Joshi et al., 2000).

Le miel est donc, par définition, un produit 100% naturel, l'homme n'intervenant absolument pas dans sa fabrication proprement dite.

Le travail de l'apiculteur consiste à fournir aux abeilles des conditions favorables, puis à récolter le miel, à s'assurer qu'il soit de bonne qualité et qu'il se conserve correctement (Lequet, 2010).

f.2. Les différents types des miels

Il existe une innombrable variété de miels, correspondant aux fleurs et plantes visitées par les abeilles, ainsi qu'à la source récoltée (nectar ou miellat). On peut ainsi séparer les miels en deux catégories :

- Les miels monofloraux ou unifloraux aussi appelés « miels de cru » qui proviennent de façon prédominante d'une seule espèce florale.
- Les miels polyfloraux ou « miels toutes fleurs » ou « miels mille fleurs » qui résultent de la récolte des abeilles sur plusieurs espèces florales (Clément, 2009). Les miels les plus employés pour une utilisation cutanée sont le miel de thym, le miel de lavande, le miel de châtaigner et le miel de manuka (*Leptospermum scoparium*).

f.3. Composition chimiques du miel

La composition chimique du miel est très complexe. En effet, elle est influencée par les nombreuses étapes de transformation de celui-ci et par des facteurs très variables, comme la température et la ventilation de la ruche, la nature de la flore visitée et celle du sol sur lequel pousse ces plantes, les conditions météorologiques lors de la miellée, la race des abeilles ou encore l'état physiologique de la colonie (www.01sante.com)

f.3.1. Les sucres

Les hydrates de carbone constituent la partie la plus importante du miel. Il s'agit en grande partie de monosaccharides (glucose et fructose), du saccharose, du maltose, et d'autres sucres présents à l'état de traces (erlose, mélézitose, isornaltose, nigérose, turanose, maltulose...) La présence de glucose et de fructose est le résultat de l'action d'une enzyme sur le saccharose: l'invertase. La présence des autres sucres semble dépendre des plantes qui ont été butinées.

f.3.2. L'eau

La teneur en eau est en moyenne de 17 %, mais le miel étant un produit biologique, ce chiffre peut fluctuer. Les abeilles ferment avec un opercule les alvéoles remplies de miel quand la teneur en eau avoisine les 17%. Il faut noter que certains miels de Bruyères peuvent contenir jusqu'à 22-25% d'eau.

f.3.3. Les acides

Le miel contient aussi des acides. Le plus important est l'acide gluconique mais on trouve aussi une vingtaine d'acides organiques, comme l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide lactique, l'acide malique, l'acide oxalique, l'acide butyrique, l'acide pyroglutamique et l'acide succinique. A

l'état de traces, le miel contient de l'acide formique, de l'acide chlorhydrique et de l'acide phosphorique. Les lactones participent également à l'acidité du miel.

f.3.4. Les oligo-éléments

Le miel est un aliment qui apporte de nombreux oligo-éléments qui sont indispensables à la santé de l'homme. Suivant leurs origines florales, les miels présentent des concentrations variables en oligo-éléments. Il est intéressant de constater que des miels de différentes saisons et de différentes origines géographiques se complètent; ainsi une consommation variée tout au long de l'année assure des apports intéressants en oligo-éléments. Potassium, phosphore, calcium, soufre, magnésium, manganèse, silicium, bore, fer, zinc, cuivre et baryum sont retrouvés en plus ou moins grande quantité dans le miel. Ces substances participent au bon fonctionnement de notre organisme.

Quelques rôles d'oligo-éléments dans l'organisme humain:

- Le potassium est un cation intracellulaire d'une grande importance puisqu'il est utilisé entre autre par les cellules du muscle cardiaque.
- Le phosphore entre dans la composition de l'adénosine triphosphate.
- Les ions calcium jouent un rôle dans les phénomènes liés à la coagulation du sang et à l'excitation neuromusculaire.
- Le soufre est un oxydant; il entre dans la composition de nombreuses molécules organiques intervenant dans de nombreux métabolismes. De plus, le miel facilite l'assimilation des oligo-éléments; en effet les travaux du Professeur (Bengsch 1997) ont montré que les oligo-éléments sont mieux assimilés par l'organisme lorsqu'ils sont dans du miel que lorsqu'on les consomme seuls.

f.3.5. Les protéines

Le miel est une substance assez pauvre en protides. On y trouve des peptones, des albumines, des globulines ainsi que des acides aminés comme la proline, l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'alanine, la cystéine...

f.3.6. Les enzymes

De nombreuses enzymes existent dans le miel: l'invertase, l' α -amylase, la β -amylase, l'oe-glucosidase, la glucose oxydase, une catalase et une phosphatase. Elles proviennent soit des nectars (origine végétale), soit des sécrétions salivaires des abeilles (origine animale). L'invertase est responsable de l'hydrolyse des disaccharides.

Les amylases transforment l'amidon en glucose.

La glucose-oxydase donne de l'acide gluconique et du peroxyde d'hydrogène à partir du glucose.

Ces enzymes étant thermolabiles, leur présence ou leur absence peut servir d'indicateur de surchauffe du miel.

f.3.7. Les vitamines

Le miel contient peu de vitamines. On y trouve essentiellement des vitamines du groupe B: vitamines B1, B2 B3 (appelée aussi PP), B4 et B5. Parfois on y trouve aussi de la vitamine C, ainsi que les vitamines A, Ket D.

f.3.8. Divers

Plusieurs facteurs antibiotiques naturels ont été trouvés dans le miel peroxyde d'hydrogène, flavonoïdes,

Le miel contient également des éléments figurés : grains de pollen, spores de champignons, algues microscopiques, levures, etc., dont l'identification sous le microscope permet d'obtenir des renseignements sur l'origine florale et géographique (analyse pollinique des miels ou méliisso-palynologie). L'étude microscopique du miel permet de lui attribuer une appellation: miel toutes fleurs, miel de lavande, de châtaignier.

Un miel n'est jamais issu à 100% du même type de fleur; on donne au miel le nom de l'espèce qui est majoritaire. Les pigments colorent et aromatisent les miels. Ce sont principalement des caroténoïdes, des xanthophylles et des flavonoïdes.

f.4. Propriété antibactérienne

Le miel a des propriétés antibactériennes connues depuis plus d'un siècle. Quoiqu'utilisé dans de nombreuses cultures depuis des millénaires, son efficacité avait été constatée sans reconnaissance de ses propriétés antibactériennes (Assie, 2004).

Le miel est un bactériostatique et bactéricide. Son activité est attribuée à l'osmolarité élevée, l'acidité et à la composition chimique (tel que le peroxyde d'hydrogène, les acides organiques, les substances volatiles, des composés phénoliques, de cire d'abeille, nectar, pollen et propolis).

Les variations dans le type et le niveau de l'activité antimicrobienne du miel sont associés à leur origines floral, l'emplacement géographique de la source florale, l'âge et la santé de la colonie (White, 1956; Bogdanov, 1997). L'activité antibactérienne du miel de nectar est plus influencée par la chaleur, de la lumière et le stockage que le miel de miellat (Bogdanov, 2009).

L'action antibactérienne du miel est déterminée par plusieurs facteurs et quatre d'entre eux sont mis en amont: l'osmolarité, le pH acide, la présence du système peroxyde d'hydrogène, la présence du système non-peroxyde.

f.5. Propriété anti-oxydante

De jour en jour la demande de produits naturels augmente pour une alimentation saine, à la fois en raison des effets négatifs possibles d'additifs alimentaires synthétiques sur la santé humaine et de la perception du consommateur accrue de ce problème au cours des dernières années

(Baltrušaitytė et *al.*, 2007; Ertürk et *al.*, 2014). Le miel est à la tête de la liste de ces types de produits naturels.

Selon des études récentes, les substances anti oxydantes disponibles dans diverses sources naturelles et les aliments peuvent effectivement représenter un moderne «fontaine de jouvence». Les preuves suggèrent que les vitamines C et E et le bêta-carotène, un précurseur de vitamine A, peut réduire le risque de certaines formes de cancer, les maladies cardiaques, accidents vasculaires cérébraux, et les cataractes et peut ralentir le processus de vieillissement.

III.5. Les étapes de la congélation

III.5.1. Equilibration

Consiste à mettre le sperme dans le réfrigérateur à 4°C avant la congélation, pour permettre au cryoprotecteur d'agir et de limiter le choc thermique pour les spz (Mocé et *al.*, 2003b).

III.5.2. Conditionnement

Son but est de fractionner la semence de façon à ce qu'elle soit facilement stockable, utilisable et identifiable (Decuadro- Hansen, 2004). Nothling et SHuttleworth en 2005 ont montré que la congélation en paillettes de 0.5 ml améliore le pourcentage de spz mobiles 60 minutes après décongélation et réduit le nombre des spz endommagés par rapport à des pailles de 0.25 ml. Dans les dernières années, les paillettes les plus couramment utilisés sont celles de 0,5 ou 0,25 ml (Mocé et vicente, 2009).

III.5.3. Congélation

Elle consiste à mettre les paillettes horizontalement à 2 -10 cm au dessus de l'azote liquide pendant 10 minutes (en vapeur de l'azote liquide), puis les plonger dans l'azote liquide (Mocé et *al.*, 2003a).

La congélation se fait, donc, en deux étapes: le refroidissement dans la vapeur d'azote liquide et l'immersion des paillettes dans l'azote liquide.

a. La vitesse de refroidissement

Elle joue rôle important pour la qualité des spermatozoïdes après décongélation. Si elle est lente, le sperme est amélioré (Chen et Foote, 1994), si elle est trop rapide, des changements irréversible seront notés sur les spermatozoïdes, suite à un choc thermique. Ces changements consistent en une diminution de la production d'énergie, une augmentation de la perméabilité membranaire, un mouvement circulaire et une perte de mobilité (Decuadro-Hansen, 2004). Plusieurs chercheurs ont montré que la diminution de la motilité des spermatozoïdes associée à des

taux de refroidissement plus rapides étaient dus à une baisse de la viabilité qui résulte de la congélation (**Liu et al., 2007**).

b. La position des paillettes

Il ya des auteurs qui disent que placer les paillettes horizontalement serait préférable que de les mettre verticalement, mais ils n'ont pas comparés les deux types de position (**Pena et Linde-Forsberg, 2000**).

III.5.4. Décongélation

C'est la dernière étape de la congélation, est une étape critique pour la survie, la mobilité et la capacité fécondante des spz cryoconservés. Une décongélation rapide est préférable afin de prévenir la possibilité de recristallisation des molécules d'eau pouvant être très dommageable pour la membrane (**Forthier, 2010**).

La décongélation consiste à mettre les paillettes dans un bain marie à 45°C pendant 10 secondes (**Mocé. et al., 2005**).

III.5.4.1. Les conditions de la congélation-décongélation

Le succès de la congélation dépend de :

a. La nature du sperme

Des différences dans la fertilité étaient observées entre les mâles, ce qui pourrait indiquer une différence dans la résistance des spermatozoïdes à la congélation-décongélation (**Mocé et al., 2005**).

b. La température

En ce qui concerne la température de stockage, elle est généralement entre 15 et 18°C, elle constitue un bon état de stockage des semences du lapin. Néanmoins, la température optimale peut dépendre de la dilution utilisée (**Boiti et al., 2005**).

Il ya d'autres chercheurs qui ont trouvé que les températures de décongélation jouent un rôle important dans la qualité de sperme après décongélation (**Mocé et al., 2003b**).

Selon **Liu et al (2012)** la réfrigération diminue la motilité des spermatozoïdes suite à une baisse de leur viabilité.

c. Dilution

Le taux de dilution joue un rôle important dans la survie des spz, le taux de dilution élevé (plus de 1/100) a un effet néfaste sur la motilité des spz (**Boiti et al., 2005**).

d. Incubation

Le sperme destiné à l'IA, nécessite de maintenir sa vitalité et sa capacité physiologique de fertilisation sur un intervalle de temps défini.

Le sperme doit être dilué ou bien les spermatozoïdes doivent être séparés et placés dans un milieu final. Pour la semence diluée ainsi que pour les spermatozoïdes qui sont dans le milieu, les conditions optimales doivent être assurées par la sélection des tampons adaptés aux organes de reproduction; l'incubateur « dioxyde de carbone (5%) maintient à long terme la vitalité des spermatozoïdes en réduisant leur contact avec l'oxygène (**Boitti et al., 2005**).

III.5.5. Protocole de la congélation chez le lapin

Le sperme du lapin présente quelques particularités qui devraient être tenues en compte pour étudier son protocole de conservation (**Holt, 2000**).

De façon générale, la congélation du sperme du lapin comprend les étapes suivantes décrites par **Strazinger** en 1971:

- 1-Taux de dilution 1/4.
- 2-Le refroidissement à 5 ° C pendant environ 3 heures.
- 3-Ajout de glycérol 6% 30 minutes avant de les congeler.
- 4- Emballage du sperme dilué dans des paillettes en plastique et les faire refroidir.
- 5- Congélation dans la vapeur d'azote pendant 6 à10 min, puis Stockage dans l'azote liquide.
- 7-La décongélation est effectuée pendant 20 secondes à l'aide d'une solution de décongélation à 37 C°.

III.5.6. Les différents protocoles de la congélation du sperme de lapin

La congélation du sperme de lapin est un obstacle principal à la diffusion à grande échelle de l'insémination artificielle, car le sperme de lapin est moins sensible à la réfrigération (30-0°C) mais il est très sensible à la congélation (**Castellini et al., 1992**).

En 1986, **Parrish et Foote** ont étudié la fertilité du sperme de lapin réfrigéré à 5°C et du sperme congelé-décongelé, avec l'utilisation de différents traitements (13,3% de jaune d'œuf et un cryoprotecteurs acétamide 0,667M). Ils ont remarqué que la fertilité du sperme réfrigéré à 5°C n'est pas affectée par rapport à la fertilité du sperme frais. Par contre pour le sperme congelé-décongelé, la fertilité est réduite à 20%. La survie et la capacitation du sperme congelé jouent un rôle dans sa fertilité, cependant malgré tous les efforts qui ont été fournis, cette fertilité reste encore réduite.

Les amides ont été utilisés comme des agents cryoprotecteurs diminuant les dommages des spermatozoïdes lors de la congélation et du stockage.

La mobilité des spermatozoïdes n'est élevée que lors de l'utilisation combinée de DMSO avec le glycérol (**Chen et al., 1989**).

En **2011**, **Serin** et ces collaborateurs ont étudié l'effet du prétraitement des cellules spermatiques du lapin avec différentes concentrations de cholestérol chargé dans les cyclodextrines, notamment sur l'occurrence de réaction acrosomiale au bout de 72h déstockage. Ils ont constaté que le cholestérol empêche la réaction acrosomique prématurée des spermatozoïdes du lapin.

En **2012**, **Safaa** et ses collaborateurs ont étudiés l'effet de différents dilueurs de décongélation sur la qualité du sperme, la fertilité et la prolificité dans 2 lignées d lapin. Il sont utilisé trois différents milieux de dilution:

1-3 M DMSO +0,1 M saccharose;

2-Tris à base de : 0,25 M tris +3,0 DMSO +20% jaune d'œuf;

3-2 M acétamide +20% jaune d'œuf;

Aux quels ils ont ajouté le sperme à raison de V:V pour remplir les paillettes à Congeler; ces dernières sont d'abord refroidis à 5°C pendant 45mn, mises horizontalement à la vapeur d'azote liquide pendant 10 min.

Ils ont obtenu une meilleur fertilité et prolificité avec les dilueurs 1 et 2.

PARTIE
EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODE

IV.1.Objectif :

L'objectif de notre travail est de tester l'effet d'une supplémentation du dilueur (tris buffer) de la semence du lapin par le miel d'euphorbe Algérien à différentes concentrations sur la conservation du sperme à température ambiante (22°C), en suivant la motilité massale et individuelle ainsi que la viabilité des spermatozoïdes après dilution 24 et 48h.

MATERIEL ET METHODES**IV.2.Lieu et période de travail :**

Notre étude s'est déroulée au niveau du laboratoire d'hygiène et de pathologie infectieuse ainsi que le laboratoire de la reproduction des animaux de la ferme (ITMA) université de Tiaret, durant le mois de septembre 2020.

IV.3.Les lapins utilisés et les conditions d'élevage :

Dans cette étude on a utilisé trois lapin males et deux femelles de la race local .La moyenne d'âge des males reproducteurs est de 08 mois, leurs poids varie entre 2.5kg et 3.2 kg élever dans des bonnes conditions d'élevage , les males reproducteurs sont placés dans des cages individuelles mesurant 70cm de longueur sur 40cm de largeur et 30cm de hauteur. Les femelles sont logés dans une maternité, des cages grillagées individuelle dont les mêmes dimensions que celles des mâle set munies avec des Boites à nids.

IV.3.1.Alimentation et abreuvement

Les animaux étaient nourris à la base d'aliment granulé distribué chaque matin en raison de 100 g dans des trémies métalliques qui équipent chacune des cages d'élevage cet aliment granulé est fabriqué à base de maïs , de tourteaux de soja, de luzerne ,de son, de phosphate bi calcique et de CMV spéciale lapin.



Figure 9: aliment granulé pour lapin

L'eau distribuée aux lapins provient du réseau local d'eau potable. Elle est disponible en permanence grâce à un système de conduit en PVC munis de tétines automatiques. Des bacs en plastique raccordés au système d'abreuvement sont remplis quotidiennement.



Figure 10: système d'abreuvement du lapin

IV.4. Préparation des vagins artificiels et des tubes de collecte

IV.4.1. Matériel :

Le matériel utilisé pour la collecte de la semence fraîche est :

- Une seringue.
- De l'eau chaude ($\approx 50\text{ C}^\circ$)
- Un lubrifiant non spermicide et
- Un vagin artificiel.



Figure 11 : Différents constituants du vagin artificiel

IV.4.2.Préparation du vagin artificiel

A l'aide d'une gaine nous avons introduit la capote dans le vagin la petite extrémité était repliée sur le vagin du côté de la petite ouverture. La grande extrémité était repliée du côté de la grande ouverture, à l'aide d'une seringue, nous avons injecté de l'eau chaude ($\approx 50^{\circ}\text{C}$) dans la cavité formée entre le vagin et la capote puis on a fermé le vagin avec le bouchon. A la fin nous avons placé le tube de récolte sur le vagin dans sa petite ouverture et à l'aide de lubrifiant on a lubrifié la grande ouverture .



Figure 12 : les étapes de préparation du vagin artificiel.

IV.4.2.3.Technique de collecte :

Après avoir préparé le vagin artificiel et maintenu à une température de 39°C dans une étuve, nous avons introduit une lapine dans la cage du mâle pour lui servir de leurre. Au moment où le mâle tentait de s'accoupler avec la femelle, nous avons inséré rapidement le vagin artificiel de façon que le pénis entre dans la grande extrémité et donc l'éjaculation se produisait, Par la suite le mâle se laissait glisser à côté de la lapine en émettant un cri et y restait quelques secondes allongé.



Figure 13 : Technique de récolte du sperme chez le lapin.

IV.5.L'analyse du sperme

Dès que la collecte est terminée, la température de la semence est maintenue à 37°C en mettant le tube de collecte dans un bain-marie réglé à 37°C ,ou en le tenant dans la paume de la main pendant toute l'analyse ,Nous avons commencés par l'analyse macroscopique du sperme. Nous avons noté sa couleur, son volume et son PH puis l'analyse microscopique en utilisant un microscope optique, pour la recherche de la motilité massale, la motilité individuelle, et la viabilité des spermatozoïdes.

IV.5.1.Analyse macroscopique

Méthode

Directement après la collecte, nous avons analysé la **Couleur** par observation à l'œil nu, le **volume** en lisant directement sur le tube de collecte gradué et le pH par un papier-PH (bandelette pH).

IV.5.1.1.Couleur :

La couleur est déterminée par observation de la semence dans le tube de collecte transparent.

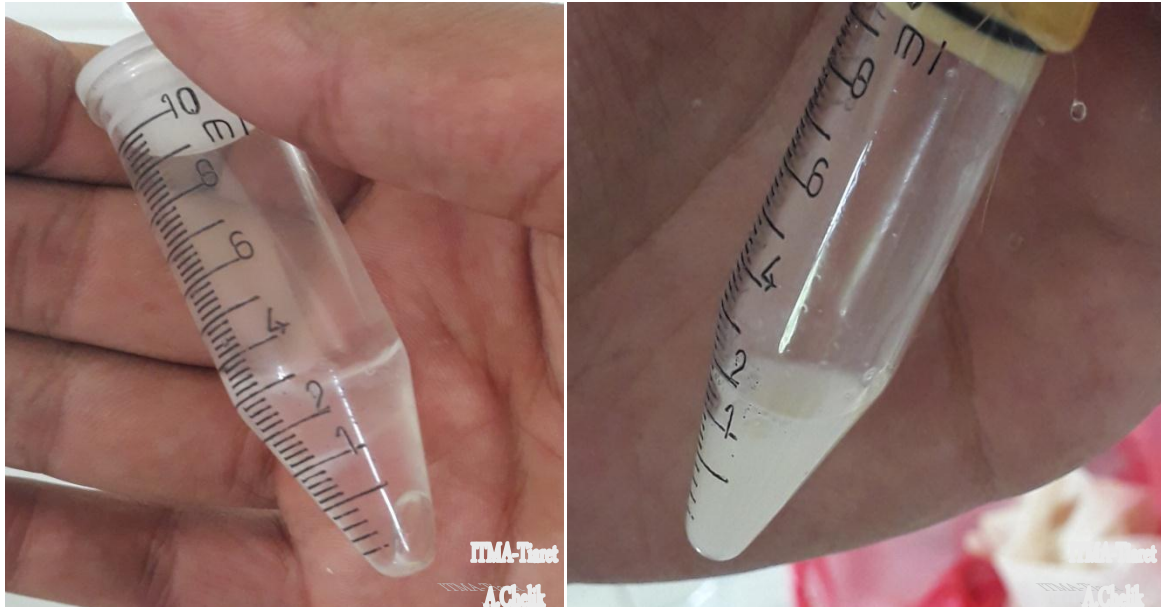


Figure 14 : les couleurs de la semence

IV.5.1.2. Volume :

Le volume total de l'éjaculat recueilli est mesuré par lecture sur le tube gradué servant à la collecte. Si le sperme recueilli contient du gel, ce dernier est éliminé à l'aide d'une pipette pasteur ou une pince préalablement chauffée à la vapeur 37°C et refroidi à la température corporelle afin d'éviter tout choc thermique pouvant altérer la semence. Nous avons procédé à un contrôle de volume de la semence avec le gel et le volume sans gel.

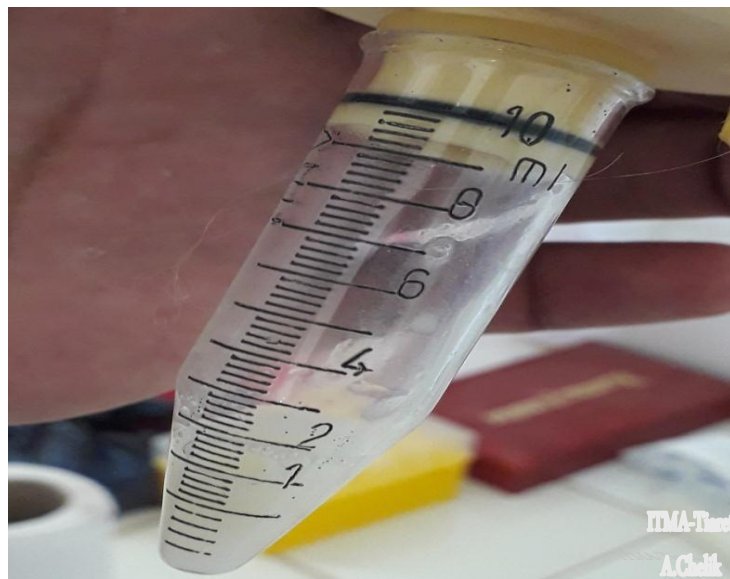


Figure 15 : mesure de volume d'éjaculat par un tube gradué

IV.5.1.3.PH :

Le ph de la semence est mesuré à l'aide d'un papier ph



Figure 16 : bandelette à pH

IV.5.2.L'analyse microscopique**a. Matériel**

Nous avons utilisé pour l'analyse microscopique du sperme le matériel suivant

- Des lames
- Des lamelles
- Des tubes
- Des micropipettes variant de 10 μ l à 200 μ l et 1000 μ l.



Figure 17 : matériel d'analyse microscopique

b .Les solutions

Nous avons utilisé dans notre étude des solutions que nous avons préparées nous-mêmes ;

1-Le tris buffer préparé à base:

- ❖ Du tris (hydroxyméthylaminométhane): 3,028g
- ❖ De l'Acide-citrique: 1.250g
- ❖ Du D-glucose: 1.675g
- ❖ De l'Eau distillé : 100ml



Figure 18 : préparation du dilueur tris buffer

2-Les colorants: éosine-nigrosine contenant :

*Éosine 1%

*Nigrosine10%

3-le miel d'euphorbe

IV.5.3.La préparation des concentrations de miel :

Ces solutions sont préparées comme suit :On a préparé une solution au 1/10^{ème} par l'addition de 1ml de miel d'euphorbe a 9 ml d'eau distillée pour obtenir une solution a 10 %. A partir de cette solution on a préparé les concentration suivantes 1%,3% et 5% par l'ajout de 0.5 ml de la solution a 10% a 4.5 ml d'eau distillée, 01.5 ml avec 03.5ml d'eau distillée, 02.5 ml avec 02.5 ml d'eau distillée respectivement.



Figure 19 : préparation des dilueurs du miel

Motilité massale

La motilité massale est le mouvement d'ensemble des spermatozoïdes. Cette dernière est estimée directement après la collecte par observation d'une goutte de sperme déposée sur une lame sous microscope optique au grossissement X10. Une note est attribuée selon l'échelle de **Petitejean (1965)** de 0 à 9.

Tableau 4: Echelle utilisé pour déterminer la MM d'après PETITJEAN H, 1965.

Note	Description
0	-Pas de spermatozoïdes.
1	-Spermatozoïdes immobiles.
2	-Quelques spermatozoïdes agités, oscillants surplace.
3	-Beaucoup de spermatozoïdes agités sans déplacement notable.
4	-Quelques spermatozoïdes immobiles, quelques spermatozoïdes surplaces, quelques spermatozoïdes mobiles.
5	-Comme(4) mais plus de spermatozoïdes mobiles, mobilité assez bonne mais pas homogène.
6	-La quasi-totalité des spermatozoïdes se déplacent, motilité bonne et homogène.
7	-Comme (6) avec amorce de mouvements de vagues.
8	-Comme (7) avec mouvement de vagues lentes.
9	-Vagues énergétiques, aspect de tourbillons, motilités excellente.

Motilité individuelle

La motilité individuelle est le mouvement de chaque spermatozoïde. Pour estimer cette motilité nous avons suivi les étapes suivantes :

- Déposer une goutte de sperme dilué entre lame et lamelle.
- Observer sous microscope optique la motilité au grossissement X40.
- Donner une note selon l'échelle d'ADIEU de 0 à 4.

Tableau 5 : Echelle utilisé pour déterminer la MI d'après ADRIEU., 1974.

Note	Description
0	-Spermatozoïdes immobiles.
1	-Les spermatozoïdes ont des mouvements de flagelles sans déplacement.
2	-Les spermatozoïdes se déplacent lentement, les mouvements circulaires dominant.
3	-Les spermatozoïdes ont des mouvements heurtés, leurs déplacements s'effectuent le long d'une hélice de diamètres sensiblement égale à leur longueur.
4	-Les spermatozoïdes se déplacent rapidement le long d'une hélice de faible.

Viabilité

La viabilité est le pourcentage des spermatozoïdes vivants, nous l'avons estimé par observation sous microscope d'un frottis réalisé après la coloration à l'éosine-nigrosine suscité. Les spermatozoïdes colorés en rose sont morts tandis que les spermatozoïdes incolores sont vivants. Pour calculer les pourcentages, nous avons appliqué la formule de **Boussit D.,(1989)**.

Nombre total des spermatozoïdes (200) \longrightarrow 100%

Nombre des spz vivants \longrightarrow % des spz vivants

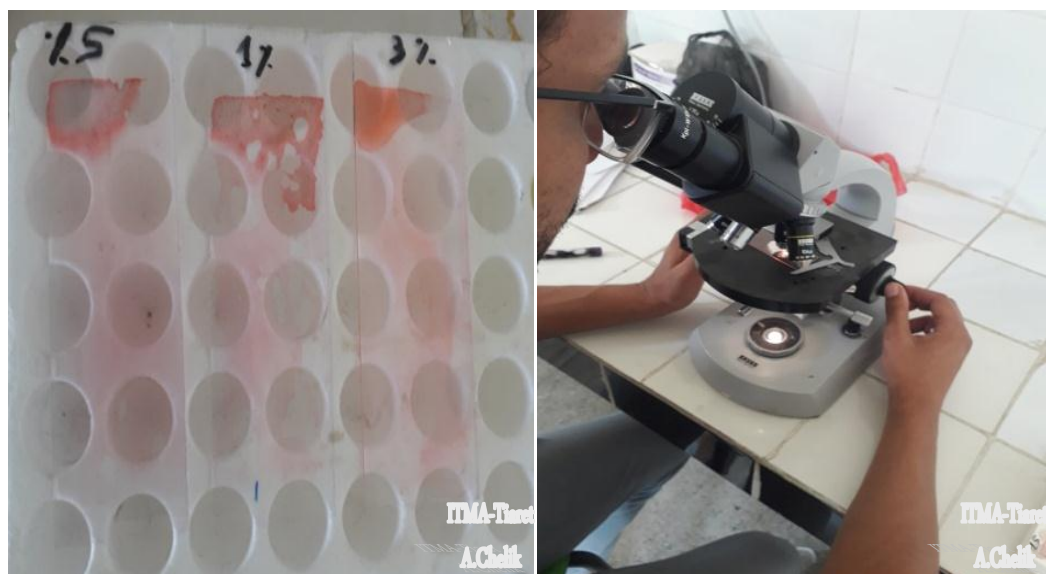


Figure 20: observation sous microscope d'un frottis réalisé après coloration à l'éosine-nigrosine

CHAPITRE V :

RESULTATS

V.1. Analyse macroscopique :

Les caractéristiques macroscopiques de chaque prélèvement sont révélées dans le tableau comme suit :

Tableau 6:caractères macroscopiques du sperme des lapins étudiés

	couleur	volume
1 ^{er} prélèvement	Blanc nacré	02.3ml
2 ^{ème} prélèvement	Transparent	02.5ml
3 ^{ème} prélèvement	Blanc nacré	02ml
4 ^{ème} prélèvement	Transparent	0.5ml
5 ^{ème} prélèvement	Blanc nacré	01 ml

Nous avons prélevé 5 échantillons des 3 lapins, ces prélèvements présentés des couleurs et des volumes différents, le 1er et le 3ème prélèvement présentés une couleur blanche nacré ainsi que le 2ème et le 4ème prélèvement présentés une couleur transparente, donc nous avons écarté ces deux échantillons qui ne présentés que du gel ,le 5ème prélèvement est de couleur blanchâtre, donc on à choisi 3 prélèvements sur 5 pour cette étude .

Tableau 7:les valeurs et les moyennes d'analyse micro et macroscopique de la semence

paramètres	volume	PH	motilité massale	motilité individuelle
1er prélèvement	2,3	7,5	5	3
2ème prélèvements	2	8	7	4
3ème prélèvements	1	8	9	4
moyenne	1,77	7,83	7,00	3,67
écart type	0,68	0,29	2,00	0,58
min	1	7,5	5	3
max	2,3	8	9	4

La valeur du volume des trois échantillons varie entre 01 et 02,3 ml, où le volume du premier prélèvement était de 02,3 ml et le volume du deuxième prélèvement était de 02 ml, tandis que

Le troisième prélèvement présenté un volume de 1 ml, la moyenne des 3 prélèvements est de 1,77 ml.

Les valeurs du pH oscillent entre 7.5 et 8, avec une moyenne de 7.5 pour les 3 prélèvements.

V.2. Analyse microscopique

V.2.1. La Mobilité

La moyenne de la motilité massale dans les semences que nous avons analysées sur le microscope est de 07 selon l'échelle de PITTJEAN 1965.

La moyenne de la motilité individuelle des semences que nous avons analysés est de 3.47 selon l'échelle de ADRIEU., 1974.

La totalité des spermatozoïdes présentés des mouvements par vague avec une bonne motilité et une homogénéité.

Les déplacements sont importants et des mouvements rapides des spermatozoïdes sont observés ; ils présentent une motilité excellente avec absence des pzs immobiles.

Tableau 8 : valeurs et moyennes de motilité massale et individuelle de la semence témoin.

	0h		24h		48h	
	Motilité massale	Motilité individuelle	Motilité massale	Motilité individuelle	Motilité massale	Motilité individuelle
Témoin						
1^{er} prélèvement	5	3	1	0	1	0
2^{ème} prélèvements	5	3	1	0	1	0
3^{ème} prélèvements	9	4	2	0	1	0
moyenne	6,33	3,33	1,33	0,00	1,00	0,00
écart type	1,89	0,47	0,47	0,00	0,00	0,00
maximum	9	4	2	0	1	0
minimum	5,00	3,00	1,00	0,00	1,00	0,00

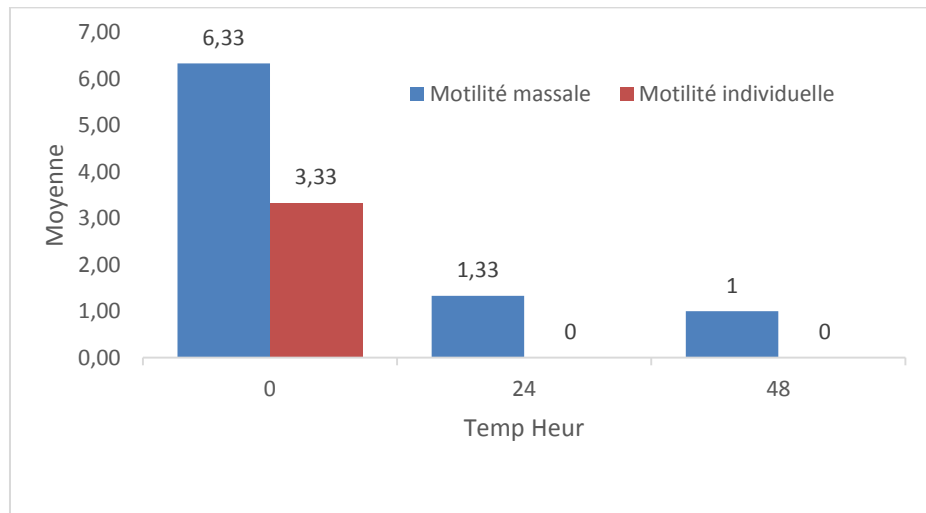


Figure 21: histogramme des moyennes de la motilité massale et individuelle de la semence Témoin

Le tableau et l’histogramme montre la motilité massale et individuelle des semence témoin ou on a noté une bonne motilité massale et individuelle à 0h juste après la récolte avec une moyenne égale à 6,33 et 3,33 respectivement La moyenne de cette motilité après 24h et 48h a montré une chute drastique pour atteindre des moyennes de 1,33 et 1 pour la motilité massale et 0 pour la motilité individuelle respectivement.

Tableau 9 : valeur et moyenne de la motilité massale et individuelle de la semence a concentration 1 % du miel

	0h		24h		48h	
	Motilité massale	Motilité individuelle	Motilité massale	Motilité individuelle	Motilité massale	Motilité individuelle
1%						
1 er prélèvement	6	2	2	1	1	0
2ème prélèvements	6	3	4	2	2	1
3ème prélèvements	6	3	4	2	1	0
moyenne	6,00	2,67	3,33	1,67	1,33	0,33
écart type	0,00	0,47	0,94	0,47	0,47	0,47
maximum	6	3	4	2	2	1
minimum	6,00	2,00	2,00	1,00	1,00	0,00

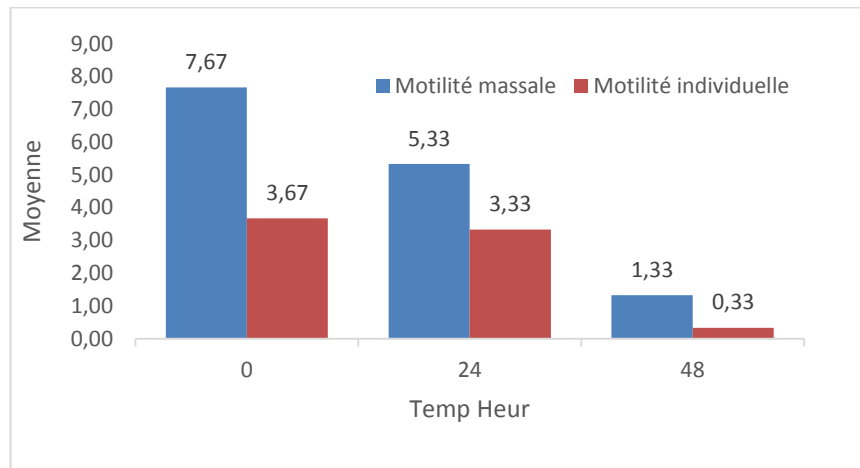


Figure 22 : histogramme des moyennes de la motilité massale et individuelle de la semence à la concentration 1% du miel.

Le tableau et l'histogramme montre la motilité massale et individuelle des semences à la concentration 1% de miel d'euphorbe algérien, on a noté une bonne motilité massale et individuelle à 0h juste après la récolte avec une moyenne égale à 7 et 4,67 respectivement. La moyenne de cette motilité après 24h a montré une légère diminution avec une moyenne égale à 5 et 3 respectivement, après 48h cette dernière a chuté pour atteindre des moyennes de 2,67 1,33 de motilité massale et individuelle respectivement.

Tableau 10: valeur et moyenne de la motilité massale et individuelle de la semence à concentration 3 % du miel

	0h		24h		48h	
	Motilité massale	Motilité individuelle	Motilité massale	Motilité individuelle	Motilité massale	Motilité individuelle
3%						
1^{er} prélèvement	7	3	5	3	1	0
2^{ème} prélèvements	7	4	5	3	2	1
3^{ème} prélèvements	9	4	6	4	1	0
moyenne	7,67	3,67	5,33	3,33	1,33	0,33
écart type	0,94	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47
maximum	9	4	6	4	2	1
minimum	7,00	3,00	5,00	3,00	1,00	0,00

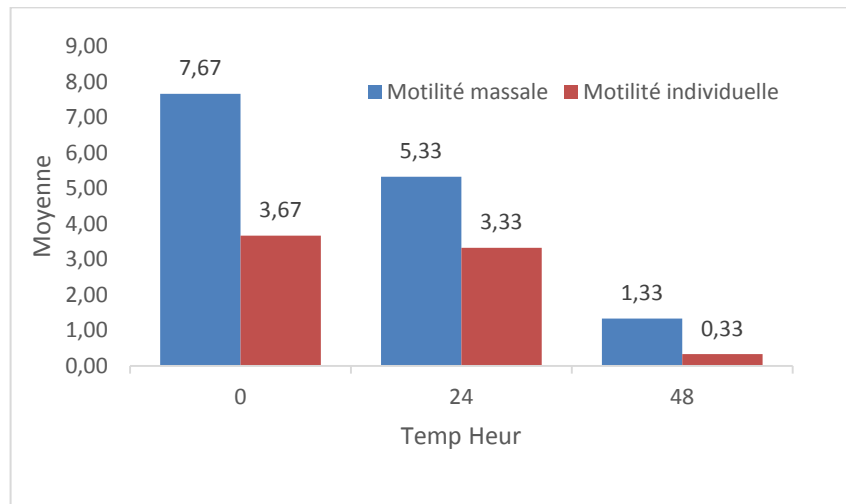


Figure 23: histogramme du moyenne de la motilité massale et individuelle de la semence a concentration 3% du miel.

Le tableau et l’histogramme montre la motilité massale et individuelle des semence a la concentration 3% de miel d’euphorbe algérien, on a noté une bonne motilité massale et individuelle à 0h juste après la récolte avec une moyenne égale à 7,67 et 3,67 respectivement La moyenne de cette mobilité après 24h a montré une légère diminution avec une moyenne égale à 5,33 et 3,33 respectivement, après 48h cette dernière a chuté pour atteindre des moyenne de 1,33 0,33 de motilité massale et individuelle respectivement .

Tableau 11: valeur et moyenne de la motilité massale et individuelle de la semence à concentration 5 % du miel

	0h		24h		48h	
5%	Motilité massale	Motilité individuelle	Motilité massale	Motilité individuelle	Motilité massale	Motilité individuelle
1 er prélèvement	5	6	4	2	1	0
2ème prélèvements	7	4	5	3	5	3
3ème prélèvements	9	4	6	4	2	1
moyenne	7,00	4,67	5,00	3,00	2,67	1,33
écart type	1,63	0,94	0,82	0,82	1,70	1,25
maximum	9	6	6	4	5	3
minimum	5,00	4,00	4,00	2,00	1,00	0,00

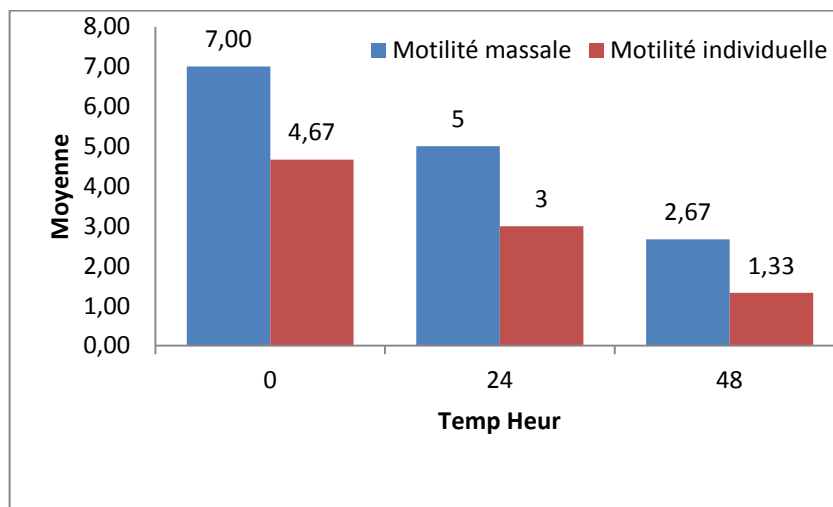


Figure 24: histogramme des moyennes de la motilité massale et individuelle de la semence a concentration 5% du miel.

Le tableau et l’histogramme montre la motilité massale et individuelle des semence a la concentration 5% de miel d’euphorbe algérien, on a noté une bonne motilité massale et individuelle à 0h juste après la récolte avec une moyenne égale à 7 et 4,67 respectivement La moyenne de cette mobilité après 24h a montré une légère diminution avec une moyenne égale à 5 et 3 respectivement, après 48h cette dernière a chuté pour atteindre des moyenne de 2,67, 1,33 de motilité massale et individuelle respectivement .

Tableau 12 : valeur et moyenne de viabilité des 3 prélèvements de différent concentration.

viabilité	1 ^{er} prélèvement		2 ^{ème} prélèvements		3 ^{ème} prélèvements	
	mort	vivant	mort	vivant	mort	vivant
T	78%	22%	73%	27%	30%	70%
1%	62%	28%	73%	27%	41%	59%
3%	73%	27%	68%	32%	28%	72%
5%	15%	85%	85%	15%	55%	45%
moyenne	57%	41%	75%	25%	39%	62%

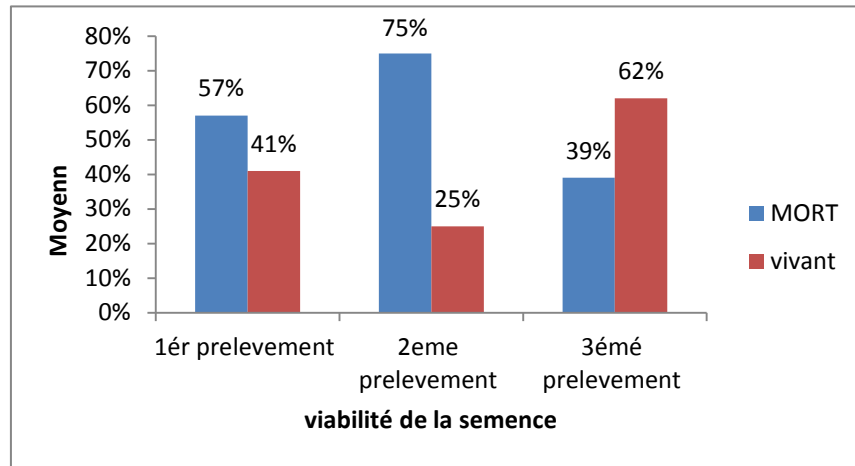


Figure 25 : histogramme des moyennes de viabilité des semences analysés.

V.2.2.La viabilité :

Le tableau et l'histogramme montre la moyenne de la viabilité des différents prélèvements de semence le premier prélèvement à montrés une 57% de spermatozoïdes vivant et 41% de morts le deuxième prélèvement a montré des valeurs de viabilité égale a 75% de spermatozoïdes vivant et 25% de spermatozoïdes morts, le troisième prélèvement à montré une 39% de spermatozoïdes vivant et 62% de spermatozoïdes morts.

DISCUSSION

Discussion**Pourquoi utiliser le miel dans la conservation du sperme :**

D'un point de vue physique, le miel ne gèlera pas à des températures très basses. La viscosité du miel augmente et deviendra épaisse et se condensera avec la diminution de la température. Le miel a une transition vitreuse comprise entre **-42 et -51 ° C**. En dessous de cette température, le miel entre dans un état vitreux et deviendra un solide amorphe (non cristallin) et empêchera la formation de cristaux de glace (**Kantor. Z et al, 1999**). En outre, le miel possède des propriétés chimiques uniques dans la mesure où il contient un mélange de **25** sucres représentant environ **95% - 97%** de sa matière sèche (principalement du fructose et du glucose). Outre les saccharides, de nombreuses autres substances bioactives, telles que des acides organiques, des enzymes, des antioxydants et des vitamines, sont présentes dans le miel (**Bogdanov S et al, 2008**). Une telle composition produit divers effets nutritionnels, biologiques et pharmacologiques sur les cellules vivantes, à savoir des activités antimicrobiennes (antivirales, antifongiques et antibactériennes), antioxydantes et antitoxines, anti-inflammatoires, antimutagènes (**Bogdanov S et al, 2008 ; Manyi-Loh CE et al, 2011**). Le fructose et le glucose agissent comme des cryoprotecteurs extracellulaires non pénétrants en raison de leur poids moléculaire élevé et maintiennent l'équilibre osmotique (**Meryman HT, 1971**). De plus, les sucres constituent la principale source d'énergie dont les spermatozoïdes ont besoin pour développer leurs processus métaboliques (**Gil L et al, 2010**). De nos jours, il existe des preuves des effets antioxydants du miel (**Orsolich N et al, 2007 ; Aljady AM et al, 2000**). Les flavonoïdes du miel d'abeille possèdent une activité de balayage des radicaux libres, inhibant ainsi les dommages de l'ADN induit par ces derniers (**Chen CH et al, 2014**). Des études portant sur différentes espèces : bovines (**El-Sheshtawy et al. 2014**), ovines (**Jerez-Ebenspergera RA et al, 2015 ; Jerez-Ebenspergera RA, 2015b**), caprines (**Olayemi et al. 2011**), carpes communes (**Ogretmen F et al, 2014**) et humaines (**Fakhrildin MB et al., 2014**), ont permis de déterminer les propriétés antioxydantes du miel lors de la cryoconservation des spermatozoïdes.

Les scientifiques s'efforcent actuellement de trouver une alternative aux antibiotiques pour enrayer l'utilisation des antibiotiques dans les agents de cryoconservation du sperme. Le miel, un produit d'origine naturelle, possède une activité antibactérienne puissante (**Zoheir et al., 2015**) et constitue une bonne source d'énergie pour les spermatozoïdes en raison de la présence de glucose et de fructose (**Al-Waili., 2004**). Les microorganismes présents dans le sperme réduisent la motilité, la longévité et l'intégrité acrosomique des spermatozoïdes en concurrençant directement les spermatozoïdes avec des nutriments ou en produisant des produits toxiques (**Catry et al., 2010; Morrell et Wallgren, 2014**). Alors que les résultats obtenus par (**Banday, M.N, 2017**) n'ont pas

pu être comparés faute de littérature sur cet aspect, où il a conclu que le miel ne pouvait pas être utilisé comme alternative aux antibiotiques dans les milieux de cryoconservations de sperme de béliers mais qui peut être utilisé comme source d'énergie à une concentration supérieure à **2,5%**.

La motilité, la vitalité, la morphologie et l'intégrité du cytoplasme et la membrane acrosomique sont des paramètres de la fonction spermatique directement liés à la capacité de fécondation, modifiés par la conservation à moyen et long terme. Dans cette étude, on a trouvé une diminution de la motilité progressive observée entre 0, 24 et 48 heures après la conservation du sperme de lapins aux différentes concentrations de miel d'euphorbe. Des études antérieures ont montré un effet protecteur fourni par le jaune d'œuf sur ce paramètre chez plusieurs espèces (**Crespilho et al., 2014; Alli et al., 2015; Sánchez et al., 2006**). Concernant la motilité massale, la motilité individuelle et la vitalité, il y avait une différence significative dans le temps de conservation entre les différentes concentrations de miel par rapport au témoin. **Rosato et coll. (2006)** ont rapporté une vitalité de 65% chez les spermatozoïdes de lapin réfrigérés en utilisant un dilueur commercial (Lepus) après 24 heures de réfrigération, après un résultat inférieur par rapport aux deux dilueurs utilisés dans cette étude (TEY $79 \pm 10,91$ % et TSM $75,57 \pm 11,87$ %). Les résultats obtenus dans cette étude avec le dilueur Tris buffer (témoin) sont inférieurs à ceux obtenus avec le même dilueur supplémenté par différentes concentrations de miel d'euphorbe et cette différence est plus marquée dans la concentration 3%.

Les résultats de la présente étude sont aussi en accord étroit avec l'étude de **El-Nattat et al., 2016** qui ont également obtenu une meilleure motilité et une meilleure viabilité des spermatozoïdes après décongélation avec un taux de miel de **2%, contre 3%, 4% et 5%**. **El-Sheshtawy et al., 2014** ont également signalé une amélioration de la motilité des spermatozoïdes et du nombre de spermatozoïdes vivants à **1%** pour le sperme de taureau cryoconservé et à **3%** pour le sperme de taureau refroidi et autres. Les résultats de (**Mohamed Mahmoud et al, 2017**), ont montré que l'impact primordial du miel sur les agents de dilution et de cryoconservation du sperme était de soutenir la motilité des spermatozoïdes réfrigérés de buffle. L'effet d'incorporation de miel était évident dans le dilueur, au moment où il entre en contact avec le sperme (**0 h**) et par la suite. L'addition de **2%** de miel était associée au taux de motilité le plus élevé **1, 2 et 4 h** après le refroidissement. Le miel est un mélange de sucres (fructose ~ **38,5%** et glucose ~ **31,0%**) et d'autres composés.

Nos résultats confirment et affirment que la supplémentation du dilueur par le miel d'euphorbe augmente et améliore la motilité et la viabilité après une conservation à température ambiante par rapport au témoin du sperme de lapin. Néanmoins, les études ultérieures devraient

envisager des facteurs directement liés aux paramètres évalués dans cette étude. Des facteurs tels que la race, la saisonnalité de la reproduction, la lignée génétique, l'état physiologique, ainsi que dans l'étude des différents composants du dilueur de conservation. Dans le but d'améliorer le maintien et la fonctionnalité de la cellule spermatique, en plus de préserver le potentiel de fécondation des spermatozoïdes, sous des protocoles de réfrigération ou de congélation.

CONCLUSION

Conclusion

La tolérance du sperme de lapin à la conservation à température ambiante (22 °C) de 0 , 24 et 48 heures, mesurée en termes des paramètres de base de la qualité spermatique (motilité, vitalité) par le dilueur Tris buffer supplémenté par différentes concentration de miel d'euphorbe montre un meilleur comportement en ce qui concerne le maintien des paramètres spermatique motilité massale, individuelle et vitalité, en particulier la concentration 3% sur la base des résultats obtenus dans cette étude, il est conseillé d'utiliser du miel d'euphorbe comme principal composant du dilueur de conservation pour les doses de sperme de lapin conserve à 0,24,et 48 heures.

PERSPECTIVES ET RECOMMAANDATION

Perspectives et recommandations

Les résultats que nous avons obtenus dans notre étude ouvrent des perspectives intéressantes, elles nous ont laissé penser à :

- ❖ Augmenter l'effectif de travail (le nombre des lapins et des éjaculats utilisés pour chacun d'entre eux).
- ❖ Approfondir les examens utilisés (système CASA) et élargir les paramètres d'évaluation de la semence pour l'obtention de résultats de plus en plus objectives et précises.
- ❖ Essayer d'inséminer des lapine avec ces semences pour savoir l'effet in vivo et calculé la fertilité.
- ❖ Tester d'autres types et d'autres concentrations de miel et vérification de son effet avec d'autres dilueurs de congélation pour lapin.
- ❖ Une comparaison de notre milieu de dilution avec d'autres milieux de dilution commercialisés pour mieux juger son effet sur les paramètres de sperme de lapin.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Allen R.G. et Tresini M., 2000, Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic.Biol.Med* 28, 463-499.

Al-Waili, NS 2004. Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J. Med. Food.* 7: 210-222.

Al Nasassrah M., 1998, The effect of an increase in chain length on the mechanical properties of polyethylene glycols, *Europ. J. Pharm. Biopharm.* 46: p 31-38

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

Althouse G.C., Kuster C., Clark S.G, Weisiger R.M, 2000, Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, 53, 1167, 1176

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.

Ana Martins-Bessa, Anto´nio Rocha , A. Mayenco-Aguirre, 2006, Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders, *Theriogenology* 66 ,2047–2055.

Anonyme, International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI), *The International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook*, 11th Edition, CTFA, Washington DC, 2006.

ARAOUDIOU et AIT SAÏD thèse 2018 , Etude des Caractéristiques de la semence des lapins de la souche synthétique dans un élevage de Tizirt.

Arriola J. et Foote R. H., 2001, Accessory Sperm as an Indication of Fertilizing Ability of Rabbit Spermatozoa Frozen in Egg Yolk–Acetamide With Detergent.

Assie, B., 2004. Le miel comme agent cicatrisant. Thèse d'exercice en médecine «Qualification Médecine Générale ». Université Paul Sabatier de Toulouse, 115 p.

Baril G., Chemineau P., Cognie Y.,Leboeuf B.,orgeur P., Vallet J-C., 1993. Manuel de formation our l'insémination artificielle.

Barone R., 1984. Anatomie comparée des mammifères domestiques, Tome 3, Splanchnologie 1, Appareil digestif, Appareil respiratoire, Vigot Eds, Paris, France, 879 pp.

Barkok A., 1992. Quelques aspects de l'élevage du lapin au Maroc. *Options Méditerranéennes. Séries Séminaires*. N°17, 19-22.

Références bibliographiques

Béguel J.P., 2012, Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, Thèse: Université de Bretagne occidentale

Billard R, Legendre M, 1980, cryoconservation du sperme de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* R.).

Bidanel et al., 2003, Apport des nouvelles biotechnologies aux programmes d'amélioration génétique du porc 2003. Journées Recherche Porcine, 35, 355-368.

Boiti C, Castellini C, Theau-Clément M, Besenfelder, Liguori L., Renieri T. et Pizz F, 2005, Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen, world rabbit sci., 13: 71-91.

Boussit D (1989) Reproduction et insémination artificiel en cuniculture. Assoc Fr cuniculture. Lempdes Frans 234p.

Banday, M. N.; Lone, F. A.; Rasool, F.; Rather, H. A. and Rather, M.A, 2017. Article: Does natural honey act as an alternative to antibiotics in the semen extender for cryopreservation of crossbred ram semen?

Ben Cheikh N 1993 Production de sperme et fertilité du lapin mâle *Oryctolagus cuniculus* : Effet de la fréquence de collecte et du type génétique. Thèse d'état, Ecole Nationale Agronomique de Toulouse. 142p .

Bencheick, 1995. Effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoïdes récoltés chez le lapin ; Ann.zootech.44,263-279p.

Bogdanov, S., Martin, P., Lullman, C., Borneck ,R., Morlot, M., Heritier J., Vorwol, G., Russmann, H., Persano-Oddo, L., Sabatini A. G., Marcazzan, G. L., Marioleas, P., Tsigouri, A., Kerkvliet, J., Ortiz, A. and Ivanov T. (1997). Harmonised Methods of the European Honey commission. Apidologie (extra issue), 1-59

Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. 2008. Honey for nutrition and health: a review. J Am Coll Nutr; 27: 677-689

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 sci. 2004, 12: 227 – 234.

Bansal A.K. et Bilaspuri G. S., 2011, Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions

Castellini C., 2008, Semen production and management of rabbit bucks, 9th World Rabbit Congress – June 10-13, Verona – Italy

CASTELLINI C., LATTAIOLI P., BERNARDINI M., DAL BOSCO A. 2000. Effect of dietary α -tocopheryl acetate and ascorbic acid on rabbit semen storage at 5 °C. *Theriogenology*, 54, 523-533.

Références bibliographiques

- Castellini C., Cardinali R., Lattaioli P., Dal Bosco A., 2005**, Comparison of different dietary sources of PUFA n-3 on semen characteristics of rabbit bucks. *Reprod. Dom. Animal.* (Abstr. 386), 180.
- Catapano A.L., 1997**, Antioxidant effect of flavonoids, *Angiology* **48**, 39-44
- Catry, B; Van Duijkeren, E; Pomba, MC; Greko, C; Moreno, MA; Pyorala, S and Torneke, K 2010**. Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals, epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiol. Infect.*, 138: 626-644.
- Chaou T., 2006**. Etude des paramètres zootechniques et génétiques d'une lignée paternelle sélectionnée mise en place en G0 et sa descendance, du lapin local « *Oryctolagus Cuniculus* ». Mémoire de Magistère, Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, 102p.
- Chabory E, 2009**, Caractérisation fonctionnelle de la glutathion peroxydase 5 murine. Thèse : Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de doctorat.
- Chen CH, Weng M, Wu CH, Lin J. 2004**. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evid Based Complement Altern Med.* 1(2): 175-185
- Clément, H. 2009**. Guide des miels. In *Le traité rustica de l'apiculture*. Paris, Rustica, 528p.
- Codex Alimentarius, 2001**. Commission Standards, Codex Standards for Honey, (1981/ revised 1987/ revised 2001), FAO– Rome, 2001, 1-7.
- Colin M., Lebas F., 1996**. Rabbit meat production in the world. A proposal.
- Combs G.F. Jr, Bunk M.J., Lavorgna M.W. 1981**, Vitamin E and selenium important in chick diet, *Feedstuffs USA*, 1981, **53**: 19, p 20.
- Corpet D. E., Parnaud G, Tache S., Pierre F., 2003** le polyéthylène glycol, un puissant suppresseur du cancer colorectal, découvert en étudiant l'effet promoteur 26 , p :291–300.
- Decuadro-Hansen G., 2004**, La réfrigération et la congélation du sperme : expérience chez l'animal Chilled and frozen semen: the animal experience, *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 32 (2004) 887–893
- El-Nattat, WS; El-Sheshtawy, RI; El-Batawy, KA; Shahba, MI and El-Seadawy, IE 2016**. Preservability of buffalo bull semen in tris-citrate extender enriched with bee's honey. *J. Innov. Pharm. Biol. Sci.*, 3: 180-185.
- El-Sheshtawy RI, El-Nattat WS, Sabra HA, Ali AH. 2014**. Effect of honey solution on semen preservability of local breeds of cattle bulls. *Wld Appl Sci J.* 32(10): 2076-2078.
- England G.C.W., 1993**, Cryopreservation of dog semen: a review, *Journal of Reproduction and Fertility Supplements* 4, 243-255

Références bibliographiques

Fakhrildin MB, Alsaadi RA. 2014. Honey supplementation to semen freezing medium improves human sperm parameters post-thawing. *J FAM Reprod Health*; 8(1): 27-31.

Finzi A., 1990. Recherches pour la sélection de souches de lapins thermo tolérants. Options Méditerranéennes, Série A : séminaires méditerranéens numéro A-8.

Forthier M., 2010, La cryométrie en flux comme outil pour caractériser et évaluer le potentiel de fertilité des spermatozoïdes bovins, Thèse pour l'obtention du grade de maître en science. Faculté de médecine. Université Laval.

Foulkes J.A., 1977, The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa, *J Reprod Fertil*, 49:277-284.

Garrido, N., M. Meseguer, C. Simon, A. Pellicer and J. Remohi, 2004, "Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility." *Asian J Androl* 6(1): 59-65.

Gil L, Mascaró F, Mur P, Gale I, Silvia A, González N, et al. 2010. Freezing ram semen: the effect of combination of soya and rosemary essences as a freezing extender on post-thaw sperm motility. *Reprod Domest Anim.* 45: 91.

Godeas, C., F. Tramer, F. Micali, M. Soranzo, G. Sandri et E. Panfili, 1997. "Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa." *Biol Reprod* 57(6): 1502-8.

Halliwell, B., Gutteridge, J., 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press.

Holland, M. K., J. G. Alvarez and B. T. Storey (1982). "Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa." *Biol Reprod* 27(5): 1109-

HEGELIN M , ET THIRIET A, 2012, Atlas photographique de l'anatomie clinique des NAC (petits mammifères à l'exception du furet. Doctorat vétérinaire .faculté de médecine de Créteil .

Holt W.V., 2000, Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47–58

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

Jerez-Ebenspergera RA, Luñoa V, Olacireguia M. 2015. González N, Blasb I de, Gila L. Effect of pasteurized egg yolk and rosemary honey supplementation on quality of cryopreserved ram semen. *Small Rum Res*; 130: 153-156.

Références bibliographiques

- Kantor Z, Pitsi G, Thoen J. 1999.** Glass transition temperature of honey as a function of water content as determined by differential scanning calorimetry. *Agric Food Chem.* 47: 2327-2330.
- Kakuk T., Darnas A. 1973,** Biotin deficiency, *Magyar Allatorvosok Lapja*, 95: 9, 477-482.
- Larbier M., Leclercq B, 1992,** Nutrition et alimentation des volailles, Paris, France : ESTEM, 1992.352 p.
- Lanzafame F., 2009,** Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility, Vol 19. No 5. 638–659 *Reproductive BioMedicine Online*; www.rbmonline.com/Article/4182 on web 30 September 2009.
- Lausanne A.R.L., 2010,** Le Stress Oxydatif, Dr Méd. Dany Mercan Unilab dany.mercan@unilabs.com.
- Liu E, Kitajima SH, Wiese E, Reifenerg K, Morimoto M, Watanabe T et Fan J, 2007,** Re-Establishment of complement C6-Deficient rabbit colony by cryopreserved sperme transported from abroad
- Li Y., Huang T.T., Carlson E.J., Melov S., Ursell P.C., Olson J.L., Noble L.J., Yushimura M.P., Berger C., Chan P.H. et al., 1995,** Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase, *Nat, Genet* 11 376-381.
- Laren M.D., 2007,** Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier.
- Laren M.D., 2007,** Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier.
- Lebas F., 2011.** Cuniculture, biologie du lapin. www.cuniculture.info (accès le 27/12/2011).
- Lebas F., 2010.** Biologie du lapin. <http://www.cuniculture.info/Docs/indexbiol.htm>
- Lequet, L. 2010.** Du nectar a un miel de qualité : contrôles analytiques du miel et conseils pratiques a l'intention de l'apiculteur amateur. Thèse Med. Vét. Université Claude Bernard, Lyon, 195p
- Martin 1981 J.O.** U.S. 4, 268, 502 (Eli Lilly and Co.) May 19.**Manyi-Loh CE, Clarke AM, Ndip RN. 2011.** An overview of honey: therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *Afr J Microbiol Res.* 5: 844-852.
- Mapson, L.W., Goddard, D.R., 1951.** The reduction of glutathione by plant tissues. *Biochem J* 49, 592-601.
- Meryman HT. 1971.** Cryoprotective agents. *Cryobiology.* 8:173-183.
- Miles J. J. et Demasi D.F., 1986,** U.S. 4, 599, 363 (Lever Brothers Co.) July 8, made in Germany 44: p. 43-45
- Mohamed Mahmoud Moustafa kaniel, Ahmed Reda Mohamed, 2017.**Elkhawagah Effect of honey supplementation on Egyptian buffalo semen

Références bibliographiques

- Morena M., Martin-Mateo M., Cristol J.P. et Canaud B., 2002**, Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours (p201).
- Morera P., Kuzminsky G., Fausto A.M., 1996**, Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope,36 P (565-575).
- MOCE, 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. Valencia. July 2000. Vol A: 197-201.*
- Mocé E., Purdy P.H., et Grahama J.K., 2010**, Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. Published by Elsevier B.V.
- Najjar A, Rouatbi M et Ben Mrad M 2009** Le rythme de récolte affecte-t-il le spermogramme du lapin et la fertilité des lapines ? In Proc : 16^{èmes} journées scientifiques sur les résultats de la recherche agricole, 2 et 3 décembre 2009, Nabeul, Tunisia. 16 : 336-343
- Negre-Salvayre A. et Salvayre R., 2005**, Effet protecteur des acides gras contre les stress oxydatifs: Implication en physiopathologie vasculaire, OCL VOL. 12 N° 5-6.
- NIZZA A., Di Meo C., Taranto S., 2003**. Effect of collection rhythms and season on rabbit semen production report Dom Anim , 38 :436-439.
- Ogretmen F, Inanan BE. 2014**. Evaluation of cryoprotective effect of Turkish pine honey on common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Cryo Lett.* 35(5): 427-437.
- Olayemi FO, Adenigi DA, Oyeyemi MO. 2011**. Evaluation of sperm motility and viability in honey included egg yolk based extenders. *Glob Vet*; 7 (1): 19-21.
- Orsolich N, Basic I. Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. In: Singh VK, Govil JN, Arunachalam C, editors. 2007. Recent progress in medicinal plants. USA: Studium Press LLC, p. 55-113.**
- Pancera S.A, Luis H.M, Silva D.B., Watson Loh B, Itri R.C, Pessoa A .Jr D., Petri D.F.S, 2002**, The effect of poly(ethylene glycol) on the activity and structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase in solution p:291–300
- Partyka A., Ewa Łukaszewicz et Wojciech Niz'an'ski, 2012**, Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen, *Theriogenology* 77 (2012) 1497–1504.
- Peña A.I. , Linde-Forsberg C., 2000**, Effects of Equex, one- or two- steps dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 53, 859, 875.
- Pré J., 1991**, La lipoperoxydation, *Path Biol* 39, 716-736.
- Rall, T.W., Lehninger, A.L., 1952**, Glutathione reductase of animal tissues. *J Biol Chem* 194,119-130.

Références bibliographiques

Raphaël .B., Maud.B, Pierre.B,PierrickH, Catherine J L,GérardJ M,Elise M, René R, Luc J.J.R, 2004, Projet cryoyster: optimisation, standardisation et validation de la congélation de laitance d'huitre creuse *crassostrea gigas* a des fins de conservation et de diffusion génétique.

Rouvier R., 1990. Introduction, options méditerranéenne. SIHEAM Séries séminaires n° : 8 (78)..

Reimann J., 1974, Archiv d. Pharmacie, 307, 321u. 328.

Sergent O., Griffon B., Cillard P., Cillard J., 2000, Alcool et stress oxydatif, Pathol Biol 2001 ; 49 : 689-95, 2001 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS.

Sabbagh M., 1983. «Etude de la sexualité et de la reproduction du lapin domestique *Oryctolagus cuniculus* à des températures, le comportement alimentaire et fonctionnement thyroïdien et surrénalien en période d'adaptation au stress thermique » .thèse de doctorat. Université de Dakar Ecole Inter –état des Science Et médecine Vétérinaire .p12-50.

Sekido, R., Lovell-Badge, R. (2008) Erratum: Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific *Sox9* enhancer. *Nature* **456**, 824 .

Smyth H.F.,1947, The toxicity of high molecular weight Polyethylene glycols, J. Am Pharm. Assoc. Sci. Ed. 36, p 157-160.

Stănescu P. M. et Alin I. B., 2010, Comparative Studies of ISSN 1843-5270; Electronic ISSN 1843-5378.

Surai P.F., 1992, Vitamin E feeding of poultry males, In : Proceedings of the 19th World's Poultry Congress, Amsterdam, Netherlands, 19-24,September 1992, Beekbergen, Netherlands: World's Poultry Science Association, volume 1, p 57.

Smyth H.F. J., 1950,Am. Pharm. Assoc. Sci.Ed. 39 p 349

Stahl, W., Sies, H., 1997, Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*, 1997, vol 46 (2), p S14-S18.

Tan, K.H., Meyer, D.J., Coles, B., Ketterer, B., 1986, Thymine hydroperoxide, a substrate for rat Se-dependent glutathione peroxidase and glutathione transferase isoenzymes. *FEBS Lett* 207, 231-233.

THEAU-CLEMENT, 2005.Advances in the control of rabbit reproduction : the doe, 9th annual conference of the european society for domestic animal reproduction . 1-3 september 2005 , murcia (spain)

Theau-Clement M., Sanchez A., Duzert R., Saleil G., Brun G.M., 2009, Etudes de factures de variation de la production spermatique chez le lapin

Thierry JOLY , Michèle THEAU-CLÉMENT(*)

ISARA-FESIA, 31 place Bellecour - 69288 Lyon Cédex 02

* INRA-Station d'Amélioration Génétique des Animaux, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cédex

Références bibliographiques

Turney-M. E. 1981, U.S. 4, 280, 994 (Union Carbide Corp.) July 28,

Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, et Flohe L. ,1999, Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285: 1393-1396,

Wang H. J., Pan Y. X., Wang W.Z., Zucker I. H., Wang W., 2009, NADPH Oxidas Derived Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Modulates the Exercise Pressor Reflex. *J Appl Physiol.* Jun 4.

Wei, Y.H., et al., 1998, Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and agedependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann N Y Acad Sci.*,**854**: p. 155-70.

Zoheir, KMA; Harisa, GI; Abo-Salem, OM and Ahmad, SF. 2015.Honey bee is a potential antioxidant against cyclophosphamide-induced genotoxicity in albino male mice. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 28: 973-981.